

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

世界华人消化杂志®

WORLD CHINESE JOURNAL OF DIGESTOLOGY

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

2012 年 7 月 18 日 第 20 卷 第 20 期 (Volume 20 Number 20)



20/2012

ISSN 1009-3079



9 771009 307056

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

世界华人消化杂志®

编辑委员会

2012-01-01/2014-12-31

wcjd@wjgnet.com www.wjgnet.com

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
杨思凤教授
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
陈国忠主任医师
陈洪副教授
陈其奎教授
陈卫昌教授
陈胎胜教授
程斌教授
迟宝荣教授
崔立红教授
丁士刚教授
董蕾教授
杜雅菊主任医师
杜奕奇副教授
樊晓明教授
房静远教授
冯志杰主任医师
傅春彬主任医师
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
季国忠教授
江米足教授
姜春萌教授
姜慧卿教授
姜相君主任医师
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
陆伦根教授
马红主任医师
马欣主任医师
毛高平教授
孟庆华教授
倪润洲教授
欧希龙副教授
潘秀珍教授
朴云峰教授
秦成勇教授
任粉玉教授
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
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

徐可树教授
杨建民教授
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
张志坚教授
郑培永副教授
郑鹏远教授
郑素军副主任医师
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

白雪巍副主任医师
蔡开琳副教授
蔡三军主任医师
曹杰主任医师
陈光教授
陈海龙教授
陈积圣教授
陈进宏副主任医师
陈凇教授
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
崔亚甫教授
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

何晓顺教授
何裕隆教授
黄志勇教授
季加孚教授
莫卫东教授
姜波健教授
金山主任医师
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
李胜研究员
李涛副主任医师
李文岗教授
李旭副教授
李永翔教授
李志霞教授
李宗芳教授
梁力建教授
刘宝林教授
刘超教授
刘建教授
刘颖斌主任医师
陆云飞教授
禄韶英副教授
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
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
宋振顺教授
孙诚谊教授
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
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
赵刚副教授
智绪亭教授
周伟平教授
邹小明教授

消化感染病学

陈国凤主任医师
陈红松研究员
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

世界华人消化杂志®

编辑委员会

高润平教授
高泽立副教授
龚国忠教授
管世鹤副教授
胡国信主任医师
靳雪源主任医师
刘正稳教授
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
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
南极星教授
牛英才研究员
王富春教授
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
江建新副主任医师
李璦教授
刘宝瑞教授
刘炳亚研究员
刘平教授
刘云鹏教授
卢晓梅教授
沈克平主任医师
王阁教授
向德兵副教授
肖文华主任医师

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
赵卫主任医师

消化内镜及介入治疗学

郝俊鸣副主任医师
茅爱武教授
孙明军教授
万军教授
袁友红副教授

消化中西医结合学

唐文富副教授
王学美研究员
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
樊红教授
高国全教授
高英堂研究员
管冬元副教授
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
李增山副教授
刘克辛教授
刘森副教授
任超世研究员
任浩副教授
任晓峰副教授
台桂香教授
谭学瑞教授
田文静副教授
汪思应教授
王钦红教授
魏继福研究员
吴道澄教授

吴军研究员
吴俊华副教授
徐宁志研究员
许文燮教授
阴赧宏研究员
郁卫东副研究员
喻荣彬教授
周南进研究员
周素芳教授
周晓武副主任医师
竺亚斌研究员

消化病理学

陈云昭副教授
杜祥教授
邓昊副教授
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
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 ● 2012 年 7 月 18 日 第 20 卷 第 20 期 (总第388期)

述 评	1807 胃癌癌前病变的研究进展及防治对策 范尧夫, 魏睦新
基础 研究	1813 5-Fu对低氧下胃癌SGC7901细胞系中SP细胞比例及HIF-2 α 、ABCG2表达的影响 张小茜, 冯玉光, 吴美英, 朱芸, 白红霞, 王西艳 1819 18 α 甘草酸对CCl ₄ 诱导的肝纤维化大鼠氧化应激的影响 丁天鹏, 曲颖, 陆伦根, 施根林, 王若飞 1824 平滑肌特异性PGC-1 α 转基因小鼠抗急性结肠炎的效应及其机制 刘一笑, 陈腾飞, 王梦雨, 崔鑫, 唐寅, 黄薇, 张玲, 刘占举, 刘国庆
临 床 研 究	1832 MMP-9和TIMP-1在胃癌组织中的表达失衡及其与ZHX2的相关性 陈其军, 吕自力, 党裔武, 魏晶晶 1838 幽门螺杆菌对胃癌细胞中钙调蛋白基因启动子区去甲基化的诱导作用 周建奖, 王妍, 谢渊, 赵艳, 谷颖
文 献 综 述	1843 凋亡抑制蛋白家族在食管癌分子靶向治疗中的研究进展 唐鹏, 黄华 1848 Cajal间质细胞的研究进展 翁超, 袁琴, 范莹 1853 姜黄素衍生物EF24的抗肿瘤机制研究进展 刘海涛, 王逦逦, 刘连新
研 究 快 报	1858 沉香化气胶囊对糖尿病大鼠小肠ICC和肌间神经丛的影响 陈凤琴, 余跃, 薛丹, 王巧民 1863 五指山小型猪胰岛对糖尿病大鼠的治疗作用 蒋小峰, Thomas Linn, 向广阳, 王业增, 钱滔来, 曹良启, 杨学伟, 章乐虹, 陈德
临 床 经 验	1868 2006-2010年陕西省干部群体脂肪肝流行病学调查 李敏, 周健, 史丽萍, 张艾莉, 白智平, 刘元琳 1873 枯草杆菌肠球菌二联活菌胶囊对非酒精性脂肪性肝炎肠道菌群失调的干预作用 杨林辉, 郭华, 蔡俊, 蔡晓伟, 刘贵伦, 陈东风 1879 ADV初治耐药与LAM耐药者再耐药时HBV-RT区的变异特征 邵幼林, 张锁才, 柳龙根, 赵卫峰 1884 原发性胆汁性肝硬化114例 张立伟, 林连捷, 郑长青, 林艳, 张静洁, 周慧慧 1889 腹腔镜保胆取石术和息肉切除术临床分析53例 徐新保, 张辉, 张洪义, 刘承利, 何晓军, 肖梅, 张宏义, 冯志强 1895 多学科协作诊治模式下治疗不可切除结直肠癌67例 赵国刚, 冯富星, 运涛, 白雪巍 1900 WCX磁珠联合MALDI-TOF-MS技术在结直肠癌诊断中的应用 王秀丽, 高春芳, 范乃军

附 录	1906 《世界华人消化杂志》投稿须知 1911 2012年国内国际会议预告
志 谢	1912 志谢世界华人消化杂志编委
消 息	1812 《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) 1818 2011年度《世界华人消化杂志》发文情况 1831 WJG成功通过评审被PMC收录 1837 《世界华人消化杂志》被评为中国精品科技期刊 1852 《世界华人消化杂志》2011年开始不再收取审稿费 1857 《世界华人消化杂志》修回稿须知 1867 《世界华人消化杂志》性质、刊登内容及目标 1872 《世界华人消化杂志》外文字符标准 1878 中国科技信息研究所发布《世界华人消化杂志》影响因子0.694 1883 《世界华人消化杂志》入选《中国学术期刊评价研究报告-RCCSE权威、核心期刊排行榜与指南》 1888 《世界华人消化杂志》栏目设置 1899 《世界华人消化杂志》出版流程 1905 《世界华人消化杂志》正文要求
封面故事	《世界华人消化杂志》编委, 魏睦新, 教授, 210029, 江苏省南京市, 南京医科大学第一附属医院中医科
本期责任人	编务 周媛; 送审编辑 李军亮, 张姗姗; 组版编辑 闫晋利; 英文编辑 王天奇; 责任编辑 张姗姗; 形式规范审核编辑部主任 李军亮; 最终清样审核总编辑 马连生

 <p>Shijie Huaren Xiaohua Zazhi</p> <p>吴阶平 题写封面刊名 陈可冀 题写版权刊名 (旬刊)</p> <p>创 刊 1993-01-15 改 刊 1998-01-25 出 版 2012-07-18 原刊名 新消化病学杂志</p> <p>期 刊 名 称 世界华人消化杂志 主 管 单 位 山西省科学技术厅 主 办 单 位 太原消化病研治中心</p> <p>编 辑 世界华人消化杂志编辑委员会 030001, 山西省太原市双塔西街77号 电话: 0351-4078656 E-mail: wcjd@wjgnet.com http://www.wjgnet.com</p> <p>出 版 世界华人消化杂志编辑部 030001, 山西省太原市双塔西街77号 电话: 0351-4078656 E-mail: wcjd@wjgnet.com http://www.wjgnet.com</p>	<p>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, 福建医科大学附属医院协和医院消化内科 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</p> <p>编 辑 部 主 任 李军亮</p>	<p>印刷 北京科信印刷厂 发行 国内: 北京报刊发行局 国外: 中国国际图书贸易总公司 (100044, 北京市399信箱) 订购 全国各地邮电局</p> <p>《世界华人消化杂志》是一份同行评议性的旬刊, 是一份被《中国科技论文统计源期刊》和《中文核心期刊要目总览》收录的学术类期刊。《世界华人消化杂志》的英文摘要被美国《化学文摘》, 荷兰《医学文摘库/医学文摘》和俄罗斯《文摘杂志》收录。</p> <p>《世界华人消化杂志》正式开通了在线办公系统(http://www.baishideng.com/wcjd/ch/index.aspx), 所有办公流程一律可以在线进行, 包括投稿、审稿、编辑、审读, 以及作者、读者、编者之间的信息反馈交流。</p> <p>特别声明 本刊刊出的所有文章不代表本刊编辑部和本刊编委会的观点, 除非特别声明。本刊如有印装质量问题, 请向本刊编辑部调换。</p> <p>2012年版权归世界华人消化杂志所有</p>
--	--	--

World Chinese Journal of Digestology

July 2012 Contents in Brief Volume 20 Number 20

EDITORIAL	1807 Precancerous lesions of gastric cancer: Research progress and preventive strategies <i>Fan YF, Wei MX</i>
BASIC RESEARCH	<p>1813 Effect of 5-Fu on the ratio of SP cells and expression of HIF-2α and ABCG2 in human gastric cancer cell line SGC7901 under hypoxia <i>Zhang XQ, Feng YG, Wu MY, Zhu Y, Bai HX, Wang XY</i></p> <p>1819 18α-glycyrrhizin ameliorates oxidative stress in rats with CCl₄-induced liver fibrosis <i>Ding TP, Qu Y, Lu LG, Shi GL, Wang RF</i></p> <p>1824 Smooth muscle-specific overexpression of PGC-1α protects mice from acute colitis <i>Liu YX, Chen TF, Wang MY, Cui X, Tang Y, Huang W, Zhang L, Liu ZJ, Liu G</i></p>
CLINICAL RESEARCH	<p>1832 Correlation between MMP-9/TIMP-1 imbalance and ZHX2 expression in gastric carcinoma <i>Chen QJ, Lv ZL, Dang YW, Wei JJ</i></p> <p>1838 <i>Helicobacter pylori</i> induces demethylation of the Calmodulin gene promoter in gastric cancer cells <i>Zhou JJ, Wang Y, Xie Y, Zhao Y, Gu Y</i></p>
REVIEW	<p>1843 Progress in understanding the role of inhibitor of apoptosis proteins in molecular targeted therapy of esophageal cancer <i>Tang P, Huang H</i></p> <p>1848 Progress in research of interstitial cells of Cajal <i>Weng C, Yuan Q, Fan Y</i></p> <p>1853 Advances in understanding mechanisms underlying the antitumor activity of curcumin analogue EF24 <i>Liu HT, Wang LL, Liu LX</i></p>
RAPID COMMUNICATION	<p>1858 Effect of Chenxiang Huaqi Capsules on interstitial cells of Cajal and myenteric plexus in the intestine of diabetic rats <i>Chen FQ, Yu Y, Xue D, Wang QM</i></p> <p>1863 Treatment of diabetic rats using islets from a herd of outbred Wuzhishan miniature pigs <i>Jiang XF, Linn T, Xiang GY, Wang YZ, Qian TL, Cao LQ, Yang XW, Zhang LH, Chen D</i></p>
CLINICAL PRACTICE	<p>1868 An epidemiological investigation of the prevalence and risk factors for fatty liver in the cadre population in Shaanxi Province from 2006 to 2010 <i>Li M, Zhou J, Shi LP, Zhang AL, Bai ZP, Liu YL</i></p> <p>1873 Intervention effect of microbiological capsules containing <i>Bacillus subtilis</i> and <i>Enterococcus</i> on intestinal flora in patients with NASH <i>Yang LH, Guo H, Cai J, Cai XW, Liu GL, Chen DF</i></p> <p>1879 Analysis of mutations in the reverse transcriptase domain of HBV polymerase in adefovir-resistant HBV patients <i>Shao YL, Zhang SC, Liu LG, Zhao WF</i></p> <p>1884 Clinical features of primary biliary cirrhosis: An analysis of 114 cases <i>Zhang LW, Lin LJ, Zheng CQ, Lin Y, Zhang JJ, Zhou HH</i></p> <p>1889 Laparoscopic cholelithotomy and polypectomy of gallbladder polyps for cholelithiasis and/or cholecystic polyps: An analysis of 53 cases <i>Xu XB, Zhang H, Zhang HY, Liu CL, He XJ, Xiao M, Zhang HY, Feng ZQ</i></p> <p>1895 Management of unresectable colorectal cancer by multimodality therapy: An analysis of 67 cases <i>Zhao GG, Feng FX, Yun T, Bai XW</i></p>

	1900 Diagnosis of colorectal cancer by MALDI-TOF-MS combined with WCX magnetic beads <i>Wang XL, Gao CF, Fan NJ</i>
APPENDIX	1906 Instructions to authors of <i>World Chinese Journal of Digestology</i> 1911 Meeting events calendar in 2012
ACKNOWLEDGMENT	1912 Acknowledgments to reviewers of <i>World Chinese Journal of Digestology</i>
COVER	Editorial Board Member of <i>World Chinese Journal of Digestology</i> , Mu-Xin Wei, Professor, Department of Chinese Medicine, the First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210029, Jiangsu Province, China
RESPONSIBLE EDITORS FOR THIS ISSUE	Assistant Editor: <i>Yuan Zhou</i> Review Editor: <i>Jun-Liang Li, Shan-Shan Zhang</i> Electronic Page Editor: <i>Jin-Li Yan</i> English Language Editor: <i>Tian-Qi Wang</i> Editor-in-Charge: <i>Shan-Shan Zhang</i> Proof Editor: <i>Jun-Liang Li</i> Layout Editor: <i>Lian-Sheng Ma</i>

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

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

Founded on January 15, 1993
Renamed on January 25, 1998
Publication date July 18, 2012

NAME OF JOURNAL
World Chinese Journal of Digestology

RESPONSIBLE INSTITUTION
Department of Science and Technology
of Shanxi Province

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

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

PRINTING
Beijing Kexin Printing House

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

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

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, Hangzhou 310006, Zhejiang Province, China

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

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

SCIENCE EDITORS

Director: Jun-Liang Li

SUBSCRIPTION

RMB 68 Yuan for each issue
RMB 2448 Yuan for one year

CSSN

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

COPYRIGHT

© 2012 Published by *World Chinese Journal of Digestology (WCJD)*. All rights reserved; no part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise without the prior permission of *WCJD*. Authors are required to grant *WCJD* an exclusive licence to publish.

SPECIAL STATEMENT

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

INSTRUCTIONS TO AUTHORS

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

Copyright © 2012 by Editorial Department of *World Chinese Journal of Digestology*

胃癌癌前病变的研究进展及防治对策

范尧夫, 魏睦新

范尧夫, 魏睦新, 南京医科大学第一附属医院中医科 江苏省南京市 210029

魏睦新, 教授, 医学博士, 博士生导师, 主要从事消化病中西医结合基础与临床研究。

江苏省中医药管理局基金资助项目, No. JD11040

作者贡献分布: 魏睦新策划本课题组的实验研究设计、部分核心内容的撰写与全文审定; 范尧夫负责资料收集、分析研究及文章撰写。

通讯作者: 魏睦新, 教授, 210029, 江苏省南京市广州路300号, 南京医科大学第一附属医院中医科. weimuxin@njmu.edu.cn
电话: 025-83718836-6267

收稿日期: 2012-04-12 修回日期: 2012-05-31

接受日期: 2012-06-28 在线出版日期: 2012-07-18

Precancerous lesions of gastric cancer: Research progress and preventive strategies

Yao-Fu Fan, Mu-Xin Wei

Yao-Fu Fan, Mu-Xin Wei, Department of Chinese Medicine, the First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210029, Jiangsu Province, China

Supported by: the Program of Jiangsu Provincial Administration of Traditional Chinese Medicine, No. JD11040

Correspondence to: Mu-Xin Wei, Professor, Department of Chinese Medicine, the First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, 300 Guangzhou Road, Nanjing 210029, Jiangsu Province, China. weimuxin@njmu.edu.cn

Received: 2012-04-12 Revised: 2012-05-31

Accepted: 2012-06-28 Published online: 2012-07-18

Abstract

The development of precancerous lesions of gastric cancer is a critical stage of the evolution of gastric cancer. Early detection and intervention for these lesions are of considerable significance in reducing the morbidity of gastric cancer. The development of precancerous lesions of gastric cancer is controlled by multiple factors such as *Helicobacter pylori* infection, DNA methylation, microsatellite instability, and *p53* status. Because of high malignancy and unclear etiology of gastric cancer, there are certain difficulties in carrying out successful primary prevention. This review aims to review the recent advances in understanding the pathogenesis of and preventive strategies for gastric precancerous lesions.

Key Words: Gastric cancer; Precancerous lesions of

gastric cancer; Intraepithelial neoplasia

Fan YF, Wei MX. Precancerous lesions of gastric cancer: Research progress and preventive strategies. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2012; 20(20): 1807-1812

摘要

胃癌癌前病变(precancerous lesions of gastric cancer, PLGC)是胃癌发生和发展过程中的一个重要阶段, 早期发现和干预是防控胃癌的重要手段。在PLGC的形成过程中, DNA甲基化、微卫星不稳定性、*p53*以及幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *H. pylori*)感染等占有重要位置。鉴于胃癌的高度恶性, 且其病因发病机制尚未完全阐明, 实施针对病因的一级预防比较困难。本文就目前PLGC发病机制、防治对策等问题进行总结, 以便于临床医师对胃癌前病变进行密切的监测及有效的干预。

关键词: 胃癌; 癌前病变; 上皮内瘤变

范尧夫, 魏睦新. 胃癌癌前病变的研究进展及防治对策. *世界华人消化杂志* 2012; 20(20): 1807-1812

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/1807.asp>

0 引言

目前全球范围内, 消化系肿瘤的发病率及死亡率均居高不下, 其中胃癌处于我国各类恶性肿瘤死亡率的首位, 严重威胁着人类的健康^[1,2]。胃癌是我国最常见的癌症之一, 流行病学调查发现进展期胃癌5年生存率不足20%, 而早期胃癌及手术后5年生存率高达90%以上^[3]。胃癌的发病机制尚不明确, 一般认为胃癌的发生常在癌变之前经历相当漫长的演变过程, 是一多步骤、逐渐进展的过程, 众多基因及分子改变的累积与这一演变过程密切相关^[4]。1988年Correa等^[5]提出胃癌的发生模式为: “正常胃黏膜-慢性浅表性胃炎-慢性萎缩性胃炎-小肠型肠上皮化生-大肠型肠上皮化生-异型增生(中重度)-胃癌(肠型)”, 这是目前较为认可的胃癌进展模式。由于胃癌发生的分子机制目前尚不清楚, 所以胃癌癌前病变与胃癌的发生关系成了目前的

■背景资料

在消化系统肿瘤发生率居高不下的情况下, 胃癌癌前病变(PLGC)与胃癌的发生关系成了目前研究的热点。PLGC是胃癌发生和发展过程中的一个重要阶段, 早期发现和干预是防控胃癌的重要手段。

■同行评议者

沈克平, 主任医师, 上海中医药大学附属龙华医院

■ 研发前沿

在PLGC的形成过程中, DNA甲基化、微卫星不稳定性、*p53*以及幽门螺杆菌(*H. pylori*)感染等占有重要位置。人们试图寻找好的诊断方法来及早发现癌前病变, 通过有效措施对其进行干预治疗以阻断其进一步发展, 进而有效降低胃癌发生率。

研究热点。人们试图寻找好的诊断方法来及早发现癌前病变, 并通过对其干预治疗来阻断胃癌发生。所以及早发现癌前病变, 阻断其进一步发展, 可以有效降低胃癌发生率。近年来, PLGC在基础研究和临床治疗中均取得了长足的发展。本文从PLGC发生及其癌变的机制、中西医防治对策等方面作一述评。

1 胃癌癌前病变与胃癌的关系

胃癌前期变化包括癌前状态和癌前病变两个方面。癌前状态为临床概念, 指胃癌前期疾病, 如慢性萎缩性胃炎(chronic atrophic gastritis, CAG)、胃溃疡、胃息肉、术后残胃、恶性贫血等, 目前疾病研究中以幽门螺旋杆菌(*Helicobacter pylori*, *H. pylori*)感染最受重视。而癌前病变则为病理概念, 指胃黏膜及腺上皮的某种病变, 可能转变成胃癌, 包括肠上皮化生、不典型增生或异型增生。2000年WHO公布的新版消化系统肿瘤病理学和遗传学分类中^[6], 将上皮内瘤变(intraepithelial neoplasia, IN)和肠化生(简称肠化, intestinal metaplasia, IM)视为胃癌的癌前病变(precancerous lesion of gastric cancer, PLGC)^[7]。一般认为, 胃黏膜不完全性肠化生、中重度不典型增生, 具有较明显的癌变倾向, 需要进行积极的治疗。

1.1 胃黏膜上皮内瘤变与胃癌 2000年国际癌症研究机构(international agency for research on cancer, IARC)对胃肠道癌前病变和早期胃癌的诊断标准作了一些规定, 首次将IN的定义引入到消化系统肿瘤中, 建议用IN取代“异型增生”、“不典型增生”和“原位癌”^[6]。胃黏膜上皮内瘤变(gastric intraepithelial neoplasia, GIN)是指胃黏膜上皮结构和细胞学上的异常。结构异常表现为上皮排列紊乱和细胞极性丧失; 细胞学异常表现为细胞核不规则、深染, 核质比例增高和核分裂活性增加等。WHO推荐将上皮内瘤变分为2级, 即低级别与高级别上皮内瘤变(low-grade and high-grade intraepithelial neoplasia), LGIN相当于轻度和中度异型增生, HGIN相当于重度异型增生和原位癌。进行胃镜活检时应用上皮内瘤变这一名称, 并不排斥同时存在癌。Misraji等^[8]研究显示一些活检标本诊断为HGIN或重度异型增生, 在3 mo内发现浸润性癌, 表明最初活检时已经存在癌。

GIN由于其既可以发生在胃固有黏膜腺体上皮, 也可以发生在肠化生的腺体上皮, 故有

胃型和肠型之分^[9]。荷兰的一次大规模队列研究结果显示, CAG、IM、LGIN、HGIN患者最终发展为胃癌分别是0.10%、0.25%、0.60%、6.00%, 且PLGC的严重程度直接关系到患者的预后^[10]。我国一项针对GIN的调查显示^[11], 轻、中、重度GIN癌变率分别为1.7%、9.8%和42.1%。阮洪军等^[12]回顾性分析显示28例术前病理诊断HGIN的患者中术后仅4例维持HGIN的诊断, 其余24例均为胃癌, 提示胃镜活检胃黏膜病理诊断为HGIN的患者在大部分情况下同时已经存在癌变。国外文献中显示HGIN到确诊为胃癌平均4-48 mo, 而从LGIN进展为胃癌的平均时间为10-48 mo^[13,14]。同时研究表明LGIN患者38%-75%可以逆转为正常胃黏膜, 19%-50%持续存在, 而HGIN患者只有不到16%可以消退, 持续存在者占14%-58%^[15,16]。

临床中我们发现大部分GIN属于低级别, 在经过适当对症治疗之后还是可以逆转的。虽然LGIN的癌变率并不高, 但是患者仍然需要定期复查和积极治疗。对于HGIN在短期内发生癌变的可能性较高, 所以临床上多建议行内镜下黏膜切除。

1.2 胃黏膜肠上皮化生与胃癌 IM是指胃黏膜固有腺体在病理情况下被肠腺样腺体所替代, 当受到刺激时出现杯状细胞和吸收细胞^[17]。根据IM黏膜组织学变化的不同, 可将IM分为3种亚型: 完全小肠型(I型)、不完全小肠型(II型)及不完全大肠型^[18]。根据研究证实, 不完全性IM发生胃癌的危险性远远大于完全性IM。

流行病学调查发现, 胃黏膜肠化生具有高致癌风险, 因此被视作胃癌前病变。在我国进行的一项调查显示, 胃癌高发省份IM的发生率要比低发省份高得多^[19]。日本研究人员在进行评估PLGC与胃癌关系时发现IM是肠型胃癌发生的唯一条件^[20], 由IM发展为胃癌的相对危险度是6.4(95%CI)。一项对PLGC的长期研究指出, *H. pylori*、重度CAG、IM是胃癌的高发因素^[21]。因此IM的逆转治疗的成效对于降低胃癌的发生率有着实质性的意义。

1.3 幽门螺杆菌与胃癌 自从Marshall成功培养和分离出*H. pylori*以来, 大量文献报道证实, *H. pylori*感染是胃癌发展过程中的重要因素^[22]。WHO已将*H. pylori*列为第1类致癌危险因子^[23]。*H. pylori*感染可引起胃黏膜上皮细胞增殖与凋亡失衡、调控基因异常、诱导氧化应激、上调诱导型一氧化氮合酶、环氧合酶、端粒酶等相关基因的

表达, 最终导致PLGC和胃癌. 因此, 清除*H. pylori*可以有效阻断PLGC的进程、恢复胃黏膜细胞的分子生物学行为, 降低胃癌发生率.

赖铭裕等^[24]在322例*H. pylori*感染胃黏膜活检标本中发现不典型增生占有率为11.5%, 显著高于无感染组, 提示*H. pylori*感染与胃癌前病变有关, 从而产生胃癌的机会亦增加. 李红霞^[25]从慢性非萎缩性胃炎, 慢性萎缩性胃炎伴肠化生、异型增生的发展过程中, *H. pylori*的感染率逐渐增高; 研究结果还显示, P53蛋白在慢性非萎缩性胃炎炎组、肠化生、异型增生和胃癌中的*H. pylori*(+)组其表达率要高于其*H. pylori*(-)组. Schneller等^[26]报道约70%*H. pylori*感染者可以检测到cag致病岛(*CagA*)基因, *CagA*基因阳性者胃窦黏膜肠化生的几率增高, *CagA*蛋白进入细胞, 诱导细胞凋亡, 持续的细胞凋亡最后导致胃上皮细胞的过度增殖和DNA合成增加, 最后可能导致胃黏膜萎缩、肠化生, 恶性转化.

2 胃癌癌前病变的机制

由于PLGC处于不同阶段发生癌变的几率各不相同, 所以内镜复查监测就显得尤为重要. 但是我国受到经济水平和医疗环境的限制, 现阶段将胃镜作为普查项目无法施行, 所以对PLGC的癌变机制研究, 争取发现灵敏度较高的标志物是目前研究的重点. 近几年来国内外学者深入到PLGC的分子生物学领域, 对原癌基因、癌基因及其产物、抑癌基因、凋亡调节基因、DNA修复基因和端粒酶的研究表明了各种致癌因素可能以协同或序贯的方式引起细胞非致死的DNA损害是肿瘤发生的中心环节^[27]. 目前在PLGC的癌变过程中, 研究机制主要集中在以下几个方面.

2.1 DNA甲基化与胃癌癌前病变 DNA甲基化是一种重要的遗传学表达机制, 是对DNA的一种化学修饰, 在维持染色体结构、X染色体失活、基因印记及胚胎发育、细胞分化、肿瘤发生等方面均起重要作用^[28]. 国内研究发现胃癌组织中*c-myc*和*c-Ha-ras*基因甲基化水平降低, *c-Ha-ras*低甲基化是胃腺细胞早期癌变的一个重要遗传学事件^[29]. 国外研究中发现CDH1的甲基化似乎是伴*H. pylori*感染的慢性胃炎的早期事件, MLH1甲基化则发生于晚期伴随肠上皮化生的病变中^[30]. 王贺玲等^[31]对与细胞周期及细胞凋亡有关的4组基因进行研究, 结果显示一个癌组织中出现多个基因及其启动子甲基化的现象, 说

明了甲基化在肿瘤发生中协调出现. 越来越多的研究证实DNA甲基化可考虑作为检测PLGC标本中的肿瘤细胞, 甚至对血液中肿瘤细胞的检测、预测对化疗药物的敏感性及全面治疗结果的评价都是一个较好的指标.

2.2 微卫星不稳定性与胃癌癌前病变 微卫星不稳定性(microsatellite instability, MSI)系MMR基因突变及其功能异常造成DNA频发复制错误(RER)并不断积累而产生, 细胞的微卫星(MS)DNA序列发生改变, 失去正常生理调控功能, 引起细胞的增生及分化异常, 从而参与肿瘤发生. MSI是错配修复基因缺陷的重要标记. Hasuo等^[32]研究发现早期胃癌行内镜下切除术后, MSI的检测可作为评判肿瘤复发的标志. Hamamoto等^[33]通过9个微卫星位点的研究, 结果显示胃癌组织中MSI阳性率为46.7%, 癌旁肠化组织MSI阳性率为26.7%. 李异玲等^[34]研究结果表明: MSI在萎缩性胃炎及肠上皮化生等癌前期病变阶段就开始出现, 并且其在癌前期病变的表达阳性率与胃癌比有显著差异($P<0.05$), 说明MSI是胃癌发生的早期事件之一. 以上的研究表明MSI的检测对筛选胃癌相关的抑癌基因提供了一个很好的手段, 检测MSI有可能成为胃癌早期诊断以及判断预后的有效手段.

2.3 抑癌基因p53与胃癌癌前病变 抑癌基因p53是迄今发现与人类肿瘤相关性最高的抑癌基因, 定位于17号染色体短臂上, 野生型p53基因可因突变转变成突变型p53基因, 突变型p53丧失其正常功能, 且部分突变型p53获得促增殖、转化致癌潜能, 并能抑制细胞凋亡. 国外报道p53抑癌基因异常是肠型胃癌发生的早期事件, 其表达为早期胃癌的重要诊断参考指标. 赵松等^[35]的结果显示从正常胃黏膜、囊性扩张腺体、轻、中度不典型增生、大肠型化生、重度不典型增生至胃癌, P53表达率呈依次上升趋势, 其中重度不典型增生组与胃癌组该基因表达率差异无统计学意义($P>0.05$), 而与正常胃黏膜组间差异显著($P<0.001$). 最近研究表明p16基因蛋白常表达对胃癌的发生发展、恶变程度、淋巴结转移预后有密切关系.

2.4 端粒、端粒酶与胃癌癌前病变 端粒是一种天然线状染色体的末端, 端粒酶是由蛋白质和RNA构成的核蛋白, 其功能是合成染色体末端的端粒. 端粒可维持染色体结构的完整性, 防止染色体结构在复制时丢失及防止其被核酸酶降解. 在细胞恶变时, 端粒酶被激活, 催化端粒延长, 使

■ 相关报道

魏睦新等课题组运用中医论治的原理, 结合胃肠道细胞生物学、现代中药药理以及内镜病理, 摸索出了一系列治疗方案, 取得了很好的临床逆转疗效.

■创新盘点

本文就目前胃癌癌前病变发病机制、防治对策等问题进行总结,以便于临床医师对胃癌前病变进行密切的监测及有效的干预。

癌细胞无限增殖。徐萍等^[36]研究显示:胃癌组织端粒酶活性表达阳性率为91%,胃癌前病变组织端粒酶活性表达阳性率为56%,正常胃组织中无端粒酶活性表达,胃癌组与正常组端粒酶活性表达阳性率有显著差异($P<0.001$)。由于正常组织中检测不到端粒酶,所以端粒酶可以作为区别正常、良性增生及癌细胞的一个重要指标。

3 胃癌癌前病变中西医防治对策

PLGC的逆转消失是预防胃癌发生的有效措施。依据胚胎学发生行为,在特定的条件下,组织萎缩或化生具有潜在的可逆性。那么PLGC是否也具有逆转性呢?答案肯定与否对于我们的治疗有着至关重要的意义。如果PLGC可以逆转,就可以明显降低胃癌的发生率;若PLGC不具有可逆性,那以后我们对于PLGC的研究方向就只能转为预防。流行病学调查发现PLGC通过合理的用药之后完全可以逆转为正常胃黏膜细胞。从现阶段中西医防治对策来看,主要分为以下几个方面:

3.1 根除幽门螺杆菌 由于*H. pylori*的存在可以诱导CAG、IM、GIN的发生,加速PLGC癌变的速度,所以根除*H. pylori*对于逆转PLGC起到了关键的作用。Lee等^[37]通过动物实验证明,应用奥美拉唑、甲硝唑和克拉霉素根除*H. pylori*,可显著减轻GIN程度,防止由低级别进展为HGIN。Mabe等^[38]随访北海道4 133例患者发现早期根治*H. pylori*的患者胃癌发病率(0.24%)明显低于根除*H. pylori*失败的患者(1.39%)。

3.2 肿瘤分化诱导剂 维甲类化合物是目前研究较深入的肿瘤分化诱导剂,可抑制多种组织器官的化学诱生癌,抑制人胃癌细胞株的生长。动物实验发现维甲酸和丁酸钠对大鼠实验性胃癌前病变有部分逆转及阻断作用^[39]。临床研究亦证明,应用维甲类化合物维胺酯和维安酸治疗PLGC,有效率达70.0%-89.3%。因此肿瘤分化诱导剂可以有效阻止PLGC发生癌变或使其逆转为正常,为胃癌二级预防的重要手段。

3.3 抗氧化剂 当胃黏膜发生萎缩时候,胃酸分泌会明显减少,胃内pH环境的改变有利于内源性致癌物质的生成,如果能够及时补充抗氧化剂可能对于PLGC逆转有一定的意义。有研究发现长期补充抗氧化剂、维生素、叶酸和胡萝卜素对预防和阻断胃黏膜上皮内瘤变进展有一定作用^[40]。周连鸿等报道叶酸对慢性萎缩性胃炎伴异型增生有改善作用,其作用主要是通过提高

DNA总甲基化水平来实现。Lashner等发现补充叶酸可使恶性贫血患者的胃黏膜巨细胞异型增生消失。

3.4 中医药治疗 中医药在肿瘤治疗方面的作用越来越受到关注,不论是其对癌前疾病的抑制作用,还是对机体免疫力的提高,都已成为中药抗肿瘤机制的研究热点^[41]。目前研究表明许多中药和复方具有保护黏膜,改善胃黏膜血液循环,增强胃黏膜上皮细胞的再生和修复功能,可以有效逆转PLGC的发生。魏睦新教授领导的课题组运用中医论治的原理,结合胃肠道细胞生物学、现代中药药理以及内窥镜病理,摸索出了一系列治疗方案,取得了很好的临床逆转疗效^[42-44]。吕林懋等^[45]报道芪莲舒痞汤治疗慢性萎缩性胃炎癌前病变56例,从内镜及病理检查结果证明总有效率89.30%。高绍芳等^[46]运用化浊解毒方(茵陈、藿香、佩兰、茯苓、黄连、全蝎、白花蛇舌草、半边莲、半枝莲)能抑制PLGC大鼠胃黏膜癌基因CyclinD1 mRNA的表达,激活胃黏膜抑癌基因PTEN mRNA的表达,从而达到逆转胃癌前病变,防止其向胃癌发展的效果。邱卫东^[47]采用温胃健脾汤联合隔姜灸治疗PLGC,结果治疗组总有效率88.9%,对照组总有效率69.4%,2组比较有统计学意义($P<0.05$)。中医药对于PLGC的治疗遵循“治未病”的理念,该方法对于PLGC获效的机制可能与中药的多靶点调控作用有关,一定程度地纠正胃黏膜细胞增殖与凋亡的失衡状态,使细胞在正常范围内有效增殖,使得具有恶性转化潜能的胃黏膜细胞向良性表型转化。

3.5 内镜干预治疗 早期胃癌内镜下治疗已能达到治愈,但PLGC的内镜下干预治疗尚处于探索阶段。一般认为单纯的IM及LGIN不需要内镜处理,而HGIN可以通过内镜治疗而逆转。褚衍六等^[48]在临床中发现窄带成像技术有助于提高活检的准确率,更能准确的发现PLGC。刘思德等^[49]采用针形电刀进行黏膜下整片切除术治疗GIN 5例,6 mo后内镜复查见病变部残基形成瘢痕,病理检查未见病变残留,完整切除率100%。叶国良等^[50]认为胃上皮内瘤变行内镜黏膜下剥离术治疗内镜下有明确病灶的上皮内瘤变可及时发现早期胃癌,并有效预防胃癌的发生、发展。

4 结论

目前对于PLGC的发生、癌变机制及其逆转治

疗的研究已经取得显著进展, 随着细胞分子生物学的不断发展, 在基因和分子层面进一步探寻PLGC发病及癌变机制, 才能使逆转治疗得到突破性进展. 同时继续研究、寻找有效的治疗CAG及促进IM、GIN逆转的新药物和中西医结合治疗最佳方案, 服务于胃癌的早期筛查、发现和早期干预.

5 参考文献

- Jemal A, Siegel R, Xu J, Ward E. Cancer statistics, 2010. *CA Cancer J Clin* 2010; 60: 277-300
- 李连弟, 张思维, 鲁凤珠, 牧人, 孙秀娣, 皇甫小梅, 孙杰, 周有尚, 夏毅, 戴旭东, 饶克勤, 陈育德, 孙爱明, 薛志福. 中国恶性肿瘤死亡谱及分类构成特征研究. *中华肿瘤杂志* 1997; 19: 323-328
- Yamamoto H, Kita H. Endoscopic therapy of early gastric cancer. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2005; 19: 909-926
- Correa P. A human model of gastric carcinogenesis. *Cancer Res* 1988; 48: 3554-3560
- Correa P, Haenszel W, Cuello C, Tannenbaum S, Archer M. A model for gastric cancer epidemiology. *Lancet* 1975; 2: 58-60
- Hamilton SR, Aaltonen LA. World Health Organization classification of tumours, Pathology and genetics of tumours of digestive system. Lyon: IARC Press, 2000
- Gutierrez-Gonzalez L, Graham TA, Rodriguez-Justo M, Leedham SJ, Novelli MR, Gay LJ, Ventayol-Garcia T, Green A, Mitchell I, Stoker DL, Preston SL, Bamba S, Yamada E, Kishi Y, Harrison R, Jankowski JA, Wright NA, McDonald SA. The clonal origins of dysplasia from intestinal metaplasia in the human stomach. *Gastroenterology* 2011; 140: 1251-1260. e1-e6
- Misraji J, Lauwers GY. Gastric epithelial dysplasia. *Semin Diagn Pathol* 2002; 19: 20-30
- 吕宾. 胃上皮内瘤变的演变和逆转治疗. *胃肠病学* 2011; 16: 577-579
- de Vries AC, van Grieken NC, Looman CW, Casparie MK, de Vries E, Meijer GA, Kuipers EJ. Gastric cancer risk in patients with premalignant gastric lesions: a nationwide cohort study in the Netherlands. *Gastroenterology* 2008; 134: 945-952
- 张弘, 王明涛, 王晓英, 李雪松, 张博, 姜世满. 胃黏膜上皮细胞异型增生的胃镜随访及病理分析. *中国医师进修杂志* 2008; 31: 9-11
- 阮洪军. 胃黏膜高级别上皮内瘤变46例分析. *全科医学临床与教育* 2009; 7: 430-431
- Kokkola A, Haapiainen R, Laxén F, Puolakkainen P, Kivilaakso E, Virtamo J, Sipponen P. Risk of gastric carcinoma in patients with mucosal dysplasia associated with atrophic gastritis: a follow up study. *J Clin Pathol* 1996; 49: 979-984
- Yamada H, Ikegami M, Shimoda T, Takagi N, Maruyama M. Long-term follow-up study of gastric adenoma/dysplasia. *Endoscopy* 2004; 36: 390-396
- Bearzi I, Brancorsini D, Santinelli A, Rezai B, Mannello B, Ranaldi R. Gastric dysplasia: a ten-year follow-up study. *Pathol Res Pract* 1994; 190: 61-68
- Lansdown M, Quirke P, Dixon MF, Axon AT, Johnston D. High grade dysplasia of the gastric mucosa: a marker for gastric carcinoma. *Gut* 1990; 31: 977-983
- 吴燕敏, 魏睦新. 胃黏膜肠化生病因及逆转性研究进展. *中国中西医结合消化杂志* 2010; 18: 62-65
- Morgan R, Adam A. Use of metallic stents and balloons in the esophagus and gastrointestinal tract. *J Vasc Interv Radiol* 2001; 12: 283-297
- You WC, Zhang L, Gail MH, Li JY, Chang YS, Blot WJ, Zhao CL, Liu WD, Li HQ, Ma JL, Hu YR, Bravo JC, Correa P, Xu GW, Fraumeni JF. Precancerous lesions in two counties of China with contrasting gastric cancer risk. *Int J Epidemiol* 1998; 27: 945-948
- Shimoyama T, Fukuda S, Tanaka M, Nakaji S, Munakata A. Evaluation of the applicability of the gastric carcinoma risk index for intestinal type cancer in Japanese patients infected with *Helicobacter pylori*. *Virchows Arch* 2000; 436: 585-587
- Sakaki N, Kozawa H, Egawa N, Tu Y, Sanaka M. Ten-year prospective follow-up study on the relationship between *Helicobacter pylori* infection and progression of atrophic gastritis, particularly assessed by endoscopic findings. *Aliment Pharmacol Ther* 2002; 16 Suppl 2: 198-203
- 王平, 魏睦新. 胃癌前病变的研究进展及中西医结合防治现状. *中国中西医结合消化杂志* 2010; 18: 341-344
- Leung WK, Lin SR, Ching JY, To KF, Ng EK, Chan FK, Lau JY, Sung JJ. Factors predicting progression of gastric intestinal metaplasia: results of a randomised trial on *Helicobacter pylori* eradication. *Gut* 2004; 53: 1244-1249
- 赖铭裕, 陶霖. 幽门螺杆菌感染与胃黏膜上皮不典型增生的关系. *疾病监测* 2005; 20: 545-546, 554
- 李红霞. HP感染与胃癌和癌前病变中P53蛋白表达关系. *中国社区医师* 2012; 14: 275-276
- Schneller J, Gupta R, Mustafa J, Villanueva R, Straus EW, Raffanelli RD. *Helicobacter pylori* infection is associated with a high incidence of intestinal metaplasia in the gastric mucosa of patients at inner-city hospitals in New York. *Dig Dis Sci* 2006; 51: 1801-1809
- 杜中红, 魏晓萍, 惠起源. 胃癌前病变癌变机制及筛查研究进展. *现代肿瘤医学* 2010; 18: 814-816
- Li Y, Tollefsbol TO. Impact on DNA methylation in cancer prevention and therapy by bioactive dietary components. *Curr Med Chem* 2010; 17: 2141-2151
- Luo J, Li YN, Wang F, Zhang WM, Geng X. S-adenosylmethionine inhibits the growth of cancer cells by reversing the hypomethylation status of c-myc and H-ras in human gastric cancer and colon cancer. *Int J Biol Sci* 2010; 6: 784-795
- Perri F, Cotugno R, Piepoli A, Merla A, Quitadamo M, Gentile A, Pilotto A, Annese V, Andriulli A. Aberrant DNA methylation in non-neoplastic gastric mucosa of *H. Pylori* infected patients and effect of eradication. *Am J Gastroenterol* 2007; 102: 1361-1371
- 王贺玲, 孙军, 李岩, 王学清. 抑癌基因的甲基化水平与胃癌的关系. *中华消化杂志* 2007; 27: 492-493
- Hasuo T, Semba S, Li D, Omori Y, Shirasaka D, Aoyama N, Yokozaki H. Assessment of microsatellite instability status for the prediction of metachronous recurrence after initial endoscopic submucosal dissection for early gastric cancer. *Br J Cancer* 2007; 96: 89-94
- Hamamoto T, Yokozaki H, Semba S, Yasui W, Yunotani S, Miyazaki K, Tahara E. Altered microsatellites in incomplete-type intestinal metaplasia adjacent to primary gastric cancers. *J Clin Pathol* 1997; 50: 841-846
- 李异玲, 周立平, 王轶淳, 付宝玉. 胃癌及癌前病变中微卫星不稳定性变化. *世界华人消化杂志* 2008; 16: 94-97
- 赵松, 付英梅, 赵柏, 刘连新. 慢性萎缩性胃炎黏膜上

■名词解释

胃癌的癌前病变 (PLGC): 一种病理概念, 系指胃黏膜及腺上皮的某种病变, 可能转变成胃癌, 包括肠上皮化生、不典型增生或异型增生.

■同行评价

本文较全面地综述了胃癌癌前病变的研究进展及防治措施, 具有较好的科学意义。

- 皮中P53和C-erbB-2表达的临床意义. 世界华人消化杂志 2006; 14: 2943-2947
- 36 徐萍, 唐永明. 端粒酶活性在胃癌组织中表达的临床意义. 东南国防医药 2009; 11: 518-519, 522
- 37 Lee CW, Rickman B, Rogers AB, Ge Z, Wang TC, Fox JG. Helicobacter pylori eradication prevents progression of gastric cancer in hypergastrinemic INS-GAS mice. *Cancer Res* 2008; 68: 3540-3548
- 38 Mabe K, Takahashi M, Oizumi H, Tsukuma H, Shibata A, Fukase K, Matsuda T, Takeda H, Kawata S. Does Helicobacter pylori eradication therapy for peptic ulcer prevent gastric cancer? *World J Gastroenterol* 2009; 15: 4290-4297
- 39 梁增文. 胃癌前病变的研究进展. 广西医学 2005; 27: 1127-1130
- 40 Xiao SD, Meng XJ, Shi Y, Hu YB, Zhu SS, Wang CW. Interventional study of high dose folic acid in gastric carcinogenesis in beagles. *Gut* 2002; 50: 61-64
- 41 魏睦新, 胡平. 消化病中西医结合基础研究评述. 世界华人消化杂志 2009; 17: 2545-2549
- 42 吴燕敏, 马国花, 魏睦新. 香砂六君子汤加味治疗肠上皮化生50例. 中国中医急症 2008; 17: 246
- 43 李豫. 魏睦新治疗慢性萎缩性胃炎伴肠化的方证应用经验探析. 江苏中医药 2010; 42: 14-15
- 44 吴燕敏, 魏睦新. 胃肠道细胞生物学的中西医结合研究进展. 世界华人消化杂志 2010; 18: 1411-1416
- 45 吕林懋, 曹志群, 王淑敏, 相宏杰, 房志. 芪莲舒痞汤治疗慢性萎缩性胃炎癌前病变的临床研究. 中国中西医结合消化杂志 2011; 19: 7-9
- 46 高绍芳, 李佃贵, 郭敏, 崔建从, 张夙, 李金花. 化浊解毒和胃方对胃癌前病变大鼠胃癌相关基因的影响. 中华中医药杂志 2010; 25: 34-37
- 47 邱卫东. 温胃健脾汤联合隔姜灸治疗虚寒型慢性萎缩性胃炎临床研究. 吉林中医药 2012; 32: 372-373
- 48 褚衍六, 张娟, 刘向阳, 高孝忠, 刘奉, 刘洁. 内镜窄带成像技术在诊断萎缩性胃炎与肠上皮化生的临床价值研究. 中国实用内科杂志 2010; 30: 265-266
- 49 刘思德, 张亚历, 白岚, 智发朝, 陈村龙, 潘德寿, 万田谟, 周丹, 张振书, 周殿元, 姜泊. 采用针形电刀行黏膜下整片切除术(ESD)治疗早期胃癌及胃癌前病变8例报道. 中国消化内镜 2007; 1: 27-28
- 50 叶国良, 盛红, 张新军, 郑拓, 金燕萍. 内镜黏膜下剥离术在治疗胃上皮内瘤变中的应用与评价. 胃肠病学和肝病学杂志 2012; 21: 319-321

编辑 张姗姗 电编 闫晋利

ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) CN 14-1260/R 2012年版权归世界华人消化杂志

• 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! (编辑部主任: 李军亮 2012-03-08).

5-Fu对低氧下胃癌SGC7901细胞系中SP细胞比例及HIF-2 α 、ABCG2表达的影响

张小茜, 冯玉光, 吴美英, 朱芸, 白红霞, 王西艳

张小茜, 冯玉光, 潍坊医学院附属消化内科 山东省潍坊市 261031

吴美英, 朱芸, 白红霞, 王西艳, 潍坊医学院 山东省潍坊市 261053

张小茜, 讲师, 在读博士, 主要从事消化系统肿瘤的研究。

作者贡献分布: 本课题由冯玉光与张小茜设计; 研究过程由张小茜、冯玉光、吴美英、朱芸、白红霞及王西艳共同完成; 数据分析由张小茜与吴美英完成; 本论文写作由张小茜与冯玉光完成。

通讯作者: 冯玉光, 博士, 副教授, 硕士研究生导师, 261042, 山东省潍坊市虞河路465号, 潍坊医学院附属医院消化内科。f-yg2008@163.com

电话: 0536-8068912

收稿日期: 2012-04-21 修回日期: 2012-05-20

接受日期: 2012-06-01 在线出版日期: 2012-07-18

Effect of 5-Fu on the ratio of SP cells and expression of HIF-2 α and ABCG2 in human gastric cancer cell line SGC7901 under hypoxia

Xiao-Qian Zhang, Yu-Guang Feng, Mei-Ying Wu, Yun Zhu, Hong-Xia Bai, Xi-Yan Wang

Xiao-Qian Zhang, Yu-Guang Feng, Department of Gastroenterology, the Affiliated Hospital of Weifang Medical College, Weifang 261031, Shandong Province, China
Mei-Ying Wu, Yun Zhu, Hong-Xia Bai, Xi-Yan Wang, Weifang Medical College, Weifang 261053, Shandong Province, China

Correspondence to: Yu-Guang Feng, Associate Professor, Department of Gastroenterology, the Affiliated Hospital of Weifang Medical College, 465 Yuhe Road, Weifang 261042, Shandong Province, China. f-yg2008@163.com

Received: 2012-04-21 Revised: 2012-05-20

Accepted: 2012-06-01 Published online: 2012-07-18

Abstract

AIM: To investigate the mechanism of resistance to 5-fluorouracil (5-Fu) chemotherapy in gastric cancer cells under hypoxia.

METHODS: The proliferative activity of SGC7901 cells was determined by MTT assay, and the half maximal inhibitory concentration (IC₅₀) of 5-Fu under normoxia and hypoxia was calculated. After 5-Fu at a concentration of IC₅₀ was incubated with cells for 24, 48 or 72 h under hypoxia, the percentage of SP cells was detected by Hoechst 33342 staining, the expression of

HIF-2 α protein was detected by immunocytochemistry, and the expression of ABCG2 was detected by fluorescence immunocytochemistry.

RESULTS: 5-Fu inhibited the proliferation of SGC7901 cells in a dose- and time-dependent manner under normoxia and hypoxia. The IC₅₀ of 5-Fu under normoxia and hypoxia was 100 mg/L and 200 mg/L, respectively. The ratio of SP cells in SGC7901 cells was 1.87% under normoxia, and significantly increased after induction by hypoxia for 24, 48, and 72 h. Treatment with 5-Fu had no significant impact on the proportion of SP cells under normoxia, but gradually increased SP cell proportion under hypoxia. The expression levels of HIF-2 α and ABCG2 proteins in SGC7901 cells were lower under normoxia. Treatment with 5-Fu had no significant impact on the expression of HIF-2 α and ABCG2 proteins under normoxia, but gradually increased their expression under hypoxia.

CONCLUSION: The mechanism underlying the resistance of SGC7901 cells to 5-Fu under hypoxia may be related to inducing HIF-2 α and ABCG2 expression and promoting stemness.

Key Words: 5-Fluorouracil; Hypoxia; Cancer stem cells; SP cells; ATP-binding cassette superfamily G member 2; Hypoxia inducible factor-2 α

Zhang XQ, Feng YG, Wu MY, Zhu Y, Bai HX, Wang XY. Effect of 5-Fu on the ratio of SP cells and expression of HIF-2 α and ABCG2 in human gastric cancer cell line SGC7901 under hypoxia. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2012; 20(20): 1813-1818

摘要

目的: 探讨低氧下5-Fu化疗抵抗的机制。

方法: MTT检测常氧和低氧下的细胞活力, 并计算5-Fu的半数抑制浓度(IC₅₀)。以IC₅₀的5-Fu分别作用细胞常氧和低氧组细胞24、48和72 h后, 收集标本, Hoechst33342染色法检测侧群(side population, SP)细胞的比例, 免疫细胞化学法检测低氧诱导因子(hypoxia-

■背景资料

低氧是多种实体肿瘤包括胃癌的特征之一, 低氧不但可以维持肿瘤干细胞的未分化状态, 还可以诱导非肿瘤干细胞的去分化, 从而表现肿瘤干细胞特征, 可能是低氧下肿瘤放化疗抵抗和复发的根源。

■同行评议者

陈卫昌, 教授, 苏州大学附属第一医院消化内科

■ 研发前沿

化疗是当前治疗胃癌的主要手段之一,但治疗效果仍无重大进展,其主要原因就是胃癌细胞对化疗药物产生了多药耐药,该领域是目前研究的一个热点,但具体耐药机制尚不十分明确。

inducible factor-2 α , HIF-2 α), 荧光免疫细胞化学法检测ABCG2(ATP-binding cassette superfamily G member 2)的表达。

结果: 常氧和低氧下, 5-Fu均呈时间、剂量依赖性抑制SGC7901细胞增殖, 其IC₅₀分别为100、200 mg/L。常氧下SP细胞的比例为1.87%, 低氧诱导后其比例逐渐增加。常氧下5-Fu-IC₅₀作用于细胞不用时间后, SP细胞的比例无明显变化, 低氧下其比例却逐渐增加。常氧下, HIF-2 α 和ABCG2蛋白呈低水平表达, 且5-Fu-IC₅₀作用于不同时间后也无明显变化, 低氧下5-Fu-IC₅₀作用于不同时间后二者的表达逐渐增加。

结论: 低氧下5-Fu对胃癌SGC7901细胞存在化疗抵抗可能与低氧通过诱导HIF-2 α -ABCG2通路的表达、促进肿瘤细胞的干细胞化有关, 这可能是肿瘤化疗抵抗和复发的根源。

关键词: 5-Fu; 低氧; 肿瘤干细胞; 侧群细胞; ABCG2; 低氧诱导因子-2 α

张小茜, 冯玉光, 吴美英, 朱芸, 白红霞, 王西艳. 5-Fu对低氧下胃癌SGC7901细胞系中SP细胞比例及HIF-2 α 、ABCG2表达的影响. 世界华人消化杂志 2012; 20(20): 1813-1818
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/1813.asp>

0 引言

低氧是多种实体肿瘤包括胃癌的特征之一, 可诱导肿瘤细胞低氧诱导因子(hypoxia-inducible factor, HIFs)的活性, HIFs与肿瘤的血管生成、侵袭转移及放化疗抵抗等恶性生物学表型密切相关^[1]。低氧通过诱导干细胞产生HIFs, 调控Notch和Oct4、Wnt、c-Myc、ABCG2(ATP-binding cassette superfamily G member 2)等多种干细胞信号通路的表达, 维持干细胞未分化特征^[2-5]。最近很多学者从不同的细胞系和肿瘤组织中分离到了一群侧群(side population, SP)细胞, 可以作为研究肿瘤干细胞的重要资源^[6]。ABCG2是分选多潜能干细胞的标记, 参与肿瘤的多药耐药, 而多药耐药是导致胃癌化疗失败的一个重要原因^[7-9]。研究表明ABCG2是HIF-2 α 的一个直接靶基因, 低氧通过诱导HIF-2 α -ABCG2通路高表达导致肿瘤干细胞的多药耐药^[10,11]。研究低氧下化疗药物对肿瘤干细胞的影响有助于深入阐明化疗抵抗的干细胞机制, 具有重要的理论及临床意义。肿瘤低氧可降低化疗药5-Fu的抗肿瘤活性^[12], 我们推测5-Fu化疗抵

抗可能与低氧促进肿瘤细胞的干细胞化有关, 为此我们研究了低氧下5-Fu对人胃癌SGC7901细胞系中SP细胞的比例及HIF-2 α 、ABCG2表达变化的影响。

1 材料和方法

1.1 材料 人胃癌细胞株SGC7901购自山东省医学科学院; 5-Fu为上海旭东海普药业有限公司生产; 氯化钴(CoCl₂)购于美国Sigma公司; RPMI 1640培养基、MTT均购自美国Gibco公司; 胎牛血清(杭州四季青); HIF-2 α 、ABCG2多克隆抗体、罗丹明标记山羊抗兔IgG及SP-9000免疫组化试剂盒均为北京中杉金桥生物技术有限公司产品。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养: 人胃癌细胞株SGC7901接种于含100 mL/L胎牛血清、青霉素、链霉素各1 \times 10⁵ U/L的RPMI 1640培养液中, 置37 $^{\circ}$ C、50 mL/L CO₂培养箱内常规传代培养。化学缺氧剂CoCl₂(浓度为150 μ mol/L)用于模拟肿瘤内低氧微环境。

1.2.2 MTT法测定常氧和低氧下5-Fu对胃癌细胞的增殖抑制率: 取对数生长期的细胞, 以2 \times 10⁴/L的密度接种于96孔培养板, 每孔体积为200 μ L。分为常氧组和低氧组, 低氧组待细胞贴壁后分别加入CoCl₂和不同浓度的5-Fu(25、50、100、200 mg/L), 常氧对照组不加CoCl₂。在37 $^{\circ}$ C、50 mL/L CO₂培养箱中培养24、48、72 h后, 用移液枪吸走旧培养基, 每孔加入5 g/L MTT溶液20 μ L和新鲜培养基180 μ L, 继续培养4 h; 吸尽上清液, 加入二甲基亚砜100 μ L/孔, 振荡10 min充分溶解, 在酶标仪上以490 nm波长测每孔的吸光度A值。细胞生长抑制率 = (对照孔A值 - 实验孔A值)/对照孔A值 \times 100%。

1.2.3 Hoechst33342染色法检测5-Fu对低氧下SGC7901细胞SP细胞比例的影响: 取对数生长期的SGC7901制成2 \times 10⁸/L的细胞悬液, 每孔0.5 mL, 加入放有盖玻片的24孔板内。设常氧组、低氧组, 低氧组加入CoCl₂和半数抑制浓度的5-Fu(200 mg/L), 常氧组只加半数抑制浓度的5-Fu(100 mg/L), 分别培养24、48、72 h后取出细胞爬片, PBS冲洗, 冷丙酮固定13 min。细胞爬片加入0.1% Triton室温放置20 min, 加入适量Hoechst33342, 37 $^{\circ}$ C避光孵育30 min, PBS冲洗, 最后用PBS封片。倒置荧光显微镜下观察, 计算SP细胞所占比例。

1.2.4 免疫细胞化学法观察5-Fu对低氧下胃癌细

表 1 不同时间、不同浓度5-Fu常氧和低氧下对SGC7901细胞增殖活性的影响 (A值, mean \pm SD, $n = 4$)

5-Fu	24 h		48 h		72 h	
	低氧	常氧	低氧	常氧	低氧	常氧
0 mg/L组	0.839 \pm 0.005	0.781 \pm 0.014	0.839 \pm 0.005	0.778 \pm 0.008	0.840 \pm 0.002	0.778 \pm 0.009
25 mg/L组	0.819 \pm 0.031	0.744 \pm 0.005	0.716 \pm 0.009	0.618 \pm 0.011	0.700 \pm 0.013	0.578 \pm 0.011
50 mg/L组	0.775 \pm 0.008	0.713 \pm 0.005	0.646 \pm 0.009	0.536 \pm 0.013	0.600 \pm 0.010	0.485 \pm 0.010
100 mg/L组	0.733 \pm 0.013	0.672 \pm 0.003	0.576 \pm 0.005	0.417 \pm 0.007	0.498 \pm 0.012	0.330 \pm 0.011
200 mg/L组	0.644 \pm 0.071	0.608 \pm 0.005	0.431 \pm 0.005	0.213 \pm 0.011	0.311 \pm 0.009	0.159 \pm 0.014

胞HIF-2 α 表达: 分组同1.2.3, 取制备好的细胞爬片, 按试剂盒步骤检测HIF-2 α , DAB显色, 脱水, 透明, 中性树胶封片. 用已知阳性的乳腺癌切片作为阳性对照, 以PBS代替一抗作为阴性对照. 结果判定: HIF-2 α 的阳性结果为细胞浆内有棕黄色颗粒出现. 采用Imagepro plus图像分析软件, 检测HIF-2 α 阳性细胞的平均A值, 以间接反映HIF-2 α 蛋白的表达量, 并取其均值.

1.2.5 免疫荧光法检测5-Fu对低氧下胃癌细胞ABCG2蛋白的表达: 分组同1.2.3, 将细胞爬片依次加入0.1% Triton、山羊血清, 一抗4 $^{\circ}$ C过夜, 滴加罗丹明标记山羊抗兔IgG, 37 $^{\circ}$ C避光孵育1 h, PBS冲洗, 最后用PBS封片, 荧光显微镜下观察并拍照. 用已知阳性的精原细胞瘤切片作为阳性对照, 以PBS代替一抗作为阴性对照. 结果判定: ABCG2的阳性结果为细胞质表达红色荧光.

统计学处理 定量资料的统计描述用mean \pm SD表示, MTT用析因设计分析, 组间比较用 t 检验和单因素方差分析, 用统计软件SPSS17.0分析, $P < 0.05$ 为有统计学意义.

2 结果

2.1 低氧环境下不同浓度5-Fu对SGC7901细胞增殖的影响 低氧环境下, 不同浓度的5-Fu作用不同时间后, SGC7901细胞的增殖活性显著高于常氧对照组($F = 3544.12$, $P < 0.01$). 低氧环境下, 相同浓度的5-Fu呈时间依赖性地抑制SGC7901细胞增殖, 作用48 h其增殖抑制率显著高于24 h, 72 h又高于48 h; 不同浓度的5-Fu呈剂量依赖性地抑制SGC7901细胞增殖, 50 mg/L组高于25 mg/L组, 100 mg/L组高于50 mg/L组, 而200 mg/L组又显著高于100 mg/L组(均 $P < 0.01$, 表1). 细胞在接种后的48-72 h处于对数生长期, 常氧和低氧下不同浓度的5-Fu作用于SGC7901细胞48 h后的生长抑制率分别为(常氧: 20.57%、31.11%、46.40%、72.62%; 低氧: 14.15%、23.00%、31.35%、48.63%); 故5-Fu在常氧和低氧下对SGC7901细胞

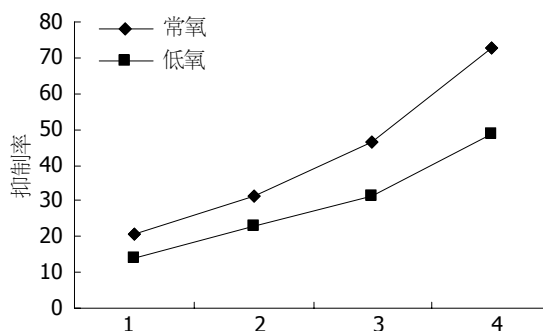


图 1 低氧下不同浓度的5-Fu作用48 h后对SGC7901细胞的增殖抑制率. 1: 25 mg/L组; 2: 50 mg/L组; 3: 100 mg/L组; 4: 200 mg/L组.

的IC₅₀分别约为100、200 mg/L(图1).

2.2 Hoechst33342染色法检测IC₅₀的5-Fu对低氧下SGC7901细胞SP细胞比例的影响 荧光显微镜下观察可见, SP细胞的胞核较大, 呈圆形或者椭圆形, 淡染或者低染. 胃癌SGC7901经Hoechst33342染色后胞核呈低染的比例为1.87%. 常氧下IC₅₀的5-Fu作用24、48和72 h后, SP细胞比例无明显变化, 低氧下IC₅₀的5-Fu作用24、48和72 h后, SP细胞的比例逐渐增加, 分别为3.36%、3.64%、4.00%, 与同时时间点的常氧组相比, 差异具有统计学意义($t = 3.215$ 、5.667、4.286, 均 $P < 0.05$, 图2).

2.3 免疫细胞化学染色法观察IC₅₀的5-Fu对低氧下SGC7901细胞HIF-2 α 蛋白表达的影响 常氧下HIF-2 α 蛋白呈低水平表达, IC₅₀的5-Fu作用不同时间后HIF-2 α 蛋白的表达无明显变化, 低氧环境下, IC₅₀的5-Fu作用不同时间后, HIF-2 α 蛋白的表达逐渐增加, 与同时时间点的常氧组比较, 差异有统计学意义(常氧下A值0.319 \pm 0.007, 常氧加IC₅₀的5-Fu作用24、48、72 h后A值无明显变化, 低氧加IC₅₀的5-Fu作用后A值依次为: 24 h 0.585 \pm 0.017, 48 h 0.780 \pm 0.012, 72 h 0.824 \pm 0.014, $F = 344.659$, $P < 0.01$, 图3).

2.4 荧光免疫细胞化学染色检测IC₅₀的5-Fu对低氧下SGC7901细胞中ABCG2蛋白表达的影响 常

■相关报道

研究表明ABCG2是HIF-2 α 的一个直接靶基因, 低氧通过诱导HIF-2 α -ABCG2通路高表达导致肿瘤干细胞的多药耐药.

■创新盘点

本研究结果表明低氧可降低5-Fu的抗肿瘤活性,并初步揭示其机制可能与低氧通过诱导HIF-2 α -ABCG2通路的表达,促进肿瘤细胞的干细胞化有关。

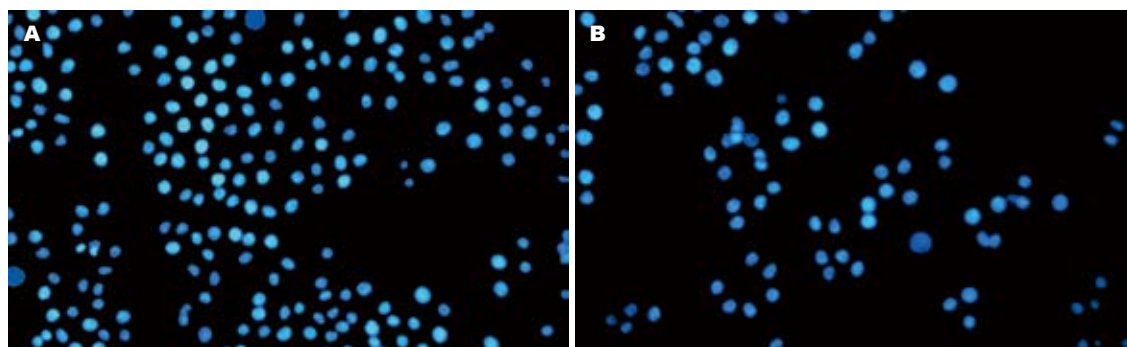


图2 Hoechst染色法检测半数抑制浓度的5-Fu对低氧下SGC7901中SP细胞比例的影响($\times 200$). A: 100 mg/L 5-Fu常氧作用48 h组; B: 200 mg/L 5-Fu低氧作用48 h组。

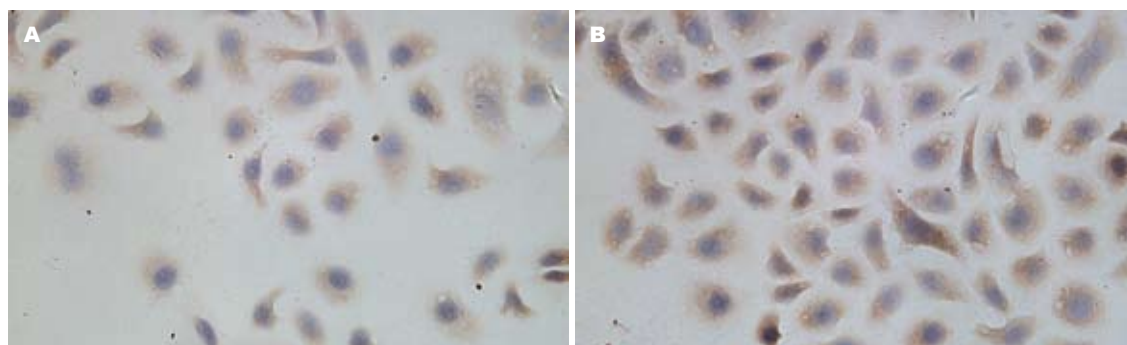


图3 免疫细胞化学法检测SGC7901细胞HIF-2 α 蛋白的表达($\times 400$). A: 100 mg/L 5-Fu常氧作用48 h组; B: 200 mg/L 5-Fu低氧作用48 h组。

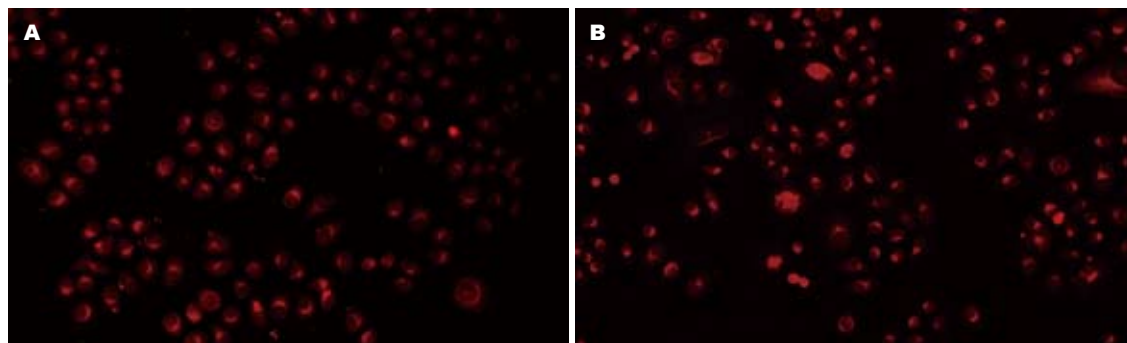


图4 荧光免疫细胞化学染色检测ABCG2蛋白的表达和SP细胞比例的变化($\times 200$). A: 100 mg/L 5-Fu常氧作用48 h组; B: 200 mg/L 5-Fu低氧作用48 h组。

氧下ABCG2蛋白呈低水平表达, IC_{50} 的5-Fu作用不同时间后, ABCG2蛋白的表达无明显变化, 低氧环境下, IC_{50} 的5-Fu作用不同时间后, ABCG2蛋白的表达逐渐增加, 与同时时间点的常氧组比较, 差异有统计学意义(常氧下A值 0.304 ± 0.015 , 低氧加 IC_{50} 的5-Fu作用后A值依次为: 24 h 0.464 ± 0.039 , 48 h 0.599 ± 0.024 , 72 h 0.781 ± 0.017 , $F = 301.496$, $P < 0.01$, 图4)。

3 讨论

由于肿瘤细胞的快速增殖和血管生长的相对

滞后, 实体肿瘤包括胃癌中普遍存在低氧区域, 低氧下发生化疗抵抗是肿瘤化疗失败的重要原因^[13], 多种化疗药物低氧下抗肿瘤作用下降^[14]。低氧微环境可诱导肿瘤细胞产生HIFs, 包括HIF-1、HIF-2和HIF-3。HIF-2在血管生长、骨髓造血和能量代谢中起非常重要作用。HIF-2 α 是HIF-2的功能性亚基和活性亚基, 且HIF-2 α 的高表达与肿瘤细胞的血管生成、侵袭转移及化疗抵抗密切相关^[15-18]。此外, 低氧可导致基因组的不稳定, 促进肿瘤干细胞的发生^[19]。Hoechst33342是一种脂溶性DNA结合染

料, 可以穿过细胞膜而与DNA结合, 在紫外光激发下可发出蓝色和红色两种荧光, 主要应用在细胞周期的研究. 1996年, Goodell等^[20]在用Hoechst33342荧光染料对小鼠骨髓造血干细胞进行检测时, 发现不到0.1%的一小群细胞呈彗星状分布在细胞主群的一侧, 他们将这群细胞称为SP细胞. Kondo等^[21]最早在大鼠胶质瘤细胞系C6中首先发现了肿瘤系中SP细胞的存在. 近年来在多种肿瘤细胞系中都发现了SP细胞, 他们具有自我更新和多向分化增殖潜能, 因此将SP作为鉴定干细胞的标志之一, SP细胞可以作为干细胞研究的重要资源^[22].

近有很多研究报道, SP细胞是肿瘤发生、发展、复发、转移和化疗抵抗的根源^[6,23,24]. Das等^[25]报道, 低氧会促使肿瘤的SP细胞迁移到低氧区域而且会导致SP细胞的扩增. 最近的研究还表明, 低氧微环境可激活HIF-2 α -ABCG2信号通路^[6,26], 使干细胞标志物ABCG2表达增加, 从而促进SP细胞处于未分化状态和增强SP细胞外排药物的能力. 乳腺癌耐药蛋白[breast cancer resistance protein(BCRP/ABCG2)]是与干细胞表型有密切关系的一个, 被认为是一个通用的干细胞标志物^[27]. 诱导凋亡是5-Fu抗肿瘤的基本机制^[28], 研究表明, 肿瘤低氧可降低5-Fu的抗肿瘤活性^[12]. 此外, 5-Fu是细胞周期特异性药物, 对细胞各个周期均有抑制作用, 以S期的作用最佳^[29].

本研究发现, 低氧模拟剂可显著促进SP细胞的比例及HIF-2 α 、ABCG2蛋白的表达, 与常氧组比较明显升高, 这与最近的很多研究报道相一致^[18,20,28]. 其机制可能与低氧微环境促进SP细胞扩增及诱导肿瘤细胞HIF-2 α -ABCG2表达增加有关. 低氧微环境下5-Fu呈时间和剂量性地抑制SGC7901细胞增殖, 但与常氧组相比, 其抑制作用减弱, 这可能与低氧促进ABCG2表达升高相关. 低氧微环境下, 随着5-Fu作用时间的延长, SP细胞的比例及HIF-2 α 、ABCG2蛋白的表达逐渐增加, 与常氧组各时间点比较均具有统计学意义. 这与大量的S期细胞被杀死, 残存的G₀期细胞增多及低氧促进SP细胞扩增有关. SP细胞具有的强大的外排药物能力和所处的相对静息的细胞周期都导致其更高的耐药能力, 这是导致临床上胃癌化疗失败的主要原因之一.

总之, 我们的研究结果提示, 胃癌细胞中存在表达肿瘤干细胞标志物的SP细胞, 低氧微环境下这类细胞的比例增加和活性增强导致了胃癌的化疗抵抗. 阻断低氧和SP细胞之间的调节

通路, 诱导其分化及改善肿瘤中存在的低氧环境等, 有助于改善胃癌的化疗抵抗, 增强化疗效果, 其具体机制有待于进一步研究.

4 参考文献

- 1 Bertout JA, Patel SA, Simon MC. The impact of O₂ availability on human cancer. *Nat Rev Cancer* 2008; 8: 967-975
- 2 Simon MC, Keith B. The role of oxygen availability in embryonic development and stem cell function. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008; 9: 285-296
- 3 Zhang J, Li L. Stem cell niche: microenvironment and beyond. *J Biol Chem* 2008; 283: 9499-9503
- 4 Heddleston JM, Li Z, Lathia JD, Bao S, Hjelmeland AB, Rich JN. Hypoxia inducible factors in cancer stem cells. *Br J Cancer* 2010; 102: 789-795
- 5 Hiyama A, Skubutyte R, Markova D, Anderson DG, Yadla S, Sakai D, Mochida J, Albert TJ, Shapiro IM, Risbud MV. Hypoxia activates the notch signaling pathway in cells of the intervertebral disc: implications in degenerative disc disease. *Arthritis Rheum* 2011; 63: 1355-1364
- 6 Hu L, McArthur C, Jaffe RB. Ovarian cancer stem-like side-population cells are tumorigenic and chemoresistant. *Br J Cancer* 2010; 102: 1276-1283
- 7 Doyle LA, Ross DD. Multidrug resistance mediated by the breast cancer resistance protein BCRP (ABCG2). *Oncogene* 2003; 22: 7340-7358
- 8 Kim M, Turnquist H, Jackson J, Sgagias M, Yan Y, Gong M, Dean M, Sharp JG, Cowan K. The multidrug resistance transporter ABCG2 (breast cancer resistance protein 1) effluxes Hoechst 33342 and is overexpressed in hematopoietic stem cells. *Clin Cancer Res* 2002; 8: 22-28
- 9 Wielinga P, Hooijberg JH, Gunnarsdottir S, Kathmann I, Reid G, Zelcer N, van der Born K, de Haas M, van der Heijden I, Kaspers G, Wijnholds J, Jansen G, Peters G, Borst P. The human multidrug resistance protein MRP5 transports folates and can mediate cellular resistance against antifolates. *Cancer Res* 2005; 65: 4425-4430
- 10 Martin CM, Ferdous A, Gallardo T, Humphries C, Sadek H, Caprioli A, Garcia JA, Szweda LI, Garry MG, Garry DJ. Hypoxia-inducible factor-2 α transactivates Abcg2 and promotes cytoprotection in cardiac side population cells. *Circ Res* 2008; 102: 1075-1081
- 11 Xiang L, Liu ZH, Huan Q, Su P, Du GJ, Wang Y, Gao P, Zhou GY. Hypoxia-inducible factor-2 α is associated with ABCG2 expression, histology-grade and Ki67 expression in breast invasive ductal carcinoma. *Diagn Pathol* 2012; 7: 32
- 12 Yoshida S, Ito D, Nagumo T, Shirota T, Hatori M, Shintani S. Hypoxia induces resistance to 5-fluorouracil in oral cancer cells via G(1) phase cell cycle arrest. *Oral Oncol* 2009; 45: 109-115
- 13 Shannon AM, Bouchier-Hayes DJ, Condrion CM, Toomey D. Tumour hypoxia, chemotherapeutic resistance and hypoxia-related therapies. *Cancer Treat Rev* 2003; 29: 297-307
- 14 Cosse JP, Michiels C. Tumour hypoxia affects the responsiveness of cancer cells to chemotherapy and promotes cancer progression. *Anticancer Agents Med Chem* 2008; 8: 790-797
- 15 Löfstedt T, Fredlund E, Holmquist-Mengelbier L, Pietras A, Ovenberger M, Poellinger L, Pahlman

■同行评价

本文主要探讨了低氧下5-Fu对胃癌SGC7901细胞存在化疗抵抗可能与低氧通过诱导HIF-2 α -ABCG2通路的表达、促进肿瘤细胞的干细胞化有关. 选题尚可, 设计合理, 有一定的研究参考价值.

- S. Hypoxia inducible factor-2alpha in cancer. *Cell Cycle* 2007; 6: 919-926
- 16 Koukourakis MI, Giatromanolaki A, Skarlatos J, Corti L, Blandamura S, Piazza M, Gatter KC, Harris AL. Hypoxia inducible factor (HIF-1a and HIF-2a) expression in early esophageal cancer and response to photodynamic therapy and radiotherapy. *Cancer Res* 2001; 61: 1830-1832
- 17 Roberts AM, Watson IR, Evans AJ, Foster DA, Irwin MS, Ohh M. Suppression of hypoxia-inducible factor 2alpha restores p53 activity via Hdm2 and reverses chemoresistance of renal carcinoma cells. *Cancer Res* 2009; 69: 9056-9064
- 18 Koukourakis MI, Giatromanolaki A, Sivridis E, Simopoulos C, Turley H, Talks K, Gatter KC, Harris AL. Hypoxia-inducible factor (HIF1A and HIF2A), angiogenesis, and chemoradiotherapy outcome of squamous cell head-and-neck cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2002; 53: 1192-1202
- 19 Nelson DA, Tan TT, Rabson AB, Anderson D, Degenhardt K, White E. Hypoxia and defective apoptosis drive genomic instability and tumorigenesis. *Genes Dev* 2004; 18: 2095-2107
- 20 Goodell MA, Brose K, Paradis G, Conner AS, Mulligan RC. Isolation and functional properties of murine hematopoietic stem cells that are replicating in vivo. *J Exp Med* 1996; 183: 1797-1806
- 21 Kondo T, Setoguchi T, Taga T. Persistence of a small subpopulation of cancer stem-like cells in the C6 glioma cell line. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101: 781-786
- 22 Challen GA, Little MH. A side order of stem cells: the SP phenotype. *Stem Cells* 2006; 24: 3-12
- 23 Yao J, Cai HH, Wei JS, An Y, Ji ZL, Lu ZP, Wu JL, Chen P, Jiang KR, Dai CC, Qian ZY, Xu ZK, Miao Y. Side population in the pancreatic cancer cell lines SW1990 and CFPAC-1 is enriched with cancer stem-like cells. *Oncol Rep* 2010; 23: 1375-1382
- 24 Fillmore CM, Kuperwasser C. Human breast cancer cell lines contain stem-like cells that self-renew, give rise to phenotypically diverse progeny and survive chemotherapy. *Breast Cancer Res* 2008; 10: R25
- 25 Das B, Tsuchida R, Malkin D, Koren G, Baruchel S, Yeger H. Hypoxia enhances tumor stemness by increasing the invasive and tumorigenic side population fraction. *Stem Cells* 2008; 26: 1818-1830
- 26 Covello KL, Kehler J, Yu H, Gordan JD, Arsham AM, Hu CJ, Labosky PA, Simon MC, Keith B. HIF-2alpha regulates Oct-4: effects of hypoxia on stem cell function, embryonic development, and tumor growth. *Genes Dev* 2006; 20: 557-570
- 27 Zhou S, Schuetz JD, Bunting KD, Colapietro AM, Sampath J, Morris JJ, Lagutina I, Grosveld GC, Osawa M, Nakauchi H, Sorrentino BP. The ABC transporter Bcrp1/ABCG2 is expressed in a wide variety of stem cells and is a molecular determinant of the side-population phenotype. *Nat Med* 2001; 7: 1028-1034
- 28 Yoshida K, Yamaguchi K, Osada S, Kawaguchi Y, Takahashi T, Sakashita F, Tanaka Y. Challenge for a better combination with basic evidence. *Int J Clin Oncol* 2008; 13: 212-219
- 29 金懋林. 进展期胃癌全身化学治疗新进展. *外科理论与实践* 2003; 8: 18-20

编辑 张姗姗 电编 闫晋利

ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) CN 14-1260/R 2012年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

2011 年度《世界华人消化杂志》发文情况

本刊讯 2011-01-01/2011-12-31,《世界华人消化杂志》共收到稿件1576篇,退稿932篇,退稿率59.13%,发表文章644篇,所有文章均经过编委专家同行评议.其中,发表述评35篇(5.43%),基础研究135篇(20.96%),临床研究71篇(11.02%),焦点论坛17篇(2.64%),文献综述111篇(17.24%),研究快报58篇(9.01%),临床经验189篇(29.35%),病例报告24篇(3.73%);文章作者分布遍及全国各地,绝大多数来自高等院校及附属医院.在此,特别感谢为《世界华人消化杂志》进行同行评议的各位编委专家,你们的同行评价对文章发表质量做出了重要贡献;也希望各位编委踊跃为《世界华人消化杂志》继续撰写高质量的评论性文章,为科学知识的传播做出贡献!(编辑部主任:李军亮 2012-01-01)

18 α 甘草酸对CCl₄诱导的肝纤维化大鼠氧化应激的影响

丁天鹏, 曲颖, 陆伦根, 施根林, 王若飞

丁天鹏, 施根林, 王若飞, 中国人民武装警察部队江苏省总队医院 江苏省扬州市 225003

曲颖, 陆伦根, 上海交通大学附属第一人民医院消化内科 上海市 200080

丁天鹏, 主任医师, 主要从事医院管理及感染病诊治工作。

作者贡献分布: 此课题由丁天鹏、曲颖及陆伦根设计; 研究过程由曲颖、施根林及王若飞操作完成; 数据分析由丁天鹏、曲颖、施根林及王若飞完成; 本论文写作由陆伦根指导, 丁天鹏与曲颖完成撰写。

通讯作者: 陆伦根, 教授, 200080, 上海市虹口区海宁路100号, 上海交通大学附属第一人民医院消化内科。

lunlunlul965@yahoo.com.cn

电话: 021-63240090-3062 传真: 021-63241377

收稿日期: 2012-04-19 修回日期: 2012-05-22

接受日期: 2012-06-19 在线出版日期: 2012-07-18

18 α -glycyrrhizin ameliorates oxidative stress in rats with CCl₄-induced liver fibrosis

Tian-Peng Ding, Ying Qu, Lun-Gen Lu, Gen-Lin Shi, Ruo-Fei Wang

Tian-Peng Ding, Gen-Lin Shi, Ruo-Fei Wang, Jiangsu Provincial Corps Hospital, Chinese Armed People's Forces, Yangzhou 225003, Jiangsu Province, China

Ying Qu, Lun-Gen Lu, Department of Gastroenterology, Shanghai First People's Hospital, School of Medicine, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200080, China

Correspondence to: Lun-Gen Lu, Professor, Department of Gastroenterology, Shanghai First People's Hospital, School of Medicine, Shanghai Jiaotong University, 100 Haining Road, Hongkou District, Shanghai 200080, China. lunlunlul965@yahoo.com.cn

Received: 2012-04-19 Revised: 2012-05-22

Accepted: 2012-06-19 Published online: 2012-07-18

Abstract

AIM: To investigate the effect of 18 α -glycyrrhizin (18 α -GL) on oxidative stress in rats with experimental liver fibrosis.

METHODS: Male SD rats were randomly divided into five groups: control group, fibrosis group, low-, medium-, and high-dose GL groups. Except the control group, liver fibrosis was induced by subcutaneous injection of 40% CCl₄ for 8 weeks in rats of the other groups. The three GL groups were treated with different doses of GL (6.25, 12.5, 25 mg/kg, respectively). All the rats were sacrificed at the end of the 8th week. Histopathological changes in the liver tissue were evaluated by HE staining and Mas-

son collagen staining. The contents of MDA and HNE and the activity of SOD and GSH-PX in liver tissue homogenate were determined.

RESULTS: 18 α -GL could inhibit CCl₄-induced liver fibrosis. The contents of MDA and HNE were elevated in the liver fibrosis group (both $P < 0.05$), but 18 α -GL could markedly increase SOD and GSH-PX activity (both $P < 0.05$) and reduce the levels of MDA and HNE to protect the liver from damage.

CONCLUSION: 18 α -GL can ameliorate hepatic histopathological changes and reduce hepatic lipid peroxidation, thus exerting antioxidant and antifibrotic effects in rats with experimental liver fibrosis.

Key Words: 18 α -glycyrrhizin; Liver fibrosis; Oxidative stress

Ding TP, Qu Y, Lu LG, Shi GL, Wang RF. 18 α -glycyrrhizin ameliorates oxidative stress in rats with CCl₄-induced liver fibrosis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2012; 20(20): 1819-1823

摘要

目的: 探讨18 α 甘草酸(18 α glycyrrhizin, 18 α -GL)对四氯化碳(carbon tetrachloride, CCl₄)诱导的大鼠肝纤维化的作用。

方法: 建立动物模型: 采用40% CCl₄皮下注射方法建立肝纤维化模型。动物分为对照组、肝纤维化模型组和18 α -GL干预组(高、中、低剂量)。8 wk后, 做HE和Masson染色观察病理情况, 并检测肝脏组织丙二醛(malondialdehyde, MDA)、4-羟基壬烯酸(hydroxynonenal, HNE)含量及超氧化物酶(superoxide dismutase, SOD)和谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GSH-PX)活力。

结果: 18 α -GL能够显著改善纤维化大鼠肝脏组织病理学变化, 发现在模型组中MDA和HNE含量显著升高(均 $P < 0.05$), 而18 α -GL能够提高肝脏组织中SOD和GSH-PX活力(均 $P < 0.05$), 抑制脂质过氧化物MDA和HNE表达。

■背景资料

肝纤维化是各种慢性肝病的共同病理基础, 国内外学者对中草药抗纤维化的作用机制进行了广泛研究。

■同行评议者

刘绍能, 主任医师, 中国中医科学院广安门医院消化科

■ 研发前沿

甘草酸(GL)是中药甘草的主要活性成分,有广泛的药理功能,可保护肝细胞。

结论: 18 α -GL能够改善肝纤维化大鼠病理,具有抗氧化和抗纤维化作用。

关键词: 18 α 甘草酸; 肝纤维化; 氧化应激

丁天鹏, 曲颖, 陆伦根, 施根林, 王若飞. 18 α 甘草酸对CCl₄诱导的肝纤维化大鼠氧化应激的影响. 世界华人消化杂志 2012; 20(20): 1819-1823
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/1819.asp>

0 引言

肝纤维化是各种原因如病毒、酒精、代谢性疾病、胆汁淤积、毒物、自身免疫性疾病等所导致的肝脏损伤后修复的一种病理状态^[1-3]。肝纤维化发生发展的细胞及其分子机制的研究,为这一疾病的预防提供了依据。许多临床和动物实验均提示了肝纤维化的发生发展与氧化应激、氧自由基损伤和脂质过氧化等有关^[4-6]。临床上甘草制剂广泛应用于肝病治疗,对于慢性病毒性肝炎患者,该类物质均有很好地改善临床症状和降低血清转氨酶的效果,是一种肝细胞保护剂,具有抗炎、保护肝细胞膜及改善肝功能的作用^[7-9]。本实验拟从氧化应激方面探讨18 α 甘草酸(18 α glycyrrhizin, 18 α -GL)对CCl₄诱导的大鼠肝纤维化的作用机制。

1 材料和方法

1.1 材料 健康♂ Sprague-Dawley(SD)大鼠, SPF级, 体质量180-220 g, 由中科院上海实验动物中心提供, 饲养于上海交通大学医学院实验动物饲养中心, 制备CCl₄肝损伤纤维化模型。所有动物自由进食、饮水, 温度、湿度符合标准, 明暗12 h/12 h循环。18 α 甘草酸(江苏正大天晴药业股份有限公司提供), 制成浓度分别为2.5、1.25和0.6 g/L的溶液; 考马斯亮兰蛋白测定试剂盒、MDA、SOD和GSH-PX检测试剂盒购自南京建成生物工程研究所; 蛋白酶抑制剂(No. P8340)购自Sigma公司; OxiSelect™ HNE-His Adduct ELISA Kit购自Cell Biolabs公司; 紫外/可见分光光度计(Ultaspec2000型)购自Pharmacia Biotech公司; 酶标分析仪(Microplate Reader, Model 550)购自美国Bio-Rad公司。

1.2 方法

1.2.1 分组及造模: 所有大鼠适应性喂养1 wk, 随机分为5组, 分别为正常对照组(control group)、肝纤维化造模组(fibrosis group)、低剂量GL治疗组(6.25 mg/kg, low dose GL group)、中剂

量GL治疗组(12.5 mg/kg, intermediate dose GL group)和高剂量GL治疗组(25 mg/kg, high dose GL group)。后4组大鼠给予皮下注射40%CCl₄溶液(纯橄榄油配制)0.5 mL/100 g, 随后给予0.2 mL/100 g, 2次/wk(共8 wk), 建立大鼠肝纤维化模型。正常对照组相同剂量橄榄油皮下注射。GL干预组建模同时给予相应剂量的GL溶液腹腔注射, 1次/d(共8 wk)。第8周末, 动物麻醉后, 取肝右叶2小块肝组织于冰生理盐水快速冲洗后放10%中性甲醛溶液内固定, 其余放液氮贮存。

1.2.2 肝组织MDA、SOD、GSH-PX和HNE的含量检测: 肝组织组织丙二醛(malondialdehyde, MDA)、超氧化物酶(superoxide dismutase, SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GSH-PX)和4-羟基壬烯酸(hydroxynonenal, HNE)检测按试剂盒推荐的方法进行。

1.2.3 借助HE和Masson染色观察肝组织纤维化程度: 取大鼠组织, 4%甲醛溶液固定, 石蜡包埋, 切片, 常规HE和Masson染色, 光学显微镜下观察肝组织纤维化程度^[10]。S₀: 无纤维化; S₁: 有些汇管区纤维化±短纤维隔; S₂: 汇管区纤维化, 纤维隔形成; S₃: 多数汇管区纤维化, 偶有P-P汇管桥接纤维化; S₄: 汇管区纤维化伴明显的P-P汇管桥接纤维化和P-C汇管-中央桥接纤维化; S₅: 明显P-P汇管桥接纤维化/P-C汇管-中央桥接纤维化, 偶有结节; S₆: 肝硬化。

统计学处理 用SPSS11.0统计软件, 数据以mean±SD表示, 进行方差分析。多组间采用One-Way ANOVA分析, 病理学半定量资料用Kruskal-Wallis检验。P<0.05为具有显著性差异。

2 结果

2.1 各组大鼠病理学观察 正常对照组大鼠生长情况良好, 肝纤维化模型组大鼠一般情况差, 精神萎靡, 皮毛光泽度欠佳, 体质量增长缓慢。采用HE染色及Masson胶原纤维染色后, 显微镜下观察可见, 正常组肝组织小叶结构完整, 无肝细胞脂肪变或坏死、无炎性细胞浸润及纤维组织增生; 模型组肝组织病理损害严重, 肝细胞明显肿胀变性, 尤以脂肪变性为甚, 部分出现气球样变性, 肝小叶结构被破坏, 肝小叶周围明显坏死, 纤维组织增生并形成假小叶(图1)。18 α -GL干预组肝组织未形成明显的假小叶, 只有少量纤维组织增生, 多仅局限于汇管区, 而肝细胞脂肪变性为主。各组纤维化分期见表1。

2.2 18 α 甘草酸对氧化应激的作用 作为脂质过氧

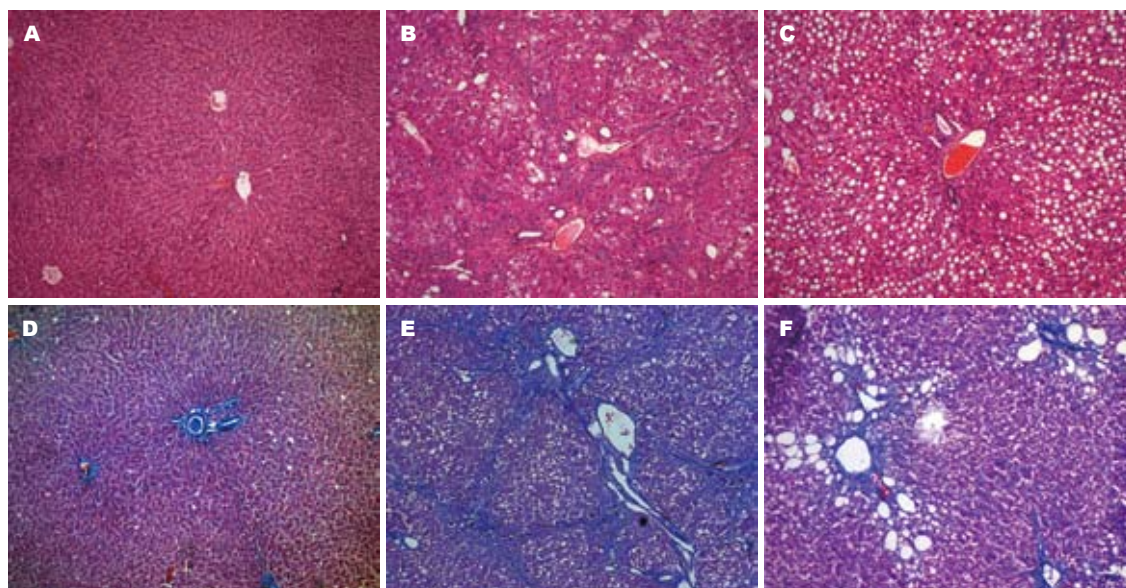


图1 各组大鼠病理组织学变化(HE和Masson染色, $\times 100$)。A-C: 正常组、造模组和18 α 甘草酸高剂量HE染色; D-F: 正常组、造模组和18 α 甘草酸高剂量Masson染色。

■ 相关报道

肝纤维化的发生发展与氧化应激、氧自由基损伤和脂质过氧化等有关。GL通过抗炎、抗脂质过氧化、调节免疫和稳定溶酶体等作用,可有效地防治实验性和临床各种肝损害,为抗肝纤维化新途径提供了理论依据。

表1 各组大鼠纤维化分期

	病理学分期	<i>P</i> 值
对照组	0	0.000
肝纤维化组	5.17 \pm 0.83	
低剂量GL组	4.20 \pm 1.03	0.034
中剂量GL组	3.83 \pm 1.11	0.006
高剂量GL组	3.58 \pm 1.31	0.005

化指标,模型组大鼠肝脏组织中检测出的MDA和HNE含量较正常组有显著升高($P < 0.05$),而各剂量用药组的大鼠肝组织中,MDA和HNE的含量都较模型组有下降,尤其是中高剂量更有显著性差异($P < 0.05$)。SOD和GSH-PX能清除自由基,保护细胞免受损伤,反映了机体的抗氧化能力。模型组中其含量较对照组显著下降,反映了CCl₄可诱导产生自由基,消耗机体内的抗氧化酶;而各个用药组大鼠肝脏组织中SOD和GSH-PX的活力都保持在较高的水平(表2),说明18 α -GL能够提高大鼠肝脏组织中SOD和GSH-PX的活力。

3 讨论

肝纤维化是许多肝脏疾病的一个中间发展环节,肝脏纤维化改变后若得不到有效治疗,最终会发展为肝硬化、甚至肝癌和肝衰竭,而目前认为纤维化病理过程可逆,因而治疗肝纤维化也成为肝病治疗的一个重要环节^[11,12]。随着对肝纤维化形成机制的深入认识,纤维化检测手段的

不断改善,对于治疗肝纤维化药物的研究和开发取得了一定进展,这些药物通过不同的环节和作用机制对肝脏纤维化进行干预,并且保护了肝脏的功能。由于植物药来源于自然,具有作用温和、毒性低等特点,目前已经有多种植物药在体外细胞实验、体内动物实验甚至临床实验中表现出良好的应用前景^[13-15]。我国具有悠久的中医中药研究应用历史,又具有丰富的药用植物资源,深入研究和开发植物来源药物用于肝纤维化的治疗显示了其广阔的应用前景。甘草为多年生草本植物甘草的根及根茎,为临床上最为常用的中草药之一^[16,17]。我们实验采用18 α -GL来研究其在CCl₄大鼠肝纤维化中的作用和机制。

CCl₄为一种选择性肝毒性药物,其作用机制为进入肝脏后引起肝小叶内中央肝静脉周围细胞坏死,导致纤维增生,该模型适合于肝纤维化发生、发展过程的动态观察和研究,是目前国内外常采用的动物模型^[18-20]。我们发现CCl₄皮下注射8 wk后,肝组织病理学检查可见肝组织内厚薄不一的纤维间隔包绕肝小叶,形成假小叶,具有肝纤维化的特征,表明造模成功。而且病理组织学观察及分期发现18 α -GL能改善CCl₄大鼠肝纤维程度,尤其是高剂量组改善最明显,说明18 α -GL能够预防实验性大鼠肝纤维化的进展。

我们实验中还发现模型组大鼠肝脏组织匀浆中脂质过氧化产物MDA和HNE的含量明显升高,抗氧化酶SOD和GSH-PX活力明显降低,提

■创新盘点

本研究采用CCl₄诱导大鼠肝纤维化模型,从氧化应激角度探讨18α-甘草酸(18α-GL)对大鼠肝纤维化的作用,表明18α-GL能够改善肝纤维化大鼠病理,具有抗氧化和抗纤维化作用。

表 2 肝组织氧化应激指标HNE、MDA、SOD以及GSH-PX的检测

	HNE(mg/L)	MDA(nmol/mg Prot)	SOD(U/mg Prot)	GSH-PX(U/mg Prot)
对照组	1.47 ± 0.23 ^c	1.35 ± 0.31 ^c	121.18 ± 15.66 ^c	70.14 ± 7.05 ^{ce}
肝纤维化组	3.16 ± 0.69 ^{ae}	3.12 ± 0.76 ^{ae}	90.12 ± 20.98 ^{ae}	50.13 ± 5.50 ^{ae}
低剂量GL组	3.05 ± 0.70 ^{ae}	2.77 ± 0.71 ^{ae}	98.36 ± 13.92 ^{ae}	56.50 ± 6.86 ^a
中剂量GL组	2.40 ± 0.57 ^{ac}	1.88 ± 0.48 ^c	117.52 ± 14.72 ^c	58.15 ± 6.36 ^{ac}
高剂量GL组	2.00 ± 0.56 ^c	1.36 ± 0.42 ^c	122.82 ± 25.54 ^c	62.33 ± 5.78 ^{ac}

^aP<0.05 vs 对照组; ^cP<0.05 vs 肝纤维化组; ^eP<0.05 vs 高剂量GL组。

示氧化应激在肝纤维化的发生发展中起到了重要作用。Wang等^[21]发现CCl₄诱导肝纤维化模型中MDA以及促炎症因子的显著性升高,而GSH-PX和SOD显著降低。Tipoe等^[5]也在肝纤维化小鼠模型中发现了氧化应激状态,并认为抗氧化剂通过减轻氧化应激而保护肝损伤和改善纤维化。Ferré等^[22]在肝硬化患者中发现在调节OS和脂类代谢中具有重要抗氧化活性的对氧磷酶-1(paraoxonase-1, PON-1)在血清和肝脏中显著增加,但活性显著降低,可能是PON-1在水解脂质过氧化后活性降低或者高密度脂蛋白的结构发生变化导致PON-1活性下降。另外有报道ROS能促进HSC通过上调核转录因子KLF6(Kruppel-like factor 6)分泌TGF-β1^[23],并激活HSC转化为肌成纤维细胞^[24]。体外研究还发现CCl₄单独作用培养的HSC并不引起其活化,而将CCl₄处理过的肝细胞条件培养液作用HSC,可引起HSC活化^[25],同样经氧化应激处理过的肝细胞条件培养液也能引起HSC活化^[26],表明CCl₄引起的肝纤维化中,氧化应激主要通过诱导肝细胞损伤旁分泌刺激HSC活化。

正常状态下机体产生少量的ROS参与代谢,在病理条件下,ROS产生过多或抗氧化系统活性下降,可引发脂质过氧化反应损伤细胞膜使细胞受损^[27]。ROS与生物膜的磷脂、酶和膜受体相关的多不饱和脂肪酸的侧链及核酸等大分子物质起脂质过氧化反应形成脂质过氧化产物(LPO)如MDA和HNE,导致细胞膜、线粒体膜等生物膜结构的异常及功能障碍^[28,29],从而最终导致细胞结构和功能的改变,MDA和HNE含量间接反映了组织过氧化的损伤程度。机体为了防御新陈代谢及其他生命活动中氧自由基的损伤和破坏,在组织和细胞中建立和形成一套完善的抗氧化防御体系,而SOD是这个体系中的一种重要金属酶。检测SOD含量的变化可作为衡量肝损伤程度的指标。GSH-PX是机体内广泛存

在的一种重要的催化H₂O₂分解的酶,他特异性催化GSH与H₂O₂的反应,进而清除有害的氧化代谢产物,阻断脂质过氧化连锁反应,从而保护细胞免收氧化应激损伤。GL的抗氧化作用也有报道,GL对硫唑嘌呤诱导的人肝细胞内GSH的减少也显示出有效的保护作用,这种现象可能与甘草的某些成分能抑制自由基生成相关的酶和保护线粒体膜通透性,进而减少反应性氧自由基积聚有关^[30]。Tripathi等^[31]研究丁基过氧化氢可使肝细胞内GSH下降、ROS升高、脂质过氧化、细胞内抗氧化防御功能受损、线粒体膜去极化、DNA破碎、染色体固缩、细胞色素C释放和半胱天冬酶激活。GL预处理后可减少丁基过氧化氢诱导的反应性氧自由基的生成,使得GSH下降不明显。我们实验中发现18α-GL干预组能够有效的提高SOD和GSH-PX酶的活力,而显著降低MDA和HNE含量,认为可以改善组织内氧化应激状态。而对血清转氨酶的改善作用认为是通过药物的抗自由基损伤作用,从而减少了自由基对肝细胞的破坏,保护了肝细胞。

总之,氧化应激是CCl₄诱导大鼠肝纤维化的重要机制,18α-GL能够明显改善纤维化大鼠组织病理学变化,抑制CCl₄诱导的肝纤维化进程,可能机制通过诱导肝组织内SOD和GSH-PX酶的活力,增强细胞的抗氧化能力,阻断氧化应激过程,降低脂质过氧化产物MDA和HNE产量,而减少了对肝脏细胞长期攻击,减轻肝损伤,抑制纤维化进程。

4 参考文献

- 1 Lee UE, Friedman SL. Mechanisms of hepatic fibrogenesis. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2011; 25: 195-206
- 2 Friedman SL. Liver fibrosis -- from bench to bedside. *J Hepatol* 2003; 38 Suppl 1: S38-S53
- 3 Bataller R, Brenner DA. Liver fibrosis. *J Clin Invest* 2005; 115: 209-218
- 4 Simula MP, De Re V. Hepatitis C virus-induced oxidative stress and mitochondrial dysfunction: a

- focus on recent advances in proteomics. *Proteomics Clin Appl* 2010; 4: 782-793
- 5 Tipoe GL, Leung TM, Liong EC, Lau TY, Fung ML, Nanji AA. Epigallocatechin-3-gallate (EGCG) reduces liver inflammation, oxidative stress and fibrosis in carbon tetrachloride (CCl₄)-induced liver injury in mice. *Toxicology* 2010; 273: 45-52
- 6 Clichici S, Catoi C, Mocan T, Filip A, Login C, Nagy A, Daicoviciu D, Decea N, Gherman C, Moldovan R, Muresan A. Non-invasive oxidative stress markers for liver fibrosis development in the evolution of toxic hepatitis. *Acta Physiol Hung* 2011; 98: 195-204
- 7 Kumada H. Long-term treatment of chronic hepatitis C with glycyrrhizin [stronger neo-minophagen C (SNMC)] for preventing liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma. *Oncology* 2002; 62 Suppl 1: 94-100
- 8 Iino S, Tango T, Matsushima T, Toda G, Miyake K, Hino K, Kumada H, Yasuda K, Kuroki T, Hirayama C, Suzuki H. Therapeutic effects of stronger neo-minophagen C at different doses on chronic hepatitis and liver cirrhosis. *Hepatol Res* 2001; 19: 31-40
- 9 Veldt BJ, Hansen BE, Ikeda K, Verhey E, Suzuki H, Schalm SW. Long-term clinical outcome and effect of glycyrrhizin in 1093 chronic hepatitis C patients with non-response or relapse to interferon. *Scand J Gastroenterol* 2006; 41: 1087-1094
- 10 Ishak K, Baptista A, Bianchi L, Callea F, De Groote J, Gudat F, Denk H, Desmet V, Korb G, MacSween RN. Histological grading and staging of chronic hepatitis. *J Hepatol* 1995; 22: 696-699
- 11 Povero D, Busletta C, Novo E, di Bonzo LV, Cannito S, Paternostro C, Parola M. Liver fibrosis: a dynamic and potentially reversible process. *Histol Histopathol* 2010; 25: 1075-1091
- 12 Pinzani M, Rombouts K. Liver fibrosis: from the bench to clinical targets. *Dig Liver Dis* 2004; 36: 231-242
- 13 Seeff LB, Curto TM, Szabo G, Everson GT, Bonkovsky HL, Dienstag JL, Shiffman ML, Lindsay KL, Lok AS, Di Bisceglie AM, Lee WM, Ghany MG. Herbal product use by persons enrolled in the hepatitis C Antiviral Long-Term Treatment Against Cirrhosis (HALT-C) Trial. *Hepatology* 2008; 47: 605-612
- 14 Wang R, Kong J, Wang D, Lien LL, Lien EJ. A survey of Chinese herbal ingredients with liver protection activities. *Chin Med* 2007; 2: 5
- 15 Luk JM, Wang X, Liu P, Wong KF, Chan KL, Tong Y, Hui CK, Lau GK, Fan ST. Traditional Chinese herbal medicines for treatment of liver fibrosis and cancer: from laboratory discovery to clinical evaluation. *Liver Int* 2007; 27: 879-890
- 16 Sato H, Goto W, Yamamura J, Kurokawa M, Kageyama S, Takahara T, Watanabe A, Shiraki K. Therapeutic basis of glycyrrhizin on chronic hepatitis B. *Antiviral Res* 1996; 30: 171-177
- 17 Ashfaq UA, Masoud MS, Nawaz Z, Riazuddin S. Glycyrrhizin as antiviral agent against Hepatitis C Virus. *J Transl Med* 2011; 9: 112
- 18 Desmyter L, Fan YD, Praet M, Jaworski T, Vervecken W, De Hemptinne B, Contreras R, Chen C. Rating of CCl₄-induced rat liver fibrosis by blood serum glycomics. *J Gastroenterol Hepatol* 2007; 22: 1148-1154
- 19 Huang Q, Xie Q, Shi CC, Xiang XG, Lin LY, Gong BD, Zhao GD, Wang H, Jia NN. Expression of angiotensin-converting enzyme 2 in CCl₄-induced rat liver fibrosis. *Int J Mol Med* 2009; 23: 717-723
- 20 Muriel P, Moreno MG, Hernández Mdel C, Chávez E, Alcantar LK. Resolution of liver fibrosis in chronic CCl₄ administration in the rat after discontinuation of treatment: effect of silymarin, silibinin, colchicine and trimethylcolchicinic acid. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2005; 96: 375-380
- 21 Wang H, Wei W, Wang NP, Gui SY, Wu L, Sun WY, Xu SY. Melatonin ameliorates carbon tetrachloride-induced hepatic fibrogenesis in rats via inhibition of oxidative stress. *Life Sci* 2005; 77: 1902-1915
- 22 Ferré N, Marsillach J, Camps J, Mackness B, Mackness M, Riu F, Coll B, Tous M, Joven J. Paraoxonase-1 is associated with oxidative stress, fibrosis and FAS expression in chronic liver diseases. *J Hepatol* 2006; 45: 51-59
- 23 Stärkel P, Sempoux C, Leclercq I, Herin M, Deby C, Desager JP, Horsmans Y. Oxidative stress, KLF6 and transforming growth factor-beta up-regulation differentiate non-alcoholic steatohepatitis progressing to fibrosis from uncomplicated steatosis in rats. *J Hepatol* 2003; 39: 538-546
- 24 Isono M, Soda M, Inoue A, Akiyoshi H, Sato K. Reverse transformation of hepatic myofibroblast-like cells by TGFbeta1/LAP. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 311: 959-965
- 25 Bedossa P, Houghlum K, Trautwein C, Holstege A, Chojkier M. Stimulation of collagen alpha 1(I) gene expression is associated with lipid peroxidation in hepatocellular injury: a link to tissue fibrosis? *Hepatology* 1994; 19: 1262-1271
- 26 Svegliati Baroni G, D'Ambrosio L, Ferretti G, Casini A, Di Sario A, Salzano R, Ridolfi F, Saccomanno S, Jezequel AM, Benedetti A. Fibrogenic effect of oxidative stress on rat hepatic stellate cells. *Hepatology* 1998; 27: 720-726
- 27 杨丽丽, 柳涛, 王淼, 邢练军, 季光, 郑培永. 氧化应激与非酒精性脂肪性肝病研究进展. *世界华人消化杂志* 2009; 17: 896-900
- 28 Magder S. Reactive oxygen species: toxic molecules or spark of life? *Crit Care* 2006; 10: 208
- 29 Finkel T, Holbrook NJ. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* 2000; 408: 239-247
- 30 Wu YT, Shen C, Yin J, Yu JP, Meng Q. Azathioprine hepatotoxicity and the protective effect of liquorice and glycyrrhizic acid. *Phytother Res* 2006; 20: 640-645
- 31 Tripathi M, Singh BK, Kakkar P. Glycyrrhizic acid modulates t-BHP induced apoptosis in primary rat hepatocytes. *Food Chem Toxicol* 2009; 47: 339-347

同行评价

通过建立肝纤维化模型,观察18 α -GL对CCl₄肝纤维化大鼠氧化应激的影响,该研究是预防和治疗肝纤维化的重要课题,相关内容有重要的参考价值。

编辑 张姗姗 电编 闫晋利

平滑肌特异性PGC-1 α 转基因小鼠抗急性结肠炎的效应及其机制

刘一笑, 陈腾飞, 王梦雨, 崔鑫, 唐寅, 黄薇, 张玲, 刘占举, 刘国庆

■背景资料

炎症性肠病(IBD)与环境、遗传、感染及免疫等因素相关。多数IBD患者病情反复, 迁延不愈。因此, 明确IBD的发病机制, 寻找新的潜在基因治疗靶点, 对预防及治疗IBD具有重大理论及实际意义。

刘一笑, 王梦雨, 崔鑫, 唐寅, 黄薇, 张玲, 刘国庆, 北京大学医学部心血管所教育部分子心血管学重点实验室 北京市100191

陈腾飞, 刘占举, 同济大学附属第十人民医院胃肠科 上海市200072

刘一笑, 在读硕士, 主要从事平滑肌特异性PGC-1 α 转基因动物的表型研究。

作者贡献分布: 此课题由刘国庆与刘占举设计; 动物模型由陈腾飞、刘一笑及王梦雨制作完成; 转基因小鼠肠道蛋白表达Western blot检测由崔鑫完成; 结肠病理评分由陈腾飞完成; 体质量及日常指标记录由王梦雨与刘一笑完成; 动物取材由刘一笑、王梦雨、崔鑫及唐寅完成; 普通PCR、实时定量PCR(Real-time PCR)、切片、数据记录及统计由刘一笑完成; 论文写作由黄薇与刘一笑完成。

通讯作者: 刘国庆, 教授, 博士研究生导师, 100191, 北京市海淀区学院路38号, 北京大学医学部心血管研究所。

georgeliu@bjmu.edu.cn

电话: 010-82802769

收稿日期: 2012-04-18 修回日期: 2012-05-15

接受日期: 2012-05-18 在线出版日期: 2012-07-18

Smooth muscle-specific overexpression of PGC-1 α protects mice from acute colitis

Yi-Xiao Liu, Teng-Fei Chen, Meng-Yu Wang, Xin Cui, Yin Tang, Wei Huang, Ling Zhang, Zhan-Ju Liu, George Liu

Yi-Xiao Liu, Meng-Yu Wang, Xin Cui, Yin Tang, Wei Huang, Ling Zhang, George Liu, Institute of Cardiovascular Science & Key Laboratory of Molecular Cardiovascular Science of Ministry of Education, Peking University Health Science Center, Beijing 100191, China

Teng-Fei Chen, Zhan-Ju Liu, Department of Gastroenterology, Shanghai Tenth People's Hospital, Tongji University, Shanghai 200072, China

Correspondence to: George Liu, Professor, Institute of Cardiovascular Science & Key Laboratory of Molecular Cardiovascular Science of Ministry of Education, Peking University Health Science Center, 38 Xueyuan Road, Haidian District, Beijing 100191, China. georgeliu@bjmu.edu.cn

Received: 2012-04-18 Revised: 2012-05-15

Accepted: 2012-05-18 Published online: 2012-07-18

Abstract

AIM: To investigate the effect of smooth muscle-specific overexpression of peroxidase proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 α (PGC-1 α) on dextran sulfate sodium (DSS)-induced acute colitis in mice.

METHODS: Two-month-old male mice were

divided into four groups according to genotype (non-Tg/Tg) and treatment (H₂O/DSS), 10-13 mice for each group. Mice were administered with 3% DSS in drinking water for 7 days (+DSS) to induce inflammatory bowel disease (IBD). Control groups were given normal drinking water (+H₂O). At the end of the study, the symptoms and pathological changes were evaluated using disease activity index (DAI) and histopathological score (HPS) of acute colitis, respectively. The mRNA levels of inflammatory cytokines in the colon were determined.

RESULTS: Compared to control groups, DSS-treated groups had significantly decreased body weight (both $P < 0.01$), increased DAI (both $P < 0.01$) and HPS (9.6 ± 1.2 vs 1.2 ± 0.4 ; 5.0 ± 0.8 vs 1.2 ± 0.6 , in non-Tg and Tg groups, respectively, both $P < 0.01$), and significantly shorter colon (5.0 cm \pm 0.3 cm vs 7.8 cm \pm 0.2 cm; 4.9 cm \pm 0.1 cm vs 8.0 cm \pm 0.3 cm, in non-Tg and Tg groups, respectively, both $P < 0.01$). Compared to the DSS-treated non-Tg group, the treated Tg group had significantly decreased DAI ($P < 0.01$), HPS (5.0 ± 0.8 vs 9.6 ± 1.2 , $P < 0.01$) and tumor necrosis factor α (TNF α) mRNA level (0.24 ± 0.07 vs 0.45 ± 0.10 , $P < 0.05$), and increased peroxidase proliferator-activated receptor γ (PPAR γ) mRNA level (0.98 ± 0.15 vs 0.41 ± 0.07 , $P < 0.05$).

CONCLUSION: Smooth muscle-specific overexpression of PGC-1 α protects against DSS-induced acute colitis by reducing the expression of inflammatory factor TNF α , which might result from the activation of PPAR γ .

Key Words: PGC-1 α ; Dextran sulfate sodium; Inflammatory bowel disease

Liu YX, Chen TF, Wang MY, Cui X, Tang Y, Huang W, Zhang L, Liu ZJ, Liu G. Smooth muscle-specific overexpression of PGC-1 α protects mice from acute colitis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2012; 20(20): 1824-1831

摘要

目的: 探讨平滑肌特异性过表达过氧化物

■同行评议者

姜慧卿, 教授, 河北医科大学第二医院消化科

酶增殖体激活受体 γ 辅助激活因子1 α (SMC-PGC-1 α)对葡聚糖硫酸钠(dextran sulfate sodium, DSS)诱导的小鼠急性结肠炎的影响。

方法: 按照SMC-PGC-1 α 转基因阴性/阳性(non-Tg/Tg)及诱导与否分为4组, 每组10-13只。诱导组给予3%DSS自由饮用7 d诱导急性结肠炎, 对照组则给予正常饮用水。通过疾病活动指数(disease activity index, DAI)评估及结肠组织病理学评分(histopathological score, HPS)来明确SMC-PGC-1 α 过表达对DSS诱导的小鼠急性结肠炎的影响, 并通过检测结肠炎相关基因mRNA表达水平的检测来研究SMC-PGC-1 α 抗结肠炎的作用机制。

结果: 诱导组相较于对照组: (1)体质量减轻明显($P<0.01$); (2)DAI明显升高($P<0.01$); (3)结肠长度明显缩短(non-Tg组中5.0 cm+0.3 cm vs 7.8 cm+0.2 cm; Tg组中4.9 cm+0.1 cm vs 8.0 cm+0.3 cm, $P<0.01$); (4)HSP明显加重(non-Tg组中9.6+1.2 vs 1.2+0.4; Tg组中5.0+0.8 vs 1.2+0.6, $P<0.01$)。说明肠炎造模成功。诱导组中, Tg组相较于non-Tg组: (1)DAI明显降低($P<0.01$); (2)HPS明显减轻(5.0+0.8 vs 9.6+1.2, 5.0+0.8 vs 1.2+0.6, $P<0.01$); (3)TNF α 基因表达水平降低(0.24+0.07 vs 0.45+0.10, $P<0.05$); (4)PPAR γ 基因表达水平增高(0.98+0.15 vs 0.41+0.07, $P<0.05$)。

结论: SMC-PGC-1 α 过表达可能通过激活PPAR γ , 降低炎症因子TNF α 的表达, 从而在DSS诱导的急性结肠炎中对结肠起到保护作用。

关键词: 过氧化物酶增殖体激活受体 γ 辅助激活因子1 α ; 葡聚糖硫酸钠; 炎性肠病

刘一笑, 陈腾飞, 王梦雨, 崔鑫, 唐寅, 黄薇, 张玲, 刘占举, 刘国庆. 平滑肌特异性PGC-1 α 转基因小鼠抗急性结肠炎的效应及其机制. 世界华人消化杂志 2012; 20(20): 1824-1831
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/1824.asp>

0 引言

炎症性肠病(inflammatory bowel disease, IBD)是指病因未明的肠道炎症性疾病。其发病机制尚未明确, 与环境、遗传、感染及免疫等因素相关。临床表现以腹痛、血性腹泻及发热为主。肠道组织病理改变以黏膜破坏、溃疡形成、组织增生、肠壁各层炎性细胞浸润等特征为主, 可累及肠壁全层, 常见于直肠和乙状结肠, 常并发梗阻、脓肿及瘘道形成、药物治疗效果差。多数IBD患者病情反复, 迁延不愈。因此, 明确IBD

的发病机制, 寻找新的潜在基因治疗靶点, 对预防及治疗IBD具有重大理论及实际意义。有研究发现人的结肠组织中有较高水平的过氧化物酶增殖体激活受体 γ (peroxisome proliferator-activated receptor γ , PPAR γ)表达^[1], 在炎症通路中, PPAR γ 是具有抗炎作用的重要转录因子, 他从上游对炎症因子表达进行调控的作用得到广泛关注和研究。已有不少研究表明给予PPAR γ 激动剂后有明显减轻IBD症状及降低炎症因子表达的作用^[2,3], 提示PPAR γ 可能成为IBD的潜在治疗靶点^[4]。在一项关于共轭亚油酸对IBD起保护作用的研究中, 发现伴随PPAR γ 的激活, 过氧化物酶增殖体激活受体 γ 辅助激活因子1 α (PGC-1 α)的表达水平也明显升高^[5]。另一项研究表明肠上皮细胞中PGC-1 α 也有丰富的表达, 并能通过独立途径调节活性氧水平从而调节线粒体介导的肠上皮细胞凋亡, 对肠道起到保护作用^[6]。以上结果均提示PGC-1 α 可能起到抗IBD的重要作用。结肠组织中有丰富的平滑肌组织, 人结肠分离的环状平滑肌细胞能够合成及分泌多种炎症因子^[7]参与肠道炎症反应。因此, 我们通过应用平滑肌特异性基因SM22 α 的启动子, 介导PGC-1 α 在平滑肌细胞的表达, 成功获得了在胃肠道高表达的PGC-1 α 的小鼠模型(SMC-PGC-1 α)。进而给予葡聚糖硫酸钠(dextran sulfate sodium, DSS)诱导急性结肠炎, 通过疾病活动指数(disease activity index, DAI)评估及结肠组织病理学评分(histopathological score, HPS)来明确SMC-PGC-1 α 过表达对DSS诱导的小鼠急性结肠炎的影响, 并通过检测结肠组织中结肠炎相关基因mRNA表达水平来评价SMC-PGC-1 α 抗IBD的作用机制。

1 材料和方法

1.1 材料 健康SPF级C57BL/6J δ 小鼠48只, 其中SMC-PGC-1 α 转基因小鼠(Tg)26只, 同窝阴性对照小鼠22(non-Tg)只, 8周龄, 体质量20-25 g。葡聚糖硫酸钠(DSS, 36 000-50 000 kDa, 美国MP Biochemicals公司); TRIzol Reagent(美国Invitrogen公司); RNA Transcript Kit(MML-V, 美国Promega公司); 100 bp DNA ladder(美国Promega公司); Real-time PCR Kit(日本TaKaRa公司); 蛋白酶抑制剂(cocktail, 德国Roche公司); 兔抗鼠PGC-1 α 多克隆抗体(美国Santa Cruz公司); HRP标记的羊抗兔二抗(中国中杉金桥生物技术有限公司); 发光液(美国Cell Signaling Technology公

■研发前沿

在炎症通路中, PPAR γ 是具有抗炎作用的重要转录因子, 他从上游对炎症因子表达进行调控的作用得到广泛关注和研究。

■相关报道

有研究表明PGC-1 α 作为PPAR γ 的辅助激活因子,其过表达能激活PPAR γ ,而PPAR γ 的激活能够抑制TNF α 或促进IL-10的基因表达。

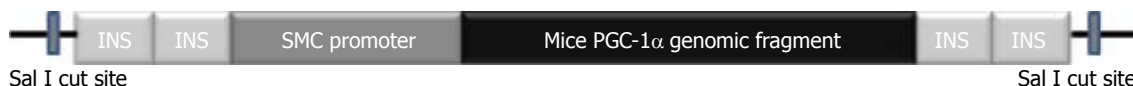


图1 用于受精卵原核显微注射的线性化片段. 带有平滑肌细胞表达SMC启动子的小鼠PGC-1 α 基因组片段。

司). Leica显微注射操作系统; Eppendoff离心机; Bio-Rad普通PCR仪; M-G research real time PCR仪; Olympus光学显微镜。

1.2 方法

1.2.1 转基因小鼠模型的构建及鉴定: 构建带有平滑肌SMC启动子的小鼠PGC-1 α 表达载体, 将其线性化后(图1)通过显微注射法注入受精卵雄原核区, 目的基因随受精卵有丝分裂随机整合到基因组, 将接受注射的受精卵通过输卵管回输至假孕雌鼠, 出生的F0代小鼠通过PCR进行基因型鉴定, 阳性小鼠再与野生型C57BL/6J小鼠杂交繁育出F1代, 繁殖至F6代, 遗传背景稳定时我们对结肠组织进行PGC-1 α 基因及蛋白的检测, 明确PGC-1 α 在结肠平滑肌中的表达水平. 取材时留取结肠组织两份进行液氮冻存, 其中一份加TRIzol匀浆后进行总RNA的提取, 反转录获得cDNA后用于PGC-1 α 基因水平检测; 另一份组织用添加蛋白酶抑制剂的RIPA裂解液匀浆后进行组织总蛋白的提取, 通过Western blot进行PGC-1 α 蛋白检测. F7-F8代用于本次实验。

1.2.2 分组及模型的建立: 实验动物分为4组-DSS诱导肠炎Tg及non-Tg组, 非诱导Tg及non-Tg组($n = 11-13$). DSS诱导肠炎组小鼠给予3%DSS自由饮用7 d诱导急性结肠炎, 非诱导组给予正常饮用水. 每天监测体质量、粪便性状及潜血, 于第7天动物取材. 对每只小鼠结肠进行长度测量后, 留取结肠组织两份: 一份甲醛固定后常规石蜡包埋, 切片后进行苏木精-伊红染色(hematoxylin-eosin staining, HE)染色; 另一份液氮冻存, 用于RNA提取。

1.2.3 DAI的测定: 肠炎DAI由3部分组成, 各分为5个等级, 对应0-4分-体质量的减轻程度(无、1%-5%、6%-10%、11%-20%、>20%)、大便秘性状(正常、疏松、稀便、介于稀便与腹泻之间、腹泻)及血便(无血、轻度血便、明显血便、介于明显血便与便血之间、便血), 3部分所得总分即为DAI^[8]。

1.2.4 结肠长度的测量: 结肠长度变短是结肠损伤的一个指标, 取材时留取肛门以上至回盲部的肠段用于长度测量。

1.2.5 HPS的评定: 将小鼠结肠组织进行石蜡包埋切片, HE染色后镜下观察, IBD病理改变主

要有炎症细胞浸润、溃疡形成、隐窝破坏、肠壁水肿及肠壁肌层的增生等. 病理评分按照炎症程度(无、轻度及重度对应0-2分), 病变深度(无、病变达黏膜下层、达肌层、达浆膜层对应0-3分), 隐窝破坏程度(无、基底1/3隐窝被破坏、基底2/3隐窝被破坏、仅有完整表面上皮、全部隐窝和上皮被破坏对应0-4分)及病变范围(1%-25%、26%-50%、51%-75%、76%-100%对应0-3分)4项进行, 各项得分的总和即为病理评分^[9]。

1.2.6 结肠相关基因表达水平检测: 提取总RNA, 反转录为cDNA后, Real-time PCR检测基因表达水平, GAPDH为内参. 引物均由北京奥科鼎盛生物科技有限公司合成, 引物序列见表1. PCR反应条件: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性10 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性15 s, 58 $^{\circ}\text{C}$ 退火30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸10 s, 40个扩增循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min. 反应结束后由Real-time PCR仪根据反应过程中产生的荧光信号进行数据处理得出Ct值^[10]. 结果表示为目的基因与内参GAPDH的mRNA表达量的比值。

统计学处理 应用SPSS17.0统计软件进行统计学处理, 数据用mean+SE表示. 数据分析采用因素方差分析(Anova)联合Fisher精确检验(Fisher's exact test); 非参数检验则用Wilcoxon秩和检验(Mann-Whitney). $P < 0.05$ 则表示有统计学差异。

2 结果

2.1 SMC-PGC-1 α 小鼠的基因型鉴定、组织mRNA及蛋白表达水平检测 成功构建SMC-PGC-1 α 转基因小鼠. 基因型鉴定结果, 有400 bp条带者为Tg, 无条带者为non-Tg. Tg组结肠PGC-1 α mRNA水平较non-Tg组明显增高, 约为non-Tg组的2倍(0.59 ± 0.10 vs 0.27 ± 0.02 , $P < 0.01$); Tg组蛋白表达水平也较non-Tg组明显增高. 结果表明, SMC-PGC-1 α 转基因小鼠构建成功并且结肠平滑肌高表达PGC-1 α (图1-4)。

2.2 SMC-PGC-1 α 过表达对急性肠炎DAI的影响 实验过程中, 非诱导组小鼠体质量稳定, 诱导组体质量明显减轻, 最严重的可降低为非诱导组的30%左右. 诱导组中, Tg组及non-Tg组体质量减轻程度并无明显差异(图5A). 非诱导组小鼠

表 1 PCR引物列表

引物名称	引物序列 ¹	扩增大小(bp)
TNF α	F: 5'-CTGTGAAGGGAATGGGTGTT-3' R: 5'-CAGGGAAGAATCTGGAAAGGTC-3'	384
IL-10	F: 5'-ACCTGGTAGAAGTGATGC-3' R: 5'-AAGGAGTTGTTCCGTTA-3'	366
TGF β	F: 5'-GGCGGTGCTCGCTTTGTA-3' R: 5'-TCCCGAATGTCTGACGTATTGA-3'	201
¹ PGC-1 α	F: 5'-CAGATGGAGCCGTGAC-3' R: 5'-TGCGACTGCGGTTGT-3'	400
² PGC-1 α -m	F: 5'-CACAAACGATGACCCTC-3' R: 5'-GCATGTTGCGACTGC-3'	107
PPAR γ	F: 5'-GACCACTCGCATTCTTT-3' R: 5'-CCACAGACTCGGCACTCA-3'	266
GAPDH	F: 5'-TGATGACATCAAGAAGGTGGTGAAG-3' R: 5'-TCCTTGGAGGCCATGTAGGCCAT-3'	240

F: 上游引物; R: 下游引物; ¹基因型鉴定引物; ²组织mRNA检测引物.



图 2 普通PCR基因型鉴定结果. 有400 bp条带的为转基因阳性(Tg), 无400 bp条带的为转基因阴性(non-Tg).



图 3 Western blot检测结肠PGC-1 α 蛋白表达.

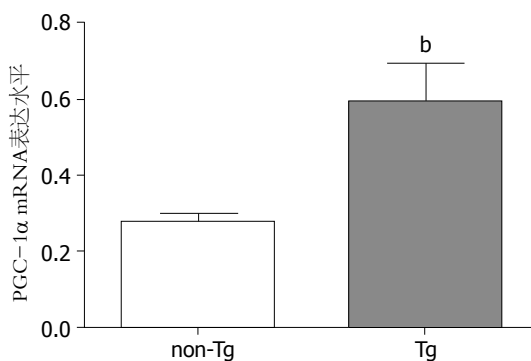


图 4 real-time PCR对结肠PGC-1 α mRNA水平进行定量($n = 7$ 或8). ^b $P < 0.01$ vs non-Tg组.

DAI一直处于基线水平, 相比之下, 诱导组DAI自第3天起则明显增高(图5B, $P < 0.01$). 取材时可见诱导组小鼠小肠、盲肠、结肠肠腔内有积血、结肠及直肠肠腔内有不成形稀便, 部分小鼠有血便(图6A), 诱导组结肠长度相对于非诱导组减少3 cm以上. 诱导组中, non-Tg组与Tg组间无明显区别(图6B, non-Tg诱导组 vs 非诱导

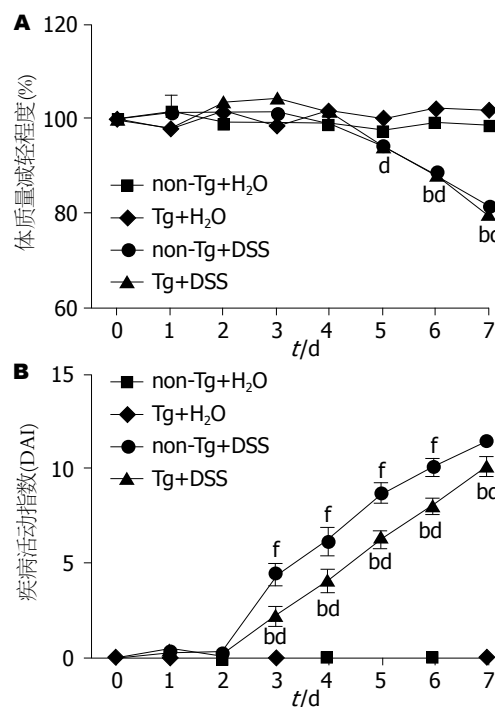


图 5 结肠炎诱导过程中, 体质量和疾病活动指数(DAI)变化曲线. A: 体质量变化曲线, 数值用每天体质量与初始(第0天)体质量的百分比来表示; B: 疾病活动指数(DAI)变化曲线.

组为5.0 cm+0.3 cm vs 7.8 cm+0.2 cm, Tg诱导组 vs 非诱导组为4.9 cm+0.1 cm vs 8.0 cm+0.3 cm, $P < 0.01$). 以上结果说明肠炎造模成功. 诱导组中, 相对于non-Tg组, Tg组DAI从第3天起明显降低($P < 0.01$), 说明SMC-PGC-1 α 有明显抗IBD的作用.

2.3 SMC-PGC-1 α 过表达对急性结肠炎的病理评分的影响 相对于non-Tg组, Tg组结肠黏膜破坏、

■创新盘点

本文应用SM22 α 的启动子驱动PGC-1 α 在平滑肌细胞表达, 成功建立了在胃肠道高表达PGC-1 α 的小鼠模型.

同行评价

本研究方法可靠, 结果可信, 具有一定的研究价值.

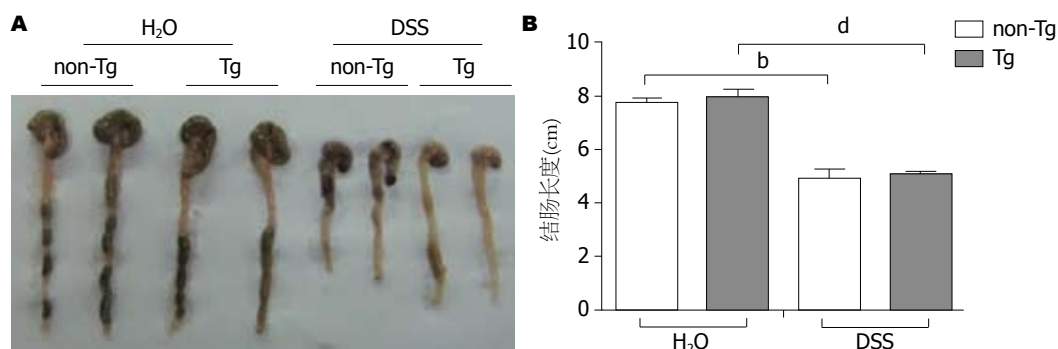


图6 结肠长度. A: 结肠全长肉眼观; B: DSS诱导后第7天结肠长度测定($n = 11-13$), ^b $P < 0.01$; ^d $P < 0.01$.

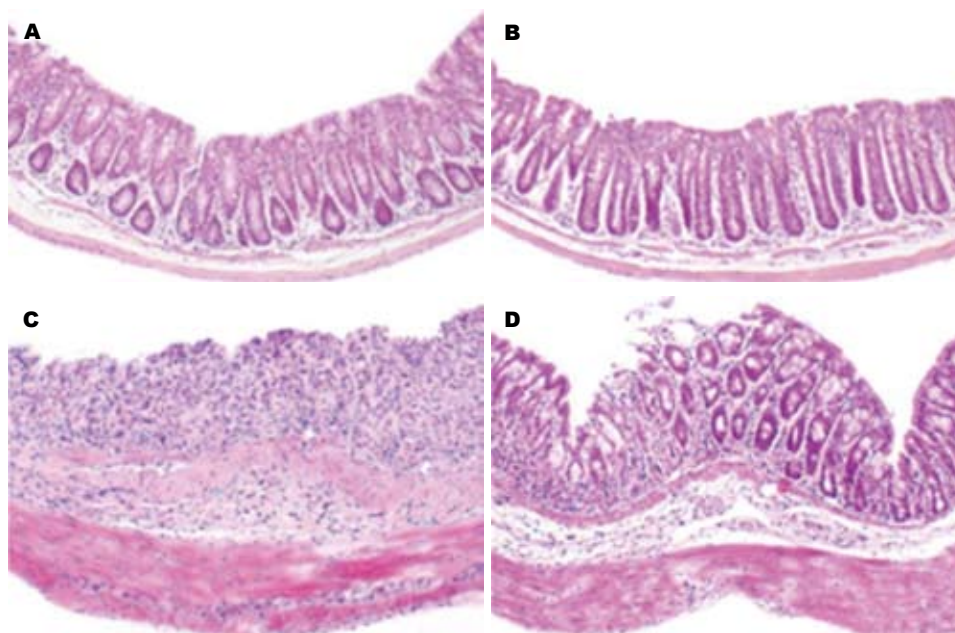


图7 结肠HE染色. A: non-Tg+H₂O组; B: Tg+H₂O组; C: non-Tg+DSS组; D: Tg+DSS组.

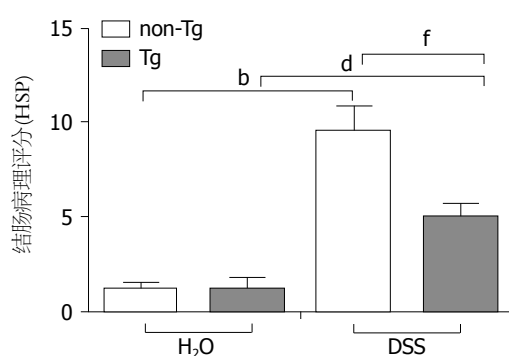


图8 结肠病理评分以评估结肠炎的严重程度. ^b $P < 0.01$; ^d $P < 0.01$; ^f $P < 0.01$.

肠壁水肿及炎性细胞浸润程度明显减轻(图7). HSP可见诱导组明显较非诱导组高(图8, non-Tg诱导组 *vs* 非诱导组为 9.6 ± 1.2 *vs* 1.2 ± 0.4 , $P < 0.01$; Tg诱导组 *vs* 非诱导组为 5.0 ± 0.8 *vs* 1.2 ± 0.6 , $P < 0.01$). 诱导组中, Tg组HSP明显较non-Tg组低(图8, 5.0 ± 0.8 *vs* 9.6 ± 1.2 , $P < 0.01$). 结果表明,

SMC-PGC-1 α 在DSS诱导的结肠炎中对结肠组织有明显保护作用.

2.4 结肠中SMC-PGC-1 α 过表达对结肠炎相关基因表达水平的影响 诱导组中, Tg组结肠组织肿瘤坏死因子 α (TNF α)基因表达水平低于non-Tg组60%(图9A, 0.24 ± 0.07 *vs* 0.45 ± 0.10 , $P < 0.05$). 两组间白介素10(IL-10)及转化生长因子 β 1(TGF β 1)表达水平无明显差异(图9B, C), 而Tg组PPAR γ 基因表达量较non-Tg组有明显增加, 约2.5倍(图9D, 0.98 ± 0.15 *vs* 0.41 ± 0.07 , $P < 0.05$).

3 讨论

我们应用SM22 α 的启动子驱动PGC-1 α 在平滑肌细胞表达, 成功建立了在胃肠道高表达PGC-1 α 的小鼠模型. 该小鼠模型呈现明显对抗DSS诱导的IBD的表型. 结肠组织中PPAR γ 基因表达上调而TNF α 表达下降, 从而抑制炎症进展, 为该小鼠模型抗IBD的可能机制.

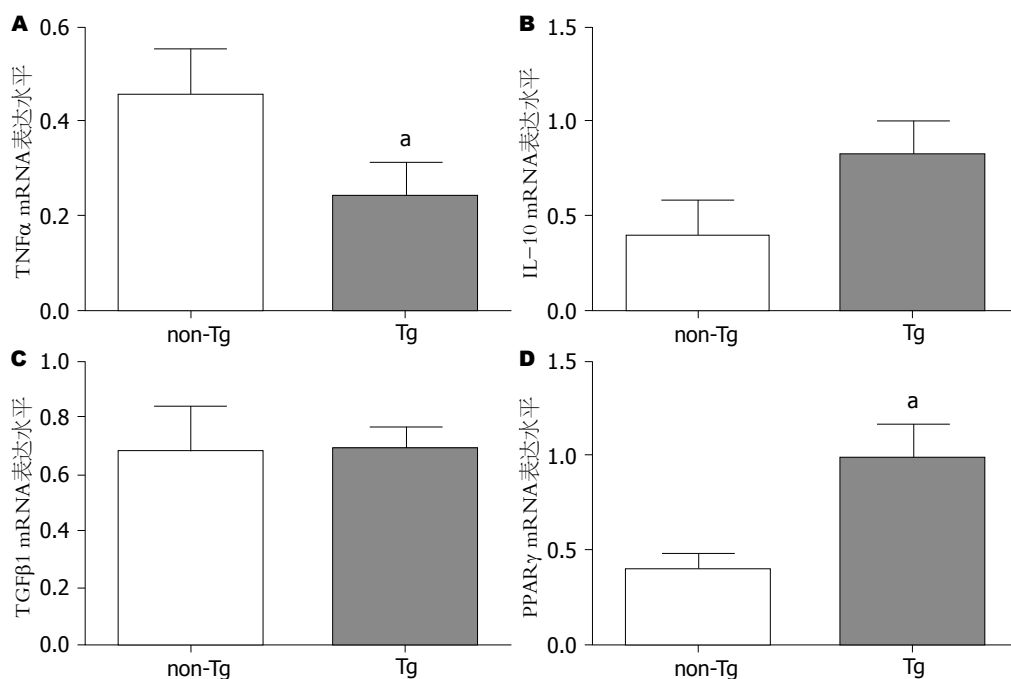


图9 平滑肌特异性过表达PGC-1 α 对局部结肠炎相关基因的表达影响. A: TNF α mRNA水平; B: IL-10 mRNA水平; C: TGF β 1 mRNA水平; D: PPAR γ mRNA水平. ^a $P < 0.05$ vs non-Tg组.

近年来对于PGC-1 α 的研究主要集中在肝脏、心肌、骨骼肌的线粒体功能、能量代谢及骨骼肌纤维表型转换等方面. PGC-1 α 全身敲除小鼠表现出多系统的能量代谢紊乱, 导致适应性产热障碍、肥胖、脂肪肝、I型骨骼肌纤维表型消失及运动能力降低、心功能下降. 其中, 心肌细胞线粒体电子传递相关基因表达水平下降且线粒体有氧呼吸的第3阶段消失; 骨骼肌细胞线粒体表型异常^[11-14]. 肝脏特异性PGC-1 α 敲除小鼠表现出高甘油三酯血症、糖异生障碍以及胰岛素信号通路的异常^[15]; 骨骼肌特异性PGC-1 α 敲除小鼠表现出运动能力下降、肌纤维损伤以及运动后血浆中炎症标志物TNF α 水平升高^[16]. 而骨骼肌特异性PGC-1 α 转基因小鼠, II型骨骼肌纤维会向I型骨骼肌纤维表型转化^[17]. 在心肌过表达PGC-1 α 则会引起与心肌能量需求不匹配的线粒体生物合成, 氧气过度消耗, 最终导致心脏结构异常及心功能减退^[18,19].

我们建立的平滑肌特异性PGC-1 α 转基因小鼠-SMC-PGC-1 α 小鼠在自然生长状态下无明显异常表型. 有鉴于IBD可能与平滑肌的炎症相关, 我们通过诱导转基因小鼠的IBD, 来观察平滑肌特异性PGC-1 α 表达对结肠炎的可能影响. 在诱导结肠炎过程中, 诱导组较非诱导组体质量减轻明显. 但在诱导组中, Tg与non-Tg组体质量减轻程度无明显差异; 而DAI则明显降低, 说明SMC-PGC-1 α 小鼠对IBD有一定耐受的能力. 与

此相一致, 结肠的病理评分显示, SMC-PGC-1 α 能减轻结肠组织黏膜破坏、肠壁水肿及炎性细胞浸润.

有研究表明PGC-1 α 作为PPAR γ 的辅助激活因子, 其过表达能激活PPAR γ ^[20], 而PPAR γ 的激活能够抑制TNF α 或促进IL-10的基因表达^[21,22]. 诸多临床研究报告TNF α 在IBD患者血浆及肠道局部活检组织表达上调, 并能造成肠上皮屏障功能障碍^[23,24]. 动物实验结果则表明通过抗体中和TNF α 或者药物抑制TNF α 水平升高能够明显减轻小鼠实验性结肠炎的症状及结肠病变^[25,26]. IL-10在结肠炎的发病过程中则作为重要的保护性细胞因子参与其进展^[27,28]. 我们的结果表明, 在结肠组织中, Tg诱导组较non-Tg组PPAR γ 的表达增加约2.5倍, TNF α 下降60%, IL-10也有增高趋势, 显示SMC-PGC-1 α 过表达抗IBD的作用主要是通过激活PPAR γ , 下调TNF α 的表达, 从而抑制炎症的进展.

本研究明确了SMC-PGC-1 α 在IBD中对结肠组织的保护作用, 并初步明确了其可能机制, 为寻找IBD潜在基因治疗靶点提供了研究基础. 而作为线粒体生物合成功能的重要调节基因, PGC-1 α 的表达水平会影响线粒体的生物合成及呼吸链电子传递的完整性, 最终对于活性氧的生成产生影响^[29,30]. 因此, 我们需要进一步对结肠平滑肌细胞的线粒体功能、局部活性氧(ROS)生成进行评估并对结肠组织氧化相关基

因进行检测,以研究PGC-1 α 转基因对平滑肌线粒体功能以及对结肠局部组织氧化/抗氧化系统平衡的影响,从而对SMC-PGC-1 α 抗IBD的机制进行比较全面的解释.

4 参考文献

- Fajas L, Auboeuf D, Raspé E, Schoonjans K, Lefebvre AM, Saladin R, Najib J, Laville M, Fruchart JC, Deeb S, Vidal-Puig A, Flier J, Briggs MR, Staels B, Vidal H, Auwerx J. The organization, promoter analysis, and expression of the human PPAR γ gene. *J Biol Chem* 1997; 272: 18779-18789
- Desreumaux P, Dubuquoy L, Nutton S, Peuchmaur M, Englaro W, Schoonjans K, Derijard B, Desvergne B, Wahli W, Chambon P, Leibowitz MD, Colombel JF, Auwerx J. Attenuation of colon inflammation through activators of the retinoid X receptor (RXR)/peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ) heterodimer. A basis for new therapeutic strategies. *J Exp Med* 2001; 193: 827-838
- Ramakers JD, Verstege MI, Thuijls G, Te Velde AA, Mensink RP, Plat J. The PPAR γ agonist rosiglitazone impairs colonic inflammation in mice with experimental colitis. *J Clin Immunol* 2007; 27: 275-283
- Dubuquoy L, Rousseaux C, Thuru X, Peyrin-Biroulet L, Romano O, Chavatte P, Chamaillard M, Desreumaux P. PPAR γ as a new therapeutic target in inflammatory bowel diseases. *Gut* 2006; 55: 1341-1349
- Bassaganya-Riera J, Reynolds K, Martino-Catt S, Cui Y, Hennighausen L, Gonzalez F, Rohrer J, Benninghoff AU, Hontecillas R. Activation of PPAR γ and δ by conjugated linoleic acid mediates protection from experimental inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 2004; 127: 777-791
- D'Errico I, Salvatore L, Murzilli S, Lo Sasso G, Latorre D, Martelli N, Egorova AV, Polishuck R, Madeyski-Bengtson K, Lelliott C, Vidal-Puig AJ, Seibel P, Villani G, Moschetta A. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator 1-alpha (PGC1alpha) is a metabolic regulator of intestinal epithelial cell fate. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011; 108: 6603-6608
- Salinthon S, Singer CA, Gerthoffer WT. Inflammatory gene expression by human colonic smooth muscle cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2004; 287: G627-G637
- Mchenga SS, Wang D, Janneh FM, Feng Y, Zhang P, Li Z, Lu C. Differential dose effects of recombinant IL-25 on the development of dextran sulfate sodium-induced colitis. *Inflamm Res* 2010; 59: 879-887
- Dieleman LA, Palmen MJ, Akol H, Bloemena E, Peña AS, Meuwissen SG, Van Rees EP. Chronic experimental colitis induced by dextran sulphate sodium (DSS) is characterized by Th1 and Th2 cytokines. *Clin Exp Immunol* 1998; 114: 385-391
- Fink L, Seeger W, Ermert L, Hänze J, Stahl U, Grimmer F, Kummer W, Bohle RM. Real-time quantitative RT-PCR after laser-assisted cell picking. *Nat Med* 1998; 4: 1329-1333
- Lin J, Wu PH, Tarr PT, Lindenberg KS, St-Pierre J, Zhang CY, Mootha VK, Jäger S, Vianna CR, Reznick RM, Cui L, Manieri M, Donovan MX, Wu Z, Cooper MP, Fan MC, Rohas LM, Zavacki AM, Cinti S, Shulman GI, Lowell BB, Krainc D, Spiegelman BM. Defects in adaptive energy metabolism with CNS-linked hyperactivity in PGC-1alpha null mice. *Cell* 2004; 119: 121-135
- Leone TC, Lehman JJ, Finck BN, Schaeffer PJ, Wende AR, Boudina S, Courtois M, Wozniak DF, Sambandam N, Bernal-Mizrachi C, Chen Z, Hollloszy JO, Medeiros DM, Schmidt RE, Saffitz JE, Abel ED, Semenkovich CF, Kelly DP. PGC-1alpha deficiency causes multi-system energy metabolic derangements: muscle dysfunction, abnormal weight control and hepatic steatosis. *PLoS Biol* 2005; 3: e101
- Arany Z, Novikov M, Chin S, Ma Y, Rosenzweig A, Spiegelman BM. Transverse aortic constriction leads to accelerated heart failure in mice lacking PPAR-gamma coactivator 1alpha. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103: 10086-10091
- Arany Z, He H, Lin J, Hoyer K, Handschin C, Toka O, Ahmad F, Matsui T, Chin S, Wu PH, Rybkin II, Shelton JM, Manieri M, Cinti S, Schoen FJ, Bassel-Duby R, Rosenzweig A, Ingwall JS, Spiegelman BM. Transcriptional coactivator PGC-1 alpha controls the energy state and contractile function of cardiac muscle. *Cell Metab* 2005; 1: 259-271
- Estall JL, Kahn M, Cooper MP, Fisher FM, Wu MK, Laznik D, Qu L, Cohen DE, Shulman GI, Spiegelman BM. Sensitivity of lipid metabolism and insulin signaling to genetic alterations in hepatic peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1alpha expression. *Diabetes* 2009; 58: 1499-1508
- Handschin C, Chin S, Li P, Liu F, Maratos-Flier E, Lebrasseur NK, Yan Z, Spiegelman BM. Skeletal muscle fiber-type switching, exercise intolerance, and myopathy in PGC-1alpha muscle-specific knock-out animals. *J Biol Chem* 2007; 282: 30014-30021
- Lin J, Wu H, Tarr PT, Zhang CY, Wu Z, Boss O, Michael LF, Puigserver P, Isotani E, Olson EN, Lowell BB, Bassel-Duby R, Spiegelman BM. Transcriptional co-activator PGC-1 alpha drives the formation of slow-twitch muscle fibres. *Nature* 2002; 418: 797-801
- Wu Z, Puigserver P, Andersson U, Zhang C, Adelman G, Mootha V, Troy A, Cinti S, Lowell B, Scarpulla RC, Spiegelman BM. Mechanisms controlling mitochondrial biogenesis and respiration through the thermogenic coactivator PGC-1. *Cell* 1999; 98: 115-124
- Lehman JJ, Barger PM, Kovacs A, Saffitz JE, Medeiros DM, Kelly DP. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 promotes cardiac mitochondrial biogenesis. *J Clin Invest* 2000; 106: 847-856
- Puigserver P, Wu Z, Park CW, Graves R, Wright M, Spiegelman BM. A cold-inducible coactivator of nuclear receptors linked to adaptive thermogenesis. *Cell* 1998; 92: 829-839
- Su CG, Wen X, Bailey ST, Jiang W, Rangwala SM, Keilbaugh SA, Flanagan A, Murthy S, Lazar MA, Wu GD. A novel therapy for colitis utilizing PPAR-gamma ligands to inhibit the epithelial inflammatory response. *J Clin Invest* 1999; 104: 383-389
- Celinski K, Dworzanski T, Korolczuk A, Piasecki R, Slomka M, Madro A, Fornal R. Effects of peroxisome proliferator-activated receptors-gamma ligands on dextran sodium sulphate-induced colitis in rats. *J Physiol Pharmacol* 2011; 62: 347-356
- Murch SH, Lamkin VA, Savage MO, Walker-Smith JA, MacDonald TT. Serum concentrations of tumour necrosis factor alpha in childhood chronic

- inflammatory bowel disease. *Gut* 1991; 32: 913-917
- 24 Murch SH, Braegger CP, Walker-Smith JA, MacDonald TT. Location of tumour necrosis factor alpha by immunohistochemistry in chronic inflammatory bowel disease. *Gut* 1993; 34: 1705-1709
- 25 Kojouharoff G, Hans W, Obermeier F, Männel DN, Andus T, Schölmerich J, Gross V, Falk W. Neutralization of tumour necrosis factor (TNF) but not of IL-1 reduces inflammation in chronic dextran sulphate sodium-induced colitis in mice. *Clin Exp Immunol* 1997; 107: 353-358
- 26 Myers KJ, Murthy S, Flanagan A, Witchell DR, Butler M, Murray S, Siwkowski A, Goodfellow D, Madsen K, Baker B. Antisense oligonucleotide blockade of tumor necrosis factor-alpha in two murine models of colitis. *J Pharmacol Exp Ther* 2003; 304: 411-424
- 27 Lindsay JO, Hodgson HJ. Review article: the immunoregulatory cytokine interleukin-10—a therapy for Crohn's disease? *Aliment Pharmacol Ther* 2001; 15: 1709-1716
- 28 Larmonier CB, Uno JK, Lee KM, Karrasch T, Laubitz D, Thurston R, Midura-Kiela MT, Ghishan FK, Sartor RB, Jobin C, Kiela PR. Limited effects of dietary curcumin on Th-1 driven colitis in IL-10 deficient mice suggest an IL-10-dependent mechanism of protection. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2008; 295: G1079-G1091
- 29 St-Pierre J, Drori S, Uldry M, Silvaggi JM, Rhee J, Jäger S, Handschin C, Zheng K, Lin J, Yang W, Simon DK, Bachoo R, Spiegelman BM. Suppression of reactive oxygen species and neurodegeneration by the PGC-1 transcriptional coactivators. *Cell* 2006; 127: 397-408
- 30 Puigserver P, Spiegelman BM. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator 1 alpha (PGC-1 alpha): transcriptional coactivator and metabolic regulator. *Endocr Rev* 2003; 24: 78-90

编辑 曹丽鸥 电编 闫晋利

ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) CN 14-1260/R 2012年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

WJG 成功通过评审被 PMC 收录

本刊讯 PubMed Central(PMC)是由美国国家医学图书馆(NLM)下属国家生物技术信息中心(NCBI)创立的开放存取(Open Access)的生物医学和生命科学全文数据库。此数据库只收录采取国际同行评审制度评议的期刊,并对收录期刊有较高的科学、编辑及数据文件质量要求。

截至目前,我国只有两本期刊被PMC收录。《浙江大学学报B》(英文版)(*Journal of Zhejiang University Science B*)是我国第一本通过PMC评审并于2006-03-15被收录的期刊。《世界胃肠病学杂志》(英文版)(*World Journal of Gastroenterology, WJG*)第二本通过PMC评审并于2009-03-26被收录,全文免费向公众开放,见: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/tocrender.fcgi?journal=818&action=archive> (WJG编辑部主任:程剑侠 2009-03-26)

MMP-9和TIMP-1在胃癌组织中的表达失衡及其与ZHX2的相关性

陈其军, 吕自力, 党裔武, 魏晶晶

■背景资料

近年来的研究表明基质金属蛋白酶(MMPs)家族与基质金属蛋白酶组织抑制剂(TIMPs)家族表达失衡与多种肿瘤的浸润和转移密切相关, 此外, ZHX2的过表达与胃癌的浸润深度有关。本研究旨在探讨胃癌组织中是否存在MMPs/TIMPs表达失衡? 这种失衡与ZHX2蛋白过表达有无相关性。

陈其军, 吕自力, 党裔武, 魏晶晶, 广西医科大学第一附属医院病理科 广西壮族自治区南宁市 530021

陈其军, 在读硕士, 主要从事肿瘤病理研究。

广西青年科学基金资助项目, No. 0728057

作者贡献分布: 此课题由陈其军与吕自力设计; 研究过程由陈其军、党裔武及魏晶晶操作完成; 研究所用新试剂及分析工具由党裔武提供; 数据分析由陈其军完成; 论文书写由陈其军与吕自力完成。

通讯作者: 吕自力, 副教授, 530021, 广西壮族自治区南宁市, 广西医科大学第一附属医院病理科。lvzili@yahoo.com.cn

电话: 0771-5356534

收稿日期: 2012-03-26 修回日期: 2012-05-05

接受日期: 2012-06-29 在线出版日期: 2012-07-18

Correlation between MMP-9/TIMP-1 imbalance and ZHX2 expression in gastric carcinoma

Qi-Jun Chen, Zi-Li Lv, Yi-Wu Dang, Jing-Jing Wei

Qi-Jun Chen, Zi-Li Lv, Yi-Wu Dang, Jing-Jing Wei, Department of Pathology, the First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530021, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China

Supported by: the Youth Science Foundation of Guangxi, No. 0728057

Correspondence to: Zi-Li Lv, Associate Professor, Department of Pathology, the First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530021, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China. lvzili@yahoo.com.cn
Received: 2012-03-26 Revised: 2012-05-05
Accepted: 2012-06-29 Published online: 2012-07-18

Abstract

AIM: To detect the expression of matrix metalloproteinase 9 (MMP-9), tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) and ZHX2 in gastric carcinoma and to analyze their association with pathological features.

METHODS: Immunohistochemistry was used to examine the expression of MMP-9, TIMP-1, and ZHX2 proteins in 62 cases of gastric carcinoma and matched tumor-adjacent tissue specimens. The correlation of MMP-9, TIMP-1 and ZHX2 protein expression with clinicopathological characteristics of gastric carcinoma was then analyzed.

RESULTS: The positive rate of MMP-9 expres-

sion was significantly higher (66.13% vs 29.03%, $P < 0.01$), and that of TIMP-1 was significantly lower (41.94% vs 74.19%, $P < 0.01$) in gastric carcinoma than in tumor-adjacent tissue. The positive rate of MMP-9 expression was significantly higher in the ZHX2-positive group than in the ZHX2-negative group (84.44% vs 17.65%, $P < 0.05$). MMP-9 expression was not associated with age, gender, tumor size, tumor location, general type, tumor differentiation, lymph node metastasis, distant metastasis, or TNM stage, but was significantly associated with depth of invasion ($P < 0.05$). The positive rate of TIMP-1 expression was significantly lower in the ZHX2-positive group than in the ZHX2-negative group (28.89% vs 76.49%, $P < 0.05$). TIMP-1 expression was not associated with age, gender, tumor size, tumor location, general type, tumor differentiation, depth of invasion, lymph node metastasis, distant metastasis, or TNM stage.

CONCLUSION: Detection of MMP-9 protein expression may be used to assess the malignant biological behavior and prognosis of gastric carcinoma. MMP-9/TIMP-1 imbalance may be related to the expression of ZHX2 in gastric carcinoma.

Key Words: Matrix metalloproteinase 9; Tissue inhibitor of metalloproteinase-1; ZHX2; Gastric carcinoma; Clinicopathological features; Immunohistochemistry

Chen QJ, Lv ZL, Dang YW, Wei JJ. Correlation between MMP-9/TIMP-1 imbalance and ZHX2 expression in gastric carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2012; 20(20): 1832-1837

摘要

目的: 探讨胃癌中MMP-9和TIMP-1蛋白表达与ZHX2蛋白表达的关系, 并分析其与胃癌患者临床病理特征的相关性及其临床意义。

方法: 应用免疫组织化学Envision二步法检测62例胃癌组织及癌旁正常胃组织中MMP-9、TIMP-1及ZHX2蛋白的表达。用SPSS13.0统计

■同行评议者

邵先玉, 教授, 泰山医学院附属医院消化内科

软件分析MMP-9和TIMP-1蛋白表达与ZHX2蛋白表达的相关性, 并分析其与患者的临床病理特征的关系。

结果: MMP-9蛋白在62例胃癌组织及癌旁正常胃组织中阳性表达率分别为66.13%(41/62)和29.03%(18/62)($P<0.01$), TIMP-1蛋白在胃癌组织及癌旁正常胃组织中阳性表达率分别为41.94%(26/62)和74.19%(46/62)($P<0.01$)。MMP-9蛋白表达在ZHX2阳性和阴性表达组中的阳性率分别为: 84.44%(38/45)和17.65%(3/17)($P<0.05$), 与患者的年龄、性别、肿瘤大小、发生部位、大体类型、分化程度、淋巴结转移、远处转移、TNM分期均无关($P>0.05$), 而与肿瘤的浸润深度有关($P<0.05$); TIMP-1蛋白表达在ZHX2阳性和阴性组中阳性率分别为: 28.89%(13/45)和76.47%(13/17)($P<0.05$), 与患者的年龄、性别、肿瘤大小、发生部位、大体类型、分化程度、浸润深度、淋巴结转移、远处转移、TNM分期均无关($P>0.05$)。

结论: MMP-9高表达可以作为评估胃癌恶性生物学行为及预后的指标, MMP-9/TIMP-1表达失衡与ZHX2表达相关, MMP-9和TIMP-1可为临床选择化疗药物提供参考依据。

关键词: 基质金属蛋白酶9; 基质金属蛋白酶组织抑制剂; ZHX2; 胃癌组织; 临床病理特征; 免疫组织化学

陈其军, 吕自力, 党裔武, 魏晶晶. MMP-9和TIMP-1在胃癌组织中的表达失衡及其与ZHX2的相关性. 世界华人消化杂志 2012; 20(20): 1832-1837
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/1832.asp>

0 引言

胃癌(gastric carcinoma)是最常见的消化系统肿瘤, 其浸润和转移是影响生存质量和预后的主要因素, 也是影响治疗效果的重要因素之一^[1-4]。近年来的研究表明基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMPs)家族与基质金属蛋白酶组织抑制剂(tissue inhibitor of metalloproteinases, TIMPs)家族表达失衡与多种肿瘤的浸润和转移密切相关^[5-11], 我们既往的研究发现ZHX2的过表达与胃癌的浸润深度有关^[12]。那么胃癌组织中是否存在MMP-9/TIMP-1蛋白表达失衡? 这种失衡与ZHX2蛋白过表达是否有关? 与胃癌的临床病理特征是否有关? 因此, 本研究采用免疫组织化学方法检测62例胃癌组织及癌旁正常

胃组织中MMP-9、TIMP-1及ZHX2蛋白的表达, 现报道如下。

1 材料和方法

1.1 材料 收集2010-04/2011-06在广西医科大学第一附属医院接受胃大部切除术的胃癌标本62例作为试验组, 其中男42例, 女20例, 年龄26-81岁, 平均58.71岁; 收集癌旁正常胃组织(均距肿瘤边缘5 cm以上)62例作为对照组。所有病例术前均未行放化疗。胃癌TNM分期采用美国癌症联合会(AJCC)标准(2002), 其中I期7例, II期33例, III期14例, IV期8例。组织学分级: 其中高分化腺癌5例, 中分化腺癌14例, 低分化腺癌43例, 高-中分化组包括乳头状腺癌和管状腺癌, 低分化组包括低分化腺癌、印戒细胞癌和黏液腺癌。兔抗人MMP-9及TIMP-1即用型抗体购自北京中杉金桥生物技术有限公司; 免疫组织化学二步法Envision system、DAB显色液、即用型二抗购自上海长岛生物技术有限公司; 所有抗体试剂均按说明书要求保存和使用。

1.2 方法

1.2.1 免疫组织化学Envision二步法: 标本离体后立即40 g/L甲醛固定, 常规石蜡包埋制作切片, 切片烤片后二甲苯脱蜡, 乙醇水化, 柠檬酸抗原修复液高压修复, 3%过氧化氢灭活内源性过氧化物酶, MMP-9及TIMP-1即用型抗体室温2 h, 二抗室温20 min, DAB显色, 流水冲洗, 苏木素复染, 常规脱水/透明后中性树胶封片。以PBS代替一抗作阴性对照。

1.2.2 结果判定: MMP-9及TIMP-1阳性染色均呈棕黄色颗粒, 定位于胃癌细胞及胃黏膜上皮细胞的胞浆, 对免疫组织化学结果的评判: 以阳性细胞 $<10\%$ 为阴性(-), $\geq 10\%$ 的为阳性, 并根据阳性细胞所占比例分为: 10%-25%(+), 26%-50%(++), 51%-75%(+++), $>75\%$ (++++). ZHX2的阳性判断方法同前^[12]。

统计学处理 应用SPSS13.0软件进行统计处理, 组间比较采用 χ^2 检验或Fisher确切概率法, 等级相关性采用Spearman等级相关分析。

2 结果

2.1 MMP-9蛋白表达与胃癌患者临床病理特征的关系 MMP-9阳性表达呈棕黄色颗粒, 定位于胃癌细胞浆(图1)及胃黏膜上皮细胞浆。在62例胃癌组织中MMP-9蛋白阳性表达率为66.13%(41/62), 明显高于在癌旁正常胃组织中

■研究前沿

有关胃癌的浸润和转移是当前研究的热点。关于MMP-9和TIMP-1蛋白表达与ZHX2蛋白表达的相关性研究, 目前国内、外均未见相关文献报道。

■相关报道

众多学者研究发现MMP-9蛋白在胃癌组织中高表达,而TIMP-1蛋白在胃癌组织中表达却下调,表明在胃癌组织中存在MMP-9/TIMP-1蛋白表达失衡。

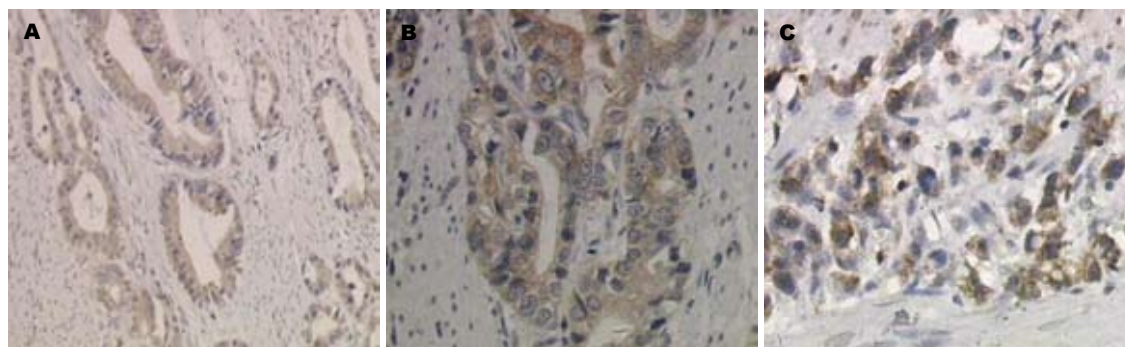


图1 MMP-9蛋白在胃癌组织的表达($\times 200$). A: 高分化腺癌; B: 中分化腺癌; C: 低分化腺癌。

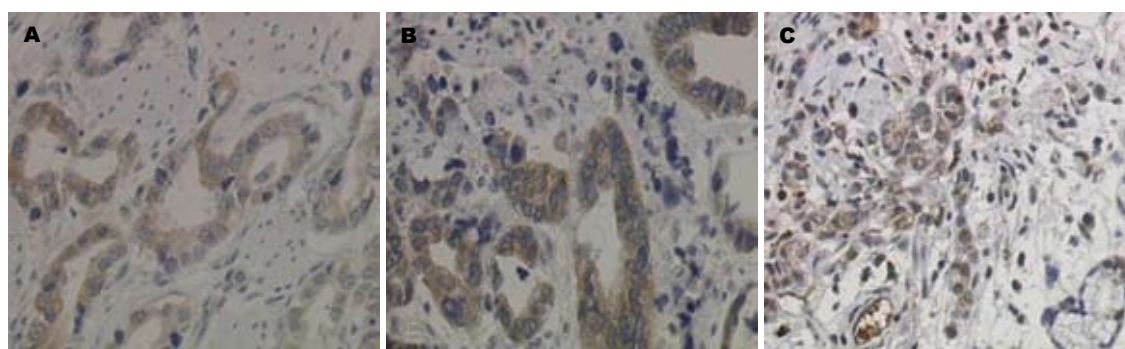


图2 TIMP-1蛋白在胃癌组织的表达($\times 200$). A: 高分化腺癌; B: 中分化腺癌; C: 低分化腺癌。

的表达(29.03%, 18/62, $P < 0.01$). MMP-9蛋白表达与患者的年龄、性别、肿瘤大小、发生部位、大体类型、分化程度、淋巴结转移、远处转移、TNM分期均无关($P > 0.05$),而与肿瘤的浸润深度有关($P < 0.05$, 表1).

2.2 TIMP-1蛋白表达与胃癌患者临床病理特征的关系 TIMP-1阳性表达呈棕黄色颗粒,定位于胃癌细胞浆(图2)及胃黏膜上皮细胞浆.在62例胃癌组织中TIMP-1蛋白阳性表达率为41.94%(26/62),明显低于在癌旁正常胃组织中的表达(74.19%, 46/62, $P < 0.01$). TIMP-1蛋白表达与患者的年龄、性别、肿瘤大小、发生部位、大体类型、分化程度、浸润深度、淋巴结转移、远处转移、TNM分期均无关($P > 0.05$, 表2).

2.3 胃癌组织中MMP-9、TIMP-1、ZHX2蛋白表达之间的关系 MMP-9蛋白的表达与ZHX2蛋白表达呈正相关($r = 0.630$, $P < 0.01$, 表3); TIMP-1蛋白的表达与ZHX2蛋白表达呈负相关($r = -0.430$, $P < 0.01$, 表4).

3 讨论

肿瘤的发生和发展是一个多步骤、多基因、多因素参与的复杂过程.其中MMPs和TIMPs在降解细胞外基质(extracellular matrix, ECM)过程

中起着重要作用,参与恶性肿瘤的浸润和转移,是恶性肿瘤浸润和转移调节的主要蛋白^[13-15]. MMPs是一类结构中含有 Zn^{2+} 的肽链内切酶家族,几乎能降解ECM的所有成分,体内存在许多抑制物可以特异性或者非特异性抑制MMPs的活性,主要是TIMPs^[16]. TIMPs由分泌MMPs的细胞同时分泌,是MMPs生理性抑制物,活性的MMPs受特定的TIMPs调节.在活化的MMPs阶段, TIMPs可直接与活化的MMPs形成紧密的1:1复合物,抑制其活性^[17,18].

MMPs家族中, MMP-9是重要的一员,而其抑制剂TIMPs中, TIMP-1作用最强,与MMP-9共同作用使ECM降解及修复维持动态平衡,对抑制肿瘤的浸润转移有重要作用^[19-22]. 本研究显示MMP-9蛋白在胃癌组织中存在高表达,而TIMP-1蛋白在胃癌组织中表达却下调,表明在胃癌组织中存在MMP-9/TIMP-1蛋白表达失衡,这与许多学者报道相符^[23-30]. 本研究还发现MMP-9蛋白阳性表达与患者的年龄、性别、肿瘤大小、发生部位、大体类型、分化程度、淋巴结转移、远处转移、TNM分期均无关($P > 0.05$),而与肿瘤的浸润深度有关($P < 0.05$). 而TIMP-1蛋白阳性表达与患者的年龄、性别、肿瘤大小、发生部位、大体类型、分化程度、浸

表 1 MMP-9蛋白表达与患者临床病理特征的关系

临床病理特征	<i>n</i>	+(<i>n</i>)	-(<i>n</i>)	阳性率(%)	<i>P</i> 值
性别					0.897
男	42	28	14	66.67	
女	20	13	7	65.00	
年龄(岁)					0.794
<60	28	19	9	67.86	
≥60	34	22	12	64.71	
肿瘤大小(cm)					0.798
<5	37	24	13	64.86	
≥5	25	17	8	68.00	
发生部位					0.326
胃底/贲门	12	8	4	66.67	
胃体	13	6	7	46.15	
胃窦/幽门	37	26	11	70.27	
大体类型					0.669
隆起型	8	6	2	75.00	
溃疡型	46	31	15	67.39	
浸润型	8	4	4	50.00	
分化程度					0.554
低分化	43	27	16	62.79	
中分化	14	11	3	78.57	
高分化	5	3	2	60.00	
浸润深度					0.035
T1	3	0	3	0.00	
T2	10	9	1	90.00	
T3	41	30	11	73.17	
T4	8	6	2	75.00	
淋巴结转移					0.823
N0	21	15	6	71.43	
N1	23	15	8	65.22	
N2	7	5	2	71.43	
N3	11	6	5	54.55	
远处转移					1.000
M0	54	36	18	66.67	
M1	8	5	3	62.50	
TNM分期					0.450
I 期	7	3	4	42.86	
II 期	33	24	9	72.73	
III 期	14	9	5	64.29	
IV 期	8	5	3	62.50	

表 2 TIMP-1蛋白表达与患者临床病理特征的关系

临床病理特征	<i>n</i>	+(<i>n</i>)	-(<i>n</i>)	阳性率(%)	<i>P</i> 值
性别					0.831
男	42	18	24	42.86	
女	20	8	12	40.00	
年龄(岁)					0.243
<60	28	14	14	50.00	
≥60	34	12	22	35.29	
肿瘤大小(cm)					0.193
<5	37	18	19	48.65	
≥5	25	8	17	32.00	
发生部位					0.813
胃底/贲门	12	6	6	50.00	
胃体	13	5	8	38.46	
胃窦/幽门	37	15	22	40.54	
大体类型					0.160
隆起型	8	3	5	37.50	
溃疡型	46	17	29	36.96	
浸润型	8	6	2	75.00	
分化程度					0.542
低分化	43	20	23	46.51	
中分化	14	4	10	28.57	
高分化	5	2	3	40.00	
浸润深度					0.904
T1	3	1	2	33.33	
T2	10	5	5	50.00	
T3	41	16	25	39.02	
T4	8	4	4	50.00	
淋巴结转移					0.312
N0	21	10	11	47.62	
N1	23	10	13	43.48	
N2	7	4	3	57.14	
N3	11	2	9	18.18	
远处转移					0.710
M0	54	22	32	40.74	
M1	8	4	4	50.00	
TNM分期					0.362
I 期	7	3	4	42.86	
II 期	33	16	17	48.48	
III 期	14	3	11	21.43	
IV 期	8	4	4	50.00	

■创新盘点

本实验通过免疫组织化学法首次探讨了MMP-9/TIMP-1蛋白与ZHX2蛋白在人胃癌组织中表达的相关性。

表 3 胃癌中MMP-9和ZHX2蛋白表达之间的关系 (*n*)

ZHX2	MMP-9		合计
	+	-	
+	38	7	45
-	3	14	17
合计	41	21	62

表 4 胃癌中TIMP-1和ZHX2蛋白表达之间的关系 (*n*)

ZHX2	TIMP-1		合计
	+	-	
+	13	32	45
-	13	4	17
合计	26	36	62

润深度、淋巴结转移、远处转移、TNM分期均

无关($P>0.05$). 表明在胃癌浸润过程中, TIMP-1

■应用要点

本研究初步探讨了MMP-9和TIMP-1蛋白表达与ZHX2蛋白表达的相关性,有助于揭示胃癌发生、发展、浸润和转移的机制,并能作为评估胃癌恶性生物学行为及预后的指标之一;另一方面可以为临床选择化疗药物提供参考依据。

并不是MMP-9唯一的抑制剂。

我们既往的研究发现ZHX2的过表达与胃癌的浸润深度有关,为了进一步的研究ZHX2在胃癌中的作用机制,我们将本研究结果MMP-9和TIMP-1蛋白在胃癌中的表达与前期同组胃癌病例ZHX2蛋白表达,进行相关性检验分析发现:在62例胃癌组织中MMP-9蛋白的表达与ZHX2蛋白表达呈正相关($r = 0.630, P < 0.01$),在ZHX2阳性和阴性表达组中的MMP-9阳性表达率分别为: 84.44%(38/45)和17.65%(3/17)($P < 0.05$);TIMP-1蛋白的表达与ZHX2蛋白表达呈负相关($r = -0.430, P < 0.01$),在ZHX2阳性和阴性组中TIMP-1阳性表达率分别为: 28.89%(13/45)和76.47%(13/17)($P < 0.05$),表明MMP-9/TIMP-1蛋白表达失衡与ZHX2蛋白表达相关。关于MMP-9和TIMP-1蛋白表达与ZHX2蛋白表达的相关性研究,目前国内外均未见相关文献报道,具体机制也有待进一步研究。分析其原因可能为:ZHX2通过与NF- κ B结合,影响其下游基因MMPs/TIMPs的表达,从而调节胃癌的浸润和转移。其详细机制有待于进一步研究。

总之,联合检测胃癌组织中MMP-9、TIMP-1、ZHX2蛋白表达具有重要的临床意义,一方面有助于揭示胃癌发生、发展、浸润和转移的机制,并能作为评估胃癌恶性生物学行为及预后的指标之一;另一方面可以为临床选择化疗药物提供参考依据。对于三者在胃癌发生、发展、浸润和转移过程中的相互作用机制还有待进一步的研究。

4 参考文献

- Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Thun MJ. Cancer statistics, 2009. *CA Cancer J Clin* 2009; 59: 225-249
- Lukaszewicz-Zajac M, Mroczko B, Szmitkowski M. [The significance of metalloproteinases and their inhibitors in gastric cancer]. *Postepy Hig Med Dosw (Online)* 2009; 63: 258-265
- Singh RD, Haridas N, Patel JB, Shah FD, Shukla SN, Shah PM, Patel PS. Matrix metalloproteinases and their inhibitors: correlation with invasion and metastasis in oral cancer. *Indian J Clin Biochem* 2010; 25: 250-259
- Fernandez-Gomez J, Escaf S, Gonzalez LO, Suarez A, Gonzalez-Reyes S, Gonzalez J, Miranda O, Vizoso F. Relationship between metalloprotease expression in tumour and stromal cells and aggressive behaviour in prostate carcinoma: Simultaneous high-throughput study of multiple metalloproteases and their inhibitors using tissue array analysis of radical prostatectomy samples. *Scand J Urol Nephrol* 2011; 45: 171-176
- O'Grady A, Dunne C, O'Kelly P, Murphy GM, Leader M, Kay E. Differential expression of matrix metalloproteinase (MMP)-2, MMP-9 and tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP)-1 and TIMP-2 in non-melanoma skin cancer: implications for tumour progression. *Histopathology* 2007; 51: 793-804
- Altadill A, Rodríguez M, González LO, Junquera S, Corte MD, González-Dieguez ML, Linares A, Barbón E, Fresno-Forcelledo M, Rodrigo L, Vizoso FJ. Liver expression of matrix metalloproteases and their inhibitors in hepatocellular carcinoma. *Dig Liver Dis* 2009; 41: 740-748
- Vizoso FJ, González LO, Corte MD, Rodríguez JC, Vázquez J, Lamelas ML, Junquera S, Merino AM, García-Muñoz JL. Study of matrix metalloproteinases and their inhibitors in breast cancer. *Br J Cancer* 2007; 96: 903-911
- Adithi M, Nalini V, Kandam M, Krishnakumar S. Expression of matrix metalloproteinases and their inhibitors in retinoblastoma. *J Pediatr Hematol Oncol* 2007; 29: 399-405
- Christopoulos TA, Papageorgakopoulou N, Ravazoula P, Mastronikolis NS, Papadas TA, Theocharis DA, Vynios DH. Expression of metalloproteinases and their tissue inhibitors in squamous cell laryngeal carcinoma. *Oncol Rep* 2007; 18: 855-860
- Gentner B, Wein A, Croner RS, Zeitraeger I, Wirtz RM, Roedel F, Dimmler A, Dorlaque L, Hohenberger W, Hahn EG, Brueckl WM. Differences in the gene expression profile of matrix metalloproteinases (MMPs) and their inhibitors (TIMPs) in primary colorectal tumors and their synchronous liver metastases. *Anticancer Res* 2009; 29: 67-74
- Groblewska M, Siewko M, Mroczko B, Szmitkowski M. The role of matrix metalloproteinases (MMPs) and their inhibitors (TIMPs) in the development of esophageal cancer. *Folia Histochem Cytobiol* 2012; 50: 12-19
- 陈其军, 吕自力, 党裔武, 魏晶晶, 孙忠亮. 转录抑制因子ZHX2在胃癌组织中的表达及临床意义. *世界华人消化杂志* 2011; 19: 3163-3167
- Görög T, Beier UH, Bäumken J, Meyer JE, Hoffmann M, Gottschlich S, Maune S. Metalloproteinases and their inhibitors: influence on tumor invasiveness and metastasis formation in head and neck squamous cell carcinomas. *Head Neck* 2006; 28: 31-39
- Bourboulia D, Stetler-Stevenson WG. Matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs): Positive and negative regulators in tumor cell adhesion. *Semin Cancer Biol* 2010; 20: 161-168
- Watanabe H. [Extracellular matrix--regulation of cancer invasion and metastasis]. *Gan To Kagaku Ryoho* 2010; 37: 2058-2061
- Kim HS, Kim HJ, Park KG, Kim YN, Kwon TK, Park JY, Lee KU, Kim JG, Lee IK. Alpha-lipoic acid inhibits matrix metalloproteinase-9 expression by inhibiting NF- κ B transcriptional activity. *Exp Mol Med* 2007; 39: 106-113
- Nagase H, Visse R, Murphy G. Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovasc Res* 2006; 69: 562-573
- Rydlova M, Holubec L, Ludvikova M, Kalfert D, Franekova J, Povysil C, Ludvikova M. Biological activity and clinical implications of the matrix metalloproteinases. *Anticancer Res* 2008; 28: 1389-1397
- Vempati P, Karagiannis ED, Popel AS. A biochemical model of matrix metalloproteinase 9 activation and inhibition. *J Biol Chem* 2007; 282: 37585-37596

- 20 Boyd S, Tolvanen K, Virolainen S, Kuivanen T, Kylönen L, Saarialho-Kere U. Differential expression of stromal MMP-1, MMP-9 and TIMP-1 in basal cell carcinomas of immunosuppressed patients and controls. *Virchows Arch* 2008; 452: 83-90
- 21 Hu XX, Li L, Li DR, Zhang W, Cheng XQ, Zhang JQ, Tang BJ. [Expression of matrix metalloproteinases-9,2,7, and tissue inhibitor of metalloproteinases-1,2,3 mRNA in ovarian tumors and their clinical significance]. *Ai Zheng* 2004; 23: 1194-1198
- 22 Dragutinović V, Izrael-Zivković L, Radovanović N. Relation of matrix metalloproteinase-9 to different stages of tumors in the serum of gastric cancer. *Dig Dis Sci* 2009; 54: 1203-1207
- 23 Lukaszewicz-Zajac M, Mroczko B, Szmitkowski M. Gastric cancer - The role of matrix metalloproteinases in tumor progression. *Clin Chim Acta* 2011; 412: 1725-1730
- 24 Kemik O, Kemik AS, Sümer A, Dulger AC, Adas M, Begenik H, Hasirci I, Yilmaz O, Purisa S, Kisli E, Tuzun S, Kotan C. Levels of matrix metalloproteinase-1 and tissue inhibitors of metalloproteinase-1 in gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2011; 17: 2109-2112
- 25 Zhang M, Zhu GY, Gao HY, Zhao SP, Xue Y. Expression of tissue levels of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in gastric adenocarcinoma. *J Surg Oncol* 2011; 103: 243-247
- 26 Mroczko B, Lukaszewicz-Zajac M, Groblewska M, Czyzewska J, Gryko M, Guzińska-Ustymowicz K, Kemon A, Kedra B, Szmitkowski M. Expression of tissue inhibitors of metalloproteinase 1 (TIMP-1) in gastric cancer tissue. *Folia Histochem Cytobiol* 2009; 47: 511-516
- 27 de Mingo M, Morán A, Sánchez-Pernaute A, Iniesta P, Díez-Valladares L, Pérez-Aguirre E, de Juan C, García-Aranda C, Díaz-López A, García-Botella A, Martín-Antona E, Benito M, Torres A, Balibrea JL. Expression of MMP-9 and TIMP-1 as prognostic markers in gastric carcinoma. *Hepatogastroenterology* 2007; 54: 315-319
- 28 张丹丹, 郭琳, 王强. 胃癌组织中PTEN, MMP-9和Caspase-3表达的关系. *世界华人消化杂志* 2006; 14: 1487-1492
- 29 Shim KN, Jung SA, Joo YH, Yoo K. Clinical significance of tissue levels of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in gastric cancer. *J Gastroenterol* 2007; 42: 120-128
- 30 Yang S, Zhao Z, Wu R, Lu H, Zhang X, Huan C, Wang C, Wu X, Guan G. Expression and biological relationship of vascular endothelial growth factor-A and matrix metalloproteinase-9 in gastric carcinoma. *J Int Med Res* 2011; 39: 2076-2085

■同行评价

本课题选题新颖, 有重要临床指导意义。

编辑 曹丽鸥 电编 闫晋利

ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) CN 14-1260/R 2012年版权归世界华人消化杂志

●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. (编辑部主任: 李军亮 2012-01-01)

幽门螺杆菌对胃癌细胞中钙调蛋白基因启动子区去甲基化的诱导作用

周建奖, 王妍, 谢渊, 赵艳, 谷颖

■背景资料

大量的研究证明幽门螺杆菌(*H. pylori*)感染与胃癌的发生发展密切相关, 是引起胃癌的重要因素, 但其机制并不清楚。

周建奖, 王妍, 谢渊, 赵艳, 贵阳医学院分子生物学重点实验室 贵州省贵阳市 550004

谷颖, 贵阳医学院附属医院超声中心 贵州省贵阳市 550004
周建奖, 教授, 主要从事胃癌分子生物学的基础研究。

贵州省科技攻关计划基金资助项目, 黔科合SY字[2011]3067号
国家自然科学基金资助项目, No. 31060122

作者贡献分布: 周建奖与谷颖对此文所作贡献均等; 此课题由周建奖与谷颖共同设计; 研究过程由王妍、谢渊及赵艳完成; 临床标本与资料由谷颖提供、整理; 论文写作由周建奖完成。

通讯作者: 谷颖, 主任医师, 550004, 贵州省贵阳市贵医街28号, 贵阳医学院附属医院超声中心. 851827202@qq.com

电话: 0851-6752814

收稿日期: 2012-01-29 修回日期: 2012-03-30

接受日期: 2012-07-03 在线出版日期: 2012-07-18

***Helicobacter pylori* induces demethylation of the Calmodulin gene promoter in gastric cancer cells**

Jian-Jiang Zhou, Yan Wang, Yuan Xie, Yan Zhao, Ying Gu

Jian-Jiang Zhou, Yan Wang, Yuan Xie, Yan Zhao, Key Laboratory of Molecular Biology, Guiyang Medical University, Guiyang 550004, Guizhou Province, China

Ying Gu, Ultrasound Center, the Affiliated Hospital of Guiyang Medical University, Guiyang 550004, Guizhou Province, China

Supported by: the Key Science and Technology Project of Guizhou Province, No. Qian Ke He SY Zi [2011]3021; National Natural Science Foundation of China, No. 31060122

Correspondence to: Ying Gu, Chief Physician, Ultrasound Center, the Affiliated Hospital of Guiyang Medical University, 28 Guiyi Street, Guiyang 550004, Guizhou Province, China. 851827202@qq.com

Received: 2012-01-29 Revised: 2012-03-30

Accepted: 2012-07-03 Published online: 2012-07-18

Abstract

AIM: To explore the expression of Calmodulin (*CaM*) gene in gastric cancer tissue and the relationship between the methylation level of the *CaM* gene promoter and *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) infection.

METHODS: The expression of the *CaM* gene in 30 cases of gastric cancer and matched tumor-adjacent gastric tissue and metastatic lymph nodes was assessed by real-time fluorescence quantitative PCR. The relationship between *CaM* gene expression and *H. pylori* infection was ana-

lyzed. Methylation of CpG islands in the *CaM* gene promoter was measured by bisulfite modified sequencing method in gastric cancer cells infected with *H. pylori* and stably transfected with the *H. pylori* cytotoxin-associated protein A (*cagA*) gene.

RESULTS: The relative expression level of the *CaM* gene in cancer tissue was 2.08 times higher than that in tumor-adjacent gastric tissue ($P < 0.05$). The relative expression level of the *CaM* gene in *H. pylori*-positive gastric cancer was 6.11 times higher than that in the *H. pylori*-negative group ($P < 0.05$). The demethylation at -276 bp in the *CaM* gene promoter was detected in *H. pylori*-infected and *cagA*-overexpressed gastric cancer cells.

CONCLUSION: *H. pylori*, though secreting the virulence factor CagA, up-regulates the expression of the *CaM* gene in gastric cancer possibly by inducing the demethylation of the *CaM* promoter.

Key Words: Gastric carcinoma; *Helicobacter pylori*; Calmodulin; DNA methylation

Zhou JJ, Wang Y, Xie Y, Zhao Y, Gu Y. *Helicobacter pylori* induces demethylation of the Calmodulin gene promoter in gastric cancer cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2012; 20(20): 1838-1842

摘要

目的: 探讨钙调蛋白(*CaM*)基因在胃癌组织中的表达及其启动子区甲基化水平与幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *H. pylori*)感染的关系。

方法: 用实时荧光定量PCR法分别检测30例胃癌组织、癌周组织及转移淋巴结组织中*CaM*基因的表达量, 并分析其表达量与*H. pylori*感染的关系。体外建立*H. pylori*感染胃癌细胞的实验模型和*H. pylori*细胞毒素相关蛋白A(*cagA*)基因稳定转染胃癌细胞的实验模型, 以未处理的胃癌细胞为对照, 用亚硫酸氢盐修饰后测序法检测实验模型细胞中*CaM*基因启动子区甲基化水平。

■同行评议者

李瑜元, 教授, 广州市第一人民医院内科

结果: 胃癌组织中*CaM*基因的表达量是癌周组织的2.08倍($P<0.05$); *H. pylori*感染组中*CaM*基因的表达量是无*H. pylori*感染组的6.11倍($P<0.01$), *H. pylori*及其毒素蛋白CagA可引起*CaM*基因启动子区-276位点发生去甲基化修饰。

结论: *H. pylori*感染通过所分泌的毒力因子CagA诱导胃癌细胞中*CaM*基因启动子区去甲基化修饰, 从而上调胃癌组织中*CaM*基因的表达。

关键词: 胃癌; 幽门螺杆菌; 钙调蛋白; DNA甲基化

周建奖, 王妍, 谢渊, 赵艳, 谷颖. 幽门螺杆菌对胃癌细胞中钙调蛋白基因启动子区去甲基化的诱导作用. 世界华人消化杂志 2012; 20(20): 1838-1842
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/1838.asp>

0 引言

胃癌是严重危害人类健康的恶性肿瘤之一, 其死亡率居全球肿瘤相关死亡的第2位^[1]. 2006年的调查显示, 我国胃癌死亡率分别居男性和女性恶性肿瘤死因的第3位和第2位^[2]. 虽然胃癌的发病机制目前尚不清楚, 但大量的研究证明幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *H. pylori*)感染与胃癌的发生发展密切相关, 是引起胃癌的重要因素^[3-5]. *H. pylori*于1994年被世界卫生组织列为胃癌的第1致癌原, 细胞毒素相关蛋白A(cytotoxin-associated protein A, CagA)是*H. pylori*分泌的一种重要毒力因子, 并发现*cagA*阳性菌株比*cagA*阴性菌株有更大的毒性^[6-10]. 本室运用蛋白质组学的方法在*H. pylori*感染和高表达*cagA*的胃癌细胞中发现钙调蛋白(Calmodulin, CaM)表达上调^[11], 推测其可能参与*H. pylori*感染致胃癌的发病机制. 因此, 本研究定量检测了*CaM*基因在人胃癌组织中的表达及其与*H. pylori*感染的关系, 并探讨*H. pylori*感染与*CaM*基因启动子区CpG岛甲基化修饰的关系, 为胃癌的发病机制提供一定线索。

1 材料和方法

1.1 材料 2005-01/2009-12贵阳医学院附属医院胃癌根治术后经病理检查确诊的胃癌标本30例, 男23例, 女7例, 年龄38-77岁. 分别取术后胃癌组织、癌周切缘组织(距肿瘤边缘>3 cm)及胃周淋巴结, 20-30 min内液氮快速冷冻. 癌周切缘组织经术后病理检查未见肿瘤细胞, 淋巴结组织为术中清扫的胃周淋巴结, 经病理检查确诊有转移. 本研究得到了患者的知情同意及医院伦理

委员会批准。

1.2 方法

1.2.1 *CaM*基因的定量检测: TRIzol(Invitrogen公司)一步法分别提取癌周组织、胃癌组织及淋巴结组织的总RNA, 反转录成cDNA. 以各组织cDNA为模板, 在Step-one plus型实时荧光定量PCR仪(ABI公司)检测*CaM*基因的表达, 用次黄嘌呤鸟嘌呤磷酸核糖基转移酶1(hypoxanthine-guanine phosphoribosyl-transferase1, *HPRT1*)作为内参基因, 引物序列见表1. 反应条件如下: 95 °C 10 min; 95 °C 15 s, 60 °C 1 min, 共40个循环. 收集*CaM*基因的荧光信号, 以*HPRT1*为内参基因、癌周组织为对照组计算基因相对表达量 $2^{-\Delta\Delta Ct}$, $\Delta\Delta Ct = \text{处理组}(Ct_{CaM} - Ct_{HPRT1}) - \text{对照组}(Ct_{CaM} - Ct_{HPRT1})$. 用融解曲线监测各样本PCR反应的特异性, 相对标准曲线计算PCR反应的扩增效率。

1.2.2 胃组织中*H. pylori*感染的检测及分组: 酚-氯仿法提取癌周组织和胃癌组织的DNA, PCR法扩增*H. pylori*的16S rRNA基因, 2.0%琼脂糖凝胶电泳检测. 根据胃组织中*H. pylori*的感染状态分为4组, 癌周组织*H. pylori*感染组和未感染组及胃癌组织*H. pylori*感染组和未感染组, 以癌周组织*H. pylori*未感染组为对照组, 计算各组中*CaM*基因的相对表达量。

1.2.3 *CaM*基因启动子区甲基化水平的检测: 人胃癌细胞SGC-7901(中科院上海细胞库)用含100 mL/L胎牛血清和双抗(青霉素100 U/mL, 链霉素100 U/mL)的RPMI 1640培养基(Hyclone公司)于50 mL/L CO₂、37 °C恒温培养. 冻存的*H. pylori*标准菌株NCTC11637(*cagA*阳性, 中国幽门螺杆菌菌株管理与保藏中心馈赠)复苏后接种于哥伦比亚血琼脂板(Oxoid公司), 微需氧环境(50 mL/L O₂、100 mL/L CO₂、850 mL/L N₂、37 °C)培养3 d收菌备用。

将*H. pylori*悬于PBS, 用麦氏比浊法调细菌浓度达 15×10^8 个/mL, 按照细菌与细胞比例1 000:1感染胃癌细胞株SGC-7901, 6 h后收集细胞备用. 稳定表达*cagA*的SGC-7901胃癌细胞株由课题组保存, 用Zeocin 100 mg/L(Invitrogen公司)维持培养, 收集生长状态良好的细胞备用. 以未处理SGC-7901细胞作为对照. 提取上述3种细胞的DNA, 用EZDNA甲基化试剂盒(亚硫酸氢盐修饰后测序法, BSP, 美国)对其进行处理, 按说明书操作. 将修饰后的DNA作为模板扩增*CaM*基因的启动子区CpG岛, 分为*CaM1*、*CaM2*和*CaM3*三个片段扩增, 引物序列见表1. PCR反应

■研发前沿

*H. pylori*是胃癌的“Ⅰ类致癌原”, 细胞毒素相关蛋白A(CagA)是*H. pylori*分泌并注入胃上皮细胞的重要毒力因子, 其引起胃癌的分子机制是目前研究热点。

■ 相关报道

目前认为DNA甲基化修饰是肿瘤的促发因素。而钙调蛋白又是引起细胞癌变的重要分子,已被证明与胃癌的发生发展密切相关,但*H. pylori*与钙调蛋白基因的表达尚未见报道。

表 1 PCR引物序列

基因	引物序列(5'-3')	产物(bp)
<i>CaM</i>	上游: TGGAGACGGACAAGTCAACTAT	245
	下游: GACAGGACCACCAACCAATAC	
<i>HPRT1</i>	上游: TGAGGATTTGGAAAGGGTGT	118
	下游: GAGCACACAGAGGGCTACAA	
16S rRNA	上游: GCTAAGAGAT CAGCCTATGTC	118
	下游: CCGTGTCTCA GTTCCAGTGT	
甲基化 <i>CaM1</i>	上游: AAGAGGATTAATTTTTTTTAGGAGG	250
	下游: CAACCTCACCCACCTAAATA	
甲基化 <i>CaM2</i>	上游: GTTGAGGTGGGAGGGTTATTTA	392
	下游: TCCCAACACCACTACCGAA	
甲基化 <i>CaM3</i>	上游: TTTTGGTAGTGGTGTGGGA	285
	下游: AACAAACAAAACAATAAAAAATCTAAA	

CaM: 钙调蛋白; *HPRT1*: 次黄嘌呤鸟嘌呤磷酸核糖基转移酶1; 16S rRNA: 幽门螺杆菌16S rRNA。

表 2 *CaM*基因在人胃癌组织中的定量表达及其与*H. pylori*感染的关系 (mean ± SD)

组织/ <i>H. pylori</i> 感染	<i>n</i>	<i>HPRT1</i> Ct值	<i>CaM</i> Ct值	相对表达量($2^{-\Delta\Delta Ct}$)
组织类型				
癌周组织	30	25.56 ± 2.43	25.84 ± 2.69	1.00
胃癌组织	30	25.58 ± 2.96	24.32 ± 2.95	2.08 ^a
淋巴组织	30	25.64 ± 2.44	24.71 ± 2.77	1.60
<i>H. pylori</i> 感染状态				
癌周组织				
未感染	10(33%)	25.46 ± 2.14	26.42 ± 3.71	1.00
感染	20(67%)	25.95 ± 1.42	26.67 ± 1.62	1.18
胃癌组织				
未感染	10(33%)	25.87 ± 3.18	26.00 ± 4.77	1.77
感染	20(67%)	25.32 ± 1.70	23.67 ± 1.62	6.11 ^d

^a*P* < 0.05 vs 癌周组织; ^d*P* < 0.01 vs 癌周组织未感染组。

条件如下: 96 °C 10 min; 94 °C 40 s, 60 °C 40 s, 72 °C 40 s, 共40个循环; 72 °C 10 min。将*CaM1*、*CaM2*、*CaM3*基因片段分别与pMD[®]20-T载体(宝生物公司)连接, 转化大肠杆菌DH5 α , 提取阳性克隆中质粒DNA, 双酶切鉴定后测序, 比对3组细胞中*CaM1*、*CaM2*、*CaM3*基因片段序列, 寻找甲基化修饰位点。

统计学处理 多样本比较采用SPSS13.0软件的单因素方差分析, 两样本比较用独立*t*检验, *P* < 0.05为差异有显著性。

2 结果

2.1 *CaM*基因在胃癌组织中的定量表达 每例标本*CaM*和*HPRT1*基因的溶解曲线均为单峰, 定量PCR反应的特异性较高。 *CaM*和*HPRT1*基因的扩增效率在90%-109%之间, 满足 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算基因

表达量的条件。结果显示胃癌组织中*CaM*基因的表达量是癌周组织的2.08倍(表2)。

2.2 胃癌组织中*H. pylori*感染的检测 用PCR法扩增每例胃癌组织中*H. pylori* 16S rRNA, 发现30例标本中有20例*H. pylori* 16S rRNA基因阳性(图1), *H. pylori*感染的阳性率为67%。

2.3 胃组织中*H. pylori*感染与*CaM*基因表达 根据胃组织中*H. pylori*的感染状态分为4组。结果发现仅有胃癌组织*H. pylori*感染组中*CaM*基因的表达量被上调6.11倍, 表明*H. pylori*感染能上调胃癌组织中钙调蛋白基因的表达(表2)。

2.4 钙调蛋白基因启动子区CpG岛甲基化水平检测 用*H. pylori*感染胃癌细胞株SGC-7901, 同时选取稳定高表达*cagA*的SGC-7901, 以未处理的SGC-7901作对照, 用亚硫酸氢盐处理3组细胞的DNA, 扩增*CaM*基因启动子区CpG岛, 成功获得

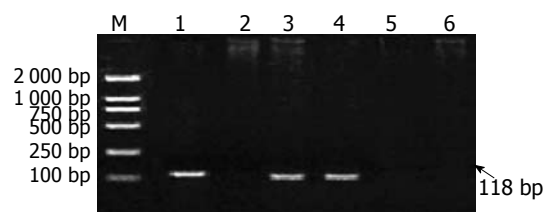


图 1 胃癌组织中*H. pylori* 16S rRNA基因电泳图. M: Marker; 1: 阳性对照; 2: 阴性对照; 3, 4: *H. pylori* 16S rRNA基因阳性; 5, 6: *H. pylori* 16S rRNA基因阴性.

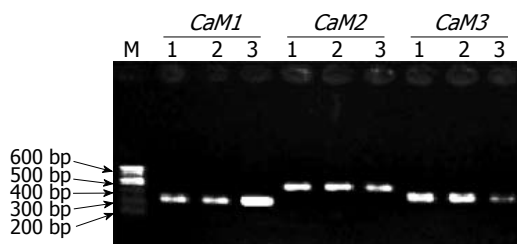


图 2 *CaM*基因启动子区CpG岛PCR产物电泳图. M: Marker; 1: 未处理SGC-7901; 2: *H. pylori*感染SGC-7901; 3: *cagA*稳定转染的SGC-7901.

CaM1、*CaM2*及*CaM3*三段PCR产物(图2). 测序鉴定后序列比对发现*H. pylori*感染及*cagA*基因稳定转染的细胞中*CaM*基因启动子区-276位点的碱基从胞嘧啶(C)变成了胸腺嘧啶(T), 发生了去甲基化修饰(图3).

3 讨论

长期的研究证明, *H. pylori*的感染是胃相关疾病的重要因素, 其分泌的毒力因子CagA蛋白是导致胃癌的主要原因之一^[12-14]. 研究发现当*H. pylori*感染胃上皮细胞后, 分泌毒力因子CagA并将其注入细胞, 调控细胞生长和分化相关的信号通路, 促进慢性胃炎的转化而致癌变^[15,16]. *CaM*是一种重要的钙结合蛋白, 与Ca²⁺结合后被激活, 而活化的*CaM*激活其下游的多个信号通路参与细胞增生、有丝分裂、神经传导及基因转录等, *CaM*还在细胞核内参与前mRNA的剪切和调控核糖体聚合等功能, 是引起细胞癌变的重要分子之一^[17]. Choi和Tomás等^[18,19]的研究发现*CaM*与细胞周期调节蛋白E相互作用, 参与调节细胞从G₁到S期的进程, 而使用其抑制剂抑制细胞分裂, 使细胞停滞在G₁期. Zhao等^[20]的研究也发现在肝细胞癌中*CaM*与PI3K结合, 促进细胞增殖. 本研究也发现人胃癌组织中*CaM*基因的表达量显著高于癌周组织($P<0.05$), 且*CaM*基因的高表达与*H. pylori*感染相关, *H. pylori*感染可以上调胃癌组织中*CaM*基因的表达($P<0.01$). 本

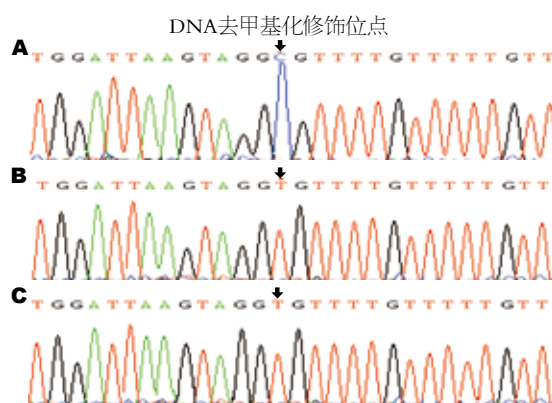


图 3 *CaM*基因启动子区CpG岛序列比对图(-276位点). A: SGC-7901; B: *H. pylori*感染SGC-7901; C: *cagA*稳定转染的SGC-7901.

研究中虽然*CaM*基因在转移淋巴结中的表达量高于癌周组织, 但没有统计学意义.

为了探讨*H. pylori*感染上调*CaM*基因表达的机制, 本研究在体外构建了2个实验模型: *H. pylori*感染胃癌细胞的实验模型和*cagA*基因稳定转染胃癌细胞的实验模型, 以未处理的胃癌细胞为对照, 研究*H. pylori*感染对*CaM*基因启动子区CpG岛甲基化修饰的影响.

DNA甲基化修饰作为一种重要的表观遗传学机制, 可引起调控细胞增殖和分化相关基因的表达异常而导致细胞癌变^[21]. 有文献报道, DNA甲基化修饰是胃癌的一个促发因素, 被证实与胃癌的发生发展密切相关^[22-25]. 2010年, Shin和Alves等^[26,27]检测临床胃癌组织中相关基因的甲基化水平, 发现*H. pylori*的感染引起上皮钙粘连素、周期蛋白依赖性激酶抑制因子2A(CDKN2A)等多个基因甲基化水平增加, 且CDKN2A基因启动子区甲基化水平的改变依赖不同的*H. pylori*表型. *H. pylori*感染引起的炎症反应也是促进DNA甲基化水平变化的原因之一. Niwa等^[28]发现*H. pylori*的感染引起胃组织中基因高甲基化的同时伴随炎症相关基因如白介素1 β 、一氧化氮合酶2和肿瘤坏死因子等基因发生甲基化水平改变, 而抑制炎症反应会抑制这些基因的甲基化水平. 此外, *H. pylori*感染的胃组织中其他基因的甲基化水平也有改变^[29,30]. 但尚未发现*H. pylori*感染与*CaM*基因的相关报道.

DNA的甲基化通常发生在启动子区的CpG岛, 本研究针对*CaM*基因启动子区CpG岛设计3对引物, 用亚硫酸氢盐修饰后测序法(BSP)检测其甲基化水平. 原理是通过亚硫酸盐处理, 使DNA中未发生甲基化的胞嘧啶(C)脱氨基转变成尿嘧啶(U), 而甲基化的胞嘧啶保持不变, 经

■创新盘点

本研究首次发现*H. pylori*通过分泌的毒力因子CagA诱导钙调蛋白基因启动子区去甲基化, 上调胃癌组织中钙调蛋白基因的表达, 参与胃癌的发生发展.

■同行评价

本研究初步探讨了 *H. pylori* 与钙调蛋白二者间的关系, 研究有一定科学性和创新性, 具有一定的借鉴意义。

PCR扩增后尿嘧啶全部转为胸腺嘧啶(T), 将PCR产物与T载体连接后测序, 通过与对照细胞的基因序列比对, 判断是否发生甲基化水平的改变. 本研究成功获得了模型细胞中 *CaM* 基因启动子区CpG岛的3段PCR产物, 经测序比对后不仅发现在 *H. pylori* 感染的胃癌细胞中 *CaM* 基因启动子区-276位点发生去甲基化改变, 而且在 *cagA* 基因稳定转染的胃癌细胞中 *CaM* 基因启动子区同样的位点也发生了去甲基化改变. 表明 *H. pylori* 感染通过所分泌的毒力因子CagA引起了 *CaM* 基因启动子区去甲基化, 可能与 *H. pylori* 感染上调人胃癌组织中 *CaM* 基因的表达有关, 该结果为揭示 *H. pylori* 感染与胃癌的发生、发展提供新的线索。

4 参考文献

- Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin* 2005; 55: 74-108
- 赵平, 孔灵芝. 中国肿瘤死亡报告. 北京: 人民卫生出版社, 2010: 52-62
- Costamagna G, Cesaro P. Early gastric cancer: detection and endoscopic treatment. *Ann Ital Chir* 2012; 83: 183-191
- Ruggiero P. Helicobacter pylori infection: what's new. *Curr Opin Infect Dis* 2012; 25: 337-344
- 柳云恩, 袁媛. 蒙古沙土鼠不同幽门螺杆菌菌株感染相关性胃病的研究进展. 世界华人消化杂志 2011; 19: 2467-2472
- Machado AM, Figueiredo C, Seruca R, Rasmussen LJ. Helicobacter pylori infection generates genetic instability in gastric cells. *Biochim Biophys Acta* 2010; 1806: 58-65
- 时昭红, 刘浩. 幽门螺杆菌感染与胃癌. 世界华人消化杂志 2011; 19: 3327-3331
- Bronte-Tinkew DM, Terebiznik M, Franco A, Ang M, Ahn D, Mimuro H, Sasakawa C, Ropeleski MJ, Peek RM, Jones NL. Helicobacter pylori cytotoxin-associated gene A activates the signal transducer and activator of transcription 3 pathway in vitro and in vivo. *Cancer Res* 2009; 69: 632-639
- 宋衍燕, 王海滨, 何利华, 张建中. 幽门螺杆菌实验室长期传代 *cagA* 启动子的进化. 世界华人消化杂志 2011; 19: 3365-3369
- 赵艳, 谢渊, 汪苏, 陈娴, 周建奖. 幽门螺杆菌毒素相关蛋白A对胃泌素基因启动子的调控作用. 中华肿瘤杂志 2010; 32: 501-506
- 陈娴, 周建奖, 谢渊, 赵艳, 徐文杰, 王妍. 幽门螺杆菌毒素蛋白CagA诱导的蛋白的差异分析及其基因在胃癌组织中的表达. 中国生物化学与分子生物学报 2011; 27: 55-62
- Helicobacter pylori promotes apoptosis, activates cyclooxygenase (COX)-2 and inhibits heat shock protein HSP70 in gastric cancer epithelial cells. *Inflamm Res* 2012; May 19. [Epub ahead of print]
- 王建旭, 冯义朝. 幽门螺杆菌感染与胃癌局部浸润的相关性. 世界华人消化杂志 2010; 18: 268-271
- 吴莺, 李翔, 周红, 范钰, 张允历, 沈琰, 何亚龙. 幽门螺杆菌对胃癌细胞BGC-823形态及凋亡相关基因表达的影响. 世界华人消化杂志 2011; 19: 1767-1772
- 谢渊, 周建奖, 赵艳, 汪苏, 陈娴. JAK2、ERK1干扰对幽门螺杆菌毒素相关蛋白CagA调控胃泌素基因表达的影响. 世界华人消化杂志 2010; 18: 2317-2321
- 董奇观, 袁媛. microRNAs与幽门螺杆菌相关性胃疾病的研究进展. 世界华人消化杂志 2012; 20: 479-485
- Coticchia CM, Revankar CM, Deb TB, Dickson RB, Johnson MD. Calmodulin modulates Akt activity in human breast cancer cell lines. *Breast Cancer Res Treat* 2009; 115: 545-560
- Choi J, Chiang A, Taulier N, Gros R, Pirani A, Husain M. A calmodulin-binding site on cyclin E mediates Ca^{2+} -sensitive G1/s transitions in vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 2006; 98: 1273-1281
- Tomás M, Marín MP, Portolés M, Megías L, Gómez-Lechón MJ, Renau-Piqueras J. Ethanol affects calmodulin and the calmodulin-binding proteins neuronal nitric oxide synthase and alphaII-spectrin (alpha-fodrin) in the nucleus of growing and differentiated rat astrocytes in primary culture. *Toxicol In Vitro* 2007; 21: 1039-1049
- Zhao L, Zhao Q, Lu R, Fu Z, Zhu Z, Jia J, Wang S, Shi L, Jian X, Yao Z. Effects of tyrosineleutide on gene expression of calmodulin and PI3K in hepatocellular carcinoma. *J Cell Biochem* 2008; 103: 471-478
- Zou XP, Zhang B, Zhang XQ, Chen M, Cao J, Liu WJ. Promoter hypermethylation of multiple genes in early gastric adenocarcinoma and precancerous lesions. *Hum Pathol* 2009; 40: 1534-1542
- 随红, 王凯冰, 白玉贤. DNA甲基化与胃癌的研究进展. 世界华人消化杂志 2011; 19: 3347-3352
- Hong SJ, Oh JH, Jeon EJ, Min KO, Kang MI, Choi SW, Rhyu MG. The overmethylated genes in Helicobacter pylori-infected gastric mucosa are demethylated in gastric cancers. *BMC Gastroenterol* 2010; 10: 137
- Tahara T, Shibata T, Nakamura M, Yamashita H, Yoshioka D, Okubo M, Yonemura J, Maeda Y, Maruyama N, Kamano T, Kamiya Y, Fujita H, Nakagawa Y, Nagasaka M, Iwata M, Hirata I, Arisawa T. Increased number of CpG island hypermethylation in tumor suppressor genes of non-neoplastic gastric mucosa correlates with higher risk of gastric cancer. *Digestion* 2010; 82: 27-36
- Ferrasi AC, Pinheiro NA, Rabenhorst SH, Caballero OL, Rodrigues MA, de Carvalho F, Leite CV, Ferreira MV, Barros MA, Pardini MI. Helicobacter pylori and EBV in gastric carcinomas: methylation status and microsatellite instability. *World J Gastroenterol* 2010; 16: 312-319
- Shin CM, Kim N, Jung Y, Park JH, Kang GH, Kim JS, Jung HC, Song IS. Role of Helicobacter pylori infection in aberrant DNA methylation along multistep gastric carcinogenesis. *Cancer Sci* 2010; 101: 1337-1346
- Alves MK, Lima VP, Ferrasi AC, Rodrigues MA, De Moura Campos Pardini MI, Rabenhorst SH. CD-KN2A promoter methylation is related to the tumor location and histological subtype and associated with Helicobacter pylori flaA(+) strains in gastric adenocarcinomas. *APMIS* 2010; 118: 297-307
- Niwa T, Tsukamoto T, Toyoda T, Mori A, Tanaka H, Maekita T, Ichinose M, Tatematsu M, Ushijima T. Inflammatory processes triggered by Helicobacter pylori infection cause aberrant DNA methylation in gastric epithelial cells. *Cancer Res* 2010; 70: 1430-1440
- Kitajima Y, Ohtaka K, Mitsuno M, Tanaka M, Sato S, Nakafusa Y, Miyazaki K. Helicobacter pylori infection is an independent risk factor for Runx3 methylation in gastric cancer. *Oncol Rep* 2008; 19: 197-202
- Qian X, Huang C, Cho CH, Hui WM, Rashid A, Chan AO. E-cadherin promoter hypermethylation induced by interleukin-1beta treatment or H. pylori infection in human gastric cancer cell lines. *Cancer Lett* 2008; 263: 107-113

凋亡抑制蛋白家族在食管癌分子靶向治疗中的研究进展

唐鹏, 黄华

唐鹏, 黄华, 昆明医科大学第二附属医院消化内科 云南省昆明市 650101

唐鹏, 硕士, 主治医师, 主要从事消化系统肿瘤的基础与临床研究. 作者贡献分布: 本文综述由唐鹏完成, 黄华审校.

通讯作者: 黄华, 主任医师, 硕士生导师, 650101, 云南省昆明市西山区麻园1号, 昆明医科大学第二附属医院消化内科. hhtrq@163.com

电话: 0871-5351281-2388

收稿日期: 2012-04-08 修回日期: 2012-05-06

接受日期: 2012-06-01 在线出版日期: 2012-07-18

Progress in understanding the role of inhibitor of apoptosis proteins in molecular targeted therapy of esophageal cancer

Peng Tang, Hua Huang

Peng Tang, Hua Huang, Department of Gastroenterology, the Second Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming 650101, Yunnan Province, China

Correspondence to: Hua Huang, Chief Physician, Department of Gastroenterology, the Second Affiliated Hospital of Kunming Medical University, 1 Mayuan Road, Xishan District, Kunming 650101, Yunnan Province, China. hhtrq@163.com

Received: 2012-04-08 Revised: 2012-05-06

Accepted: 2012-06-01 Published online: 2012-07-18

Abstract

The apoptosis and antiapoptotic signaling pathways play a critical role in the embryonic and lymphocyte development, immune system modulation, and tissue homeostasis, as well as carcinogenesis. As inhibitor of apoptosis proteins (IAPs) are highly expressed in several neoplasms and are closely related to carcinogenesis, cancer progression, radiochemotherapeutic resistance, and prognosis, therapies targeting IAPs have become a research hotspot for molecular targeted therapy of tumors. In recent years, many agents targeting IAPs which are being evaluated in clinical trials are showing promising prospect for neoplastic therapy. As such, the identification of key roles of IAPs in esophageal cancer has revealed their potential value as therapeutic targets. This report reviews the progress in understanding the role of IAPs in molecular targeted therapy of esophageal cancer.

Key Words: Apoptosis; Inhibitor of apoptosis protein family; Esophageal cancer; Molecular targeted therapy

Tang P, Huang H. Progress in understanding the role of inhibitor of apoptosis proteins in molecular targeted therapy of esophageal cancer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2012; 20(20): 1843-1847

摘要

细胞凋亡与抗细胞凋亡信号通路在胚胎及淋巴细胞发育、免疫系统调控、组织稳定及肿瘤发生中发挥着重要作用. 研究发现凋亡抑制蛋白(inhibitor of apoptosis proteins, IAPs)在多种恶性肿瘤组织中高表达, 并与肿瘤的发生、发展、放化疗抵抗性及预后密切相关, 使其成为肿瘤分子靶向治疗的研究热点. 近年来, 多种靶向IAPs药物正在进行临床试验评估, 并在试验中显示出较好的治疗前景. 同样, IAPs在食管癌发生发展中有着重要的地位, 使其成为食管癌分子靶向治疗潜在的靶点. 本文主要对IAPs在食管癌分子靶向治疗的研究进展进行综述.

关键词: 细胞凋亡; 凋亡抑制蛋白家族; 食管癌; 分子靶向治疗

唐鹏, 黄华. 凋亡抑制蛋白家族在食管癌分子靶向治疗中的研究进展. *世界华人消化杂志* 2012; 20(20): 1843-1847

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/1843.asp>

0 引言

食管癌是人类常见的恶性肿瘤之一, 统计显示2008年全球新增食管癌患者约482 300例, 死亡患者约406 800例, 其发病率在不同地区间具有显著的差异性^[1]. 我国是食管癌的高发国家, 食管癌在我国常见恶性肿瘤中发病率居第6位, 死亡率居第4位^[2]. 目前, 食管癌的治疗方法以外科手术治疗及辅助放化疗为主. 早期食管癌及时根治预后良好, 但是早期患者症状不典型, 首次就诊的患者以中晚期为主, 肿瘤对放化疗的抵抗使食管癌患者总体预后较差. 探索食管癌发生发展及放化疗抵抗的分子机制是目前食管

■背景资料

食管癌的放化疗抵抗性是目前食管癌治疗的难题. 凋亡抑制蛋白(IAPs)在多种恶性肿瘤组织中高表达, 并与肿瘤的发生发展、预后及放化疗抵抗性等密切相关. 探索IAPs在食管癌发生发展及放化疗抵抗性的作用机制对食管癌分子靶向治疗有着深远的意义.

■同行评议者

杜祥, 教授, 主任医师, 上海复旦大学附属肿瘤医院; 李增山, 副教授, 中国人民解放军第四军医大学病理教研室

■ 研发前沿

近年来的研究发现IAPs与恶性肿瘤的发生、发展、预后及放化疗敏感性密切相关,使其成为了肿瘤分子靶向治疗的研究热点。但是IAPs抑制细胞凋亡及肿瘤放化疗抵抗的分子机制仍未完全清楚,靶向IAPs治疗潜在的不良反应及疗效仍有待进一步评估。

癌的研究热点。近年来,研究发现凋亡抑制蛋白(inhibitor of apoptosis proteins, IAPs)与食管癌的发生、发展、预后及放化疗抵抗密切相关,本文主要对IAP家族在食管癌分子靶向治疗的研究进展进行综述。

1 凋亡抑制蛋白家族概述

细胞凋亡是机体为维持自身稳定,在基因的调控下,细胞发生自主有序死亡的生物学现象^[3,4]。细胞凋亡和抗细胞凋亡的动态平衡是维系生物生长发育及组织稳定的必要条件,细胞凋亡的失调与肿瘤的发生、发展密切相关^[5]。1993年,Crook等^[6]在感染杆状病毒的昆虫细胞中发现第1个IAP,到目前为止在人体内鉴定出8个IAP家族成员,分别为NIAP、XIAP/MIHA、cIAP-1、cIAP-2、Survivin、Apollon/BRUCE、ILP-2和Livin/ML-IAP。研究发现IAPs是一类高度保守的内源性抗凋亡基因家族表达产物,广泛存在于许多生物体内,参与调控细胞凋亡、细胞周期、有丝分裂及核因子kappa B(nuclear factor-kappa B, NF- κ B)信号通路传导,并与肿瘤的发生、发展、放化疗抵抗性及预后密切相关^[7-9]。

1.1 凋亡抑制蛋白的结构和功能 IAPs的分子结构特征是包含1-3个杆状病毒IAP重复序列(baculovirus IAP repeat, BIR)结构域。IAPs通过BIR结构域与细胞凋亡主要执行者caspase的BIM结构域结合,抑制caspase的活性,进而抑制细胞凋亡^[10,11]。在XIAP、cIAP-1、cIAP-2、ILP-2和Livin羧基端的RING结构具有E3泛素连接酶活性,直接调控自身及IAPs结合的caspase泛素化^[12]。Apollon的UBC结构域与RING结构域的功能相似。cIAP1和cIAP2的CARD结构域通过调节与其他蛋白质间的相互作用,参与激活caspase蛋白质复合体的形成^[12,13]。XIAP、cIAP-1、cIAP-2和ILP-2的UBA结构域与连接Lys63偶联的多聚泛素化相关^[14]。

1.2 凋亡抑制蛋白与NF- κ B信号通路 NF- κ B信号通路参与调控免疫反应、炎症、细胞增殖、细胞凋亡及肿瘤发生发展等多种生理病理进程^[8]。依据不同的激活方式, NF- κ B信号通路分为经典途径和非经典途径, IAP家族在经典途径中发挥正向调节作用,而在非典型途径中表现为负性调节作用^[15]。Mahoney等^[16]研究发现c-IAP1/2是调控肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)诱导NF- κ B活化的重要因素, c-IAP1/2缺失将增强TNF- α 诱导的细胞凋亡。Lu等^[17]研究发

现BIR1与TAB1的相互作用对于XIAP诱导NF- κ B信号通路激活有着重要的作用,破坏BIR1二聚体将阻止XIAP诱导的NF- κ B激活。

1.3 凋亡抑制蛋白与内源性IAPs拮抗剂 内源性IAPs拮抗剂对维持细胞凋亡平衡有着重要意义。第二线粒体衍生的caspase激活剂(second mitochondrial-derived activator of caspases, Smac)是一种约25 kDa的线粒体蛋白,以二聚体的形式存在于线粒体膜间隙,在细胞凋亡信号通路激活后,与细胞色素C共同被释放到细胞质,经修饰成熟后与caspase竞争连接IAPs的BIR结构域,解除IAPs对caspase的抑制作用,促进细胞凋亡^[18]。Smac氨基端的丙氨酸-缬氨酸-脯氨酸-异亮氨酸结构域是抑制IAPs的结构基础。Smac通过与XIAP、cIAP1、cIAP2、Survivin及Livin的相互作用参与调控细胞凋亡的平衡^[19]。2005年, Hariu等^[20]研究发现Livin通过BIR结构与Smac蛋白结合,增强RING结构域的E3泛素连接酶活性,促进Smac经泛素-蛋白酶途径降解,进而抑制细胞凋亡。2010年, Flanagan等^[21]研究发现XIAP并不能阻止线粒体释放细胞色素C,而是通过选择性地减少Smac释放,从而抑制细胞凋亡。此外,研究还发现Omi、eRF3、XAF1等内源性小分子IAP拮抗剂同样能够促进细胞凋亡^[22-24]。

2 凋亡抑制蛋白与食管癌

近年来,研究发现IAPs在人类多种恶性肿瘤中异常表达,并与肿瘤的发生、发展、放化疗敏感性及预后等密切相关^[8,12]。IAPs在食管癌的研究对于进一步探索食管癌的发病机制、评估患者的放化疗敏感性及预后有着深远的意义。

Survivin是IAP家族中的分子量最小的成员,参与调控细胞周期、细胞凋亡、信号通路传导、新陈代谢及环境适应性等多种生物学进程^[25]。Survivin在大部分恶性肿瘤组织中高表达,而在成人正常分化组织中不表达或微量表达,其高表达与肿瘤的放化疗敏感性及预后密切相关^[26-28]。在食管腺癌方面,赵俊杰等^[29]通过检测Survivin mRNA和GW112 mRNA在反流性食管炎、Barrett's食管及食管腺癌中的表达,结果显示Survivin和GW112基因高表达抑制细胞凋亡, Survivin在Barrett's食管及食管腺癌发生的早期阶段发挥着重要作用。在食管鳞癌方面, Takeno等^[30]研究发现Survivin在细胞质的表达与食管鳞癌的分化、侵袭性及预后密切相关。进一步检测Survivin、Survivin-2B、Survivin-deltaEx3

mRNA在食管鳞癌组织中的表达,结果显示Survivin-2B的表达水平与食管癌组织分化程度相关。Zhu等^[31]等研究发现Survivin的表达水平与食管鳞癌患者的生存时间密切相关。在Survivin高表达的食管癌细胞中,放疗引起的肿瘤细胞死亡数较少,结果显示Survivin的表达可用于评估食管鳞癌患者的预后及放疗疗效。此外,外周血中Survivin的表达同样与食管癌患者的放化疗疗效及预后密切相关,Survivin高表达预示患者的放化疗疗效及预后较差^[9,32]。

IAPs家族中的其他成员对食管癌的发生发展也发挥着重要的作用。2004年, Nemoto等^[33]研究显示XIAP、c-IAP1、c-IAP2在食管癌组织中表达增强,并与肿瘤分化程度密切相关,其在低分化组的表达较高分化组显著增强。2007年, Zhang等^[34]通过免疫组织化学、RT-PCR和Western blot检测在食管鳞癌、正常食管及多种食管鳞癌细胞系中XIAP的表达,结果显示XIAP在食管鳞癌组的表达较正常食管组明显增强, XIAP的表达与肿瘤的化疗敏感性相关。2008年, Chen等^[35]采用免疫组织化学、Western blotting和RT-PCR检测不同分期食管癌组织中Livin及VEGF的表达,结果显示Livin与VEGF的表达随着肿瘤的进展而增加, Livin与VEGF的表达呈正相关。

总之, IAPs与食管癌的发生发展、放化疗疗效及预后密切相关,并将成为评估食管癌患者预后及放化疗疗效潜在的预测因子。

3 凋亡抑制蛋白与食管癌分子靶向治疗

近年来,研究发现通过RNA干扰(RNA interference, RNAi)、小分子IAP拮抗剂、反义寡核苷酸等方法抑制IAPs在肿瘤细胞的表达,能够有效地促进肿瘤细胞凋亡,提高肿瘤细胞对放化疗的敏感性^[36-38]。随着研究的进展, AEG40826、YM155、AEG35156等靶向IAPs的药物相继进入I/II期临床试验,并在试验中显示出较好的治疗前景。靶向IAPs的分子生物治疗在食管癌的研究中也取得了较大的进展。

3.1 RNAi与靶向IAPs的食管癌治疗 RNAi是将与靶基因同源互补的双链RNA引入细胞,特异性地降解靶基因mRNA,造成靶基因在转录后沉默的分子生物学技术^[39]。RNAi现已广泛地应用于基因功能研究及基因治疗探索,为靶向IAPs治疗食管癌的研究奠定了技术基础。2007年, Zhang等^[34]研究发现小分子干扰RNA能够有

效地抑制食管癌细胞XIAP的表达,诱导食管癌细胞凋亡。进一步的研究发现,联合靶向XIAP的小分子干扰RNA能够增强食管鳞癌细胞对紫杉醇、顺铂、依托泊苷、氟尿嘧啶的化疗敏感性。2011年,陈力^[40]采用慢病毒载体构建短发夹RNA-Livin系统并转染至食管癌细胞Eca-109,结果显示靶向Livin的RNAi联合顺铂上调Caspase-3、Caspase-9的表达,抑制Eca-109细胞的增殖,促进其凋亡。

3.2 Smac蛋白类似物与食管癌 近年来, AEG40826/HGS1029、Compound C、Compound8等Smac类似物在前期研究中表现出较好的抗肿瘤作用,并相继进入I期临床试验评估^[18,41,42]。在食管癌方面, Xu等^[43]通过检测具有不同化疗疗效的食管鳞癌组织中Smac的表达,发现在36.8%食管鳞癌组织中Smac的表达显著下降,化疗敏感组与化疗抵抗组间Smac的表达具有显著差异性。通过敲除Smac基因将抑制顺铂诱导的肿瘤细胞凋亡, Smac类似物LBW242则增强顺铂诱导的肿瘤细胞凋亡,恢复肿瘤细胞的化疗敏感性。因此,联合Smac类似物的化疗方案将为化疗抵抗的食管癌患者带来新的希望。

3.3 IAPs反义寡核苷酸与食管癌 反义寡核苷酸是通过人工合成特异互补的短链DNA,大小约13-30个核苷酸,根据碱基互补原则,与目标mRNA结合后阻止目标基因的转录和翻译,并通过激活体内的RNase或ribozyme酶导致目标mRNA降解,进而抑制目标基因的表达^[44,45]。靶向IAPs的反义寡核苷酸在肿瘤的治疗研究中已经取得了突破性的进展。2011年, Nakahara等^[46]研究发现靶向Survivin的反义寡核苷酸YM155通过抑制Survivin的表达,进而抑制非霍奇金淋巴瘤、乳腺癌、非小细胞肺癌等肿瘤细胞及异体移植肿瘤的生长,提示YM155可能在肿瘤靶向治疗中具有广阔的应用前景。在I/II期临床试验中, YM155对食管癌、非小细胞肺癌、黑色素瘤等肿瘤患者表现出较好的人体安全性及潜在的临床应用价值^[47-49]。2011年, Holt等^[50]研究发现,靶向XIAP的反义寡核苷酸AEG35156能够有效地降低骨肉瘤、横纹肌肉瘤及尤文氏肉瘤肿瘤细胞中XIAP的表达,促进肿瘤细胞凋亡,增强骨肉瘤细胞791T对阿霉素、依托泊苷及长春新碱的化疗敏感性。目前, AEG35156正在进行I/II期临床试验评估,在早期试验中并未发现严重的不良反应,其肿瘤治疗疗效仍有待进一步评估^[18,51]。

■创新盘点

本文系统地介绍了IAPs的结构、功能及信号传导通路,重点阐述了IAPs在食管癌发生发展及放化疗抵抗性的作用和靶向IAPs在食管癌治疗的研究进展。

■同行评价

本综述较为系统地介绍了细胞凋亡相关信号通路在肿瘤,尤其是在食管癌发生和发展中的作用和应用前景,对于提示该类分子作为食管癌诊断标志物及治疗靶点具有潜在意义,且文献复习较为全面,具有较好的理论和实践指导意义。

3.4 靶向Survivin的免疫治疗 免疫逃逸是肿瘤细胞存活及转移的重要因素之一。靶向肿瘤相关性抗原的肿瘤疫苗通过激活患者自身免疫系统,诱导特异性的免疫反应,进而清除肿瘤细胞,是一种较理想的肿瘤治疗策略。Survivin在多种肿瘤组织中的高表达,使靶向Survivin的肿瘤免疫治疗成为了近年来的研究热点。2009年, Honma等^[52]采用Survivin-2B80-88多肽疫苗治疗晚期及复发性泌尿道上皮肿瘤患者,在I期临床试验中未发现严重的不良反应。在部分患者体内发现Survivin-2B80-88多肽疫苗诱导的特异性细胞毒性T淋巴细胞数明显增多,并有部分患者的肿瘤体积缩小,显示出较好的人体安全性及免疫效应。Survivin-2B80-88多肽疫苗在对晚期及复发性口腔肿瘤的I期临床试验中同样显示出较好的人体安全性及潜在的治疗价值^[53]。目前,虽然未见靶向Survivin的肿瘤疫苗在食管癌治疗研究的相关报道,但我们相信随着研究的进展,联合靶向Survivin的免疫治疗将为食管癌患者提供新的治疗途径。

4 结论

IAPs与食管癌的发生、发展、预后及放化疗敏感性密切相关,并可能成为食管癌较理想的治疗靶点。随着研究的进展,靶向IAPs的肿瘤治疗已显示出较好的治疗前景,为食管癌的分子靶向治疗提供了潜在的治疗途径。但是食管癌的发病机制是一个复杂的多基因和多步骤过程,IAPs抑制细胞凋亡及肿瘤放化疗抵抗的分子机制仍不完全清楚,靶向IAPs肿瘤治疗的疗效及潜在的不良反应仍有待进一步的临床试验评估。我们相信随着分子生物学技术的发展及靶向IAPs肿瘤治疗的研究进展,联合靶向IAPs的分子生物治疗将使更多的食管癌患者从中受益。

5 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
- 2 陈万春, 张思维, 郑荣寿, 雷正龙, 李光琳, 邹小龙, 赵平. 中国肿瘤登记地区2007年肿瘤发病和死亡分析. *中国肿瘤* 2011; 20: 162-169
- 3 Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972; 26: 239-257
- 4 Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol* 2007; 35: 495-516
- 5 Wei Y, Fan T, Yu M. Inhibitor of apoptosis proteins and apoptosis. *Acta Biochim Biophys Sin* (Shanghai) 2008; 40: 278-288
- 6 Crook NE, Clem RJ, Miller LK. An apoptosis-inhib-

- iting baculovirus gene with a zinc finger-like motif. *J Virol* 1993; 67: 2168-2174
- 7 Dubrez-Daloz L, Dupoux A, Cartier J. IAPs: more than just inhibitors of apoptosis proteins. *Cell Cycle* 2008; 7: 1036-1046
- 8 Gyrd-Hansen M, Meier P. IAPs: from caspase inhibitors to modulators of NF-kappaB, inflammation and cancer. *Nat Rev Cancer* 2010; 10: 561-574
- 9 Grimminger P, Vallböhmer D, Hoffmann A, Schulte C, Bollschweiler E, Schneider PM, Hölscher AH, Metzger R, Brabender J. Quantitative analysis of survivin RNA expression in blood as a non-invasive predictor of response to neoadjuvant radiochemotherapy in esophageal cancer. *J Surg Oncol* 2009; 100: 447-451
- 10 Srinivasula SM, Ashwell JD. IAPs: what's in a name? *Mol Cell* 2008; 30: 123-135
- 11 Miura K, Fujibuchi W, Ishida K, Naitoh T, Ogawa H, Ando T, Yazaki N, Watanabe K, Haneda S, Shibata C, Sasaki I. Inhibitor of apoptosis protein family as diagnostic markers and therapeutic targets of colorectal cancer. *Surg Today* 2011; 41: 175-182
- 12 Straub CS. Targeting IAPs as an approach to anti-cancer therapy. *Curr Top Med Chem* 2011; 11: 291-316
- 13 Martin SJ. Dealing the CARDs between life and death. *Trends Cell Biol* 2001; 11: 188-189
- 14 Gyrd-Hansen M, Harding M, Miasari M, Santoro MM, Zender L, Xue W, Tenev T, da Fonseca PC, Zvelebil M, Bujnicki JM, Lowe S, Silke J, Meier P. IAPs contain an evolutionarily conserved ubiquitin-binding domain that regulates NF-kappaB as well as cell survival and oncogenesis. *Nat Cell Biol* 2008; 10: 1309-1317
- 15 Varfolomeev E, Vucic D. Inhibitor of apoptosis proteins: fascinating biology leads to attractive tumor therapeutic targets. *Future Oncol* 2011; 7: 633-648
- 16 Mahoney DJ, Cheung HH, Mrad RL, Plenchette S, Simard C, Enwere E, Arora V, Mak TW, Lacasse EC, Waring J, Korneluk RG. Both cIAP1 and cIAP2 regulate TNFalpha-mediated NF-kappaB activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 105: 11778-11783
- 17 Lu M, Lin SC, Huang Y, Kang YJ, Rich R, Lo YC, Myszkowski D, Han J, Wu H. XIAP induces NF-kappaB activation via the BIR1/TAB1 interaction and BIR1 dimerization. *Mol Cell* 2007; 26: 689-702
- 18 LaCasse EC, Mahoney DJ, Cheung HH, Plenchette S, Baird S, Korneluk RG. IAP-targeted therapies for cancer. *Oncogene* 2008; 27: 6252-6275
- 19 Chai J, Du C, Wu JW, Kyn S, Wang X, Shi Y. Structural and biochemical basis of apoptotic activation by Smac/DIABLO. *Nature* 2000; 406: 855-862
- 20 Hariu H, Hirohashi Y, Torigoe T, Asanuma H, Hariu M, Tamura Y, Aketa K, Nabeta C, Nakanishi K, Kamiguchi K, Mano Y, Kitamura H, Kobayashi J, Tsukahara T, Shijubo N, Sato N. Aberrant expression and potency as a cancer immunotherapy target of inhibitor of apoptosis protein family, Livin/ML-IAP in lung cancer. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 1000-1009
- 21 Flanagan L, Sebastião J, Tuffy LP, Spring A, Li-chawska A, Devocelle M, Prehn JH, Rehm M. XIAP impairs Smac release from the mitochondria during apoptosis. *Cell Death Dis* 2010; 1: e49
- 22 Verhagen AM, Kratina TK, Hawkins CJ, Silke J, Ekert PG, Vaux DL. Identification of mammalian mitochondrial proteins that interact with IAPs via N-terminal IAP binding motifs. *Cell Death Differ* 2007; 14: 348-357

- 23 Arora V, Cheung HH, Plenchette S, Micali OC, Liston P, Korneluk RG. Degradation of survivin by the X-linked inhibitor of apoptosis (XIAP)-XAF1 complex. *J Biol Chem* 2007; 282: 26202-26209
- 24 Tu SP, Sun YW, Cui JT, Zou B, Lin MC, Gu Q, Jiang SH, Kung HF, Korneluk RG, Wong BC. Tumor suppressor XIAP-Associated factor 1 (XAF1) cooperates with tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand to suppress colon cancer growth and trigger tumor regression. *Cancer* 2010; 116: 1252-1263
- 25 Guha M, Altieri DC. Survivin as a global target of intrinsic tumor suppression networks. *Cell Cycle* 2009; 8: 2708-2710
- 26 Kelly RJ, Lopez-Chavez A, Citrin D, Janik JE, Morris JC. Impacting tumor cell-fate by targeting the inhibitor of apoptosis protein survivin. *Mol Cancer* 2011; 10: 35
- 27 Altieri DC. Survivin, cancer networks and pathway-directed drug discovery. *Nat Rev Cancer* 2008; 8: 61-70
- 28 Kanwar JR, Kamalapuram SK, Kanwar RK. Targeting survivin in cancer: patent review. *Expert Opin Ther Pat* 2010; 20: 1723-1737
- 29 赵俊杰, 雷艳霞, 任春蓉, 赵晶, 刘晓庆. 凋亡抑制基因Survivin和GW112在Barrett食管与食管腺癌中的表达及其意义. *西安交通大学学报(医学版)* 2010; 31: 720-723
- 30 Takeno S, Yamashita S, Takahashi Y, Ono K, Kamei M, Moroga T, Kawahara K. Survivin expression in oesophageal squamous cell carcinoma: its prognostic impact and splice variant expression. *Eur J Cardiothorac Surg* 2010; 37: 440-445
- 31 Zhu H, Wang Q, Hu C, Zhang W, Quan L, Liu M, Xu N, Xiao Z. High expression of survivin predicts poor prognosis in esophageal squamous cell carcinoma following radiotherapy. *Tumour Biol* 2011; 32: 1147-1153
- 32 Hoffmann AC, Vallböhmer D, Grimminger P, Metzger R, Prenzel KL, Hoelscher AH, Brabender J. Preoperative survivin mRNA detection in peripheral blood is an independent predictor of outcome in esophageal carcinoma. *Pharmacogenomics* 2010; 11: 341-347
- 33 Nemoto T, Kitagawa M, Hasegawa M, Ikeda S, Akashi T, Takizawa T, Hirokawa K, Koike M. Expression of IAP family proteins in esophageal cancer. *Exp Mol Pathol* 2004; 76: 253-259
- 34 Zhang S, Ding F, Luo A, Chen A, Yu Z, Ren S, Liu Z, Zhang L. XIAP is highly expressed in esophageal cancer and its downregulation by RNAi sensitizes esophageal carcinoma cell lines to chemotherapeutics. *Cancer Biol Ther* 2007; 6: 973-980
- 35 Chen L, Ren GS, Li F, Sun SQ. Expression of livin and vascular endothelial growth factor in different clinical stages of human esophageal carcinoma. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 5749-5754
- 36 Fulda S, Vucic D. Targeting IAP proteins for therapeutic intervention in cancer. *Nat Rev Drug Discov* 2012; 11: 109-124
- 37 Ndubaku C, Cohen F, Varfolomeev E, Vucic D. Targeting inhibitor of apoptosis proteins for therapeutic intervention. *Future Med Chem* 2009; 1: 1509-1525
- 38 Mannhold R, Fulda S, Carosati E. IAP antagonists: promising candidates for cancer therapy. *Drug Discov Today* 2010; 15: 210-219
- 39 Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 1998; 391: 806-811
- 40 陈力. 靶向Livin的RNA干扰对食管癌Eca-109细胞凋亡相关蛋白Caspase-3和Caspase-9表达的影响. *重庆医科大学学报* 2011; 36: 298-302
- 41 Probst BL, Liu L, Ramesh V, Li L, Sun H, Minna JD, Wang L. Smac mimetics increase cancer cell response to chemotherapeutics in a TNF- α -dependent manner. *Cell Death Differ* 2010; 17: 1645-1654
- 42 Chen DJ, Huerta S. Smac mimetics as new cancer therapeutics. *Anticancer Drugs* 2009; 20: 646-658
- 43 Xu Y, Zhou L, Huang J, Liu F, Yu J, Zhan Q, Zhang L, Zhao X. Role of Smac in determining the chemotherapeutic response of esophageal squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 2011; 17: 5412-5422
- 44 Goodchild J. Therapeutic oligonucleotides. *Methods Mol Biol* 2011; 764: 1-15
- 45 Galderisi U, Cascino A, Giordano A. Antisense oligonucleotides as therapeutic agents. *J Cell Physiol* 1999; 181: 251-257
- 46 Nakahara T, Kita A, Yamanaka K, Mori M, Amino N, Takeuchi M, Tominaga F, Kinoyama I, Matsuhisa A, Kudou M, Sasamata M. Broad spectrum and potent antitumor activities of YM155, a novel small-molecule survivin suppressant, in a wide variety of human cancer cell lines and xenograft models. *Cancer Sci* 2011; 102: 614-621
- 47 Satoh T, Okamoto I, Miyazaki M, Morinaga R, Tsuya A, Hasegawa Y, Terashima M, Ueda S, Fukuoka M, Ariyoshi Y, Saito T, Masuda N, Watanabe H, Taguchi T, Kakiyama T, Aoyama Y, Hashimoto Y, Nakagawa K. Phase I study of YM155, a novel survivin suppressant, in patients with advanced solid tumors. *Clin Cancer Res* 2009; 15: 3872-3880
- 48 Lewis KD, Samlowski W, Ward J, Catlett J, Cranmer L, Kirkwood J, Lawson D, Whitman E, Gonzalez R. A multi-center phase II evaluation of the small molecule survivin suppressor YM155 in patients with unresectable stage III or IV melanoma. *Invest New Drugs* 2011; 29: 161-166
- 49 Giaccone G, Zatloukal P, Roubec J, Floor K, Musil J, Kuta M, van Klaveren RJ, Chaudhary S, Gunther A, Shamsili S. Multicenter phase II trial of YM155, a small-molecule suppressor of survivin, in patients with advanced, refractory, non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2009; 27: 4481-4486
- 50 Holt SV, Brookes KE, Dive C, Makin GW. Down-regulation of XIAP by AEG35156 in paediatric tumour cells induces apoptosis and sensitises cells to cytotoxic agents. *Oncol Rep* 2011; 25: 1177-1181
- 51 Tamm I. AEG-35156, an antisense oligonucleotide against X-linked inhibitor of apoptosis for the potential treatment of cancer. *Curr Opin Investig Drugs* 2008; 9: 638-646
- 52 Honma I, Kitamura H, Torigoe T, Takahashi A, Tanaka T, Sato E, Hirohashi Y, Masumori N, Tsukamoto T, Sato N. Phase I clinical study of anti-apoptosis protein survivin-derived peptide vaccination for patients with advanced or recurrent urothelial cancer. *Cancer Immunol Immunother* 2009; 58: 1801-1807
- 53 Miyazaki A, Kobayashi J, Torigoe T, Hirohashi Y, Yamamoto T, Yamaguchi A, Asanuma H, Takahashi A, Michifuri Y, Nakamori K, Nagai I, Sato N, Hiratsuka H. Phase I clinical trial of survivin-derived peptide vaccine therapy for patients with advanced or recurrent oral cancer. *Cancer Sci* 2011; 102: 324-329

Cajal间质细胞的研究进展

翁超, 袁琴, 范莹

■背景资料

1893年, 西班牙神经解剖学家Cajal首次在消化系内发现了Cajal间质细胞(ICC)。百年来, 人们逐渐认识到他是胃肠道的起搏细胞, 对正常胃肠蠕动有着重大作用。其后在胃肠道外其他器官和系统相继发现了ICC的存在。

翁超, 袁琴, 中国医科大学临床七年制学院 辽宁省沈阳市 110001

范莹, 中国医科大学附属盛京医院普外二科 辽宁省沈阳市 110004

翁超, 在读硕士, 主要从事胆道动力调控及胆石成因的基础与临床研究。

国家自然科学基金资助项目, No. 81000183

沈阳市科学技术计划基金资助项目, No. F11-264-1-24

作者贡献分布: 本文由翁超与袁琴综述; 范莹审校。

通讯作者: 范莹, 副教授, 副主任医师, 硕士生导师, 110004, 辽宁省沈阳市和平区三好街36号, 中国医科大学附属盛京医院普外二科, surgeonfanying@yahoo.com.cn

电话: 024-96615-1-31211

收稿日期: 2012-04-14 修回日期: 2012-05-25

接受日期: 2012-06-28 在线出版日期: 2012-07-18

Progress in research of interstitial cells of Cajal

Chao Weng, Qin Yuan, Ying Fan

Chao Weng, Qin Yuan, Department of Seven-year Clinical College, China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China

Ying Fan, Department of General Surgery (Division II), Shengjing Hospital, China Medical University, Shenyang 110004, Liaoning Province, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 81000183; and the Science and Technology Project of Shenyang, No. F11-264-1-24

Correspondence to: Ying Fan, Associate Professor, Department of General Surgery (Division II), Shengjing Hospital, China Medical University, 36 Sanhao Street, Heping District, Shenyang 110004, Liaoning Province, China. surgeonfanying@yahoo.com.cn

Received: 2012-04-14 Revised: 2012-05-25

Accepted: 2012-06-28 Published online: 2012-07-18

Abstract

Interstitial cells of Cajal (ICCs) are a kind of cells mainly found in the gastrointestinal tract as pacemaker and signal transduction cells. They have a close connection with muscular cells and terminal neurons and can stimulate and promote gastrointestinal motility. With the help of electron microscopes, we can clearly recognize their distribution and inner structure. C-kit protein is expressed by ICCs. Besides, many disorders of gastrointestinal motility are related to ICCs. In recent years, many scholars have found the trace of ICCs in different organs such as the gastrointestinal tract, biliary tract, bladder, and uterus, and they have tried to state the relation-

ship between abnormal ICCs and some diseases. This article will review the progress in research of ICCs in terms of their origin, morphology, receptors, function, and related diseases.

Key Words: Interstitial cells of Cajal; Gastrointestinal tract; Signal transduction

Weng C, Yuan Q, Fan Y. Progress in research of interstitial cells of Cajal. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2012; 20(20): 1848-1852

摘要

Cajal间质细胞(interstitial cells of Cajal, ICC)是一类主要分布于胃肠道的间质细胞, 是胃肠道的起搏细胞(pacemaker cell)和信号传导细胞, 与肌细胞以及末梢神经元有着紧密的关系, 具有激发和促进胃肠蠕动的作用。借助于电子显微镜技术, 清楚观察到了ICC位置分布和内部精细结构; 应用免疫荧光等生化技术, 发现了其特殊表达的C-kit蛋白; 利用电生理技术, 得知多种胃肠动力障碍疾病也与其异常有关。多年来, 学者逐渐在胃肠道、胆道、膀胱、子宫等部位发现了ICC的踪迹, 并试图阐述其与某些疾病的发生机制。本文就ICC的起源、形态学、受体和功能、以及与其相关的疾病等作一综述。

关键词: Cajal间质细胞; 胃肠道; 信号传导

翁超, 袁琴, 范莹. Cajal间质细胞的研究进展. 世界华人消化杂志 2012; 20(20): 1848-1852

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/1848.asp>

0 引言

1893年, 西班牙神经解剖学家Sandago Puamony Cajal利用甲基蓝及嗜银染色的方法在胃肠道内首次发现了一类特殊的间质细胞, 称为Cajal间质细胞(interstitial cells of Cajal, ICC)。随着研究进展, 人们发现他是胃肠道的起搏细胞, 对维持胃肠道正常功能起着决定性作用。后来大量研究证实, ICC不仅存在于胃肠道, 还普遍存在于其他系统和器官中, 例如泌尿生殖系统^[1]、脉管

■同行评议者

王承党, 教授, 福建医科大学附属第一医院消化内科

系统^[2]、胆道系统以及各种腺体之中^[3]。本文就ICC最新研究进展进行综述。

1 ICC的来源与鉴别

ICC最初发现于胃肠道, 与肌细胞、神经末梢有着紧密联系。人们认为他可能来源于神经嵴细胞, 也可能来自于肠道间质细胞, 直到Young等^[4]利用小鼠小肠来研究ICC的胚胎起源, 才解决了这一争论问题。他们在小鼠胚胎神经嵴细胞形成前后的肠道上均发现了对ICC特异性的C-kit免疫反应蛋白, 这表明ICC并不是来源于神经嵴细胞, 而更可能来自肠道的间质细胞。

ICC区别于其他细胞的判断标准^[5]主要基于以下几点: (1)细胞形态学和超微结构的特征: ICC主要沿着间质内的神经生长, 存在于肌束内的ICC非常有限, 而且细胞内有大量与平滑肌细胞相似的纤维束、细胞膜穴样内陷; (2)分子生物学特点: ICC特有的原癌基因C-kit能编码表达一种酪氨酸激酶受体; (3)胃肠道动力的电生理特性: ICC是一类起搏细胞, 能产生特殊的慢电波^[6]。

2 ICC的形态与分布

在光镜下, ICC可用C-kit免疫反应蛋白来标记, ICC呈纺锤形或星形, 细胞核较大, 以圆形或卵圆形为主, 染色质分散, 胞质少, 一般有2-5个突起, 相互连接形成细胞网络。在电镜下, ICC的胞浆内具有丰富的线粒体、高尔基体、粗面和滑面内质网, 大量的中间纤维束以及间隙连接, 在细胞膜上可看见许多细胞膜穴样内陷^[7], 但是不同物种和组织的ICC都有他们各自独特的形态特征。小肠深肌丛ICC和结肠肌下丛ICC与平滑肌细胞非常相似, 有一层明显的基底膜和大量的细胞膜穴样内陷, 然而, 胃肠道所有的肠肌神经丛ICC与平滑肌细胞几乎没有相似之处, 而更像是纤维细胞。不同器官ICC形态的不同可能与他们的微环境有关, 包括机械力的影响、神经分布的类型以及和平滑肌细胞的空间关系等^[8]。

根据ICC形态、分布位置以及与神经丛、平滑肌空间关系的不同可将其分为多个亚型: (1)肌丛ICC(ICC of the myenteric plexus, ICC-MP)是由包含3-5个初级胞突的多级细胞组成的, 在小肠周围肠肌丛形成致密的网络结构, 但在胃和结肠则形成疏松网状结构^[9]; (2)肌内ICC(intramuscular ICC, ICC-IM)可分为环肌ICC(ICC of the circular muscle, ICC-CM)和纵肌ICC(ICC of the longitudinal muscle, ICC-LM)。前

者是环肌层主要的双极细胞, 沿着周围平滑肌长轴方向生长, 主要分布于胃和结肠中, 而在小肠很少能发现^[9]; 后者在形态上与前者相似, 但在数量上远远不如前者^[10]; (3)深肌丛ICC(ICC of the deep muscular plexus, ICC-DMP)也是多极细胞, 但是胞突非常独特地沿着圆周生长, 这与他和小肠深肌丛神经束以及环形肌纤维有着密切的联系有关^[11]; (4)黏膜下层ICC(ICC of submucosa, ICC-SM)和黏膜下丛ICC(submucosal plexus, ICC-SMP)存在于胃和结肠的黏膜下层结缔组织和环形肌内层之间^[12,13], 含有次级突起的胞轴平行于相邻的环形肌细胞, 形成疏松的网状结构; (5)浆膜下ICC(ICC of the subserosa, ICC-SS)是存在于小鼠小肠和结肠浆膜层的星形间质细胞^[14], 在细胞网状结构的形成过程中有一定作用。

3 ICC的功能和受体

1914年Keith最早提出了ICC可能是一种胃肠道起搏细胞的观点, 后来电生理研究和细胞超微结构研究发展不仅证实了他的观点, 而且认为ICC在胃肠道肌细胞中能产生慢电波^[15], 介导兴奋和抑制运动神经传递^[16], 同时ICC充当非神经源性牵张感受器, 影响平滑肌的兴奋性和慢波频率^[17], 在迷走神经传入信号过程也发挥重要作用^[18]。

分子生物学研究表明ICC能够表达原癌基因C-kit, 编码产生特征性的Kit酪氨酸激酶受体。人们通过RT-PCR方法分离出了多种ICC表达的受体。胃底ICC-IM和小肠ICC-MY可表达毒蕈碱样乙酰胆碱能受体(M₂和M₃型), 神经激肽受体(NK1和NK3型)和VIP受体(VPAC1型)^[19]。小肠ICC-DMP除表达NK1受体^[20]之外, 还表达毒蕈碱样M₂受体^[21]和生长抑素2A受体^[22]。在回肠ICC-DMP和ICC-MY则发现了5-HT₃受体, 而5-HT₄受体则在小肠被发现。在ICC-IM, ICC-DMP和ICC-MY均可检测到嘌呤P2Y₄受体^[23], 嘌呤P2X₂和P2X₃受体却仅存在于ICC-MY^[24]。在幽门ICC和平滑肌细胞能表达缩胆囊素A受体^[25]以及G蛋白耦连受体^[26]。另外NO是运动神经有效的抑制性神经递质, 能激活可溶性鸟苷酸环化酶(soluble guanylate cyclase, sGC), 而sGC存在于小肠ICC-DMP中^[27], 由此可见, ICC也是受氮能抑制性神经元支配的。此外, 有研究证实在豚鼠胆囊壁的ICC上存在着胆囊收缩素(cholecystokinin, CCK)受体^[28], 他能控制胆囊的收缩。

■研发前沿

ICC首先发现于胃肠道, 后来在腺体、胆道系统、泌尿生殖系统等器官和系统逐渐发现ICC的存在, 相关的报道研究也屡见不鲜。

■创新盘点

ICC的研究时有报道发表, 但其研究处于起步阶段, 研究部位相对单一, 本文综合世界前沿文献, 内容较全面, 使读者能大体了解当今ICC的研究方向和成果。

■应用要点

ICC是一种起搏细胞,他的数量和形态异常对动力障碍性疾病(如胃排空异常、胃轻瘫、Oddi括约肌功能障碍)有很大影响,这为治疗此类疾病提供了新的思路和方法。

4 ICC与胃肠道疾病

大量研究表明ICC是调节胃肠道动力的重要因素,这也为许多胃肠道动力障碍相关疾病提供新的病理生理学解释。目前所报道的病例中,与ICC相关的疾病主要包括贲门失弛缓症、婴儿肥厚性幽门狭窄、慢性假性肠梗阻、先天性巨结肠、炎症性肠病、慢传输型便秘、糖尿病胃轻瘫、Oddi括约肌功能障碍和其他胃肠动力障碍相关疾病以及胃肠道间质肿瘤等。

(1)贲门失弛缓症: ICC细胞质中只有少量的线粒体和滑面内质网,而且ICC与神经纤维之间的接触联系也在减少,同时平滑肌细胞有一定形态上的变化^[29]; (2)婴儿肥厚性幽门狭窄: ICC在肥厚性幽门环肌层连续缺乏^[30], ICC的缺乏可能干扰了慢电波的传播,影响了胃窦部和幽门部之间的协调运作,另外神经元NO合成酶的缺乏也会导致肥厚性幽门狭窄的发生^[31],但在肥厚性幽门切开后幽门病理标本中显示各类被标记的神经纤维、胶质细胞、神经元性NO合成酶和ICC与正常人的分布十分相似^[32]。因此,尚无确切的证据证实ICC与该病发生的相关性; (3)慢性假性肠梗阻: 有研究^[33]发现慢性假性肠梗阻小肠外肌层ICC的密度为正常人的3%,在肠肌丛周围ICC明显缺乏。但令人费解的是有实验^[34]证实在对照组和患者组中, ICC均普遍分散于纵行肌和环行肌中,因而, ICC可能只是导致慢性假性肠梗阻的多原因之一,而非主要因素; (4)胃肠道间质瘤: 通常表达特有的标记物CD34^[35],但有专家认为Kit可能更适合作为胃肠道间质瘤的标记物,而且追踪效果可能要优于CD34^[36]。因为在胃肠道间质瘤中发现了原癌基因Kit突变的存在,而且其预后效果非常差^[37],但Kit基因突变可能只是肿瘤致癌过程中的一部分,而非肿瘤来源的关键因素。对此, Hirota等^[38]提出Kit和CD34都呈阳性的间质瘤可能分化来源于ICC,然而Vanderwinden等^[39]发现Kit⁺ ICC和CD34⁺的纤维母细胞是两种相邻但不重叠的细胞,很难支持前者的假说,但关于胃肠道间质瘤起源问题尚未有可信有力的理论依据,也不能排除Hirota提出的假说。

5 ICC与胆道疾病

近年来,通过豚鼠试验,从形态学和生理学证明了Cajal样间质细胞(ICLC)在胆囊上的存在,并认为胆囊能产生和传播自发性节律与其密不可分^[40];之后又有学者在人类肝外胆道发现了ICC

的存在,与胆囊上存在的ICLC相比,肝外胆管ICLC显得更加聚集致密,但并未在肝内胆道上发现ICC的踪迹^[41]。Huang等^[42]发现ICLC主要存在于胆囊和胆管系统平滑肌层,包括肝管、胆囊管、胆囊以及胆总管上端。在胆总管下端和壶腹部, ICLC在数量上呈缓慢增长趋势,尤以壶腹部数量为多,与十二指肠ICC相当,远超出胆囊和胆管上的数量。在胆道系统之中,胆总管ICLC的数量最多,这可能与他自发性地调节胆道系统节律收缩,防止胆道系统动力障碍性疾病发生相关^[43]。

目前,尚缺乏ICC在胆道系统疾病致病过程中作用的资料。Xu等^[28]发现胆囊壁上的Cajal细胞表达一种与胆囊收缩密切相关的CCK受体,为胆囊运动障碍性疾病(如胆囊结石)的成因提供了新的理论依据。在胆总管尤其在壶腹部周围, ICC更趋于密集,为胆道动力障碍性疾病(如Oddi括约肌功能障碍)提供了有力的理论基础。有人还在胆囊恶性间质瘤中发现肿瘤细胞高度表达CD117(C-kit蛋白)和波形蛋白^[44],表明恶性间质瘤同样可以发生在胆道系统中,而且特异性的C-kit蛋白高度表达,提示ICC在肿瘤发病过程中可能发挥重要作用。

6 ICC与胃电起搏治疗

在胃不同部位分离出的ICC上,有人^[45]记录了慢波的传播过程。试验^[46]表明,用0.1 ms脉冲的电场刺激野生型小鼠胃窦细胞,能产生本体固有频率的慢波,而且波相位超前,但慢波起搏能被河豚毒素和阿托品阻断,提示相位超前是通过胆碱能神经介导的。在缺乏ICC-IM的变异型小鼠胃窦细胞中,相位超前和波的传送现象则不存在。这表明慢波频率和平滑肌收缩的神经调节是依靠神经和ICC-IM之间的相互作用达到的。然而用1-2 ms的脉冲刺激野生型和变异型小鼠,他们都能产生相位超前和波的传送现象,而且不能被河豚毒素和阿托品阻断,表明在缺乏ICC-IM的情况下,长时间的脉冲刺激能够直接启动ICC-MY上的起搏机制。由此可知, ICC-IM是体内神经调节的关键。这为体外胃电起搏治疗胃排空异常、胃轻瘫等疾病提供了新的理论依据^[47]。但是, ICC的缺乏却有利于某些糖尿病相关的胃病^[48],在体内神经刺激减少的非肥胖型糖尿病的小鼠中,胃窦部环肌层ICC-IM的数量显著降低,并且肠神经末梢和ICC-IM之间正常存在的密切联系也遭到明显破坏^[49]。所以,对于

某些特殊的胃病, 短时间脉冲(0.1 ms)不一定能通过调节慢波频率达到治疗的目的。

7 结论

一个多世纪来, 人们逐步了解了ICC的形态学和超微结构, 以及他在胃肠道动力学方面发挥的重要作用, 如胃肠道ICC动力起搏、传导慢电波和介导神经递质传导等。近年来, 在泌尿生殖系统、脉管系统、胆道系统、以及各种腺体之中也发现了ICC, 初步阐述了ICC与人类生理病理活动之间的关系。目前, 人们虽然对ICC的功能已有一定的了解, 但是, ICC与疾病的关系仍待进一步深入研究。

8 参考文献

- Shafik A, El-Sibai O, Shafik AA, Shafik I. Identification of interstitial cells of Cajal in human urinary bladder: concept of vesical pacemaker. *Urology* 2004; 64: 809-813
- Povstyan OV, Gordienko DV, Harhun MI, Bolton TB. Identification of interstitial cells of Cajal in the rabbit portal vein. *Cell Calcium* 2003; 33: 223-239
- 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
- Young HM, Ciampoli D, Southwell BR, Newgreen DF. Origin of interstitial cells of Cajal in the mouse intestine. *Dev Biol* 1996; 180: 97-107
- Komuro T, Tokui K, Zhou DS. Identification of the interstitial cells of Cajal. *Histol Histopathol* 1996; 11: 769-786
- Min KW, Leabu M. Interstitial cells of Cajal (ICC) and gastrointestinal stromal tumor (GIST): facts, speculations, and myths. *J Cell Mol Med* 2006; 10: 995-1013
- Komuro T, Seki K, Horiguchi K. Ultrastructural characterization of the interstitial cells of Cajal. *Arch Histol Cytol* 1999; 62: 295-316
- Komuro T. Comparative morphology of interstitial cells of Cajal: ultrastructural characterization. *Microsc Res Tech* 1999; 47: 267-285
- Komuro T. Structure and organization of interstitial cells of Cajal in the gastrointestinal tract. *J Physiol* 2006; 576: 653-658
- 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
- Rumessen JJ, Thuneberg L, Mikkelsen HB. Plexus muscularis profundus and associated interstitial cells. II. Ultrastructural studies of mouse small intestine. *Anat Rec* 1982; 203: 129-146
- Horiguchi K, Semple GS, Sanders KM, Ward SM. Distribution of pacemaker function through the tunica muscularis of the canine gastric antrum. *J Physiol* 2001; 537: 237-250
- Ishikawa K, Komuro T. Characterization of the interstitial cells associated with the submuscular plexus of the guinea-pig colon. *Anat Embryol (Berl)* 1996; 194: 49-55
- Vanderwinden JM, Rumessen JJ, Bernex F, Schiffmann SN, Panthier JJ. Distribution and ultrastructure of interstitial cells of Cajal in the mouse colon, using antibodies to Kit and Kit(W-lacZ) mice. *Cell Tissue Res* 2000; 302: 155-170
- Torihashi S, Ward SM, Nishikawa S, Nishi K, Kobayashi S, Sanders KM. c-kit-dependent development of interstitial cells and electrical activity in the murine gastrointestinal tract. *Cell Tissue Res* 1995; 280: 97-111
- 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
- Won KJ, Sanders KM, Ward SM. Interstitial cells of Cajal mediate mechanosensitive responses in the stomach. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102: 14913-14918
- Sanders KM, Ward SM. Interstitial cells of Cajal: a new perspective on smooth muscle function. *J Physiol* 2006; 576: 721-726
- Epperson A, Hattton WJ, Callaghan B, Doherty P, Walker RL, Sanders KM, Ward SM, Horowitz B. Molecular markers expressed in cultured and freshly isolated interstitial cells of Cajal. *Am J Physiol Cell Physiol* 2000; 279: C529-C539
- Iino S, Ward SM, Sanders KM. Interstitial cells of Cajal are functionally innervated by excitatory motor neurones in the murine intestine. *J Physiol* 2004; 556: 521-530
- Iino S, Nojyo Y. Muscarinic M(2) acetylcholine receptor distribution in the guinea-pig gastrointestinal tract. *Neuroscience* 2006; 138: 549-559
- Sternini C, Wong H, Wu SV, de Giorgio R, Yang M, Reeve J, Brecha NC, Walsh JH. Somatostatin 2A receptor is expressed by enteric neurons, and by interstitial cells of Cajal and enterochromaffin-like cells of the gastrointestinal tract. *J Comp Neurol* 1997; 386: 396-408
- Van Nassauw L, Costagliola A, Van Op den Bosch J, Cecio A, Vanderwinden JM, Burnstock G, Timmermans JP. Region-specific distribution of the P2Y4 receptor in enteric glial cells and interstitial cells of Cajal within the guinea-pig gastrointestinal tract. *Auton Neurosci* 2006; 126-127: 299-306
- Burnstock G, Lavin S. Interstitial cells of Cajal and purinergic signalling. *Auton Neurosci* 2002; 97: 68-72
- 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
- Poole DP, Van Nguyen T, Kawai M, Furness JB. Protein kinases expressed by interstitial cells of Cajal. *Histochem Cell Biol* 2004; 121: 21-30
- Salmhofer H, Neuhuber WL, Ruth P, Huber A, Russwurm M, Allescher HD. Pivotal role of the interstitial cells of Cajal in the nitric oxide signaling pathway of rat small intestine. Morphological evidence. *Cell Tissue Res* 2001; 305: 331-340
- 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
- Faussone-Pellegrini MS, Cortesini C. The muscle coat of the lower esophageal sphincter in patients with achalasia and hypertensive sphincter. An electron microscopic study. *J Submicrosc Cytol* 1985; 17: 673-685

■名词解释

Cajal间质细胞 (ICC): 一类主要分布于胃肠道的间质细胞, 是胃肠道的起搏细胞 (pacemaker cell) 和信号传导细胞, 与肌细胞以及末梢神经元有着紧密的关系, 具有激发和促进胃肠蠕动的作用。

■同行评价

本综述立题正确、文献收集相对比较齐全,内容比较新颖,对进一步深入认识ICC的生理功能及其与某些疾病的关系有很好的帮助。

- 30 Langer JC, Berezin I, Daniel EE. Hypertrophic pyloric stenosis: ultrastructural abnormalities of enteric nerves and the interstitial cells of Cajal. *J Pediatr Surg* 1995; 30: 1535-1543
- 31 Huang PL, Dawson TM, Bredt DS, Snyder SH, Fishman MC. Targeted disruption of the neuronal nitric oxide synthase gene. *Cell* 1993; 75: 1273-1286
- 32 Vanderwinden JM, Liu H, Menu R, Conreur JL, De Laet MH, Vanderhaeghen JJ. The pathology of infantile hypertrophic pyloric stenosis after healing. *J Pediatr Surg* 1996; 31: 1530-1534
- 33 Isozaki K, Hirota S, Miyagawa J, Taniguchi M, Shinomura Y, Matsuzawa Y. Deficiency of c-kit+ cells in patients with a myopathic form of chronic idiopathic intestinal pseudo-obstruction. *Am J Gastroenterol* 1997; 92: 332-334
- 34 Yamataka A, Ohshiro K, Kobayashi H, Lane GJ, Yamataka T, Fujiwara T, Sunagawa M, Miyano T. Abnormal distribution of intestinal pacemaker (C-KIT-positive) cells in an infant with chronic idiopathic intestinal pseudo-obstruction. *J Pediatr Surg* 1998; 33: 859-862
- 35 Sakurai S, Fukasawa T, Chong JM, Tanaka A, Fukayama M. Embryonic form of smooth muscle myosin heavy chain (SMemb/MHC-B) in gastrointestinal stromal tumor and interstitial cells of Cajal. *Am J Pathol* 1999; 154: 23-28
- 36 Sarlomo-Rikala M, Kovatich AJ, Barusevicius A, Miettinen M. CD117: a sensitive marker for gastrointestinal stromal tumors that is more specific than CD34. *Mod Pathol* 1998; 11: 728-734
- 37 Hou YY, Grabellus F, Weber F, Zhou Y, Tan YS, Li J, Shen KT, Qin J, Sun YH, Qin XY, Bockhorn M, Gerken G, Broelsch CE, Frilling A. Impact of KIT and PDGFRA gene mutations on prognosis of patients with gastrointestinal stromal tumors after complete primary tumor resection. *J Gastrointest Surg* 2009; 13: 1583-1592
- 38 Hirota S, Isozaki K, Moriyama Y, Hashimoto K, Nishida T, Ishiguro S, Kawano K, Hanada M, Kurata A, Takeda M, Muhammad Tunio G, Matsuzawa Y, Kanakura Y, Shinomura Y, Kitamura Y. Gain-of-function mutations of c-kit in human gastrointestinal stromal tumors. *Science* 1998; 279: 577-580
- 39 Vanderwinden JM, Rumessen JJ, De Laet MH, Vanderhaeghen JJ, Schiffmann SN. CD34+ cells in human intestine are fibroblasts adjacent to, but distinct from, interstitial cells of Cajal. *Lab Invest* 1999; 79: 59-65
- 40 Lavoie B, Balemba OB, Nelson MT, Ward SM, Mawe GM. Morphological and physiological evidence for interstitial cell of Cajal-like cells in the guinea pig gallbladder. *J Physiol* 2007; 579: 487-501
- 41 Ahmadi O, Nicholson Mde L, Gould ML, Mitchell A, Stringer MD. Interstitial cells of Cajal are present in human extrahepatic bile ducts. *J Gastroenterol Hepatol* 2010; 25: 277-285
- 42 Huang Y, Mei F, Yu B, Zhang HJ, Han J, Jiang ZY, Zhou DS. Distribution of the interstitial Cajal-like cells in the gallbladder and extrahepatic biliary duct of the guinea-pig. *Acta Histochem* 2009; 111: 157-165
- 43 Hinescu ME, Ardeleanu C, Gherghiceanu M, Popescu LM. Interstitial Cajal-like cells in human gallbladder. *J Mol Histol* 2007; 38: 275-284
- 44 Mendoza-Marin M, Hoang MP, Albores-Saavedra J. Malignant stromal tumor of the gallbladder with interstitial cells of Cajal phenotype. *Arch Pathol Lab Med* 2002; 126: 481-483
- 45 Beckett EA, McGeough CA, Sanders KM, Ward SM. Pacing of interstitial cells of Cajal in the murine gastric antrum: neurally mediated and direct stimulation. *J Physiol* 2003; 553: 545-559
- 46 Buist ML, Corrias A, Poh YC. A model of slow wave propagation and entrainment along the stomach. *Ann Biomed Eng* 2010; 38: 3022-3030
- 47 Pasricha PJ, Pehlivanov ND, Gomez G, Vittal H, Lurken MS, Farrugia G. Changes in the gastric enteric nervous system and muscle: a case report on two patients with diabetic gastroparesis. *BMC Gastroenterol* 2008; 8: 21
- 48 Ciortescu I, Stanciu C. [Gastroparesis--diagnosis and treatment]. *Rev Med Chir Soc Med Nat Iasi* 2009; 113: 330-338
- 49 Ördög T, Takayama I, Cheung WK, Ward SM, Sanders KM. Remodeling of networks of interstitial cells of Cajal in a murine model of diabetic gastroparesis. *Diabetes* 2000; 49: 1731-1739

编辑 张姗姗 电编 闫晋利

ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) CN 14-1260/R 2012年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

《世界华人消化杂志》2011年开始不再收取审稿费

本刊讯 为了方便作者来稿,保证稿件尽快公平、公正的处理,《世界华人消化杂志》编辑部研究决定,从2011年开始对所有来稿不再收取审稿费。审稿周期及发表周期不变。(编辑部主任:李军亮 2011-01-01)

姜黄素衍生物EF24的抗肿瘤机制研究进展

刘海涛, 王遯遯, 刘连新

刘海涛, 王遯遯, 刘连新, 哈尔滨医科大学附属第一医院
肝脏外科 教育部肝脾外科重点实验室 黑龙江省哈尔滨市
150001

刘海涛, 硕士, 主要从事肝癌的发生发展机制研究.

作者贡献分布: 本综述由刘海涛撰写; 刘连新与王遯遯进行审校.

通讯作者: 刘连新, 教授, 主任医师, 150001, 黑龙江省哈尔滨市
南岗区邮政街23号, 哈尔滨医科大学附属第一医院肝脏外科.
liulianxin@medmail.com.cn

电话: 0451-8555049

收稿日期: 2012-03-14 修回日期: 2012-04-21

接受日期: 2012-06-28 在线出版日期: 2012-07-18

Advances in understanding mechanisms underlying the antitumor activity of curcumin analogue EF24

Hai-Tao Liu, Luo-Luo Wang, Lian-Xin Liu

Hai-Tao Liu, Luo-Luo Wang, Lian-Xin Liu, Department
of Hepatic Surgery, the First Affiliated Hospital of Harbin
Medical University; Key Laboratory of Hepatosplenic Sur-
gery, Ministry of Education, Harbin 150001, Heilongjiang
Province, China

Correspondence to: Lian-Xin Liu, Professor, Chief Physi-
cian, Department of Hepatic Surgery, the First Affiliated
Hospital of Harbin Medical University, 23 Youzheng Street,
Nangang District, Harbin 150001, Heilongjiang Province,
China. liulianxin@medmail.com.cn

Received: 2012-03-14 Revised: 2012-04-21

Accepted: 2012-06-28 Published online: 2012-07-18

Abstract

Curcumin, a natural polyphenol which was first extracted by Vogel and Pelletier from rhizomes of the plant *Curcuma longa* L, has potent anticarcinogenic activity and low toxic side effects in a wide variety of tumor cells. It has been listed as a third-generation chemoprophylactic drug by the US National Cancer Institute. However, the therapeutic benefit is hampered by its low absorption after transdermal or oral application. Ames et al. have developed a series of novel synthetic curcumin analogs that are more potent and have better water solubility than curcumin. One of these leading compounds, EF24, exhibits about 10-fold greater cytotoxic activity against various cancer cell lines in relation to curcumin. This article will review the recent advances in understanding mechanisms underlying the antitumor activity of EF24.

Key Words: Curcumin; EF24; Antitumor mechanism

Liu HT, Wang LL, Liu LX. Advances in understanding mechanisms underlying the antitumor activity of curcumin analogue EF24. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2012; 20(20): 1853-1857

摘要

姜黄素是最早由Vogel和Pelletier从草本植物姜黄的根茎中分离得到的一种酚性天然药物, 因其抗肿瘤谱广, 不良反应小, 美国国立肿瘤研究所已将其列为第3代肿瘤化学预防药物. 但是姜黄素的治疗效果却由于口服给药后吸收率低而受到阻碍, Ames等人已开发出一系列比姜黄素水溶性更好的衍生物, 其中一种叫3,5-(E)-二(2-氟亚苄基)哌啶-4-酮酸盐(EF24), 他在多种肿瘤细胞系中表现出比姜黄素更好的细胞毒性能.

关键词: 姜黄素; 3,5-(E)-二(2-氟亚苄基)哌啶-4-酮酸盐; 抗肿瘤机制

刘海涛, 王遯遯, 刘连新. 姜黄素衍生物EF24的抗肿瘤机制研究进展. *世界华人消化杂志* 2012; 20(20): 1853-1857

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/1853.asp>

0 引言

姜黄素衍生物EF24和EF31均是抗肿瘤效能突出的两种姜黄素衍生物^[1,2], 其中以EF24研究最为广泛, 其不仅具有很好的稳定性和安全性, 还与二烯酮基未经修饰的姜黄素化合物具有相似的细胞活性. 近十年来, 人们对其抗肿瘤作用进行了广泛研究, 众多学者的研究证明EF24可以抑制肿瘤细胞增殖、生长以及肿瘤血管形成等, 并能通过抑制多条细胞信号通路达到抑制肿瘤细胞增殖和诱导细胞凋亡的作用^[3-9]. 研究者还发现通过靶向治疗可以增强EF24的抗肿瘤作用. 本文就EF24抗肿瘤机制方面的研究作一综述.

1 EF24抗肿瘤作用机制

EF24在抑制肿瘤细胞的生长、增殖、促进凋亡和血管形成过程中有多个作用靶点, 对不同的

■背景资料

姜黄素是一种酚性天然药物, 因其抗肿瘤谱广, 不良反应小而受到关注, 但是姜黄素的治疗效果因口服吸收率低而受到阻碍. 研究发现, EF24在多种肿瘤细胞系中表现出比姜黄素更好的细胞毒性能.

■同行评议者

季加孚, 教授, 北京大学肿瘤医院

■ 研发前沿

目前对于EF24的研究显示其抗肿瘤效能十分突出,近年来受到国内外众多研究机构的重视,并深入探讨了其抗肿瘤的作用机制。

肿瘤细胞系, EF24具有不同的作用机制, 甚至展现出多条途径共同抑制肿瘤生长的特性。目前对EF24的抗肿瘤机制研究主要集中在诱导细胞凋亡, 诱导细胞周期停滞, 抑制真核转录因子活化和抑制血管生成等几个方面。

1.1 诱导细胞的凋亡 有证据表明EF24可以通过氧化还原依赖的反应机制诱导肿瘤细胞凋亡^[10,11], 通过膜联蛋白V/碘化丙啶检测发现EF24可以诱导肝癌研究领域常用的5种细胞(HepG2、SK-HEP-1、PLC/PRF/5、Huh 7和Hep3B)程序性细胞死亡, 并表现出一定的浓度时间依赖性, 这与姜黄素在治疗肝癌中的作用机制相似^[12]。在研究肝癌、结肠癌、胰腺癌等众多肿瘤的凋亡途径时, 通过细胞凋亡相关蛋白Bcl-2、Bax的表达水平来判断线粒体凋亡途径是否参与细胞的凋亡是一种有效的手段^[13-15]。经研究发现EF24处理过的肝癌细胞和对照组相比抗凋亡蛋白Bcl-2表达水平呈浓度依赖性下调, Bax呈现浓度依赖性表达增多, 提示线粒体凋亡途径参与其中, 从而激活Caspase-3, 导致多聚二磷酸腺苷核糖聚合酶(poly ADP-ribose polymerase, PARP)断裂。使用Caspase-3抑制剂Z-VAD-fmk能部分阻断EF24诱导的这些肝癌细胞凋亡, 证明了这些肝癌细胞的凋亡至少部分是Caspase介导的^[16,17]。在结肠癌和胃癌中也发现EF24可以同样通过Caspase介导结肠癌细胞系HTC-116、HT-29和胃腺癌细胞系AGS的编程性细胞死亡^[18]。以上研究表明EF24在多种肿瘤细胞系中都可以通过诱导肿瘤细胞凋亡来发挥其抗肿瘤作用。

1.2 诱导细胞周期阻滞 在细胞周期中, 肿瘤抑制蛋白P53的调节功能主要体现在G₁和G₂/M期校正点的监测, 与转录激活作用密切相关, 控制着细胞周期的生长和停滞^[19-22]。Mdm2是P53的主要调节因子, 他可以通过封闭p53的转录, 将核内P53蛋白转运到胞浆, 或者促进p53降解来调节P53蛋白的活性, PTEN可以抑制PI3K/Akt通路, 该通路是可以将Mdm2转运到核内的信号通路, 如果Mdm2一直存在于胞浆将逐渐被降解, PTEN的这个抑制Mdm2转运至核内的作用使得核内肿瘤抑制蛋白P53聚集, 从而诱导p21活化^[23,24], 诱导p21活化就会导致接下来的cyclin-cdk复合物结合, 使细胞周期停滞在G₁或G₂/M期^[25]。经过2 μmol/L的EF24处理后, 对顺铂耐受的人卵巢癌细胞, 其G₂/M细胞周期调节因子CycB1、CycA、CycD1、Cdc2和Cdc25C呈现出时间依赖的表达降低, 同时细胞周期调节

因子P53的一个负性调节器Mdm2也表现出时间依赖的表达降低^[26], 表明EF24可通过诱导细胞G₂/M期停滞, 抑制对顺铂耐受的人卵巢癌细胞增殖。应用流式细胞仪对药物处理后的细胞周期各阶段细胞数目进行统计, 与对照组(未用药组)相比, EF24同样可以通过诱导G₂/M期停滞, 抑制HepG2、SK-HEP-1、PLC/PRF/5、Huh 7和Hep3B 5种肝癌细胞的增殖^[16]。除此之外有研究发现EF24(1 μmol/L)作用24 h可以诱导结肠癌细胞HCT-116、HT-29和胃腺癌细胞AGS停滞在G₂/M期, 作用48 h会发现有G₀/G₁期停滞^[18]。通过以上研究可知, EF24可以在多种细胞甚至某些耐药的肿瘤细胞系中发挥其诱导细胞周期停滞的作用, 其作用时间的长短可能对所造成的停滞周期有影响。这些表明EF24可能是一种潜在的用以治疗耐药性较强肿瘤的有效药物。

1.3 抑制真核转录因子活化 基本的NF-κB信号通路中, NF-κB二聚体通过与细胞质中3个抑制因子(IκBα、IκBβ、IκBε)中的一个结合而以无活性的状态存在, 当细胞受到各种胞内外信号刺激后, IκB激酶被激活导致其磷酸化, 泛素化降解而将二聚体释放, 转移入细胞核后与目的基因结合促进目的基因的转录^[27-29]。Cyclin B1、COX-2和Bcl-2都是NF-κB可调节的基因产物, 研究发现许多肿瘤细胞系如人上皮细胞癌(HeLa)、乳腺癌(MDA-MB-231)、人前列腺癌(PC3)、结肠癌(HT29)、人肺癌(A549、A460、Calu-1)、肺小细胞癌(H157、H358)、卵巢癌(1A9)和肝癌(HepG2、SK-HEP-1、PLC/PRF/5、Huh 7、Hep3B), EF24都可以直接作用IκB激酶, 抑制NF-κB入核, 从而起到抑制肿瘤生长的作用^[16,30]。

1.4 EF24在范科尼贫血肿瘤通道上的抑制作用 范科尼贫血是一种由基因变异引发的遗传性贫血, 早期的骨髓障碍和基因组不稳定性会导致较高的癌症发病率^[31-34], 在分子水平, 范科尼贫血通路由至少10个轴心蛋白组成, 包括(FANCA、B、C、E、F、G、L、M、FAAP24和FAAP100), 由其作为E3泛素化连接酶起到泛素化和激活FANCD2和FANCI的作用^[35], 其下游蛋白如FANCD1/BRCA2、FANCI/BRIP1和FANCI/PALB2会增加乳腺癌和卵巢癌的发生风险^[36]。因此通过抑制范科尼贫血通路中重要的一步FANCD2泛素化, 来达到降低癌症发生的风险是极有意义的。姜黄素目前已经被证实FANCD2泛素化过程中有微弱的抑制作用, Landais等^[37]以此为依据发

现EF24在抑制FANCD2泛素化过程中具有比姜黄素更好的活性和特异性, 使其成为范科尼贫血肿瘤通路抑制剂中新一员。

1.5 其他抑制肿瘤增殖的途径 COX-2过表达在结肠癌的致癌过程中有增加其对程序性细胞死亡抵抗力的作用^[38], EF24可以有效降低结肠癌细胞内COX-2的表达, 恢复细胞对编程性细胞死亡的敏感性^[18]。IL-8的高表达被认为与炎症导致结直肠癌的发生风险增加有关。EF24同样也具有潜在的改善炎症应答所致肿瘤风险的作用^[39]。血管内皮生长因子在血管发生和促进肿瘤生长中具有重要作用, EF24抑制血管内皮生长因子表达的能力也许是其抑制结直肠癌的另一种分子机制^[18]。经过EF24处理的人结肠癌细胞HCT-116在表皮生长因子诱导的磷酸化ERK水平上也表现出有意义的剂量依赖性降低, 同时EF24体内试验还可以有效抑制AKT和ERK的磷酸化, 这些都证明EF24是肿瘤存活通路上的一种抑制剂, 通过抑制PI3激酶和ERK-MAPK途径发挥作用^[18]。EF24稳定细胞内微管也许会导致缺氧诱导因子(hypoxia inducible factor-1, HIF-1)的表达下降^[40], HIF-1是肿瘤血管发生和存活的重要调节因子, 降低HIF-1的表达水平或者抑制其活性是肿瘤化学药物治疗中比较常用的治疗方法^[41-45]。希佩尔林道(VHL)是目前已知的HIF-1负性调节蛋白, 在含氧正常情况下与蛋白酶体结合促进HIF-1的降解^[46], VHL蛋白表现非活性的肾细胞RCC2在经过EF24作用后发现HIF-1没有变化, 恢复VHL蛋白活性的肾细胞RCC2经过EF24作用后使其抑制HIF-1的活性又重新恢复, 表明EF24调节降解HIF-1需要VHL蛋白的功能。近期的研究表明VHL可以连接并稳定微管^[47], 这个发现可以解释EF24发挥抗HIF-1活性的作用为什么需要有功能的VHL, 很可能是因为EF24稳定细胞内微管是依赖VHL完成的, 而这会降低HIF-1的表达^[48]。

2 EF24的限制性及解决策略

目前EF24虽然具有比姜黄素更强的抗肿瘤作用效果, 但是EF24本身仍然不易溶于水, 这样会影响其生物利用度, Agashe等^[49]研制出一种更具亲水性的EF24脂质复合物, 将EF24包裹在一层脂质体内以增加EF24的水溶性。研究发现浓度为10 $\mu\text{mol/L}$ 时EF24脂质体在肺腺癌H441和前列腺癌PC-3细胞中的抗肿瘤增殖能力要超越单一使用EF24。体内实验时, 将EF24脂质体与荧光素Tc-99m连接, 以示踪注入小鼠体内的EF24脂质复合

体, 尸检组织发现EF24的清除大部分是由肝脾吸收来实现的。这些结果说明将EF24载入脂质体是一种可行的提高EF24生物利用度的有效方法。通过分子靶向作用将EF24与凝血因子VIIa结合靶向到有脉管系统凝血激酶表达的肿瘤, 通过减少肿瘤血管生成, 也可以抑制肿瘤的生长^[50]。

3 结论

EF24作为姜黄素众多衍生物中的一种, 表现出比姜黄素更强的抗肿瘤效能, 他不仅可以诱导肿瘤细胞凋亡、周期阻滞, 还可以通过影响细胞信号传导通路, 抑制血管生成等多方面发挥作用, 其抗肿瘤作用也在众多动物模型中得到证实。EF24在肿瘤的预防和治疗上表现出了极大的潜能, 但是要想使他成为一种高效低毒的新型药物进而得到广泛应用, 其作用机制仍需要更进一步研究和证实。相信在未来的抗肿瘤研究中, 无论在联合药物治疗, 联合基因治疗还是分子靶向治疗方面, EF24都将逐渐成为一种首选的抗肿瘤治疗药物, 并有可能应用到临床肿瘤治疗。

4 参考文献

- 1 Zhu S, Moore TW, Lin X, Morii N, Mancini A, Howard RB, Culver D, Arrendale RF, Reddy P, Evers TJ, Zhang H, Sica G, Chen ZG, Sun A, Fu H, Khuri FR, Shin DM, Snyder JP, Shoji M. Synthetic curcumin analog EF31 inhibits the growth of head and neck squamous cell carcinoma xenografts. *Integr Biol (Camb)* 2012; 4: 633-640
- 2 Olivera A, Moore TW, Hu F, Brown AP, Sun A, Liotta DC, Snyder JP, Yoon Y, Shim H, Marcus AI, Miller AH, Pace TW. Inhibition of the NF- κ B signaling pathway by the curcumin analog, 3,5-Bis(2-pyridinylmethylidene)-4-piperidone (EF31): anti-inflammatory and anti-cancer properties. *Int Immunopharmacol* 2012; 12: 368-377
- 3 Aggarwal BB, Sung B. Pharmacological basis for the role of curcumin in chronic diseases: an age-old spice with modern targets. *Trends Pharmacol Sci* 2009; 30: 85-94
- 4 Odot J, Albert P, Carlier A, Tarpin M, Devy J, Madoulet C. In vitro and in vivo anti-tumoral effect of curcumin against melanoma cells. *Int J Cancer* 2004; 111: 381-387
- 5 Shoba G, Joy D, Joseph T, Majeed M, Rajendran R, Srinivas PS. Influence of piperine on the pharmacokinetics of curcumin in animals and human volunteers. *Planta Med* 1998; 64: 353-356
- 6 Anand P, Kunnumakkara AB, Newman RA, Aggarwal BB. Bioavailability of curcumin: problems and promises. *Mol Pharm* 2007; 4: 807-818
- 7 Buhrow SA, Reid JM, Jia L, Mamoru SJ, Snyder JP, Liotta DC, Ames MM. LC/MS/MS assay and mouse pharmacokinetics and metabolism of the novel curcumin analog EF-24 (NSC 716993). AACR Annual Meeting; 2005 Apr 16-20; Anaheim, United States
- 8 Adams BK, Ferstl EM, Davis MC, Herold M, Kurt-

■应用要点

EF24作为姜黄素众多衍生物中的一种, 表现出比姜黄素更强的抗肿瘤效能, 其抗肿瘤作用也在众多动物模型中得到证实。EF24在肿瘤的预防和治疗上表现出了极大的潜能。

■名词解释

范科尼贫血(Fanconi anemia): 一种罕见的常染色体隐性遗传性血液系统疾病, 属于先天性再障; 因缺少DNA螺旋的一个关键基因BRIP1, 因此许多与他相互作用的基因便不能发挥功能, 从而引发一系列伴随疾病或症状, 如BRCA1基因无法作用于DNA转录, 因此导致他经常与肿瘤伴发。

- 9 Mosley CA, Liotta DC, Snyder JP. Highly active anticancer curcumin analogues. *Adv Exp Med Biol* 2007; 595: 77-103
- 10 Adams BK, Cai J, Armstrong J, Herold M, Lu YJ, Sun A, Snyder JP, Liotta DC, Jones DP, Shoji M. EF24, a novel synthetic curcumin analog, induces apoptosis in cancer cells via a redox-dependent mechanism. *Anticancer Drugs* 2005; 16: 263-275
- 11 Sun A, Lu YJ, Hu H, Shoji M, Liotta DC, Snyder JP. Curcumin analog cytotoxicity against breast cancer cells: exploitation of a redox-dependent mechanism. *Bioorg Med Chem Lett* 2009; 19: 6627-6631
- 12 Xiao Y, Yang FQ, Li SP, Hu G, Lee SM, Wang YT. Essential oil of Curcuma wenyujin induces apoptosis in human hepatoma cells. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 4309-4318
- 13 Kapoor S. Triptolide and management of systemic malignancies besides pancreatic carcinomas. *World J Gastroenterol* 2009; 15: 1018-1019
- 14 Zhang HT, Luo H, Wu J, Lan LB, Fan DH, Zhu KD, Chen XY, Wen M, Liu HM. Galangin induces apoptosis of hepatocellular carcinoma cells via the mitochondrial pathway. *World J Gastroenterol* 2010; 16: 3377-3384
- 15 Zhang YL, Pang LQ, Wu Y, Wang XY, Wang CQ, Fan Y. Significance of Bcl-xL in human colon carcinoma. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 3069-3073
- 16 Liang Y, Yin D, Hou L, Zheng T, Wang J, Meng X, Lu Z, Song X, Pan S, Jiang H, Liu L. Diphenyl difluoroketone: a potent chemotherapy candidate for human hepatocellular carcinoma. *PLoS One* 2011; 6: e23908
- 17 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
- 18 Subramaniam D, May R, Sureban SM, Lee KB, George R, Kuppusamy P, Ramanujam RP, Hideg K, Dieckgraefe BK, Houchen CW, Anant S. Diphenyl difluoroketone: a curcumin derivative with potent in vivo anticancer activity. *Cancer Res* 2008; 68: 1962-1969
- 19 Agarwal ML, Agarwal A, Taylor WR, Stark GR. p53 controls both the G2/M and the G1 cell cycle checkpoints and mediates reversible growth arrest in human fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; 92: 8493-8497
- 20 Reinhardt HC, Schumacher B. The p53 network: cellular and systemic DNA damage responses in aging and cancer. *Trends Genet* 2012; 28: 128-136
- 21 Tanaka T. [Mechanisms of cellular senescence by tumor suppressor p53]. *Nihon Rinsho* 2011; 69: 1891-1900
- 22 Biegging KT, Attardi LD. Deconstructing p53 transcriptional networks in tumor suppression. *Trends Cell Biol* 2012; 22: 97-106
- 23 Mayo LD, Dixon JE, Durden DL, Tonks NK, Donner DB. PTEN protects p53 from Mdm2 and sensitizes cancer cells to chemotherapy. *J Biol Chem* 2002; 277: 5484-5489
- 24 el-Deiry WS, Tokino T, Velculescu VE, Levy DB, Parsons R, Trent JM, Lin D, Mercer WE, Kinzler KW, Vogelstein B. WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell* 1993; 75: 817-825
- 25 Coqueret O. New roles for p21 and p27 cell-cycle inhibitors: a function for each cell compartment? *Trends Cell Biol* 2003; 13: 65-70
- 26 Selvendiran K, Tong L, Vishwanath S, Bratasz A, Trigg NJ, Kutala VK, Hideg K, Kuppusamy P. EF24 induces G2/M arrest and apoptosis in cisplatin-resistant human ovarian cancer cells by increasing PTEN expression. *J Biol Chem* 2007; 282: 28609-28618
- 27 Perkins ND. The diverse and complex roles of NF- κ B subunits in cancer. *Nat Rev Cancer* 2012; 12: 121-132
- 28 Hayden MS, Ghosh S. NF- κ B, the first quarter-century: remarkable progress and outstanding questions. *Genes Dev* 2012; 26: 203-234
- 29 Dang TP. Notch, apoptosis and cancer. *Adv Exp Med Biol* 2012; 727: 199-209
- 30 Kasinski AL, Du Y, Thomas SL, Zhao J, Sun SY, Khuri FR, Wang CY, Shoji M, Sun A, Snyder JP, Liotta D, Fu H. Inhibition of I κ B kinase-nuclear factor-kappaB signaling pathway by 3,5-bis(2-fluorobenzylidene)piperidin-4-one (EF24), a novel monoketone analog of curcumin. *Mol Pharmacol* 2008; 74: 654-661
- 31 Kalb R, Neveling K, Nanda I, Schindler D, Hoehn H. Fanconi anemia: causes and consequences of genetic instability. *Genome Dyn* 2006; 1: 218-242
- 32 Soulier J. Fanconi anemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2011; 2011: 492-497
- 33 Valeri A, Martínez S, Casado JA, Bueren JA. Fanconi anaemia: from a monogenic disease to sporadic cancer. *Clin Transl Oncol* 2011; 13: 215-221
- 34 Garner E, Smogorzewska A. Ubiquitylation and the Fanconi anemia pathway. *FEBS Lett* 2011; 585: 2853-2860
- 35 Wang W. Emergence of a DNA-damage response network consisting of Fanconi anaemia and BRCA proteins. *Nat Rev Genet* 2007; 8: 735-748
- 36 Rahman N, Scott RH. Cancer genes associated with phenotypes in monoallelic and biallelic mutation carriers: new lessons from old players. *Hum Mol Genet* 2007; 16 Spec No 1: R60-R66
- 37 Landais I, Hiddingh S, McCarroll M, Yang C, Sun A, Turker MS, Snyder JP, Hoatlin ME. Monoketone analogs of curcumin, a new class of Fanconi anemia pathway inhibitors. *Mol Cancer* 2009; 8: 133
- 38 Tsujii M, DuBois RN. Alterations in cellular adhesion and apoptosis in epithelial cells overexpressing prostaglandin endoperoxide synthase 2. *Cell* 1995; 83: 493-501
- 39 Landi S, Moreno V, Gioia-Patricola L, Guino E, Navarro M, de Oca J, Capella G, Canzian F. Association of common polymorphisms in inflammatory genes interleukin (IL)6, IL8, tumor necrosis factor alpha, NFKB1, and peroxisome proliferator-activated receptor gamma with colorectal cancer. *Cancer Res* 2003; 63: 3560-3566
- 40 Thomas SL, Zhong D, Zhou W, Malik S, Liotta D, Snyder JP, Hamel E, Giannakakou P. EF24, a novel curcumin analog, disrupts the microtubule cytoskeleton and inhibits HIF-1. *Cell Cycle* 2008; 7: 2409-2417
- 41 Semenza GL. Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 2003; 3: 721-732
- 42 González IR, Moreno-Manzano V, Rodríguez-Jiménez FJ, Sepúlveda P, Sánchez-Puelles JM. The biology of HIF α proteins in cell differentiation and disease. *Vitam Horm* 2011; 87: 367-379

- 43 Wang R, Zhou S, Li S. Cancer therapeutic agents targeting hypoxia-inducible factor-1. *Curr Med Chem* 2011; 18: 3168-3189
- 44 Wilczynski J, Duechler M, Czyz M. Targeting NF- κ B and HIF-1 pathways for the treatment of cancer: part I. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 2011; 59: 289-299
- 45 Wilczynski J, Duechler M, Czyz M. Targeting NF- κ B and HIF-1 pathways for the treatment of cancer: part II. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 2011; 59: 301-307
- 46 Kim WY, Kaelin WG. Role of VHL gene mutation in human cancer. *J Clin Oncol* 2004; 22: 4991-5004
- 47 Hergovich A, Lisztwan J, Barry R, Ballschmieter P, Krek W. Regulation of microtubule stability by the von Hippel-Lindau tumour suppressor protein pVHL. *Nat Cell Biol* 2003; 5: 64-70
- 48 Arjumand W, Sultana S. Role of VHL gene mutation in human renal cell carcinoma. *Tumour Biol* 2012; 33: 9-16
- 49 Agashe H, Lagisetty P, Sahoo K, Bourne D, Grady B, Awasthi V. Liposome-encapsulated EF24-HP β CD inclusion complex: a preformulation study and bio-distribution in a rat model. *J Nanopart Res* 2011; 13: 2609-2623
- 50 Shoji M, Sun A, Kisiel W, Lu YJ, Shim H, McCarey BE, Nichols C, Parker ET, Pohl J, Mosley CA, Alizadeh AR, Liotta DC, Snyder JP. Targeting tissue factor-expressing tumor angiogenesis and tumors with EF24 conjugated to factor VIIa. *J Drug Target* 2008; 16: 185-197

■同行评价

本综述整体而言, 内容重点明确, 思路流畅, 讨论具有一定的新颖性, 参考文献引用合理, 且与临床应用前景相关, 具有较好的临床参考价值。

编辑 张姗姗 电编 闫晋利

ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) CN 14-1260/R 2012年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

《世界华人消化杂志》修回稿须知

本刊讯 为了保证作者来稿及时发表, 同时保护作者与世界华人消化杂志的合法权益, 本刊对修回稿要求如下。

1 修回稿信件

来稿包括所有作者签名的作者投稿函。内容包括: (1)保证无重复发表或一稿多投; (2)是否有经济利益或其他关系造成的利益冲突; (3)所有作者均审读过该文并同意发表, 所有作者均符合作者条件, 所有作者均同意该文代表其真实研究成果, 保证文责自负; (4)列出通讯作者的姓名、地址、电话、传真和电子邮件; 通讯作者应负责与其他作者联系, 修改并最终审核复核稿; (5)列出作者贡献分布; (6)来稿应附有作者工作单位的推荐信, 保证无泄密, 如果是几个单位合作的论文, 则需要提供所有参与单位的推荐信; (7)愿将印刷版和电子版版权转让给本刊编辑部。

2 稿件修改

来稿经同行专家审查后, 认为内容需要修改、补充或删节时, 本刊编辑部将把原稿连同审稿意见、编辑意见寄回给作者修改, 而作者必须于15 d内将单位介绍信、作者符合要点承诺书、版权转让信等书面材料寄回编辑部, 同时将修改后的电子稿件上传至在线办公系统; 逾期寄回的, 作重新投稿处理。

3 版权

本论文发表后作者享有非专有权, 文责由作者自负。作者可在本单位或本人著作集中汇编出版以及用于宣讲和交流, 但应注明发表于《世界华人消化杂志》××年; 卷(期); 起止页码。如有国内外其他单位和个人复制、翻译出版等商业活动, 须征得《世界华人消化杂志》编辑部书面同意, 其编辑版权属本刊所有。编辑部可将文章在《中国学术期刊光盘版》等媒体上长期发布; 作者允许该文章被美国《化学文摘》、《荷兰医学文摘库/医学文摘》、俄罗斯《文摘杂志》、《中国生物学文摘》等国内外相关文摘与检索系统收录。

沉香化气胶囊对糖尿病大鼠小肠ICC和肌间神经丛的影响

陈凤琴, 余跃, 薛丹, 王巧民

■背景资料

胃肠动力障碍是糖尿病(DM)常见的慢性并发症之一, 深入研究胃肠动力障碍的机制, 并针对此寻求有效的治疗措施成为当今研究的重点。

陈凤琴, 余跃, 薛丹, 王巧民, 安徽医科大学附属省立医院消化内科 安徽省合肥市 230001

陈凤琴, 在读硕士, 主要从事胃肠动力性疾病的研究。

安徽省自然科学基金资助项目, No. 070413142

安徽省教育厅自然科学基金重点基金资助项目, No. KJ2010A192

作者贡献分布: 陈凤琴与余跃对此文所作贡献均等; 此课题由余跃与王巧民设计; 研究过程由陈凤琴与薛丹完成; 研究用试剂和分析工具由薛丹提供; 数据分析由陈凤琴与薛丹完成; 本论文写作由陈凤琴完成, 余跃审核。

通讯作者: 余跃, 教授, 主任医师, 硕士生导师, 230001, 安徽省合肥市庐江路17号, 安徽医科大学附属省立医院消化内科。
yuyuemd@yahoo.com.cn

电话: 0551-2283380

收稿日期: 2012-04-27 修回日期: 2012-05-22

接受日期: 2012-06-01 在线出版日期: 2012-07-18

Effect of Chenxiang Huaqi Capsules on interstitial cells of Cajal and myenteric plexus in the intestine of diabetic rats

Feng-Qin Chen, Yue Yu, Dan Xue, Qiao-Min Wang

Feng-Qin Chen, Yue Yu, Dan Xue, Qiao-Min Wang, Department of Gastroenterology, the Affiliated Provincial Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230001, Anhui Province, China

Supported by: the Natural Science Foundation of Anhui Province, Nos. 070413142 and KJ2010A192

Correspondence to: Yue Yu, Professor, Department of Gastroenterology, the Affiliated Provincial Hospital of Anhui Medical University, 17 Lujiang Road, Hefei 230001, Anhui Province, China. yuyuemd@yahoo.com.cn

Received: 2012-04-27 Revised: 2012-05-22

Accepted: 2012-06-01 Published online: 2012-07-18

Abstract

AIM: To explore the protection of Chenxiang Huaqi Capsules against the impairment of interstitial cells of Cajal (ICC) and myenteric plexus in the intestine of diabetic rats.

METHODS: Healthy male SD rats were randomly divided into three groups: control group, diabetes mellitus (DM) group, and DM + Chinese herb group (DM + CH group). DM was induced in rats by a single intraperitoneal injection of streptozotocin (STZ, 60 mg/kg). The DM + CH group was given herb 15.75 g/(kg·d), while the DM group and control group were given equal

volumes of distilled water. Four weeks after intervention, all rats were given Indian ink by lavage for determining the small intestinal transit rate. The expression of c-Kit, synaptophysin, and PGP9.5 was studied by immunohistochemistry and quantified using an image analyzer.

RESULTS: Four weeks after treatment, the small intestine transit rate was increased obviously in the DM + CH group compared to the DM group (71.26 ± 5.22 vs 45.52 ± 6.42 , $P < 0.01$), but was still lower than that in the control group (71.26 ± 5.22 vs 80.40 ± 7.33 , $P < 0.05$). The total area and mean optical density value of c-Kit-positive products in the myenteric plexus were significantly increased in the DM + CH group compared to the DM group (443.28 ± 24.40 vs 358.83 ± 35.03 , $P < 0.01$; 0.16 ± 0.02 vs 0.13 ± 0.02 , $P < 0.01$), but were still lower than those in the control group (443.28 ± 24.40 vs 557.28 ± 42.35 , $P < 0.01$; 0.16 ± 0.02 vs 0.18 ± 0.02 , $P < 0.05$). Similar results were also obtained for synaptophysin and PGP9.5-positive products.

CONCLUSION: Chenxiang Huaqi Capsules may improve intestinal motility by partially reversing abnormal changes in the intestinal ICC and expression of c-Kit, synaptophysin and PGP9.5 in diabetic rats.

Key Words: Chenxiang Huaqi Capsules; Diabetes; c-Kit; protein gene product 9.5; Synaptophysin

Chen FQ, Yu Y, Xue D, Wang QM. Effect of Chenxiang Huaqi Capsules on interstitial cells of Cajal and myenteric plexus in the intestine of diabetic rats. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2012; 20(20): 1858-1862

摘要

目的: 探讨沉香化气胶囊对糖尿病(diabetes mellitus, DM)大鼠小肠Cajal间质细胞(interstitial cells of Cajal, ICC)、肌间神经丛的影响。

方法: 将健康♂SD大鼠分为正常对照组、DM模型组、DM模型+中药组。大鼠一次性腹腔注射(ip)链脲佐菌素(STZ, 60 mg/kg)造模, 选取成功模型, DM模型+中药组每天给予中药灌

■同行评议者

唐文富, 副教授, 四川大学华西医院中西医结合科

胃, 模型组和正常对照组每天给予同等容量的蒸馏水, 持续灌胃4 wk. 所有大鼠干预4 wk结束后, 给予印度墨汁灌胃测定小肠传输速率, 利用免疫组织化学和图像分析观察十二指肠c-Kit、突触素(synaptophysin, Syn)、蛋白基因产物9.5(protein gene product 9.5, PGP9.5)的表达.

结果:灌胃4 wk后, DM模型+中药组小肠传输速率均比DM模型组明显增加(71.26 ± 5.22 vs 45.52 ± 6.42 , $P < 0.01$), 仍低于对照组(71.26 ± 5.22 vs 80.40 ± 7.33 , $P < 0.05$); DM模型+中药组c-Kit、突触素、PGP9.5的阳性产物面积和吸光度值均比DM模型组明显增加(443.28 ± 24.40 vs 358.83 ± 35.03 , 832.33 ± 58.78 vs 488.83 ± 58.56 , 889.17 ± 82.75 vs 445.17 ± 64.06 , 0.16 ± 0.02 vs 0.13 ± 0.02 , 0.25 ± 0.02 vs 0.16 ± 0.01 , 0.24 ± 0.02 vs 0.15 ± 0.01 , 均 $P < 0.01$), 仍低于正常对照组(443.28 ± 24.40 vs 557.28 ± 42.35 , $P < 0.01$; 832.33 ± 58.78 vs 937.67 ± 101.23 , $P < 0.05$; 889.17 ± 82.75 vs 1050.50 ± 90.22 , $P < 0.01$; 0.16 ± 0.02 vs 0.18 ± 0.02 , $P < 0.05$; 0.25 ± 0.02 vs 0.29 ± 0.03 , $P < 0.01$; 0.24 ± 0.02 vs 0.27 ± 0.02 , $P < 0.01$).

结论:沉香化气胶囊可以促进糖尿病大鼠小肠肌间神经丛c-Kit、突触素和PGP9.5的表达, 提示对受损的DM大鼠小肠ICC、肌间神经丛有部分恢复作用, 从而对糖尿病大鼠的胃肠动力障碍有一定的改善效应.

关键词:沉香化气胶囊; 糖尿病; c-Kit; 蛋白基因产物9.5; 突触素

陈凤琴, 余跃, 薛丹, 王巧民. 沉香化气胶囊对糖尿病大鼠小肠ICC和肌间神经丛的影响. 世界华人消化杂志 2012; 20(20): 1858-1862
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/1858.asp>

0 引言

胃肠动力障碍是糖尿病(diabetes mellitus, DM)重要的并发症之一, 其发病率为25%-76%^[1], 严重影响患者生活质量. 研究显示胃肠动力障碍与Cajal间质细胞(interstitial cells of Cajal, ICC)、肠神经系统(enteric nervous system, ENS)和平滑肌细胞(smooth muscle cells, SMC)的功能密切相关^[2,3]. 沉香化气胶囊原载清代方书《增补万病回春》, 主要作用为理气疏肝, 消积和胃. 目前已广泛应用于临床, 厉兰娜等^[4]应用沉香化气胶囊治疗40例功能性消化不良患者, 结果发现患者胃排空时间明显缩短, 总有效率为92.5%, 且患者胃饱胀、嗝气、泛酸、排便不畅等症状明

显好转. 蔡震寨等对便秘型肠易激综合征^[5]和功能性消化不良^[6]的研究发现, 患者经沉香化气胶囊治疗4 wk后, 有关肠道气体的相关症状明显改善, 患者肠道容积积分与治疗前比较明显减少($P < 0.05$), 提示沉香化气胶囊能促进患者肠道气体的排出. 尽管沉香化气胶囊对胃肠动力有一定的改善作用, 但沉香化气胶囊改善胃肠动力的作用机制不甚明确. 本实验通过观察沉香化气胶囊对DM大鼠小肠c-Kit、突触素和PGP9.5表达的变化, 旨在探讨其调控DM胃肠动力障碍的作用机制, 为临床治疗提供理论依据.

1 材料和方法

1.1 材料 健康成年♂SD大鼠36只, 体质量180-210 g, 由安徽医科大学实验中心提供. 实验前在同一环境中至少饲养1 wk, 自由进食、进水, 保持光照周期12 h/12 h. 沉香化气胶囊(由沉香、木香、广藿香、香附、砂仁、莪术等组成)购自杭州胡庆余堂药业有限公司(国药准字Z20010066, 批号100905, 0.45 g/粒), 链脲佐菌素(Streptozotocin, STZ, 北京华迈科生物技术有限责任公司), 精蛋白锌胰岛素注射液(江苏万邦生化医药股份有限公司); 罗氏血糖仪器(ACCU-CHEK®Performa, Germany), 血糖试纸(ACCU-CHEK®Performa, Germany), 印度墨水(Solarbio cat, No.18060); 突触素单克隆一抗(美国Santa Cruz公司), PGP9.5单克隆一抗(英国Abcam公司), c-Kit多克隆一抗(美国Santa Cruz公司); SP法免疫组织化学试剂盒(北京中杉金桥公司).

1.2 方法

1.2.1 糖尿病大鼠模型造模及分组: 36只SD大鼠自由饮水、进食, 12 h/12 h昼夜适应性喂养1 wk后, 随机分为实验组(26只), 正常对照组(10只). 其中实验组按60 mg/kg的注射量称取STZ, 溶于柠檬酸缓冲液配制为10 g/L浓度的STZ溶液, 进行腹腔注射. 72 h及1 wk后尾静脉采血, 以血糖持续1 wk ≥ 16.9 mmol/L^[7]者为DM大鼠模型建立, 共成模20只. 将成模大鼠随机分为两组: DM+中药组和DM组. 根据《中药药理研究方法学》[大鼠剂量 = 人剂量 $\times 35$ (人转换因子)/6 (大鼠转换因子)]计算出大鼠等效剂量为15.75 g/(kg·d)^[8,9], DM组和正常对照组给以同等容量的蒸馏水灌胃, 每日1次, 每周给药7次, 共4 wk^[10].

1.2.2 一般状况: 造模成功后观察饮食、饮水、粪便、毛色及精神状态, 每周称重.

1.2.3 血糖值测定: 造模成功后, 持续给药4 wk, 每周测定各组大鼠血糖值.

■ 研发前沿

近年来, 糖尿病胃肠动力障碍的发病机制及其有效的治疗措施成为研究的热点.

■ 相关报道

Ördög等研究发现胃肠动力障碍与ICC、肠神经系统有关;厉兰娜等研究发现沉香化气胶囊对胃肠动力改善有一定的作用。

表 1 各组大鼠体重、血糖、小肠传输速率的比较 ($n = 10$, mean \pm SD)

分组	体重(g)	血糖(mmol/L)	传输速率(%)
正常组	238.50 \pm 13.69	6.23 \pm 0.89	80.40 \pm 7.33
DM组	174.00 \pm 8.88 ^b	30.30 \pm 2.83 ^b	45.52 \pm 6.42 ^b
DM+中药组	222.50 \pm 11.48 ^c	17.47 \pm 3.94 ^d	71.26 \pm 5.22 ^c

^b $P < 0.01$ vs 正常对照组; ^c $P < 0.05$, ^d $P < 0.01$ vs 正常对照组。

1.2.4 小肠传输速率测定: 造模成功, 给药4 wk末, 各组大鼠禁食不禁水24 h, 次日分别经口灌入印度墨汁0.5 mL, 30 min后水合氯醛(3 mL/kg)腹腔注射, 麻醉大鼠后处死, 用生理盐水冲洗血液^[11], 取出全胃肠道, 计算无张力下小肠传输速率(墨水前端至幽门括约肌距离/小肠全长 $\times 100\%$)。

1.2.5 小肠PGP9.5、突触素、c-Kit免疫组织化学染色: 取近端十二指肠约0.5 cm, 4%多聚甲醛固定, 石蜡包埋, 切片, 片厚3 μ m。免疫组织化学染色程序如下: (1)切片脱蜡至水, 3% H_2O_2 室温5-10 min灭活内源性酶, 蒸馏水洗3次; (2)微波抗原修复: 将切片浸入0.01 mol/L枸橼酸盐缓冲液(pH 6.0)中热修复20 min, 室温冷却后, PBS洗3次, 每次3 min; (3)滴加正常山羊血清封闭液, 室温12 min, 去多余液体; (4)滴加一抗: 突触素单克隆抗体浓度为1:150, PGP9.5单克隆抗体浓度为1:150, c-Kit多克隆抗体浓度为1:300, 4 $^{\circ}$ C孵育过夜; (5)37 $^{\circ}$ C温箱孵育45 min, PBS同上洗3次; (6)生物素化山羊抗大鼠二抗(生物素化山羊抗兔二抗)37 $^{\circ}$ C孵育12 min, PBS同上洗3次; (7)辣根酶标记链霉卵白素试剂37 $^{\circ}$ C孵育12 min, PBS同上洗3次; (8)DAB显色, 光学显微镜下观察出现棕色阳性产物时终止反应, 蒸馏水洗、苏木素复染、脱水、透明、封片。在光镜下观察, 比较正常组、中药组和模型组切片肌间神经丛内突触素、PGP9.5和c-Kit免疫反应阳性产物。每张切片随机选取5个肌间神经丛的高倍视野, 使用形态学图像分析系统(JEOR 80ID, version 6.0)测定免疫反应阳性产物的面积和平均吸光度(A)值。

统计学处理 数据均以mean \pm SD表示, 应用SPSS17.0统计软件进行处理, 多组资料间比较采用LSD检验分析。

2 结果

2.1 大鼠一般状况 造模成功后, DM大鼠出现多饮、多食、多尿、消瘦、精神萎靡、行动迟缓、毛色干枯无光泽。给药4 wk后, DM+中药组较DM组大鼠多饮、多食、多尿症状减轻, 体质

量明显增加($P < 0.01$), 精神状态好转, 但DM+中药组体重仍比正常组降低($P < 0.05$, 表1)。

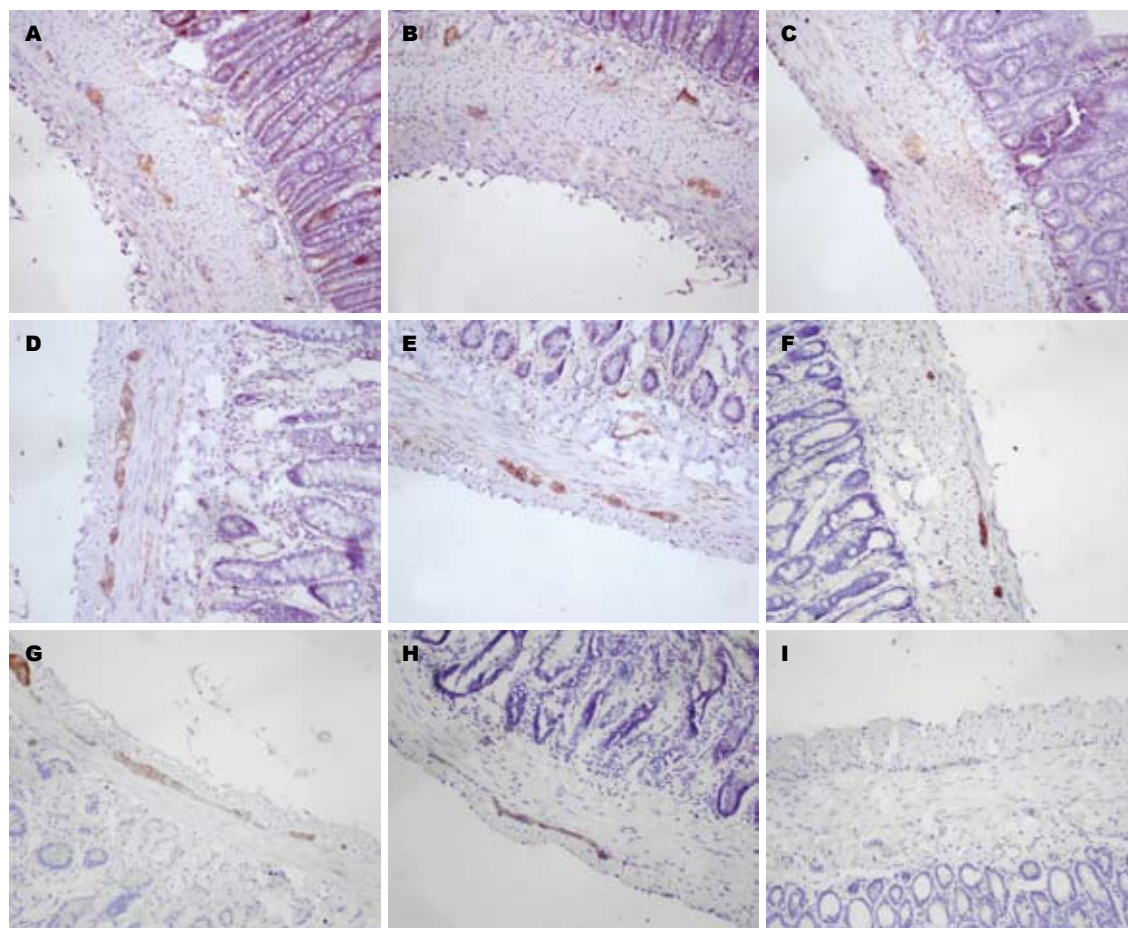
2.2 血糖测定 4 wk后, DM组的血糖显著高于正常对照组($P < 0.01$), DM+中药组比DM组的血糖值显著降低($P < 0.01$), 仍高于正常对照组($P < 0.01$, 表1)。

2.3 小肠传输速率的测定 4 wk后, DM组的小肠传输速率明显低于正常对照组($P < 0.01$), DM+中药组的传输速率比DM组显著增加($P < 0.01$), 仍低于正常对照组($P < 0.05$, 表1)。

2.4 对大鼠十二指肠组织c-Kit、突触素、PGP9.5表达的影响 免疫组织化学结果显示各组小肠肌间神经丛内均可见到c-Kit、突触素、PGP9.5免疫反应阳性细胞, 阳性产物呈棕黄色。DM组c-Kit、突触素、PGP9.5平均阳性产物面积和吸光度(A)值明显减少, DM+中药组c-Kit、突触素、pGP9.5阳性产物面积和平均A值较模型组显著增加, 但仍低于正常对照组(表2, 图1)。

3 讨论

临床和实验证明DM患者存在胃肠动力障碍^[1,3,12], 胃肠动力障碍是DM患者的常见并发症之一, DM胃肠动力障碍的病理生理特点是: 胃肠张力和收缩力低下、蠕动减慢、排空延迟^[12]。前期研究发现DM小鼠存在小肠传输速率的下降, 并且外源性干细胞因子对DM小鼠小肠动力障碍有一定的改善作用^[13]。本研究的重点在于观察DM大鼠是否存在小肠动力障碍以及沉香化气胶囊对DM大鼠的小肠动力障碍是否有改善作用。经过研究发现, DM组大鼠小肠传输速率明显低于正常组, 中药持续灌胃干预4 wk后, DM+中药组比DM组的大鼠小肠传输速率明显增加, 但仍比正常对照组低, 这表明沉香化气胶囊能改善DM大鼠的小肠动力, 促进小肠传输。此外, 光镜下可见DM+中药组的c-Kit、突触素、PGP9.5阳性产物表达的面积和平均吸光度(A)值均比DM组增加, 但低于正常对照组。这表明沉香化气胶囊可以部分恢复DM大鼠受损的小肠



■应用要点
本研究可为临床治疗糖尿病胃肠动力障碍提供新的理论依据。

图 1 光镜下三组c-Kit、突触素、PGP9.5的免疫组织化学染色($\times 200$)。A-C: c-Kit; D-F: 突触素; G-I: PGP9.5。A, D, G: 正常对照组; C, F, I: DM组; B, E, H: DM+中药组。

表 2 各组大鼠十二指肠c-Kit、突触素、PGP9.5的阳性面积和平均吸光度值的比较

	c-Kit		突触素		PGP9.5	
	阳性产物面积	平均吸光度值	阳性产物面积	平均吸光度值	阳性产物面积	平均吸光度值
正常组	557.28 \pm 42.35	0.1796 \pm 0.0208	937.67 \pm 101.23	0.2927 \pm 0.0319	1050.50 \pm 90.22	0.2722 \pm 0.0162
DM+中药组	443.28 \pm 24.40 ^d	0.1622 \pm 0.0200 ^c	832.33 \pm 58.78 ^c	0.2446 \pm 0.0166 ^d	889.17 \pm 82.75 ^d	0.2363 \pm 0.0149 ^d
DM组	358.83 \pm 35.03 ^b	0.1279 \pm 0.0176 ^b	488.83 \pm 58.56 ^b	0.1639 \pm 0.0091 ^b	445.17 \pm 64.06 ^b	0.1536 \pm 0.0108 ^b

^b $P < 0.01$ vs 正常对照组、DM+中药组; ^c $P < 0.05$, ^d $P < 0.01$ vs 正常对照组。

ICC、肌间神经丛。提示沉香化气胶囊通过促进DM大鼠小肠ICC、肠神经系统的恢复,从而改善DM大鼠胃肠动力障碍。

沉香化气胶囊原载清代方书《增补万病回春》,主要作用为理气疏肝,消积和胃。沉香、木香、莪术行气止痛,藿香、砂仁温中化湿,香附疏肝解郁,陈皮理气健脾,燥湿化痰,神曲、麦芽消食和胃,甘草调和诸药。吴承艳等^[14]研究表明木香可显著增强小鼠胃肠推进运动,使离体大鼠回肠收缩幅度明显增大,有促胃肠动力及止痛作用。李伟等^[15]研究发现陈皮能促进小鼠胃排空和肠推进,其促进肠推进作用可能与胆

碱能M受体有关。同时,蔡振寨等临床研究发现经沉香化气胶囊治疗后,肠易激综合征^[5]、功能性消化不良^[6]的患者腹痛、腹胀等症状明显好转,腹痛腹胀症状积分明显下降,治疗后肠道气体也明显减少。这与我们的研究结果是一致的。

胃肠运动功能的正常发挥需要ICC、肠神经网络和平滑肌细胞的共同参与,他们中任何一个受到损伤都会使胃肠功能受到不同程度的影响。ICC是胃肠道慢波活动的起搏细胞,参与基本电节律的传播和神经信息传递等,同平滑肌细胞和神经相互连接成网络共同调节胃肠道运动^[16,17]。多种疾病与ICC数量减少和超微结构

同行评价

本研究对揭示糖尿病并发胃肠动力障碍的中药治疗机制提供了一定的研究价值和临床意义。

破坏有关,例如便秘^[18]、多器官功能障碍综合征^[19]等,同时多项临床和实验研究显示,DM患者或动物肠道ICC(c-Kit阳性细胞)数量与正常组相比明显下降,并且给予外源性干细胞因子有利于ICC恢复^[1,20]。

肠神经系统主要由胃肠道壁内微小神经节内所含有的各类神经元和节间索组成,是一个结构和功能独特的系统。突触素抗体能选择性标记胃肠道肌间神经丛的突触和肌层的神经肌肉接头,是评价胃肠动力功能单元的重要指标^[21]。PGP9.5是目前应用较为广泛的神经结构标志物,他能广泛表达于运动和感觉神经元的前体细胞以及其他神经细胞,在神经细胞的生长和分化中作用至关重要^[22]。多项研究显示肠神经系统的损伤与胃肠传输速率的调控有一定程度的关系,Li等^[23]研究结果显示DM大鼠肌间神经丛突触素和PGP9.5的阳性表达明显低于对照组。Geramizadeh等^[18]对慢性传输型便秘的研究结果发现:与对照组相比,便秘患者环肌层内的PGP9.5阳性细胞数量明显下降。我们的研究结果同样显示DM大鼠小肠肌间神经丛内突触素和PGP9.5的阳性明显低于正常组,并且给予中药4 wk后,中药组突触素和PGP9.5的阳性高于模型对照组,但是仍低于正常组。

目前,DM胃肠动力障碍患者主要是进行西医治疗,西医治疗的主要方法是使用促胃肠动力药,改善患者局部的症状,且存在的不良反应限制了临床应用^[24],中医学的主要特点是整体观念和辨证论治,通过改善患者的全身状态从而改善患者的胃肠功能,在治疗DM胃肠动力障碍方面显示了广阔的发展前景。

总之,本研究证实了DM大鼠确实存在胃肠动力障碍,沉香化气胶囊通过部分逆转DM大鼠小肠ICC、肠神经系统的异常改变,对DM大鼠胃肠动力障碍有一定的改善作用。本研究提示沉香化气胶囊可能为临床治疗DM胃肠动力障碍提供新的理论依据,其具体机制有待于进一步研究。

参考文献

- Ordög T, Hayashi Y, Gibbons SJ. Cellular pathogenesis of diabetic gastroenteropathy. *Minerva Gastroenterol Dietol* 2009; 55: 315-343
- Donnell AM, Doi T, Hollwarth M, Kalicinski P, Czuderna P, Puri P. Deficient alpha-smooth muscle actin as a cause of functional intestinal obstruction in childhood. *Pediatr Surg Int* 2008; 24: 1191-1195
- 杨琰,余跃,高显奎,陈军,王巧民. 胰岛素对糖尿病小鼠小肠功能的影响. *中华消化杂志* 2011; 31: 235-238

- 厉兰娜,戴蕾,朱惠芳,余永红,江汉才,李玉芳,林家乐,陈炜. 沉香化气胶囊治疗功能性消化不良的临床研究—附40例临床疗效观察. *浙江中医杂志* 2002; 37: 454-455
- 蔡振寨,曹曙光,王建璋,郑君杰. 沉香化气胶囊对便秘型肠易激综合征肠道气体的治疗作用. *海峡药学* 2010; 22: 99-100
- 蔡振寨,王建璋,曹曙光,郑君杰,薛战雄. 沉香化气胶囊对功能性消化不良患者肠道气体的治疗作用. *实用医学杂志* 2010; 26: 1036-1037
- 陈霞,赵宏贤,徐富翠,梅欣明,郭勇. I型糖尿病胃轻瘫大鼠动物模型建立与优化. *四川动物* 2010; 29: 630-632
- 陈瑞明,王磊,邢练军,郑培永,季光. 清肝活血方对酒精性肝纤维化大鼠基质金属蛋白酶的调控作用. *中国中西医结合杂志* 2011; 31: 1538-1544
- 吴涛,柳涛,郑培永,邢练军,季光. 清肝活血方及其拆方对酒精性肝病大鼠CD14、TLR4表达的影响. *世界华人消化杂志* 2008; 16: 3372-3380
- 金明柱,李敬林. 益气解毒活络法对糖尿病早期肾病大鼠的药效学实验研究. *辽宁中医杂志* 2011; 38: 1971-1973
- 范玲,吴东方,雷亚宁. 急性结肠炎大鼠肠运动功能和肌间神经丛形态学变化. *温州医学院学报* 2011; 41: 37-39
- Jung HK, Kim DY, Moon IH, Hong YS. Colonic transit time in diabetic patients—comparison with healthy subjects and the effect of autonomic neuropathy. *Yonsei Med J* 2003; 44: 265-272
- 杨琰,余跃,高显奎,陈军,王巧民. 干细胞因子对糖尿病小鼠小肠平滑肌细胞慢波的影响. *世界华人消化杂志* 2010; 18: 993-997
- 吴承艳,李振彬,石建喜. 木香、丁香和威灵仙镇痛及胃肠动力作用的实验研究. *江苏中医药* 2005; 12: 61-63
- 李伟,郑天珍,瞿颂义,田治峰,邱小青,丁光辉,卫玉玲. 陈皮对小鼠胃排空及肠推进的影响. *中药药理与临床* 2002; 18: 22-23
- Huizinga JD, Zarate N, Farrugia G. Physiology, injury, and recovery of interstitial cells of Cajal: basic and clinical science. *Gastroenterology* 2009; 137: 1548-1556
- Sanders KM, Ward SM. Interstitial cells of Cajal: a new perspective on smooth muscle function. *J Physiol* 2006; 576: 721-726
- Geramizadeh B, Hayati K, Rahsaz M, Hosseini SV. Assessing the interstitial cells of Cajal, cells of enteric nervous system and neurotransmitters in slow transit constipation, using immunohistochemistry for CD117, PGP9.5 and serotonin. *Hepatogastroenterology* 2009; 56: 1670-1674
- Cai ZX, Li Y, Qi QH. Morphological changes in interstitial cells of Cajal in the deep muscular plexus and enteric motor neurons of the intestine in rats with multiple organ dysfunction syndrome. *Neural Regen Res* 2010; 5: 635-640
- 杨琰,余跃,高显奎,陈军,王巧民. 干细胞因子对糖尿病小鼠小肠Cajal间质细胞的影响. *胃肠病学和肝病学杂志* 2011; 20: 230-232
- 陈军,余跃,杨琰,高显奎,王巧民. 突触在胃起搏调控胃慢波活动中的作用. *胃肠病学和肝病学杂志* 2011; 20: 633-636
- 薛丹,余跃,杨琰,陈军. 氯化苄烷氨处理后大鼠十二指肠肌间神经丛和黏膜下神经丛的变化. *安徽医科大学学报* 2011; 46: 830-832
- Li C, Liu S, Guan Y, Qian W, du F, Hou X. Long pulse gastric electrical stimulation induces regeneration of myenteric plexus synaptic vesicles in diabetic rats. *Neurogastroenterol Motil* 2010; 22: 453-461, e108
- Günlemez A, Babaoğlu A, Arisoy AE, Türker G, Gökalp AS. Effect of domperidone on the QTc interval in premature infants. *J Perinatol* 2010; 30: 50-53

五指山小型猪胰岛对糖尿病大鼠的治疗作用

蒋小峰, Thomas Linn, 向广阳, 王业增, 钱滔来, 曹良启, 杨学伟, 章乐虹, 陈德

蒋小峰, 向广阳, 王业增, 曹良启, 杨学伟, 章乐虹, 陈德, 广州医学院第二附属医院普通外科 广东省广州市 510260
Thomas Linn, 德国吉森大学附属医院内分泌科 德国吉森市 32392

钱滔来, 深圳市南山区蛇口人民医院麻醉科 广东省深圳市 518067

作者贡献分布: 此课题由蒋小峰、钱滔来、章乐虹及陈德设计; 动物模型制作和检测分析由向广阳、王业增及蒋小峰操作完成; 胰岛分离由杨学伟、曹良启及蒋小峰完成, 病理分析由Thomas Linn完成; 论文写作由蒋小峰与向广阳完成。

通讯作者: 蒋小峰, 主治医师, 510260, 广东省广州市, 广州医学院第二附属医院普通外科, jiangxiaofeng008@yahoo.com.cn

电话: 020-3415-3080

收稿日期: 2012-02-20 修回日期: 2012-03-20

接受日期: 2012-04-19 在线出版日期: 2012-07-18

Treatment of diabetic rats using islets from a herd of outbred Wuzhishan miniature pigs

Xiao-Feng Jiang, Thomas Linn, Guang-Yang Xiang, Ye-Zeng Wang, Tao-Lai Qian, Liang-Qi Cao, Xue-Wei Yang, Le-Hong Zhang, De Chen

Xiao-Feng Jiang, Guang-Yang Xiang, Ye-Zeng Wang, Liang-Qi Cao, Xue-Wei Yang, Le-Hong Zhang, De Chen, Department of Surgery, the Second Affiliated Hospital of Guangzhou Medical University, Guangzhou 510260, Guangdong Province, China

Thomas Linn, Medical Clinic and Policlinic 3, University Hospital Giessen and Marburg GmbH, Justus-Liebig University, Giessen 32392, Germany

Tao-Lai Qian, Department of Anesthesiology, Shenzhen Shekou People's Hospital of Nangshang District, Shenzhen 518067, Guangdong Province, China

Correspondence to: Xiao-Feng Jiang, Attending Physician, Department of Surgery, the Second Affiliated Hospital of Guangzhou Medical University, Guangzhou 510260, Guangdong Province, China. jiangxiaofeng008@yahoo.com.cn

Received: 2012-02-20 Revised: 2012-03-20

Accepted: 2012-04-19 Published online: 2012-07-18

Abstract

AIM: To assess the efficacy of Wuzhishan miniature pig islets in the treatment of diabetic rats.

METHODS: Adult male miniature pigs and market pigs were used as donors. After collagenase digestion, the islets were purified and intraportally transplanted into diabetic SPF rats, with cyclosporine (20 mg/kg) intramuscularly injected as an immunosuppressive agent. Islet

graft survival was monitored by the detection of changes in blood sugar and liver histology in diabetic rats.

RESULTS: Islet yield was $4\,608 \text{ IEQ/g} \pm 593 \text{ IEQ/g}$ in the miniature pig group and $3\,820 \text{ IEQ/g} \pm 718 \text{ IEQ/g}$ in the market pig group. On day 1 after transplantation, the blood glucose decreased to normal in 84.6% of diabetic rats in both groups. Islet survival time was 3-5 d (median: 4.5 d) in the miniature pig group and 2-4 d (median: 3.7 d) in the market pig group. Kaplan-Meier analysis showed no significant difference between the two groups.

CONCLUSION: The Wuzhishan miniature pigs are an ideal donor species for islet xenotransplantation due to high islet yield and good islet function.

Key Words: Miniature pigs; Islets; Yield; Transplantation

Jiang XF, Linn T, Xiang GY, Wang YZ, Qian TL, Cao LQ, Yang XW, Zhang LH, Chen D. Treatment of diabetic rats using islets from a herd of outbred Wuzhishan miniature pigs. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2012; 20(20): 1863-1867

摘要

目的: 探讨小型猪胰岛治疗糖尿病大鼠的作用和功效。

方法: 成年健康♂五指山小型猪和普通家猪作为胰岛供体。胰腺获取后经胶原酶消化后进行胰岛提取纯化, 纯化后的胰岛通过门静脉移植到糖尿病SPF大鼠的肝内, 术后每天肌注环孢菌素(20 mg/kg)作为免疫抑制剂, 并通过检测糖尿病大鼠的血糖变化和肝脏组织学检查来判定胰岛移植后的存活情况和纠正胰岛移植的效果。

结果: 五指山小型猪胰腺消化后胰岛产量为 $4\,608 \text{ IEQ/g} \pm 593 \text{ IEQ/g}$, 纯化后为 $3\,820 \text{ IEQ/g} \pm 718 \text{ IEQ/g}$, 纯度为85%, 取自屠宰场猪胰岛产量为纯化前为 $3\,500 \text{ IEQ/g} \pm 625 \text{ IEQ/g}$, 纯化后为 $2\,720 \text{ IEQ/g} \pm 435 \text{ IEQ/g}$, 纯度为80%。两组84.6%糖尿病大鼠在移植术后第1天, 血

■背景资料

胰岛移植是治疗糖尿病的有效替代方法之一, 但目前人胰岛移植存在来源困难, 技术要求高, 费用昂贵, 因此不适合我国国情。而利用猪胰岛代替人胰岛来治疗糖尿病却有着广阔的开发前景。

■同行评议者

洪天配, 教授, 北京大学第三医院内分泌科

■研发前沿

由于猪胰岛移植到人体后,会发生凝血和排斥反应,导致猪胰岛移植治疗糖尿病研究停滞不进,但近年来随着基因工程技术的发展,通过对供体猪进行基因改造,已经使得猪胰岛移植的临床前景更加广阔。

糖降至正常。维持时间:小型猪胰岛术后存活时间为3-5 d(中位存活时间:4.5 d),普通家猪胰岛存活时间为2-4 d(中位存活时间:3.7 d)。经Kaplan-Meier分析,两组胰岛存活时间无差别。

结论:封闭群五指山小型猪分离纯化后的胰岛产量高,功能良好,可以纠正糖尿病大鼠的高血糖,适合作为异种胰岛移植的理想供体。

关键词:小型猪;胰岛;异种;移植

蒋小峰, Thomas Linn, 向广阳, 王业增, 钱滔来, 曹良启, 杨学伟, 章乐虹, 陈德. 五指山小型猪胰岛对糖尿病大鼠的治疗作用. 世界华人消化杂志 2012; 20(20): 1863-1867

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/1863.asp>

0 引言

糖尿病目前成为世界高发性疾病,我国是世界糖尿病第一大国,有9 200万患者和1.4亿糖尿病前期患者^[1]。虽然胰岛素替代治疗可以很好地控制糖尿病患者的血糖,但仍有一部分患者的血糖不易被胰岛素控制,波动幅度大,导致低血糖昏迷或其他相关并发症^[2],而且有部分患者长期胰岛素注射后会引发皮下结节,导致注射困难。胰岛移植从2000年开始进入临床试验并取得了良好的治疗效果,被认为是胰岛素替代的有效方法^[3],不但可以有效调节血糖,而且可以有效防止糖尿病引起的血管病变,明显降低糖尿病、肾病、眼病和高血压等症状。但是在我国,由于供体来源困难,胰岛分离技术还不完善,使得临床人胰岛移植技术在我国还不能顺利开展。而猪胰岛素和人胰岛素在结构上相差一个氨基酸序列,因此可以在人体发挥正常功能而调节血糖,且随着基因工程技术的发展,临床前研究证实了猪胰岛可以长期有效地纠正糖尿病灵长类动物的血糖,使科研工作者看见了临床猪胰岛移植的前景^[4,5],国际相关机构为此制订了一些政策和指南来引导合适的临床研究^[6]。我们曾对我国特有的五指山小型猪进行了胰岛分离纯化的研究,而且目前国际上的研究证实小型猪在异种胰岛移植中的优势^[7],因此在本研究中对五指山小型猪胰岛治疗糖尿病的功效进行研究。

1 材料和方法

1.1 材料 5只♂成年五指山小型猪,体质量25-30 kg,购自广东省实验动物监测所;健康♂30只SPF大鼠,体质量250-280 g,购自广东省医学实验动物

中心;所有动物实验都得到广州医学院动物实验伦理委员会的审核和批准。6只普通家猪胰腺取自嘉禾望岗屠宰场;HBSS购自Sigma公司;淋巴细胞分离液(Amersham Bioscience);胎牛血清(华美生物工程公司);胶原酶V、链脲佐菌素(STZ)、双硫宗(DTZ)均购自Sigma公司;胰岛素ELISA试剂盒购自Linco, USA;羊抗胰岛素抗体购自Zymed, South San Francisco, CA, USA。

1.2 方法

1.2.1 糖尿病大鼠模型制作:用柠檬酸液体配制STZ,浓度为1%,pH值控制在7.35-7.45。大鼠称重后,腹腔内注射STZ,剂量为60 mg/kg。STZ注射后,尾静脉抽血检测血糖,当连续2 d血糖高于22 mmol/L时则认为模型成功。模型建立成功后5-7 d进行胰岛移植。

1.2.2 胰岛消化分离:胰腺获取修整干净后,用含胶原酶V(浓度2 g/L)HBSS溶液通过胰管灌注胰腺,胰腺充分膨胀后切成4-6块,放入消化罐内用蠕动泵进行机械消化,温度控制在37.8℃-38.2℃。待胰腺充分消化后用冷HBSS液体中止,消化液用500目的滤网过滤后1 000 r/min离心5 min弃去上清液,收集沉淀的细胞用淋巴分离液进行梯度离心分离胰岛,离心密度为1.10、1.08、1.06、1.04 g/L。离心纯化后,收集纯化的胰岛,用双硫宗(DTZ)染色确认,在镜下根据胰岛直径的大小(150 μm)计算胰岛IEQ,胰岛分离纯化后不经培养直接用于移植。

1.2.3 胰岛移植:SPF糖尿病大鼠腹腔注射10%的水合氯醛(350 mg/kg),取正中切口切开腹部,将肠管拖出腹腔后用湿纱布妥善保护后,大鼠腰部垫高利于暴露肝门静脉。简单分离门静脉主干后,用血管夹夹门静脉主干远端,用22G套管针穿刺门静脉,穿刺后通过留置的套管注射纯化的不同猪胰岛,剂量为4 000-5 000 IEQ/大鼠,门静脉穿刺处用8-0的Prolene线缝合1-2针。移除血管夹,开放门静脉,回纳肠管后关腹。

1.2.4 移植术后监测:术后通过尾静脉取血每天检测糖尿病大鼠血糖变化,每组术后第1天各取3只大鼠处死后取出肝脏,用10%的甲醛固定后石蜡包埋切片,切片和蜡块送德国吉森大学进行移植肝的病理学检查,用荧光异硫氰酸耦合的胰岛素抗体检测移植肝内胰岛细胞,并用荧光显微镜(Leica DFC420C CCD)观察和处理图像。

1.2.5 术后胰岛存活情况判定:术后血糖<11.6 mmol/L时,认为胰岛发挥功能,并存活良好,当连续2 d

■相关报道

2006年, *Nature Medicine*发表了2篇有关猪胰岛治疗糖尿病的研究,取得了良好的效果;2009年,Cooper应用转人CD46基因的猪胰岛进行了治疗糖尿病猴的研究,取得了最佳的治疗效果。

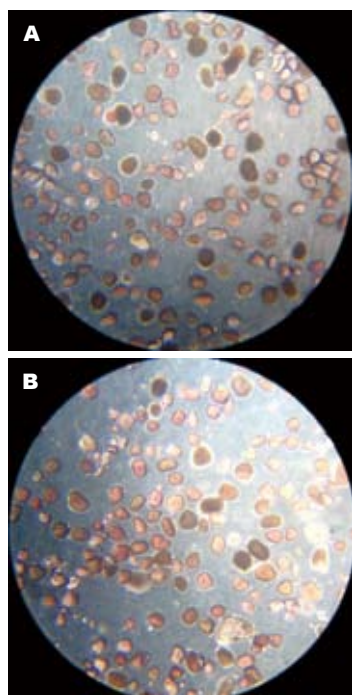


图 1 分离纯化后的猪胰岛经DTZ染色后在镜下呈现橘红色, 大小一致, 包膜完整. A: 普通家猪胰岛; B: 小型猪胰岛.

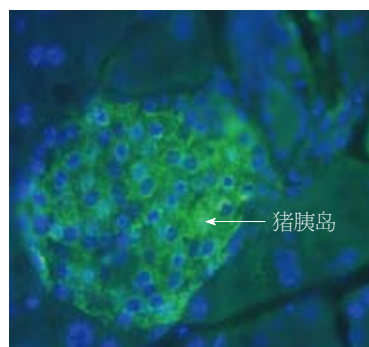


图 2 大鼠肝内移植的猪胰岛. 术后第1天每组各取3只进行肝脏病理学检测, 经胰岛素抗体染色及荧光镜下观察到胰岛在肝脏内能够存活(绿色为产生胰岛素的胰岛细胞, 包膜完整, 蓝色为细胞核).

■创新盘点

目前国内应用猪胰岛移植研究所用的猪种多为杂交大白猪, 而本研究所采用的为封闭群小型猪, 该猪种遗传背景清楚, 基因纯合度高. 因此在供体来源上保证了个体差异小, 减少了实验偏差. 保证了课题的科学性和有效性, 也为今后临床研究提供了有效的材料来源.

血糖 >11.6 mmol/L时则认为胰岛丧失功能.

2 结果

2.1 小型猪胰岛产量和质量 小型猪胰腺消化后胰岛产量纯化前为 $4\,608$ IEQ/g ± 593 IEQ/g, 纯化后为 $3\,820$ IEQ/g ± 718 IEQ/g, 纯度为85%; 取自屠宰场猪胰岛产量为纯化前为 $3\,500$ IEQ/g ± 625 IEQ/g, 纯化后为 $2\,720$ IEQ/g $\pm 4\,351$ IEQ/g, 80%. 镜下观察, 小型猪胰岛大小一致, 形态完整, 活力正常(图1). 体外培养小型猪胰岛在低糖刺激下释放胰岛素为在低糖和高糖刺激下胰岛素释放分别为 2.18 μ U/islet ± 0.21 μ U/islet和 4.211 μ U/islet ± 0.73 μ U/islet, 差异有显著性意义($P<0.01$), 而取自屠宰场猪胰岛素释放分别为 1.83 μ U/islet ± 0.36 μ U/islet和 3.61 μ U/islet ± 0.72 μ U/islet, 差异有显著性, 小型猪胰岛在低糖和高糖刺激后释放的胰岛素都高于普通家猪(表1).

2.2 糖尿病大鼠模型建立 SPF大鼠腹腔内注射STZ后每天通过尾静脉取血检测监测血糖, 当连续两次血糖 ≥ 16.7 mmol/L, 并伴有体质量下降, 多尿等症状时, 则认为造模成功. 30只大鼠造模成功为26只, 成功率为86.7%. 造模成功后5-7 d随机分成2组进行胰岛移植实验: 小型猪胰岛移植组和普通家猪胰岛移植组, 每组13只.

2.3 移植胰岛功能和存活情况 糖尿病大鼠胰岛移植后, 小型猪胰岛和普通猪胰岛移植后可以在术后第1天纠正糖尿病大鼠的高血糖, 其中在两组的糖尿病大鼠中, 每组84.6%糖尿病大鼠

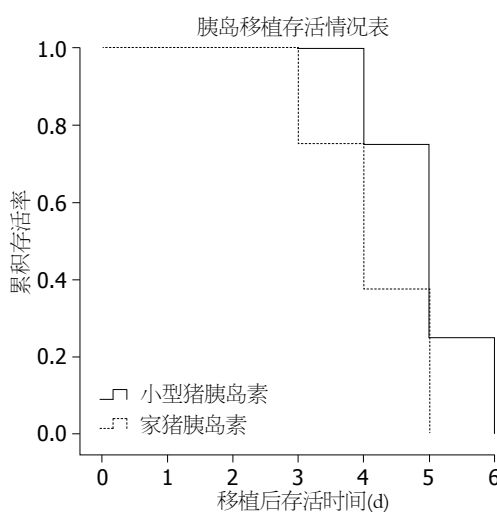


图 3 胰岛移植存活情况.

(11只/13只)的血糖恢复正常, 术后第1天每组各取3只进行肝脏病理学检测, 经胰岛素抗体染色及荧光镜下观察到胰岛在肝脏内能正常存活并发挥功能(图2, 绿色为分泌胰岛素的胰岛细胞). 小型猪胰岛术后存活时间为3-5 d(中位存活时间: 4.5 d), 普通家猪胰岛存活时间为2-4 d(中位存活时间: 3.7 d). 经Kaplan-Meier分析, 两组胰岛存活时间无差别(图3).

3 讨论

近年来由于人体器官匮乏及基因工程技术的发展, 使得猪胰岛治疗1型糖尿病的前景越来越可能^[8,9]. 大量的临床前研究证实了猪胰岛在糖尿病灵长类动物纠正血糖的能力, 但是由于目前尚缺乏一种能提供稳定胰岛来源的猪种使得异种胰岛移植目前仍然不能被广泛应用于临床. 近期的研究认为小型猪可能是比较理想的猪种来源. 并进行了大量的研究证实了小型猪的优势^[7,10]. 我国是目前世界上拥有最丰富小型猪资

■名词解释

IEQ: islet equivalent quantity的简写, 是根据胰岛直径的大小来计算胰岛的当量(以150 μm 为基准), 是重要的胰岛计量单位。

表 1 葡萄糖刺激的胰岛素释放试验

	<i>n</i>	低糖2.8 mmol/L($\mu\text{U}/\text{islet}$)	高糖16.8 mmol/L($\mu\text{U}/\text{islet}$)	<i>P</i> 值
五指山小型猪	5	2.18 \pm 0.21	4.211 \pm 0.73	<0.01
普通家猪	6	1.83 \pm 0.36	3.61 \pm 0.72	<0.01
<i>P</i> 值		<0.01	<0.01	

源的国家, 我国小型猪种类繁多, 品种优良, 因此在我国对小型猪胰岛的开发与研究更有意义^[11]。

五指山小型猪是生长在我国海南岛少数民族地区的一种优良地方猪种, 长期进行封闭饲养, 受外界干扰少, 品种较纯。封闭群的五指山小型猪个体差异小, 在我们之前的研究中发现该品系的胰腺和普通家猪相比无论是解剖形态还是功能上都有优势, 这就为胰岛分离纯化提供了一个稳定的平台, 因此我们选择该品系作为异种胰岛移植的研究。

本研究中五指山小型猪和普通家猪相比不仅胰岛产量有了明显地提高, 而且胰岛的功能也非常良好。在体外实验中, 小型猪胰岛对糖刺激的反应优于普通家猪, 反应了小型猪胰岛在经历机械分离和纯化过程损伤后, 仍然能保持良好的活力, 证实了小型猪胰岛更能耐受缺氧和损伤。在体内实验中, 两组术后的肝脏病理切片检查中发现了存活的胰岛, 并保持了良好的分泌功能, 证明了猪胰岛移植治疗糖尿病的可行性和有效性。胰岛在移植后数小时发挥作用, 第1天糖尿病大鼠的血糖就能降到正常, 84.6%糖尿病大鼠(11只/13只)的血糖恢复正常。小型猪胰岛存活时间为3-5 d (中位存活时间: 4.5 d), 普通家猪胰岛存活时间为2-4 d (中位存活时间: 3.7 d), 两组胰岛存活时间无差别。这主要由于免疫排斥和凝血反应的发生, 小型猪胰岛并不能长期维持功能, 因此如果要长期发挥功能的话, 还需要对供体进行基因修饰, 如转入人的补体抑制基因^[12], 可以延长胰岛的存活时间。

总之, 在本研究证实了五指山小型猪在胰岛的产量优势, 这和Kimm等研究一致。而且在体实验证明了其良好的功能。今后异种胰岛移植可能成为治疗胰岛素依赖性糖尿病, 特别是脆性糖尿病的一个有效替代方法^[13,14]。因此五指山小型猪作为异种胰岛移植供体来源的非常可靠, 他们不仅饲养容易, 繁殖迅速, 而且可以在一定程度进行近交繁殖, 保证基因纯度, 使得个体差异较小, 为我国在利用猪胰岛治疗糖尿病上提供了一个良好的应用平台。

4 参考文献

- 1 Yang ZJ, Liu J, Ge JP, Chen L, Zhao ZG, Yang WY. Prevalence of cardiovascular disease risk factor in the Chinese population: the 2007-2008 China National Diabetes and Metabolic Disorders Study. *Eur Heart J* 2012; 33: 213-220
- 2 Bonifacio E, Ziegler AG. Advances in the prediction and natural history of type 1 diabetes. *Endocrinol Metab Clin North Am* 2010; 39: 513-525
- 3 Shapiro AM, Ricordi C, Hering BJ, Auchincloss H, Lindblad R, Robertson RP, Secchi A, Brendel MD, Berney T, Brennan DC, Cagliero E, Alejandro R, Ryan EA, DiMercurio B, Morel P, Polonsky KS, Reems JA, Bretzel RG, Bertuzzi F, Froud T, Kandaswamy R, Sutherland DE, Eisenbarth G, Segal M, Preiksaitis J, Korbitt GS, Barton FB, Viviano L, Seyfert-Margolis V, Bluestone J, Lakey JR. International trial of the Edmonton protocol for islet transplantation. *N Engl J Med* 2006; 355: 1318-1330
- 4 Hering BJ, Wijkstrom M, Graham ML, Hårdstedt M, Aasheim TC, Jie T, Ansit JD, Nakano M, Cheng J, Li W, Moran K, Christians U, Finnegan C, Mills CD, Sutherland DE, Bansal-Pakala P, Murtaugh MP, Kirchoff N, Schuurman HJ. Prolonged diabetes reversal after intraportal xenotransplantation of wild-type porcine islets in immunosuppressed nonhuman primates. *Nat Med* 2006; 12: 301-303
- 5 Cardona K, Korbitt GS, Milas Z, Lyon J, Cano J, Jiang W, Bello-Laborn H, Hacquoil B, Strobert E, Gangappa S, Weber CJ, Pearson TC, Rajotte RV, Larsen CP. Long-term survival of neonatal porcine islets in nonhuman primates by targeting costimulation pathways. *Nat Med* 2006; 12: 304-306
- 6 Korbitt GS. The International Xenotransplantation Association consensus statement on conditions for undertaking clinical trials of porcine islet products in type 1 diabetes—chapter 3: Pig islet product manufacturing and release testing. *Xenotransplantation* 2009; 16: 223-228
- 7 Kim JH, Kim HI, Lee KW, Yu JE, Kim SH, Park HS, Park CG, Ihm SH, Ha J, Kim SJ, Lee HK, Ahn C, Park KS. Influence of strain and age differences on the yields of porcine islet isolation: extremely high islet yields from SPF CMS miniature pigs. *Xenotransplantation* 2007; 14: 60-66
- 8 Elliott RB. Towards xenotransplantation of pig islets in the clinic. *Curr Opin Organ Transplant* 2011; 16: 195-200
- 9 Dufrane D, Gianello P. Pig islets for clinical islet xenotransplantation. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2009; 18: 495-500
- 10 Jin SM, Shin JS, Kim KS, Gong CH, Park SK, Kim JS, Yeom SC, Hwang ES, Lee CT, Kim SJ, Park CG. Islet isolation from adult designated pathogen-free pigs: use of the newer bovine nervous tissue-free enzymes and a revised donor selection strategy would improve the islet graft function. *Xenotransplantation*

- 2011; 18: 369-379
- 11 冯书堂. 遗传资源创新是我国地方猪种保存和利用的重要途径—记我国近交系小型猪培育、利用20年. 猪业科学 2010; 27: 106-110
- 12 van der Windt DJ, Bottino R, Casu A, Campanile N, Smetanka C, He J, Murase N, Hara H, Ball S, Loveland BE, Ayares D, Lakkis FG, Cooper DK, Trucco M. Long-term controlled normoglycemia in diabetic non-human primates after transplantation with hCD46 transgenic porcine islets. *Am J Transplant* 2009; 9: 2716-2726
- 13 朱海涛, 于良, 王博. 猪胰岛细胞异种移植治疗糖尿病的研究进展. 世界华人消化杂志 2012; 20: 737-742
- 14 Sumi S. Regenerative medicine for insulin deficiency: creation of pancreatic islets and bioartificial pancreas. *J Hepatobiliary Pancreat Sci* 2011; 18: 6-12

■同行评价

本研究为我国在异种胰岛治疗领域提供了一个新的替代方法, 有着较高的学术价值和临床意义。

编辑 曹丽鸥 电编 闫晋利

ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) CN 14-1260/R 2012年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

《世界华人消化杂志》性质、刊登内容及目标

本刊讯 《世界华人消化杂志》[国际标准刊号ISSN 1009-3079 (print), ISSN 2219-2859 (online), 国内统一刊号CN 14-1260/R, Shijie Huaren Xiaohua Zazhi/*World Chinese Journal of Digestology*], 是一本由来自国内23个省、市、自治区、特别行政区的370位胃肠病学和肝病专家支持的开放存取的同行评议的旬刊杂志, 旨在推广国内各地的胃肠病学和肝病领域临床实践和基础研究相结合的最具有临床意义的原创性及各类评论性的文章, 使其成为一种公众资源, 同时科学家、医生、患者和学生可以通过这样一个不受限制的平台来免费获取全文, 了解其领域的所有的关键的进展, 更重要的是这些进展会为本领域的医务工作者和研究者服务, 为他们的患者及基础研究提供进一步的帮助。

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

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

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

2006-2010年陕西省干部群体脂肪肝流行病学调查

李敏, 周健, 史丽萍, 张艾莉, 白智平, 刘元琳

■背景资料

脂肪肝是广泛存在于人群范围内的慢性生活方式疾病, 发病率呈逐年上升趋势。干部群体是脂肪肝发生的高危人群, 研究干部群体脂肪肝的发病趋势及危险因素, 对寻求有效干预措施有重要的临床意义。

李敏, 周健, 史丽萍, 张艾莉, 陕西省人民医院干部病房 陕西省西安市 710068

白智平, 刘元琳, 陕西省保健局 陕西省西安市 710003

李敏, 在读硕士, 主要从事干部保健工作。

中央保健专项资金科研课题基金资助项目, No. B2009A096

作者贡献分布: 此课题由李敏、周健及史丽萍设计; 张艾莉、白智平及刘元琳负责数据收集与整理; 数据分析由李敏完成; 本文写作由李敏、史丽萍及周健完成。

通讯作者: 李敏, 710068, 陕西省西安市友谊西路256号, 陕西省人民医院干部病房, baojianban_sx@163.com

电话: 029-85251331-2548

收稿日期: 2012-04-13 修回日期: 2012-05-25

接受日期: 2012-06-28 在线出版日期: 2012-07-18

An epidemiological investigation of the prevalence and risk factors for fatty liver in the cadre population in Shaanxi Province from 2006 to 2010

Min Li, Jian Zhou, Li-Ping Shi, Ai-Li Zhang,
Zhi-Ping Bai, Yuan-Lin Liu

Min Li, Jian Zhou, Li-Ping Shi, Ai-Li Zhang, Department of Senior Cadres Ward, Shaanxi Provincial People's Hospital, Xi'an 710068, Shaanxi Province, China
Zhi-Ping Bai, Yuan-Lin Liu, Health Care Administration of Shaanxi Province, Xi'an 710003, Shaanxi Province, China
Supported by: the Central Health Fund of Ministry of Health, No. B2009A096

Correspondence to: Min Li, Department of Senior Cadres Ward, Shaanxi Provincial People's Hospital, 256 Youyi West Road, Xi'an 710068, Shaanxi Province, China. baojianban_sx@163.com

Received: 2012-04-13 Revised: 2012-05-25

Accepted: 2012-06-28 Published online: 2012-07-18

Abstract

AIM: To study the epidemiology of fatty liver in the cadre group in Shaanxi Province to provide a basis for prevention and treatment of this disease.

METHODS: The physical examination data for the cadre group in Shaanxi Province from 2006 to 2010 that were preserved in Shaanxi Provincial People's Hospital were collected by cluster sampling. The prevalence of fatty liver was calculated, and its risk factors were analyzed by logistic regression analysis.

RESULTS: The prevalence of fatty liver in the

investigated population was 40.25%, and the annual prevalence rose gradually over the five-year period. Univariate analysis indicated that the development of fatty liver was significantly associated with age, total cholesterol (TC), triglyceride (TG), high density lipoprotein (HDL-C), blood uric acid, fasting blood glucose, weight change, family history of high blood lipid, day sitting time, housework, weeks of exercise frequency, exercise time, body mass index, and abdominal circumference. Multiple logistic regression analysis revealed that the risk factors for fatty liver were TG (OR: 1.92), fasting blood glucose (OR: 1.172), body mass index (OR: 1.149), and abdominal circumference (OR: 1.140). Day sitting time had a negative correlation with the risk of fatty liver (OR: 0.786, 95% CI: 0.625-0.989).

CONCLUSION: The prevalence of fatty liver in subjects investigated rose annually in the cadre population in Shaanxi Province from 2006 to 2010. Fatty liver is closely related with TG, fasting blood glucose, body mass index and abdominal circumference. Close monitoring and effective measures should be carried out in people at higher risk for fatty liver.

Key Words: Fatty liver; Prevalence; Risk factors; Epidemiology

Li M, Zhou J, Shi LP, Zhang AL, Bai ZP, Liu YL. An epidemiological investigation of the prevalence and risk factors for fatty liver in the cadre population in Shaanxi Province from 2006 to 2010. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2012; 20(20): 1868-1872

摘要

目的: 调查陕西省干部群体脂肪肝流行病学, 为预防保健和治疗提供依据。

方法: 整群抽取2006-2010年在陕西省人民医院干部体检中心进行体检的资料保存完整的厅级干部体检资料, 进行脂肪肝患病率和危险因素的logistic回归分析。

结果: 研究对象脂肪肝患病率40.25%, 5年患病率呈逐年增高趋势, 差异有统计学意义。

■同行评议者

迟宝荣, 教授, 吉林大学第一医院
消化内科

($P<0.01$). 单因素分析显示脂肪肝与年龄、总胆固醇(total cholesterol, TC)、甘油三酯(triglyceride, TG)、高密度脂蛋白(high density lipoprotein, HDL-C)、尿酸、空腹血糖、体质量变化、家族高血脂史、日坐位时间、家务劳动、周锻炼次数、次锻炼时间、体质量指数、腹围14个因素相关;经多因素回归分析,危险因素依次为甘油三酯(OR: 1.92)、空腹血糖(OR: 1.172)、体质量指数(OR: 1.149)、腹围(OR: 1.140),日坐位时间与脂肪肝呈负相关(OR: 0.786, 95%CI: 0.625-0.989).

结论: 干部群体脂肪肝患病率逐年增高,与TG、空腹血糖水平、体质量指数及腹围密切相关,应严密监测和控制该类指标,有效防治脂肪肝.

关键词: 脂肪肝; 患病率; 危险因素; 流行病学

李敏, 周健, 史丽萍, 张艾莉, 白智平, 刘元琳. 2006-2010年陕西省干部群体脂肪肝流行病学调查. 世界华人消化杂志 2012; 20(20): 1868-1872
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/1868.asp>

0 引言

脂肪肝是遗传-环境-代谢应激相关因素所致,病变主体在肝小叶,以肝细胞脂肪变性为主的临床综合征.近年来,随着B超作为普查手段的广泛应用和人们健康意识的日渐增强,脂肪肝逐渐被大家所认识和研究,但关于干部群体的研究报道比较少见.本文聚焦陕西省干部群体,对脂肪肝的患病情况和相关发病因素进行深入分析,探讨原因,为预防保健工作提供理论依据.

1 材料和方法

1.1 材料 2006-01-01/2010-12-31在陕西省人民医院干部体检中心体检的享受厅局级待遇的在职、离退休干部,共计4 025人,其中男3 926人次,女99人次,年龄35-87岁,平均 61.64 ± 8.24 岁.各年度(2006-2010年)体检人次比为1:1.08:1.07:1.09:1.79(657:709:702:779:1 178).

1.2 方法

1.2.1 资料收集: 研究资料均来自同一体检中心,按体检类别整群抽取.研究对象体检前告知注意事项,体检当日晨空腹,生化检验由7170型日本日立株式会社自动生化分析仪测定;空腹血糖使用上海科华有限公司血糖试剂盒,氧化酶法测定;B超由飞利浦HD11XE彩色B超机测量,操作人员固定;身高、体质量采用北京海波

尔达科技有限公司的TCS-135-RTB型红外线身高体质量测量仪测量;血压采用日本A&DCD., LTD公司出产的TM-2655P型无创电子血压测量仪测定前臂血压.行为习惯调查采用“知己”健康管理软件配套问卷调查表,由专人指导填写,指导人员经过统一培训.

1.2.2 纳入标准: 研究对象中检查项目符合要求,体检资料保存完整者.依据B超结果,分为脂肪肝组与非脂肪肝组,脂肪肝的超声诊断采用中华医学会肝脏病学分会脂肪肝和酒精性肝病学组编写的《非酒精性脂肪性肝病诊疗指南(2010版)》制定的B超诊断标准.

1.2.3 排除标准: 排除各种急、慢性肝病,包括各种类型的肝炎、肝硬化、肝癌;Wilson病(肝豆状核变性);自身免疫性肝病;妊娠期脂肪肝.

统计学处理 建Epidata数据库进行数据录入,采用SPSS13.0软件进行统计分析.计量资料用 $\text{mean} \pm \text{SD}$ 表示;构成比的比较采用 χ^2 检验;相关因素分析采用logistic回归分析.

2 结果

2.1 研究对象脂肪肝患病率 研究对象共4 025人次,脂肪肝检出1 697人次,患病率40.25%,其中男性42.3%(1 685/3 926),女性12.1%(12/99).5年脂肪肝患病率呈总体逐渐上升趋势(2006年29.68%,2007年35.54%,2008年40.74%,2009年48.01%,2010年50.08%),经 χ^2 检验,具有显著差异性($\chi^2 = 96.54, P<0.01$).

2.2 不同年龄段脂肪肝患病率的动态变化 2006-2010年不同年龄阶段脂肪肝的患病构成均具有显著差别.2006-2008年50-59岁年龄段患病率最高,2009年60-69岁年龄段出现患病高峰,2010年患病高峰则出现在70岁以上人群,从整体趋势来看,随着时间推移,患病高峰逐渐向老年人群靠拢(表1).

2.3 脂肪肝发病的相关危险因素 研究人群中2010年脂肪肝检出者共590例,非脂肪肝588例,以此资料进行脂肪肝发病危险因素分析.

2.3.1 单因素分析: 以脂肪肝为应变量,将脂肪肝相关的20个自变量赋值后,进行单因素logistic回归分析,结果显示14个变量有统计学意义($P<0.05$,表2).

2.3.2 多因素分析: 通过向前引入,应用logistic多因素回归分析,结果有6个因素与脂肪肝具有独立相关性,分别为年龄、甘油三酯(triglyceride, TG)、空腹血糖、日坐位时间、体质量指数、

■ 研究前沿

目前国内关于脂肪肝流行病的研究报道很多,但关于干部群体脂肪肝的研究报道较少,本研究较全面地分析了脂肪肝的发病危险因素情况.

■创新盘点

本研究聚焦于干部群体脂肪肝,采用连续5年数据进行大样本流行病学研究,结论对干部预防保健工作具有积极指导意义。

表 1 2006-2010年脂肪肝患病率在不同年龄段的动态变化(%)

年龄段(岁)	2006年	2007年	2008年	2009年	2010年
<50	31.25	38.78	54.00	60.42	40.91
50-59	37.50	47.71	54.22	41.00	41.80
60-69	27.87	29.54	32.61	61.18	52.86
≥70	14.44	21.38	28.47	31.33	62.40
χ^2 值	17.312	31.839	38.207	47.756	30.127
P值	0.001	0.000	0.000	0.000	0.000

表 2 脂肪肝危险因素单因素分析

因素	β	SE	Wald	P值	OR	95%CI
年龄	-0.045	0.007	37.191	0.000	0.956	0.942-0.970
总胆固醇	0.133	0.065	4.246	0.039	1.143	1.007-1.297
甘油三酯	0.830	0.083	98.855	0.000	2.293	1.947-2.701
高密度脂蛋白	-1.035	0.217	36.082	0.000	0.271	0.177-0.415
低密度脂蛋白	0.103	0.071	2.082	0.149	1.109	0.964-1.275
血尿酸	0.004	0.001	30.986	0.000	1.004	1.003-1.006
空腹血糖	0.202	0.050	16.077	0.000	1.224	1.109-1.351
体质量变化	-0.282	0.112	6.365	0.012	0.754	0.606-0.939
家族糖尿病史	0.383	0.238	2.589	0.108	1.467	0.920-2.338
家族高脂血症史	0.625	0.272	5.271	0.022	1.868	1.096-3.184
日肉类摄入量	-0.059	0.103	0.327	0.567	0.943	0.770-1.154
日植物油量	-0.078	0.093	0.741	0.398	0.925	0.771-1.109
日坐位时间	-0.405	0.089	20.703	0.000	0.667	0.560-0.794
外出方式	0.005	0.015	0.090	0.764	1.005	0.975-1.035
家务劳动	0.248	0.071	12.179	0.000	1.281	1.115-1.472
周锻炼次数	-0.219	0.079	13.639	0.000	0.747	0.640-0.872
每次锻炼时间	-0.164	0.063	6.684	0.010	0.849	0.749-0.961
饮酒习惯	0.073	0.065	1.245	0.265	1.075	0.947-1.222
体质量指数	0.451	0.032	196.823	0.000	1.570	1.474-1.672
腹围	0.173	0.012	219.330	0.000	1.189	1.162-1.216

腹围,其中TG的相对危险度最高(OR = 1.920, 95%CI: 1.562-2.358);年龄因素危险系数较低,OR值接近1;日坐位时间(日坐位时间作为自变量之一,数量值为:几乎全部 = 1, >4 h = 2, <4 h = 3, 几乎没有 = 4)与脂肪肝发病呈负相关(OR: 0.786, 95%CI: 0.625-0.989, 表3)。

3 讨论

脂肪肝在全球广泛分布,患病率因诊断方法的不同而具有很大差异,公认的诊断金标准是病理组织学,但因是有创检查,存在一定并发症和风险,在流行病学调查中应用很少。其他诊断方法包括B超、CT、MR、转氨酶等,目前B超以无创、方便、价廉等优点,被广泛使用,成为流行病学调查的主要方法,诊断敏感性82%-94%,特异性82%以上^[1]。近年来国内采用B超诊断脂

肪肝的大样本研究中,薛黎等^[2]2008年关于新疆地区体检人群的研究显示脂肪肝患病率为23.27%,王凌等^[3]报道2009年江苏地区体检人群研究显示脂肪肝患病率为20.6%。关于干部群体的研究中,万红等^[4]报道2007年兰州地区干部脂肪肝检出率47.24%,吴吉萍等^[5]2008年报道合肥市干部脂肪肝检出率为31.49%,均高于一般人群。本次研究厅级干部群体脂肪肝检出率40.25%,且5年患病率呈逐渐增高并随着年龄增长而增长,逐渐呈现出中老年年龄段密集的趋势,与范建高等^[6]关于上海市的报道“总体脂肪肝患病率随着年龄增长而增高,在60-70岁年龄段达到高峰”一致,说明脂肪肝防治形势严峻,发病后如果没有通过有效的生活方式改善和控制使其逆转,将沉积伴随直至老龄阶段。同时,由于本调查研究对象为厅级干部,年龄上青年

表 3 脂肪肝危险因素多因素分析

因素	β	SE	Wald	P值	OR	95%CI
年龄	-0.032	0.010	10.481	0.001	0.986	0.950–0.987
总胆固醇	0.001	0.088	0.000	0.988	1.001	0.842–1.191
甘油三酯	0.652	0.105	98.559	0.000	1.920	1.562–2.358
高密度脂蛋白	0.249	0.308	0.650	0.420	1.282	0.701–2.346
尿酸	0.001	0.001	1.503	0.220	1.001	0.999–1.003
空腹血糖	0.159	0.061	6.732	0.009	1.172	1.040–1.321
体质量变化	-0.170	0.140	1.467	0.226	0.844	0.641–1.111
家族高脂血症	0.224	0.333	0.453	0.501	1.251	0.652–2.401
日坐位时间	-0.241	0.117	4.237	0.040	0.786	0.625–0.989
家务劳动	0.004	0.089	0.002	0.967	1.004	0.843–1.196
周锻炼次数	-0.024	0.104	0.053	0.818	0.976	0.797–1.196
每次锻炼时间	-0.145	0.082	3.090	0.079	0.865	0.736–1.017
体质量指数	0.139	0.041	11.660	0.001	1.149	1.061–1.244
腹围	0.131	0.016	69.399	0.000	1.140	1.106–1.176

■应用要点

本研究证实了干部群体脂肪肝与年龄、甘油三酯、空腹血糖、日坐位时间、体质量指数、腹围之间的相关性,可靠性好,有助于针对性干预措施的具体展开。

人群只占极少数,也可能是造成该结果的原因之一,但总体大趋势不变。

本研究将20个自变量进行单因素logistic回归分析,结果显示,年龄、总胆固醇(total cholesterol, TC)、TG、高密度脂蛋白(high density lipoprotein, HDL-C)、尿酸、空腹血糖、体质量变化、家族高脂血症、日坐位时间、家务劳动、周锻炼次数、次锻炼时间、体质量指数、腹围14个因素与脂肪肝相关($P < 0.05$)。进一步行多因素回归分析,年龄、TG、空腹血糖、日坐位时间、体质量指数、腹围是脂肪肝的独立相关因素,年龄因素危险系数较低,OR值接近1, TG危险度最高(OR = 1.920)。从脂肪肝的发病机制来看,肝细胞中TG、极低密度脂蛋白(very low density lipoprotein, VLDL)合成和排出不平衡是形成脂肪肝的主要原因^[7]。当进入肝脏的脂肪量超过肝脏的脂质和氧化能力,或肝脏合成LDL障碍,肝脏合成的内源性TG就不能以脂蛋白的形式进出肝脏,则在肝细胞内外堆积形成脂肪肝。而脂肪肝病变又影响脂代谢,加重高血脂而形成恶性循环^[8]。以TG为主的脂肪在肝内沉积是发展为脂肪肝的必要条件^[9]。本调查显示空腹血糖的危险度仅次于TG, 向国卿等^[10]报道空腹血糖的水平是衡量胰岛素反应的最简洁的指标,而且与脂肪性肝病的严重程度相关。空腹血糖受损与胰岛素抵抗直接相关,而胰岛素抵抗目前被认为是脂肪肝发病中位居前列的危险因素,在早期脂肪肝中轻微的胰岛素抵抗十分常见,随着脂肪肝加重,胰岛素抵抗也逐渐加重^[11]。

体质量指数与人体脂肪含量之间存在明显

曲线关系,肝内脂肪堆积的程度与体质量成正比。不同水平的体质量指数,其脂肪肝的检出率是不同的^[12],控制体质量指数有利于减少脂肪肝发生^[13]。许多横向研究和病例对照研究结果显示非酒精性脂肪肝患者腹围和体质量指数明显高于没有非酒精性脂肪肝者,并且报道腹型肥胖与非酒精性脂肪肝存在显著关联性^[14]。本调查显示日坐位时间与脂肪肝发病呈负相关(OR: 0.786, 95%CI: 0.625–0.989),日坐位时间越短,发生脂肪肝的危险性越小。《生命时报》记载脂肪肝主要集中在“三围”人群中,即回家围着电视、办公室围着电脑、出门围着汽车等多吃少动、容易堆积脂肪的人,干部群体是“三围”人群的一部分,脑力劳动多于体力劳动、应酬多、工作忙碌等特点造成生活方式的不健康,脂肪肝随之而来。

脂肪肝是仅次于病毒性肝炎的第2位常见肝病,能使人体对于脂类的吸收发生障碍,人体能量代谢发生紊乱,虽然被认为是良性病变,但他是许多慢性肝脏疾病的早期阶段,不经治疗的脂肪肝会逐渐发展为炎症细胞浸润、坏死、纤维化,并可能引起肝细胞癌变^[15]。脂肪肝已成为消化、内分泌代谢、营养、心血管等学科共同关注的焦点。通过本研究,干部群体应进一步提高认识,通过有效的健康管理,降低发病率,保护肝脏。

4 参考文献

- 1 黄春明, 李瑜元. 非酒精性脂肪肝的流行病学. 现代消化及介入诊疗 2009; 14: 233–237
- 2 薛黎, 孟存仁, 刘继文. 乌鲁木齐市健康体检人群非

■同行评价

本文样本量较大, 结果、结论可为预防保健和治疗提供依据。文章的科学性、创新性和可读性能较好地反映我国该领域研究的先进水平。

- 3 王凌, 沈根海, 徐勤, 陆昀. 非酒精性脂肪肝的患病率及与代谢综合征关系的研究. 中国疗养医学 2010; 5: 467-470
- 4 万红, 李玲, 唐艳萍. 兰州地区干部脂肪肝的调查报告. 临床肝胆病杂志 2008; 24: 261-262
- 5 吴吉萍, 李中南. 794例合肥市干部体检脂肪肝患病情况分析. 安徽医药 2008; 12: 246-247
- 6 范建高, 朱军, 李建新, 李锐, 戴菲, 宋晓敏, 陈兰, 李峰, 陈世耀. 上海市成人脂肪肝患病率及其危险因素流行病学调查. 中华肝脏病杂志 2005; 13: 83-88
- 7 邹玲梅. 脂肪肝患者胰岛素抵抗的临床观察. 淮海医药 2004; 22: 375-376
- 8 徐卫, 石娜, 金蝶. 血脂水平与脂肪肝关系的调查. 现代预防医学 2004; 31: 424
- 9 吴涛, 李光. 非酒精性脂肪性肝病的代谢发病机制. 世界华人消化杂志 2009; 17: 2908-2914
- 10 向国卿, 孟宪云, 张浩, 台文霞, 孟晓丹, 王炳元. 脂肪
- 肝相关危险因素的评估. 世界华人消化杂志 2009; 17: 1038-1041
- 11 Kang H, Greenon JK, Omo JT, Chao C, Peterman D, Anderson L, Foess-Wood L, Sherbondy MA, Conjevaram HS. Metabolic syndrome is associated with greater histologic severity, higher carbohydrate, and lower fat diet in patients with NAFLD. *Am J Gastroenterol* 2006; 101: 2247-2253
- 12 郑珏, 周蓓蕾, 汤蕾蕾, 张艳萍. 体重指数、高脂血症、脂肪肝3者的相关性调查分析. 陕西医学杂志 2010; 39: 437-439
- 13 陈超豪, 汪伟唯, 金杜娟, 谢婷, 李东霞, 陈建华, 郭怀兰. 医学院校教职工脂肪肝横断面研究. 实用预防医学 2011; 18: 4-6
- 14 Jakobsen MU, Berentzen T, Sørensen TI, Overvad K. Abdominal obesity and fatty liver. *Epidemiol Rev* 2007; 29: 77-87
- 15 杜烧, 虞勋, 盛小英. 非酒精性脂肪肝研究进展. 中国现代医药杂志 2009; 11: 133-135

编辑 张姗姗 电编 闫晋利

ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) CN 14-1260/R 2012年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

《世界华人消化杂志》外文字符标准

本刊讯 本刊论文出现的外文字符应注意大小写、正斜体与上下角标。静脉注射iv, 肌肉注射im, 腹腔注射ip, 皮下注射sc, 脑室注射icv, 动脉注射ia, 口服po, 灌胃ig. s(秒)不能写成S, kg不能写成Kg, mL不能写成ML, lcpm(应写为1/min)÷E%(仪器效率)÷60=Bq, pH不能写PH或P^H, *H pylori*不能写成HP, T_{1/2}不能写成tl/2或T_{1/2}, 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*ln*-(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*-methylethanilide(*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.

枯草杆菌肠球菌二联活菌胶囊对非酒精性脂肪性肝炎肠道菌群失调的干预作用

杨林辉, 郭华, 蔡俊, 蔡晓伟, 刘贵伦, 陈东风

杨林辉, 郭华, 蔡俊, 蔡晓伟, 刘贵伦, 武警重庆市总队医院
重庆市 400061

陈东风, 中国人民解放军第三军医大学附属大坪医院消化内科
重庆市 400042

杨林辉, 主治医师, 主要从事消化内科研究工作.

作者贡献分布: 杨林辉与郭华完成实验设计; 杨林辉完成实验过程、统计分析及论文写作; 蔡俊与蔡晓伟完成细菌培养和血清指标的检测; 腹部B超检查由刘贵伦完成; 陈东风进行技术指导

和论文修改.
通讯作者: 杨林辉, 主治医师, 400061, 重庆市南岸区弹子石卫

国路90号, 武警重庆市总队医院消化内科. dzswjyy@163.com

收稿日期: 2012-03-08 修回日期: 2012-05-20

接受日期: 2012-06-16 在线出版日期: 2012-07-18

Intervention effect of microbiological capsules containing *Bacillus subtilis* and *Enterococcus* on intestinal flora in patients with NASH

Lin-Hui Yang, Hua Guo, Jun Cai, Xiao-Wei Cai,
Gui-Lun Liu, Dong-Feng Chen

Lin-Hui Yang, Hua Guo, Jun Cai, Xiao-Wei Cai, Gui-Lun Liu, Department of Gastroenterology, Chongqing Municipal Corps Hospital of Chinese People's Armed Police Force, Chongqing 400061, China

Dong-Feng Chen, Department of Gastroenterology, Daping Hospital, the Third Military Medical University of Chinese PLA, Chongqing 400042, China

Correspondence to: Lin-Hui Yang, Attending Physician, Department of Gastroenterology, Chongqing Municipal Corps Hospital of Chinese People's Armed Police Force, Chongqing 400061, China. dzswjyy@163.com

Received: 2012-03-08 Revised: 2012-05-20

Accepted: 2012-06-16 Published online: 2012-07-18

Abstract

AIM: To investigate the interventional effect of microbiological capsules (Medilac-S) containing *Bacillus subtilis* and *Enterococcus* on intestinal flora in patients with nonalcoholic steatohepatitis (NASH).

METHODS: Thirty healthy adults and sixty patients with NASH were included, and they were divided into three groups: group A (30 healthy adults, control group), group B (30 patients, treated with basic drugs), and group C (30 patients, treated with basal drugs and Medilac-S).

Eight types of representative bacteria of the intestinal flora were cultivated and counted, and the levels of serum endotoxin, TNF- α , IL-6 and ALT was determined in all groups before treatment and 4 wk after treatment.

RESULTS: Compared to group A, the numbers of *Bacillus bifidus*, *Bacillus lactis* and *Bacteroides* decreased (7.13 ± 1.28 vs 8.83 ± 1.24 , $t = -6.65$, $P < 0.01$; 6.67 ± 1.21 vs 7.31 ± 1.12 , $t = -2.16$, $P < 0.05$; 6.99 ± 1.31 vs 7.82 ± 1.15 , $t = -2.41$, $P < 0.05$), that of *Enterobacteria* increased (7.28 ± 1.22 vs 6.54 ± 1.08 , $t = 4.83$, $P < 0.01$), and serum levels of endotoxin, IL-6 and TNF- α increased (168.37 EU/L \pm 24.13 EU/L vs 110.53 EU/L \pm 18.33 EU/L, $t = 11.69$, $P < 0.01$; 42.62 ng/L \pm 12.65 ng/L vs 21.58 ng/L \pm 8.47 ng/L, $t = 7.71$, $P < 0.01$; 15.98 ng/L \pm 3.19 ng/L vs 8.63 ng/L \pm 2.49 ng/L, $t = 11.97$, $P < 0.01$) in patients with NASH (groups B and C) before the treatment. After 4 weeks of treatment, the numbers of *Bacillus bifidus*, *Bacillus lactis* and *Bacteroides* increased significantly (all $P < 0.01$), that of *Enterobacteria* decreased ($P < 0.05$), and serum levels of endotoxin, TNF- α , IL-6 and ALT decreased remarkably ($P < 0.05$) in group C but not in group B compared to group A. The clinical symptoms were improved more apparently in group C than in group B.

CONCLUSION: Alteration of intestinal flora and overgrowth of Gram-negative bacilli probably participate in the development of NASH. Medilac-S can effectively improve intestinal flora, decrease serum levels of endotoxin, TNF- α , IL-6 and ALT, and improve clinical symptoms in patients with NASH.

Key Words: Nonalcoholic steatohepatitis; *Bacillus subtilis*; Intestinal flora; Microecological products; *Enterococcus*; Endotoxin

Yang LH, Guo H, Cai J, Cai XW, Liu GL, Chen DF. Intervention effect of microbiological capsules containing *Bacillus subtilis* and *Enterococcus* on intestinal flora in patients with NASH. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2012; 20(20): 1873-1878

■背景资料

非酒精性脂肪性肝病(NAFD)的发病机制至今尚未明确,在众多致病因素中,小肠细菌过度生长、细菌移位、肠黏膜通透性改变等所致的肠源性内毒素血症(IETM)在非酒精性脂肪性肝炎(NASH)的发病中起着重要的作用.

■同行评议者

任晓峰, 教授, 东北农业大学动物医学学院微生物室

■研究前沿
随着“肠-肝”轴
(Gut-Liver Axis)
这一新概念的提出,
肠道菌群正成为
肝病研究热点。

摘要

目的: 探讨枯草杆菌肠球菌二联活菌胶囊对非酒精性脂肪性肝炎(non-alcoholic steatohepatitis, NASH)患者肠道菌群失调的干预作用。

方法: 选择肠道菌群中具有代表性的细菌共8种(肠杆菌、肠球菌、葡萄球菌、双歧杆菌、乳杆菌、拟杆菌、梭菌、酵母样真菌)进行培养和计数,检测所有被研究者的血清内毒素、TNF- α 、IL-6和ALT的浓度。选择健康正常人30例作为正常对照组(A组),NASH共60例,随机分为常规治疗组(B组)和观察组(C组)各30例,B组采用常规保肝治疗,C组常规保肝治疗的同时联用枯草杆菌肠球菌二联活菌胶囊治疗,治疗4 wk,比较各组治疗前后肠道细菌数量的变化和内毒素、TNF- α 、IL-6、ALT的变化,并比较B组和C组治疗后临床症状的缓解情况。

结果: 与A组比较,治疗前NASH组肠杆菌显著增多(7.28 ± 1.22 vs 6.54 ± 1.08 , $t = 4.83$, $P < 0.01$),而双歧杆菌、乳酸杆菌、拟杆菌显著减少(7.13 ± 1.28 vs 8.83 ± 1.24 , $t = -6.65$, $P < 0.01$; 6.67 ± 1.21 vs 7.31 ± 1.12 , $t = -2.16$, $P < 0.05$; 6.99 ± 1.31 vs 7.82 ± 1.15 , $t = -2.41$, $P < 0.05$);血清中内毒素、IL-6、TNF- α 的浓度显著增高($168.37 \text{ EU/L} \pm 24.13 \text{ EU/L}$ vs $110.53 \text{ EU/L} \pm 18.33 \text{ EU/L}$, $t = 11.69$, $P < 0.01$; $42.62 \text{ ng/L} \pm 12.65 \text{ ng/L}$ vs $21.58 \text{ ng/L} \pm 8.47 \text{ ng/L}$, $t = 7.71$, $P < 0.01$; $15.98 \text{ ng/L} \pm 3.19 \text{ ng/L}$ vs $8.63 \text{ ng/L} \pm 2.49 \text{ ng/L}$, $t = 11.97$, $P < 0.01$);C组治疗后与治疗前比较双歧杆菌、乳杆菌、拟杆菌的数量显著增多($P < 0.01$),肠杆菌的数量显著减少($P < 0.05$),血清中内毒素、TNF- α 、IL-6、ALT的浓度显著降低($P < 0.01$),C组治疗后临床症状较B组有显著改善。

结论: NASH患者存在肠道菌群失调,革兰氏阴性杆菌过度生长,提示肠道微生态失衡可能参与了NASH的发生发展。枯草杆菌肠球菌二联活菌胶囊可明显改善NASH肠道菌群失调,降低血清中内毒素、TNF- α 、IL-6、ALT的水平,改善临床症状。

关键词: 非酒精性脂肪性肝炎; 枯草杆菌; 肠球菌; 微生态制剂; 肠道菌群; 内毒素

杨林辉, 郭华, 蔡俊, 蔡晓伟, 刘贵伦, 陈东风. 枯草杆菌肠球菌二联活菌胶囊对非酒精性脂肪性肝炎肠道菌群失调的干预作用. 世界华人消化杂志 2012; 20(20): 1873-1878
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/1873.asp>

0 引言

非酒精性脂肪性肝病(non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD)近年来的发病率正稳步上升。非酒精性脂肪性肝炎(non-alcoholic steatohepatitis, NASH)是NAFLD病程进展中的主要阶段,近一半的NASH患者可发展至肝纤维化,约15%发展至肝硬化,3%进展至最终的肝衰竭^[1]。NAFLD的发病机制至今尚未明确,在众多致病因素中,小肠细菌过度生长、细菌移位、肠黏膜通透性改变等所致的肠源性内毒素血症(intestinal endotoxemia, IETM)在NASH的发病中起着重要的作用。随着“肠-肝”轴(gut-liver axis)^[2]这一新概念的提出,肠道菌群正成为肝病研究热点。本文就NASH患者肠道菌群的变化及其肠源性内毒素血症进行初步研究,并采用枯草杆菌肠球菌二联活菌胶囊进行干预,观察枯草杆菌肠球菌二联活菌胶囊对NASH的治疗作用。

1 材料和方法

1.1 材料 2010-03/2011-10本院经临床、实验室和B超(或CT)检查诊断为NASH患者60例,男32例,女28例,年龄25-70岁,平均年龄 47.5 ± 12.3 岁。所有患者诊断符合NASH诊断标准^[3]。排除感染、使用抗生素、微生态调节剂、酸奶、胃肠道动力药物及其他可影响肠道通透性制剂的患者。另选择30例健康成年人且愿意受试者为正常对照组(A组),男女各15例,年龄20-70岁,平均 47.1 ± 10.7 岁。NASH组患者随机分为治疗组(B组)和观察组(C组)各30例。

1.2 方法

1.2.1 治疗: B组给予常规保肝治疗,口服甘草酸二胺肠溶胶囊(江苏正大天晴药业有限公司,规格150 mg)3粒/次,3次/日;C组在B组治疗的基础上加上枯草杆菌肠球菌二联活菌胶囊(北京韩美药品有限公司)口服治疗,500 mg/次,3次/日,疗程均为4 wk。实验期间不使用抗菌药物及其他影响肠道菌群的制剂。

1.2.2 肠道菌群的培养及检测: 采集实验对象的新鲜粪便标本2份分别盛放在普通无菌小瓶和无氧小瓶迅速送至实验室。肠道菌群的培养及检测:称取新鲜粪便0.5 g加入4.5 mL 0.9%的无菌氯化钠溶液中,按10倍连续稀释法稀释至 10^{-9} 。分别取 10^{-9} 、 10^{-7} 、 10^{-5} 、 10^{-3} 、 10^{-1} 稀释液50 μL 依次接种在选择性培养基上。肠道菌群的选择:选择具有代表性的需氧菌3种(肠杆菌、肠球菌、葡萄球菌),厌氧菌4种(双歧杆菌、乳杆

表 1 治疗前NASH患者和健康组肠道菌群菌落数的比较 (mean \pm SD, lgCFU/g)

分组	<i>n</i>	肠杆菌	肠球菌	葡萄球菌	酵母真菌	双歧杆菌	乳杆菌	拟杆菌	梭菌
A组	30	6.54 \pm 1.08	7.48 \pm 1.25	5.45 \pm 0.97	5.26 \pm 0.87	8.83 \pm 1.24	7.31 \pm 1.12	7.82 \pm 1.15	7.51 \pm 1.28
NASH组	60	7.28 \pm 1.22 ^b	7.86 \pm 1.32	5.27 \pm 1.04	4.84 \pm 0.82	7.13 \pm 1.28 ^b	6.67 \pm 1.21 ^a	6.99 \pm 1.31 ^a	7.47 \pm 1.23

^a*P*<0.05, ^b*P*<0.01 vs A组.表 2 治疗前NASH患者和健康组血清指标的比较 (mean \pm SD)

分组	<i>n</i>	内毒素(EU/L)	IL-6(ng/L)	TNF- α (ng/L)	ALT(U/L)
A组	30	110.53 \pm 18.33	21.58 \pm 8.47	8.63 \pm 2.49	26.86 \pm 6.27
NASH组	60	168.37 \pm 24.13 ^b	42.62 \pm 12.65 ^b	15.98 \pm 3.19 ^b	109.24 \pm 41.50 ^b

^b*P*<0.01 vs A组.

菌、拟杆菌、梭菌)及酵母样真菌进行培养. 培养基选择: 肠球菌、葡萄球菌用羊血平板, 肠杆菌用中国兰琼脂平板, 真菌用沙氏培养基, 双歧杆菌用BS血琼脂平板, 乳酸杆菌为MRS营养琼脂, 拟杆菌用BDS培养基, 梭菌采用RCM培养基(强化梭菌培养基). 需氧菌置35℃孵箱培养24 h, 酵母样真菌置25℃孵箱培养48-72 h, 厌氧菌采用抽气换气培养法培养48 h. 使用ATB全自动微生物鉴定系统(法国生物梅里埃公司)进行细菌鉴定. 结果以每克粪便湿重中菌落形成单位的对数值表示(lgCFU/g).

1.2.3 血清指标的检测: 清晨空腹静脉血6 mL离心后取血清置-70℃冰箱中保存待测. 血清内毒素定量测定采用鲎试剂基质偶氮显色法(试剂盒由上海伊华医学科技公司提供); TNF- α 和IL-6的检测采用酶联免疫法定量测定(试剂盒由深圳晶美生物工程有限公司提供), 按说明书进行操作; 血清ALT的检测使用日立7170A全自动生化分析仪检测.

1.2.4 临床疗效的评定: 记录B、C两组治疗前乏力、肝区不适、腹胀、厌食、腹泻、便秘等临床症状以及治疗后的缓解情况(症状减轻或消失), B超检查治疗前肝脏肿大情况以及治疗后回复情况(缩小或恢复正常大小), 并做疗效比较分析, 结合血清学指标ALT做疗效判定.

统计学处理 计量资料使用mean \pm SD表示. 使用SPSS17.0统计软件进行统计学分析, 组间比较采用独立样本*t*检验, 治疗前后比较采用配对*t*检验; 直线相关采用Pearson相关分析; 率的比较采用 χ^2 检验, *P*<0.05提示差异有统计学意义.

2 结果

2.1 治疗前NASH组和A组肠道菌群菌落数的比较 治疗前NASH组与A组比较各肠道菌群发生显著变化, 肠杆菌显著增加(*t* = 4.83, *P*<0.01), 而双歧杆菌、乳杆菌、拟杆菌显著减少(*t* = -6.65, *P*<0.01; *t* = -2.16, *P*<0.05; *t* = -2.41, *P*<0.05); 而肠球菌、葡萄球菌、酵母真菌和梭菌没有发生显著改变(*P*>0.05, 表1).

2.2 治疗前NASH组和A组血清指标的比较 治疗前NASH组与A组比较, 内毒素、IL-6和TNF- α 等指标均显著增加(*t* = 11.69、7.71、11.97, *P*<0.01, 表2).

2.3 治疗前后B组和C组肠道菌群菌落数的比较 治疗前两组所有菌落数比较均无统计学意义(*P*>0.05), 提示二者具有可比性; B组治疗后与治疗前比较无显著差异(*P*>0.05), 而C组治疗后与治疗前比较有显著改变, 其中肠杆菌显著减少(*t* = -2.79, *P*<0.05), 而双歧杆菌、乳杆菌、拟杆菌显著增加(*t* = 4.27, *P*<0.01; *t* = 3.25, *P*<0.01; *t* = 2.93, *P*<0.01, 表3, 图1).

2.4 治疗前后B组和C组血清指标的比较 治疗前两组所有指标比较均无统计学意义(*P*>0.05), 提示二者具有可比性; B组内毒素、IL-6、TNF- α 与治疗前比较无显著改变(*P*>0.05); C组治疗后与治疗前比较内毒素、IL-6、TNF- α 、ALT均有显著降低(*t* = -3.98、-2.42、-2.27、-8.61, *P*<0.01). 治疗后C组与B组比较, ALT差异显著(*t* = -4.73, *P*<0.01, 表4, 图2).

2.5 肠道菌群与内毒素及TNF- α 、IL-6的相关分析 在有显著变化的4种细菌中, 只有肠杆菌与内

■相关报道

研究表明内毒素及炎症细胞因子均参与了NASH的发生发展. 内毒素不仅直接损害肝细胞, 而且使肠道微生态环境发生改变, 加重肠道菌群失调.

■创新盘点

本文就NASH患者肠道菌群的变化及其肠源性内毒素血症进行初步研究,并采用枯草杆菌肠球菌二联活菌胶囊进行干预,观察枯草杆菌肠球菌二联活菌胶囊对NASH的治疗作用。

表 3 治疗后B组和C组肠道菌群菌落数的比较 (mean ± SD, lgCFU/g)

分组	n	时间	肠杆菌	双歧杆菌	乳杆菌	拟杆菌
B组	30	治疗前	7.35 ± 1.15	7.15 ± 1.31	6.61 ± 1.13	7.10 ± 1.19
		治疗后	7.44 ± 1.21	7.27 ± 1.10	6.67 ± 1.13	6.95 ± 1.22
C组	30	治疗前	7.57 ± 1.16	7.11 ± 1.14	6.78 ± 1.26	7.30 ± 1.35
		治疗后	6.70 ± 1.13 ^a	8.42 ± 1.26 ^b	7.63 ± 1.39 ^b	7.67 ± 1.28 ^b

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs C组治疗前。

表 4 治疗后B组和C组血清指标的比较 (mean ± SD)

分组	n	时间	内毒素(EU/L)	IL-6(ng/L)	TNF- α (ng/L)	ALT(U/L)
B组	30	治疗前	167.86 ± 25.08	43.33 ± 12.28	15.74 ± 3.18	114.35 ± 40.49
		治疗后	159.19 ± 24.53	39.07 ± 10.89	14.71 ± 2.83	85.87 ± 41.53 ^c
C组	30	治疗前	170.18 ± 22.73	42.53 ± 13.02	16.42 ± 3.21	106.52 ± 38.64
		治疗后	142.03 ± 18.56 ^b	34.75 ± 9.33 ^a	14.25 ± 2.79 ^a	57.25 ± 18.17 ^{bf}

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs C组治疗前; ^c $P < 0.05$ vs B组治疗前; ^f $P < 0.01$ vs B组治疗后。

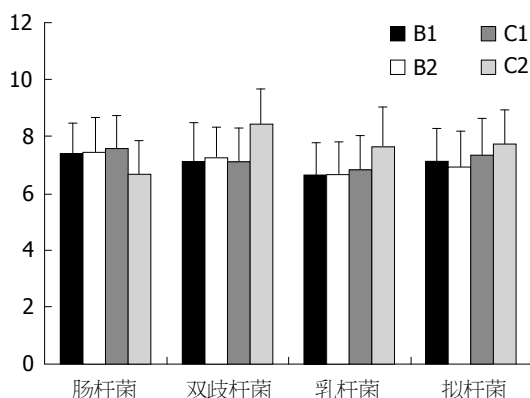


图 1 治疗前后B组和C组肠道菌群菌落数的比较。B1: B组治疗前; B2: B组治疗后; C1: C组治疗前; C2: C组治疗后。

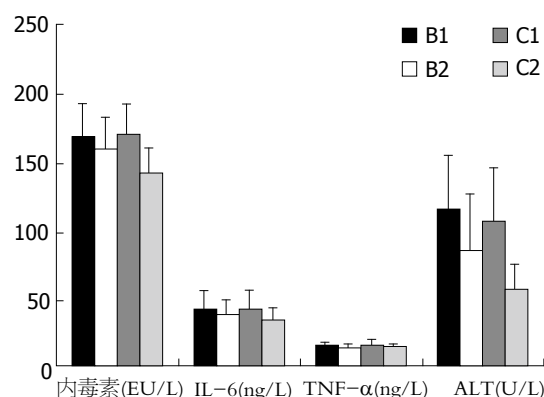


图 2 治疗前后B组和C组血清指标的比较。B1: B组治疗前; B2: B组治疗后; C1: C组治疗前; C2: C组治疗后。

毒素显著正相关($r = 0.644$, $P < 0.01$), 而肠杆菌与TNF- α 、IL-6均不相关($P > 0.05$); 血清内毒素和TNF- α 、IL-6显著正相关($r = 0.485$, $P < 0.01$; $r = 0.477$, $P < 0.01$)。

2.6 治疗前临床症状及治疗后B组和C组临床表现缓解情况(减轻或消失)比较 治疗前有症状的NASH患者主要为乏力、腹胀、肝区不适、厌食、腹泻或便秘, 其中腹胀和腹泻占到了NASH组的一半以上, 而其他症状则占NASH组的20%-40%, 12例患者无任何不适症状, 占总例数的20%。治疗后C组与B组比较临床症状及肝肿大缓解更显著($P < 0.05$ 或0.01, 表5, 6)。

3 讨论

研究证实肠道菌群失调不仅参与了肥胖的发

生^[4-6], 还与NASH关系密切^[7]。本研究显示NASH患者肠道菌群发生了显著变化, 双歧杆菌、乳杆菌和拟杆菌的菌落数均较正常对照组明显减少($P < 0.05$), 而肠杆菌的菌落数较正常对照组则有显著增加($P < 0.01$), 这提示NASH患者肠道菌群发生了显著改变, 以肠杆菌为代表的需氧菌显著增长, 而以双歧杆菌及乳杆菌为代表的厌氧菌却显著降低, 这证实了NASH存在菌群失调及肠道革兰氏阴性杆菌过度生长。现有研究表明内毒素及炎性细胞因子均参与了NASH的发生发展。内毒素不仅直接损害肝细胞, 而且使肠道微生态环境发生改变, 加重肠道菌群失调^[8]。此外, 内毒素还能激活肝脏库普弗细胞引发炎症级联反应^[9-13], 引发肝细胞凋亡、坏死。本研究中NASH患者的血清内毒素水平、TNF- α 和IL-6

表 5 治疗前B组和C组临床症状 $n(\%)$

分组	n	乏力	肝区不适	腹胀	厌食	腹泻	便秘	肝肿大
B组	30	9(30)	11(36.6)	16(53.3)	10(33.3)	17(56.7)	9(30)	16(53.3)
C组	30	8(26.6)	9(30)	17(56.6)	6(20)	15(50)	6(20)	19(63.3)

■同行评价

本实验立项依据较合理, 对临床合理应用该药物有一定的指导意义。

表 6 治疗后B组和C组临床表现缓解情况(减轻或消失)比较 $n(\%)$

分组	乏力缓解	肝区不适缓解	腹胀缓解	厌食缓解	腹泻缓解	便秘缓解	肝肿大缩小
B组	5(55.5)	4(36.3)	7(43.7)	5(50)	4(23.52)	2(22.2)	8(50)
C组	8(100)	8(88.8)	15(88.2)	6(100)	13(86.6)	5(83.3)	16(84.2)
χ^2 值	4.65	4.10	7.34	4.36	12.75	5.40	4.71
P 值	<0.05	<0.05	<0.01	<0.05	<0.01	<0.05	<0.05

较正常对照组显著增加, 直线相关分析显示肠杆菌与内毒素显著正相关, 而内毒素与TNF- α 、IL-6显著正相关, 表明肠杆菌、内毒素、炎症细胞因子间关系密切, 他们对NASH的发生发展起着重要作用, 推测正是由于NASH患者肠道革兰氏阴性杆菌过度生长导致内毒素生成过多, 且破坏了肠道原有的生物屏障功能, 结果使大量的细菌内毒素通过损害的肠黏膜屏障进入门静脉形成IETM, 内毒素及炎症细胞因子共同参与肝损害的病理过程。

枯草杆菌肠球菌二联活菌胶囊是新型的微生态制剂, 有较强的调节肠道菌群的作用^[14,15]。枯草杆菌肠球菌二联活菌治疗NASH国内外报道少见。本研究显示C组治疗后以肠杆菌为代表的需氧菌减少($P<0.05$), 而以双歧杆菌、乳杆菌、拟杆菌为代表的厌氧菌显著增多($P<0.01$), 血清内毒素、TNF- α 和IL-6也显著降低($P<0.05$), 这与储建坤等^[16]的研究结果一致。而B组则没有发生显著变化($P>0.05$), 这提示C组肠道菌群失调及IETM较B组得到了明显改善。而B组和C组治疗前后比较ALT均显著降低, 但二者比较后者降低更显著($P<0.01$), 这提示甘草酸二胺胶囊保肝治疗降酶效果显著, 但仅能从一定程度上降低转氨酶, 不能显著降低IETM以及炎症因子TNF- α 和IL-6的水平。相反, C组由于枯草杆菌肠球菌二联活菌促进肠道菌群的修复及平衡, 从一定程度上解决了肠道菌群失调及肠道革兰氏阴性杆菌过度生长的问题, 修复了受损的肠黏膜屏障, 降低了IETM, 进一步抑制了肝脏库普弗细胞产生细胞因子对肝脏的“二次打击”, 改善了肝脏的炎症程度, 因而内毒素、炎症细胞因子水平及转氨酶显著降低, 所以C组的“保

肝”效果明显强于B组。

从临床症状缓解情况及肝肿大的回缩情况看, 治疗后C组乏力、腹胀、肝区不适、厌食、大便次数增多或便秘症状、肝肿大均较B组有显著改善, 这提示联合使用保肝药和枯草杆菌肠球菌二联活菌胶囊进行干预治疗, 效果优于单用保肝药治疗, 这与张纪伟等^[17]的研究结果一致。我们在试验中还观察到虽然ALT显著降低, 临床症状也明显改善, 但C组治疗后各血清学指标仍远>正常值, 这提示联合保肝和肠道干预治疗仍然难以取得最理性的治疗效果, 原因是NASH的发病是多因素共同作用的结果, 可能仅从这两方面干预仍不能完全阻止NASH的进展, 另一方面, 我们的研究也只观察了4 wk, 长时间的干预治疗究竟效果如何仍不得而知, 所以一方面对于该治疗方案时效关系的观察还将继续进行, 另一方面对于NASH发病机制的研究则显得更为重要。

总之, NASH患者存在肠道菌群失调、革兰氏阴性杆菌过度生长和IETM, 提示肠道微生态失衡参与了NASH的发生发展。给予枯草杆菌肠球菌二联活菌胶囊调节肠道菌群治疗, 可以恢复肠道微生态平衡, 减轻IETM, 降低炎症因子的分泌, 减少对肝细胞“二次打击”, 从而对延缓NASH进展为肝纤维化、肝硬化可能具有重要作用, 所以联合使用保肝药和微生态制剂治疗NASH仍不失为目前较为理想的治疗方案。

4 参考文献

- Sheth SG, Gordon FD, Chopra S. Nonalcoholic steatohepatitis. *Ann Intern Med* 1997; 126: 137-145
- Vanni E, Bugianesi E. The gut-liver axis in nonalcoholic fatty liver disease: Another pathway to insulin resistance? *Hepatology* 2009; 49: 1790-1792

- 3 中华医学会肝病学会脂肪肝与酒精肝病学组. 非酒精性脂肪性肝病诊疗指南. 中华肝脏病杂志 2010; 18: 163-166
- 4 Bäckhed F, Ding H, Wang T, Hooper LV, Koh GY, Nagy A, Semenkovich CF, Gordon JI. The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101: 15718-15723
- 5 Turnbaugh PJ, Ley RE, Mahowald MA, Magrini V, Mardis ER, Gordon JI. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature* 2006; 444: 1027-1031
- 6 Cani PD, Amar J, Iglesias MA, Poggi M, Knauf C, Bastelica D, Neyrinck AM, Fava F, Tuohy KM, Chabo C, Waget A, Delmée E, Cousin B, Sulpice T, Chamontin B, Ferrières J, Tanti JF, Gibson GR, Casteilla L, Delzenne NM, Alessi MC, Burcelin R. Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. *Diabetes* 2007; 56: 1761-1772
- 7 Wigg AJ, Roberts-Thomson IC, Dymock RB, McCarthy PJ, Grose RH, Cummins AG. The role of small intestinal bacterial overgrowth, intestinal permeability, endotoxaemia, and tumour necrosis factor alpha in the pathogenesis of non-alcoholic steatohepatitis. *Gut* 2001; 48: 206-211
- 8 Han DW. Intestinal endotoxemia as a pathogenetic mechanism in liver failure. *World J Gastroenterol* 2002; 8: 961-965
- 9 Norman K, Pirlich M. Gastrointestinal tract in liver disease: which organ is sick? *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2008; 11: 613-619
- 10 Hirose M, Nishikawa M, Qian W, Haque A, Mashimo M, Inoue M. Mannose-conjugated alendronate selectively depletes Kupffer cells and inhibits endotoxemic shock in the mice. *Hepatol Res* 2006; 36: 3-10
- 11 Higuchi Y, Kawakami S, Yamashita F, Hashida M. The potential role of fucosylated cationic liposome/NFkappaB decoy complexes in the treatment of cytokine-related liver disease. *Biomaterials* 2007; 28: 532-539
- 12 Yee SB, Harkema JR, Ganey PE, Roth RA. The coagulation system contributes to synergistic liver injury from exposure to monocrotaline and bacterial lipopolysaccharide. *Toxicol Sci* 2003; 74: 457-469
- 13 Barton GM, Medzhitov R. Toll-like receptor signaling pathways. *Science* 2003; 300: 1524-1525
- 14 Kim YG, Moon JT, Lee KM, Chon NR, Park H. [The effects of probiotics on symptoms of irritable bowel syndrome]. *Korean J Gastroenterol* 2006; 47: 413-419
- 15 牟方宏, 胡伏莲. 又一新的微生态制剂-美常安. 临床药物治疗杂志 2004; 2: 60, 63
- 16 储建坤, 刘荣欣, 张征, 杨涛, 陈慧巧. 乳果糖联合培菲康对肝硬化自发性腹膜炎血清和腹水TNF-α和IL-6水平的影响. 河北医药 2011; 33: 1451-1452
- 17 张纪伟. 微生态制剂治疗肝源性肠道菌群失调与保肝作用. 中国微生态学杂志 2004; 16: 34-35

编辑 曹丽鸥 电编 鲁亚静

ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) CN 14-1260/R 2012年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

中国科技信息研究所发布《世界华人消化杂志》 影响因子 0.694

本刊讯 2011-12-02, 一年一度的中国科技论文统计结果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, 2010年《世界华人消化杂志》总被引频次3458次, 影响因子0.694, 综合评价总分60.6分, 分别位居内科学类49种期刊的第5位、第7位、第6位, 分别位居1 998种中国科技论文统计源期刊(中国科技核心期刊)的第79位、第320位、第190位; 其他指标: 他引率0.83, 被引半衰期4.9, 来源文献量712, 文献选出率0.90, 参考文献量17963, 平均引文数25.23, 平均作者数4.35, 地区分布数29, 机构分布数349, 基金论文比0.45, 海外论文比0.01. (编辑部主任: 李军亮 2012-01-01)

ADV初治耐药与LAM耐药者再耐药时HBV-RT区的变异特征

邵幼林, 张锁才, 柳龙根, 赵卫峰

邵幼林, 张锁才, 柳龙根, 常州市第三人民医院肝病科 江苏省常州市 213001

赵卫峰, 苏州大学附属第一医院感染科 江苏省苏州市 215006

邵幼林, 主治医师, 主要从事病毒性肝炎临床与基础研究。

作者贡献分布: 课题设计和实施由柳龙根与邵幼林完成; 张锁才负责数据的管理及统计分析; 赵卫峰参与资料收集; 写作由邵幼林与柳龙根完成。

通讯作者: 柳龙根, 主任医师, 副教授, 213001, 江苏省常州市兰陵北路300号, 常州市第三人民医院肝病科. ssewllg@163.com
电话: 0519-83016002

收稿日期: 2012-04-09 修回日期: 2012-05-08

接受日期: 2012-06-01 在线出版日期: 2012-07-18

Analysis of mutations in the reverse transcriptase domain of HBV polymerase in adefovir-resistant HBV patients

You-Lin Shao, Suo-Cai Zhang, Long-Gen Liu, Wei-Feng Zhao

You-Lin Shao, Suo-Cai Zhang, Long-Gen Liu, Department of Hepatology, the Third People's Hospital of Changzhou, Changzhou 213001, Jiangsu Province, China

Wei-Feng Zhao, Department of Infectious Diseases, the First Affiliated Hospital of Soochow University, Suzhou 215006, Jiangsu Province, China

Correspondence to: Long-Gen Liu, Chief Physician, Associate Professor, Department of Hepatology, the Third People's Hospital of Changzhou, Changzhou 213001, Jiangsu Province, China. ssewllg@163.com

Received: 2012-04-09 Revised: 2012-05-08

Accepted: 2012-06-01 Published online: 2012-07-18

Abstract

AIM: To study the characteristics of the B domain of the HBV polymerase gene in adefovir-resistant HBV patients.

METHODS: One hundred and seven patients with chronic hepatitis B treated with adefovir (ADV) (including 73 ADV-naïve patients and 34 LAM-resistant patients) at our hospital were selected. The B-C regions of the RT and S genes were amplified by PCR using specific primers flanking these regions. The PCR products were directly analyzed by sequencing. The differences in nucleotide and amino acid sequences and mutation patterns of the RT region were classi-

fied using Chromas2.0 software. HBV genotypes were analyzed using Clustalx1.81.msw.

RESULTS: Of the 107 patients, 36 had rtA181V mutation, 43 had rtA181T, 47 had rtN236T, 20 had rtM204I/V ± rtL180M, and 12 had other ADV-related mutations. In ADV-naïve patients, 27 (36.99%) had rtA181V/T, 14 (19.18%) had rtN236T, 28 (38.36%) had rtA181V/T + rtN236T, and 4 (5.48%) had other mutations. In LAM-resistant patients, 21 (61.76%) had rtA181V/T, 2 (5.88%) had rtN236T, 3 (8.82%) had rtA181V/T + rtN236T, and 8 (23.53%) had other mutations. rtA181T/V and rtN236T mutations were not detected in 12 patients, but they had rtA181S/C (2 cases), rtV214I/A (3 cases), rtQ215H (1 case), or rtH/N238S/T/R/A/K (6 cases), which are ADV resistance-related mutations.

CONCLUSION: The major ADV resistance-related mutations are rtA181T/V and rtN236T in ADV-naïve patients, and rtA181V/T in LAM-resistant patients.

Key Words: Chronic hepatitis B; Hepatitis B virus; Adefovir; Resistance mutation

Shao YL, Zhang SC, Liu LG, Zhao WF. Analysis of mutations in the reverse transcriptase domain of HBV polymerase in adefovir-resistant HBV patients. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2012; 20(20): 1879-1883

摘要

目的: 研究阿德福韦酯(adeфовir, ADV)初治耐药和ADV用于挽救治疗拉米夫定(lamivudine, LAM)耐药者再耐药时HBV毒株RT区变异特征的差异性。

方法: 我院就诊的ADV初治耐药者73例, ADV用于挽救治疗LAM耐药者后再耐药者34例, 共计107例, 在HBV DNA突破时采用PCR方法扩增HBV-RT区基因, 对PCR产物直接测序, 用Chromas2.0软件分析HBV-RT区基因的核苷酸和氨基酸差异、变异模式, 同时使用Clustalx1.81.msw进行基因型分析。

■背景资料

随着抗病毒时间延长, 耐药成为核苷类似物治疗慢性乙型肝炎(CHB)的主要问题, 导致临床耐药的基因变异形式多种多样, 如何根据耐药模式选择合理的挽救治疗成为关注的热点。

■同行评议者

杨江华, 副教授, 皖南医学院弋矶山医院感染科

■相关报道

Lee等研究显示存在rtL180M变异的LAM耐药患者ADV治疗2年耐药率为37%,而无rtL180M变异患者为3%;存在rtL80V/I变异的YMDD变异患者对ADV治疗反应更差,提示抗病毒治疗疗效与耐药模式存在直接的关系。

结果: 在107例患者中,存在rtA181V变异36例,rtA181T变异43例,rtN236T变异47例,rtM204I/V±rtL180M变异20例,其他相关变异如rtA181S/C、rtH/N238S/T/R/A/K、rtV214I/A、rtQ215H共12例。ADV初治组检测到rtA181V/T变异27例(36.99%)、rtN236T变异14例(19.18%)、rtA181V/T+rtN236T变异28例(38.36%),rtA181T/V和rtN236T以外的变异4例(5.48%)。其中发生rtA181V和rtA181T变异患者分别有33.3%、64.5%合并rtN236T变异($P=0.0091$);ADV挽救治疗LAM耐药者再耐药,检测到rtA181V/T变异21例(61.76%)、rtN236T变异2例(5.88%)、rtA181V/T+rtN236T变异3例(8.82%),rtA181T/V和rtN236T以外的变异8例(23.53%)。其中发生rtA181V患者25%合并rtN236T变异,而rtA181T变异患者未检测到rtN236T变异($P=0.2311$)。20例(58.83%)患者合并rtM204I/V变异,这20例患者中12例(35.29%)合并rtA181V/T和/或rtN236T变异的多重耐药变异。有12例未检测到rtA181T/V和rtN236T变异,但检查到rtA181S/C(2例)、rtV214I/A(3例)、rtQ215H(1例)、rtH/N238S/T/R/A/K(6例)等ADV耐药相关变异,其中ADV挽救治疗LAM耐药患者8例,ADV初治患者4例,两组间存在统计学差异($P=0.0169$)。

结论: ADV初治耐药主要发生rtA181V/T和rtN236T变异,ADV挽救治疗LAM耐药再耐药主要发生rtA181V/T变异,且后者耐药模式更复杂。

关键词: 慢性乙型肝炎; 乙型肝炎病毒; 阿德福韦酯; 耐药变异

邵幼林, 张锁才, 柳龙根, 赵卫峰. ADV初治耐药与LAM耐药者再耐药时HBV-RT区的变异特征. 世界华人消化杂志 2012; 20(20): 1879-1883
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/1879.asp>

0 引言

由于阿德福韦酯(adeфовир, ADV)对乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)的野生株^[1]和拉米夫定(lamivudine, LAM)耐药株^[2]均有抑制作用,因而被广泛用于慢性乙型肝炎(chronic hepatitis B, CHB)患者初始治疗和LAM耐药者挽救治疗。无论ADV初治或用于LAM耐药者的挽救治疗,随着治疗时间延长均会出现HBV对抗病毒药物的耐药变异,尤其是用于LAM耐药者挽救治疗时出现再耐药,HBV可能会发生多位点耐药变异,这将给后续抗病毒药物的选择带来困难。本

文通过直接测序分析,以了解ADV初治耐药和ADV用于挽救治疗LAM耐药者后再耐药时HBV毒株RT区变异特征的差异性。

1 材料和方法

1.1 材料 2006-04/2011-10在我院接受ADV治疗且发生耐药的CHB患者107例,所有患者符合中国慢性乙型肝炎指南诊断标准^[3]。ADV初治患者73例,男65例,女8例,平均43.74岁±10.37岁,其中基因C型和基因B型分别为56例和17例;ADV用于挽救治疗LAM耐药者34例,男31例,女3例,平均45.56岁±9.62岁,其中基因C型和基因B型分别为27例和7例;在ADV治疗过程中发生病毒学突破时留取血清标本,保存于-70℃待测。两组患者一般特征无统计学差异。

1.2 方法 HBV DNA抽提采用QIAGEN GmbH公司试剂盒,操作按说明书进行。在HBV P基因的保守区设计上游引物PS1: 5'CCTGCTGGTGGC TCCAGTTCAGGAACAG3'(nt56-83),下游引物PAS1: 5'AAGCCCCAACCAGTGGGGGTTGCG TCA3'(nt1188-1214)。引物由上海生物工程公司合成,反应体系和条件参考文献[4]。

统计学处理 采用Chromas2.0软件分析HBV-RT区基因的核苷酸和氨基酸差异、变异类型,同时使用Clustalx1.81.msw进行基因型分析。采用SAS8.1统计软件分析,两样本均数比较采用 t 检验,率的比较采用 χ^2 检验或Fisher exact检验。

2 结果

2.1 HBV-RT区变异检测 在107例患者中,存在rtA181V/T和/或rtN236T变异95例,rtM204I/V和/或rtL180M变异20例,其他变异如rtA181S/C、rtV214I/A、rtH/N238S/T/R/A/K、rtQ215H共12例,两组HBV-RT区变异类型详见表1。

ADV初治耐药HBV变异特征: ADV初治耐药模式有7种,含有rtA181V、rtA181T和rtN236T变异分别为24例、31例和42例,rtA181V和rtA181T变异者分别有8/24(33.33%)、20/31(64.53%)合并rtN236T变异,二者存在统计学差异($P=0.0091$);ADV挽救治疗LAM耐药者再耐药时HBV变异特征: ADV用于挽救治疗LAM耐药者再耐药时的耐药模式有12种,含有rtA181V、rtA181T和rtN236T变异分别为12例、12例和5例,rtA181V和rtA181T变异者分别有3/12(25%)、0/12合并rtN236T变异,两者间无统计学差异($P=0.2311$)。

■创新盘点

本研究从ADV开始治疗时机着手, 分析不同起始治疗时机导致ADV耐药模式的差异。

表 1 两组耐药患者RT区变异模式 $n(\%)$

	ADV初治组	LAM耐药组
rtA181V	16(21.92)	5(14.71)
rtA181T	11(15.07)	7(20.58)
rtN236T	14(19.18)	0(0)
rtA181V+rtN236T	8(10.96)	2(5.88)
rtA181T+rtN236T	20(27.39)	0(0)
rtA181V+rtN236T+rtM204V	0(0)	1(2.94)
rtA181V+rtM204I \pm tL180M	0(0)	3(8.82)
rtA181V+rtM204V+tL180M	0(0)	1(2.94)
rtA181T+rtM204I \pm tL180M	0(0)	5(14.71)
rtN236T+rtM204I	0(0)	2(5.88)
rtA181S/C+rtM204I/V \pm tL180M	0(0)	2(5.88)
rtV214I/A+rtM204I	2(2.74)	1(2.94)
rtQ215H+rtM204V+tL180M	0(0)	1(2.94)
rtH/N238S/T/R/A/K+rtM204I/V \pm tL180M	2(2.74)	4(11.76)

表 2 两组患者ADV耐药变异

	ADV初治组 $n(\%)$	LAM耐药组 $n(\%)$	P 值
rtA181T/V	27(36.99)	21(61.76)	
rtN236T	14(19.18)	2(5.88)	
rtA181T/V+rtN236T	28(38.36)	3(8.82)	¹ 0.0026
无rtA181T/V和rtN236T的其他变异	4(5.48)	8(23.53)	² 0.0004

¹ $P < 0.01$ vs rtA181T/V, rtN236T; ² $P < 0.01$ vs rtA181T/V, rtN236T及其他变异。

2.2 ADV初治耐药和ADV用于挽救治疗LAM耐药者后再耐药时ADV耐药变异的差异 对两组患者RT区变异模式采用双向无序 χ^2 检验, P 值为2.32E-09, 提示两组间RT区变异模式差别存在统计学差异。ADV初治组检测到rtA181V/T变异27例(36.99%)、rtN236T变异14例(19.18%)、rtA181V/T+rtN236T变异28例(38.36%)、rtA181T/V和rtN236T以外的变异4例(5.48%)。ADV用于LAM耐药者挽救治疗再耐药, HBV耐药变异表现得较复杂, 检测到rtA181V/T变异21例(61.76%)、rtN236T变异2例(5.88%)、rtA181V/T+rtN236T变异3例(8.82%)、rtA181T/V和rtN236T以外的变异8例(23.53%)。20例(58.83%)患者合并rtM204I/V变异, 其中12例(35.29%)合并rtA181V/T和/或rtN236T变异的多重耐药变异, 另外8例(23.53%)分别合并rtA181S/C、rtH/N238S/T/R/A/K、rtV214I/A、rtQ215H变异。对存在rtA181V/T和/或rtN236T变异的95例患者耐药变异模式分析, 发现ADV挽救治疗LAM耐药再耐药患者更易出现rtA181T/V变异, 而ADV初治患者更多发生rtN236T \pm rtA181T/V

变异, $P = 0.0026$ 。纳入无rtA181T/V和rtN236T的其他变异12例患者后, 得出同样的结论, 且提示LAM耐药后采用ADV挽救治疗再耐药后, HBV耐药模式变得更加复杂, $P = 0.0004$ (表2)。

2.3 rtA181T/V和rtN236T以外的变异 此107患者中, 有12例未检测到rtA181T/V和rtN236T变异, 但检查到rtA181S/C(2例)、rtV214I/A(3例)、rtQ215H(1例)、rtH/N238S/T/R/A/K(6例)等ADV耐药相关变异, 其中ADV挽救治疗LAM耐药患者8例, ADV初治患者4例, 两组间存在统计学差异($P = 0.0169$), 提示LAM耐药患者除了诱导rtA181V/T变异外还诱导其他变异, 导致ADV临床耐药, 使病情更加复杂。

3 讨论

我国最近的数据显示ADV5年耐药率为14.6%^[5], 到目前为止, 大量的研究报道ADV耐药主要是rtN236T和rtA181V/T变异所致^[1,2]。然而, 鲜见ADV挽救治疗LAM耐药后再耐药的报道^[6], 对于在此基础发生ADV耐药变异与ADV初治患者耐药变异之间的差异更未见报道。为此, 我们对

■应用要点

本研究显示LAM耐药后经ADV挽救治疗再耐药患者耐药模式较ADV初治耐药患者更具有多样性和复杂性,为后续治疗增加了困难。因此,临床医师在初始治疗的时候应优选抗病毒药物。

73例ADV初治耐药和34例ADV用于挽救治疗LAM耐药者后再耐药患者HBV毒株RT区进行测序,分析二者的变异特征及他们之间的差异。

本研究也发现ADV初治患者耐药主要发生rtN236T和rtA181V/T变异,其中57.53%的患者存在rtN236T变异,75.34%的患者存在rtA181V/T变异,发生rtA181V和rtA181T变异分别为24例和31例,且rtA181T变异较rtA181V变异更易发生rtN236T变异($P = 0.0091$)。ADV挽救治疗LAM耐药后再耐药主要发生rtA181V/T变异,其中17.65%的患者存在rtN236T变异,70.59%的患者存在rtA181V/T变异,发生rtA181V和rtA181T变异各为12例,但二者在是否合并rtN236T变异上无统计学差异($P = 0.2311$)。这之间出现的差异是否由于LAM诱导的rtM204V/I等变异导致HBV RT区各催化中心的构象及范德华力变化引起有待进一步研究。

本研究发现ADV挽救治疗LAM耐药再耐药患者更易出现rtA181T/V变异,而ADV初治患者主要发生rtN236T±rtA181T/V变异($P = 0.0026$)。LAM耐药主要表现为rtM204V/I伴或不伴rtL180M变异,Yatsuji等^[7]研究显示部分LAM初治患者可发生LAM诱导的rtA181T/V变异,导致HBV对LAM敏感性降低6-10倍。尽管通过测序在LAM耐药患者血清中检测出rtA181变异并不多见,但通过更科学的方法可以在更多LAM耐药患者血清中检测到这些微量存在的变异准种^[8]。由于LAM耐药患者有可能已经存在rtA181V/T变异准种,在使用ADV挽救治疗过程中rtA181V/T变异株更早被选择出来成为优势株而发生临床耐药,本研究的20例rtM204I/V变异尚未消失的患者中11例合并rtA181V/T/C/S变异,只有1例合并rtN236T变异,1例合并这2个位点变异,从临床上证实了上述推测。本研究显示ADV挽救治疗LAM耐药再耐药时58.83%的患者仍然存在rtM204I/V变异,提示ADV挽救治疗LAM耐药难以使业已存在的rtM204I/V变异准种消失,临床表现为多重耐药患者,从而导致后续抗病毒药物更难选择。

Lee等^[9]研究显示rtL180M变异与ADV耐药密切相关,存在rtL180M变异的LAM耐药患者ADV治疗2年耐药率为37%,而无rtL180M变异患者为3%。他们另一篇报道显示存在rtL80V/I变异的YMDD变异患者对ADV治疗反应更差^[10]。上述2项研究进一步提示ADV用于LAM耐药患者挽救治疗,其疗效与LAM耐药模式存在直接

关系。这可能与rtL180M变异和rtL80V/I变异作为补偿变异导致HBV复制能力增强有关^[11]。且由于rtA181V/T变异导致HBV对LAM和ADV的敏感性均下降^[12],因此我们应该根据耐药模式选择抗病毒药物,对rtN236T变异患者可加用LAM,发生rtA181V/T变异的LAM或ADV治疗患者是否选择恩替卡韦(entecavir, ETV)联合ADV治疗将取得更好的临床疗效,避免耐药发生有待于进一步观察。最近两项研究显示ETV联合ADV较LAM联合ADV治疗LAM耐药^[13]和ETV耐药^[14]患者疗效更好,该2项研究一定程度上佐证了上述推断,但需要更深入研究。

RT区rtH/N238S/T/R/A/K、rtV214I/A、rtQ215H、rtP237H等变异将导致HBV聚合酶催化中心发生几何构象改变,导致对ADV亲和力下降而耐药^[15],但也存在相反的报道^[16]。本研究对我院在107例ADV耐药患者经过测序分析发现,存在rtA181V/T变异和rtN236T变异以外的其他ADV相关变异如rtA181S/C、rtH/N238S/T/R/A/K、rtV214I/A、rtQ215H共12例,其中ADV挽救治疗LAM耐药患者较ADV初治患者更容易出现这些变异。此外,我们还发现一些新的RT区氨基酸变异,包括rtV191I、rtH197Q、rtF/Y/L/H221、rtT222A、rtS223A/T、rtS256C等氨基酸替代,虽然未见这些变异导致核苷类似物耐药报道,但提示抗病毒治疗发生耐药后HBV生物学性状更加复杂,临床意义有待更深入研究。

4 参考文献

- 1 Marcellin P, Chang TT, Lim SG, Sievert W, Tong M, Arterburn S, Borroto-Esoda K, Frederick D, Rousseau F. Long-term efficacy and safety of adefovir dipivoxil for the treatment of hepatitis B e antigen-positive chronic hepatitis B. *Hepatology* 2008; 48: 750-758
- 2 Yeon JE, Yoo W, Hong SP, Chang YJ, Yu SK, Kim JH, Seo YS, Chung HJ, Moon MS, Kim SO, Byun KS, Lee CH. Resistance to adefovir dipivoxil in lamivudine resistant chronic hepatitis B patients treated with adefovir dipivoxil. *Gut* 2006; 55: 1488-1495
- 3 中华医学会肝病学分会, 中华医学会感染病学分会. 慢性乙型肝炎防治指南(2010年版). 临床肝胆病杂志 2011; 27: I-XVI
- 4 赵卫峰, 邵幼林, 陈良云, 朱义玲, 甘建和. 阿德福韦酯治疗慢性乙型肝炎的疗效和耐药率. 中华传染病杂志 2008; 26: 550-554
- 5 Minde Z, Yimin M, Guangbi Y, JinLin H, Hao W, Hong R, Yuming W, Xiaqiu Z, Daozhen X, Yagang C, Junqi N, Youming C, Yaozong W, Dixon J, Barker K. Five years of treatment with adefovir dipivoxil in Chinese patients with HBeAg-positive chronic hepatitis B. *Liver Int* 2012; 32: 137-146
- 6 邵幼林, 张锁才, 陈良云, 吴金华, 赵卫峰. LAM耐药后ADV序贯治疗再耐药HBV变异株的动态变化. 世界华人消化杂志 2010; 18: 1895-1901
- 7 Yatsuji H, Noguchi C, Hiraga N, Mori N, Tsuge

- M, Imamura M, Takahashi S, Iwao E, Fujimoto Y, Ochi H, Abe H, Maekawa T, Tateno C, Yoshizato K, Suzuki F, Kumada H, Chayama K. Emergence of a novel lamivudine-resistant hepatitis B virus variant with a substitution outside the YMDD motif. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50: 3867-3874
- 8 Zhao WF, Shao YL, Chen LY, Wu JH, Zhu YL, Gan JH, Xiong H. Establishment of a new quantitative detection approach to adefovir-resistant HBV and its clinical application. *World J Gastroenterol* 2010; 16: 1267-1273
- 9 Lee YS, Chung YH, Kim JA, Jin YJ, Park WH, Kim SE, Lee D, Shim JH, Kim KM, Lim YS, Lee HC, Lee YS, Suh DJ. rtL180M mutation of hepatitis B virus is closely associated with frequent virological resistance to adefovir dipivoxil therapy. *J Gastroenterol Hepatol* 2012; 27: 300-305
- 10 Lee YS, Chung YH, Kim JA, Kim SE, Shin JW, Kim KM, Lim YS, Park NH, Lee HC, Lee YS, Suh DJ. Hepatitis B virus with the rtL80V/I mutation is associated with a poor response to adefovir dipivoxil therapy. *Liver Int* 2009; 29: 552-556
- 11 阎丽, 肖蕾, 魏君锋, 孙剑, 王战会, 侯金林. 乙型肝炎病毒Y(I/V)DD变异模式与基因型关系的分析. *中华肝脏病杂志* 2011; 19: 423-426
- 12 Inoue J, Ueno Y, Wakui Y, Niitsuma H, Fukushima K, Yamagiwa Y, Shiina M, Kondo Y, Kakazu E, Tamai K, Obara N, Iwasaki T, Shimosegawa T. Four-year study of lamivudine and adefovir combination therapy in lamivudine-resistant hepatitis B patients: influence of hepatitis B virus genotype and resistance mutation pattern. *J Viral Hepat* 2011; 18: 206-215
- 13 Lim YS, Lee JY, Lee D, Shim JH, Lee HC, Lee YS, Suh DJ. Randomized trial of entecavir plus adefovir in patients with lamivudine-resistant chronic hepatitis B who show suboptimal response to lamivudine plus adefovir. *Antimicrob Agents Chemother* 2012; 56: 2941-2947
- 14 Kim SS, Cheong JY, Lee D, Lee MH, Hong SP, Kim SO, Cho SW. Adefovir-based combination therapy with entecavir or lamivudine for patients with entecavir-refractory chronic hepatitis B. *J Med Virol* 2012; 84: 18-25
- 15 Shaw T, Bartholomeusz A, Locarnini S. HBV drug resistance: mechanisms, detection and interpretation. *J Hepatol* 2006; 44: 593-606
- 16 Borroto-Esoda K, Miller MD, Arterburn S. Pooled analysis of amino acid changes in the HBV polymerase in patients from four major adefovir dipivoxil clinical trials. *J Hepatol* 2007; 47: 492-498

■同行评价

本研究的内容较新, 研究结果对临床用药有指导意义。

编辑 张姗姗 电编 闫晋利

ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) CN 14-1260/R 2012年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

《世界华人消化杂志》入选《中国学术期刊评价研究报告—RCCSE 权威、核心期刊排行榜与指南》

本刊讯 《中国学术期刊评价研究报告-RCCSE权威、核心期刊排行榜与指南》由中国科学评价研究中心、武汉大学图书馆和信息管理学院联合研发, 采用定量评价和定性分析相结合的方法, 对我国万种期刊大致浏览、反复比较和分析研究, 得出了65个学术期刊排行榜, 其中《世界华人消化杂志》位居396种临床医学类期刊第45位。(编辑部主任: 李军亮 2010-01-08)

原发性胆汁性肝硬化114例

张立伟, 林连捷, 郑长青, 林艳, 张静洁, 周慧慧

■背景资料

原发性胆汁性肝硬化(PBC)是一种免疫损害介导的慢性进展性肝内胆汁淤积性疾病, 该病发病隐匿, 确诊时已进入晚期, 故提高该病的检出率、及时判断病情的轻重程度, 对患者预后至关重要。

张立伟, 林连捷, 郑长青, 林艳, 张静洁, 周慧慧, 中国医科大学附属盛京医院消化内科 辽宁省沈阳市 110004
张立伟, 硕士, 主要从事原发性胆汁性肝硬化方面的研究。
辽宁省科学技术基金资助项目, No. 2010225008
辽宁省博士科研启动基金资助项目, No. 20081048
沈阳市科学技术基金资助项目, No. F10-205-1-7
作者贡献分布: 张立伟与林连捷对此文所作贡献均等; 此课题由张立伟、林连捷及郑长青设计; 研究过程由张立伟、林连捷、郑长青、林艳、张静洁及周慧慧完成; 数据分析由张立伟完成; 本论文写作由张立伟与林连捷完成。
通讯作者: 林连捷, 副教授, 副主任医师, 110004, 辽宁省沈阳市和平区三好街36号, 中国医科大学附属盛京医院消化内科。
audreylin73@hotmail.com
收稿日期: 2012-03-26 修回日期: 2012-05-20
接受日期: 2012-06-29 在线出版日期: 2012-07-18

Clinical features of primary biliary cirrhosis: An analysis of 114 cases

Li-Wei Zhang, Lian-Jie Lin, Chang-Qing Zheng, Yan Lin, Jing-Jie Zhang, Hui-Hui Zhou

Li-Wei Zhang, Lian-Jie Lin, Chang-Qing Zheng, Yan Lin, Jing-Jie Zhang, Hui-Hui Zhou, Department of Gastroenterology, Shengjing Hospital of China Medical University, Shenyang 110004, Liaoning Province, China
Supported by: the Science and Technology Project of Liaoning Province, No. 2010225008; the Doctoral Scientific Research Foundation of Liaoning Province, No. 20081048; and the Science and Technology Project of Shenyang City, No. F10-205-1-17

Correspondence to: Lian-Jie Lin, Associate Professor, Department of Gastroenterology, Shengjing Hospital of China Medical University, 36 Sanhao Street, Heping District, Shenyang 110004, Liaoning Province, China. audreylin73@hotmail.com

Received: 2012-03-26 Revised: 2012-05-20

Accepted: 2012-06-29 Published online: 2012-07-18

Abstract

AIM: To summarize the clinical characteristics of primary biliary cirrhosis (PBC) and to explore the clinical significance of serum anti-mitochondrial antibodies (AMAs) in the diagnosis and assessment of severity of PBC.

METHODS: A retrospective analysis of clinical manifestations, serum biochemical parameters, serum antibodies and pathological features was performed in 114 patients with PBC. M2 antibody-positive patients (105 cases) were divided into four groups: those positive for only M2 (61 cases), for both M2 and M9 (9 cases), for both M2

and M4 (25 cases), and for M2, M4, and M9 (10 cases). Serological markers and complications were compared among the four groups.

RESULTS: Main clinical manifestations of PBC include fatigue, jaundice, and skin itching. The levels of alkalinity phosphatase (ALP), γ -glutamyl transpeptidase (GGT), alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), and total bilirubin (TBIL) increased to varying degrees. Serum AMA and M2 antibodies had a very high specificity and sensitivity in diagnosing PBC. Compared to the M2-positive group, the levels of ALP and IgM in M2-M4-positive group were higher ($P = 0.010, 0.014, P < 0.05$). Compared to the M2-M9-positive group, the levels of AST, TBIL, and IgG in the M2-M4-M9 positive group were higher ($P = 0.039, 0.016, 0.039, P < 0.05$). Compared to the M2-positive group, the level of TBIL in the M2-M4-M9 positive group was higher ($P = 0.023, P < 0.05$). Compared to the M2-M9 positive group, the level of IgG in the M2-positive group was higher ($P = 0.031, P < 0.05$). Thus, serum M4 and M9 levels have clinical significance in the diagnosis of PBC.

CONCLUSION: Understanding the clinical characteristics of PBC can help improve the diagnosis, treatment, and prognosis of this disease.

Key Words: Primary biliary cirrhosis; Clinical manifestations; Anti-mitochondrial antibody

Zhang LW, Lin LJ, Zheng CQ, Lin Y, Zhang JJ, Zhou HH. Clinical features of primary biliary cirrhosis: An analysis of 114 cases. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2012; 20(20): 1884-1888

摘要

目的: 总结原发性胆汁性肝硬化(primary biliary cirrhosis, PBC)的特征, 探讨血清抗线粒体抗体(antimitochondrial antibody, AMA)及分型对疾病的诊断意义及病情评价的临床意义。

方法: 对114例PBC患者的临床表现、血清生化指标、血清抗体及病理学特征等进行回顾性的分析。通过在M2抗体阳性者中, 根据M4及M9是否阳性进行分组, 即分为单纯M2阳

■同行评议者

庄林, 主任医师, 昆明市第三人民医院肝病科

性者、M2-M9阳性者、M2-M4阳性者及M2-M4-M9阳性者4组, 并比较各组间的血清学指标及其并发症。

结果: PBC临床表现主要为乏力、黄疸、皮肤瘙痒等; 生化学主要以碱性磷酸酶(alkalinity phosphatase, ALP)、 γ -谷氨酰转肽酶(γ -glutamyl transpeptidase, GGT)升高为主, 伴有谷丙转氨酶(alanine transaminase, ALT)、谷草转氨酶(automatic spanning tree, AST)及总胆红素(total bilirubin, TBIL)不同程度升高; 血清免疫球蛋白以IgM升高为主; 血清抗体中AMA及M2型抗体对该病的诊断具有较高的特异性及敏感性。通过分组比较发现M2-M4阳性者ALP及IgM高于单纯M2阳性者, P 值分别为0.010、0.014, M2-M4-M9阳性者AST、TBIL及IgG高于M2-M9阳性者, P 值分别为0.039、0.016、0.039; M2-M4-M9阳性者TBIL明显高于单纯M2阳性者, $P = 0.023$, 单纯M2阳性者IgG高于M2-M9阳性者, $P = 0.031$, 上述差异均有统计学意义($P < 0.05$)。故血清M4、M9抗体对该病的病情判断具有一定的临床意义。

结论: 掌握PBC的特征, 做到早诊断早干预, 不仅延缓病程的进展, 还能改善预后。

关键词: 原发性胆汁性肝硬化; 临床表现; 抗线粒体抗体

张立伟, 林连捷, 郑长青, 林艳, 张静洁, 周慧慧. 原发性胆汁性肝硬化114例. 世界华人消化杂志 2012; 20(20): 1884-1888
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/1884.asp>

0 引言

原发性胆汁性肝硬化(primary biliary cirrhosis, PBC)为肝内胆管进行性非化脓性破坏为主的自身免疫性肝病, 是一种慢性疾病。临床上以黄疸和皮肤瘙痒为主要症状, 实验室检查以碱性磷酸酶(alkalinity phosphatase, ALP)等反映胆汁淤积的生化学指标升高, 在病理学上表现为进行性、非化脓性、破坏性小胆管炎, 最终导致肝硬化和器官衰竭^[1]。抗线粒体抗体(antimitochondrial antibody, AMA)阳性, 尤其是其M2亚型抗体阳性为PBC的主要特征^[2]。PBC有9个亚型, 其中M2抗体在AMA的9个亚型抗体中特异性最高。近年来较多文献报道, M4及M9抗体阳性对疾病的病情判断有一定的临床意义。本病多累及中老年女性, 具体病因及发病机制尚不清楚, 目前认为其发病与基因、免疫、环境等因素有关, 随着新技术的不断应用, PBC的检出率和发病率

呈逐渐上升趋势, 引起人们足够的重视。现对中国医科大学附属盛京医院近3年诊断的114例原发性胆汁肝硬化患者进行回顾性分析, 希望能通过分析为临床治疗提供指导价值。

1 材料和方法

1.1 材料 选取中国医科大学附属盛京医院于2008-2011年已经确诊的PBC患者114例, 根据2009年欧洲肝病学会(EASL)及美国肝病学会(AASLD)推荐的诊断标准^[3,4], 当满足以下3条标准中的2条时可诊断PBC: (1)ALP>2倍正常值上限或GGT>5倍正常值上限; (2)AMA或AMA-M2阳性; (3)特征性小胆管损害的病理学改变。

1.2 方法 一般资料包括患者性别、年龄、临床症状、体征、并发症等。采用全自动生化分析仪检测谷丙转氨酶(alanine transaminase, ALT)、谷草转氨酶(automatic spanning tree, AST)、总胆红素(total bilirubin, TBIL)、 γ -谷氨酰转肽酶(γ -glutamyl transpeptidase, GGT)、ALP、胆固醇、甘油三酯; 应用免疫散射比浊法监测免疫球蛋白(IgG、IgA、IgM); 采用间接免疫荧光法(IFA)检测AMA及ANA, 进一步采用酶联免疫吸附试验(ELISA)和欧蒙免疫印迹法(EUROBLOT)分别检测AMA和ANA的亚型抗体, 通过在M2抗体阳性者中, 根据M4及M9是否阳性进行分组, 并比较各组间的血清学指标及其并发症情况。有19例患者在超声引导下快速穿刺肝组织, 常规脱水、石蜡包埋、切片, 常规进行HE染色及网染, 并对其病理特点进行分析。

统计学处理 计量资料以mean \pm SD, 计数资料以比例数及百分率进行描述, 计应用SPSS19.0统计软件计量资料进行 t 检验分析, 计数资料进行 χ^2 检验分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般情况 本组114例PBC患者, 其中男12例, 女102例, 两性别差异有统计学意义($P < 0.05$), 平均年龄为(56.02 \pm 11.29)岁。PBC主要临床症状是黄疸52例, 乏力50例, 皮肤瘙痒35例, 右上腹不适及纳差各20例, 主要并发症是脾大51例, 腹水31例, 肝门静脉直径>13 mm者31例(其中食管胃底静脉曲张21例, 无食管胃底静脉曲张者10例), 消化道出血9例, 肝性脑病1例, 眼睑黄色素瘤1例。有6例患者无临床表现, 体检发现肝功异常, 其中有3例入院后查体已存在脾大。有39例患者合并其他自身免疫性疾病, 如干燥综合征16例,

■ 相关报道

2009年欧洲肝病学会(EASL)及美国肝病学会(AASLD)关于PBC的诊断标准提出各自推荐意见。美国的Flisiak R等关于M4、M9抗体对病情程度的判断价值做出相关研究。

■创新盘点

本文总结PBC的临床特征,探讨血清AMA抗体及分型对疾病的诊断意义,强调肝脏病理穿刺在疑似PBC病理中的重要性,提出M2-M4-M9抗体阳性对PBC病情的判断价值。

表 1 M2阳性患者分组中的生物化学和免疫学指标的比较 (mean ± SD)

分组	n	ALT(U/L)	AST(U/L)	ALP(U/L)	GGT(U/L)	TBIL(μmol/L)	IgM(g/L)	IgG(g/L)
M2-M9	9	113.33 ± 82.07	77.22 ± 40.3	469.44 ± 268.61	529.00 ± 385.33	36.97 ± 39.69	3.80 ± 1.78	15.00 ± 2.74
M2	61	108.16 ± 160.41	109.85 ± 122.75	353.47 ± 208.75	485.46 ± 426.26	45.46 ± 51.53	3.49 ± 1.69	17.76 ± 5.60 [°]
M2-M4	25	127.08 ± 105.40	126.92 ± 116.32	494.12 ± 257.89 [°]	570.53 ± 425.88	66.08 ± 62.46	5.20 ± 3.09 [°]	18.83 ± 5.47
M2-M4-M9	10	103.10 ± 51.40	163.40 ± 109.12 ^a	459.36 ± 199.26	421.80 ± 202.00	135.38 ± 103.25 ^{ac}	5.57 ± 3.19	19.66 ± 5.67 ^a

^aP<0.05 vs M2-M9; [°]P<0.05 vs M2; [°]P<0.05 vs M2-M4.

类风湿关节炎8例, 桥本氏甲状腺炎14例, 溃疡性结肠炎2例, 结缔组织病2例. 其中有1例同时合并甲亢及溃疡性结肠炎, 有1例同时合并桥本氏甲状腺炎及干燥综合征, 该病合并症较多, 易误诊, 故应引起我们的注意.

2.2 血清学指标 本组114例患者肝功指标中ALT 116.90 U/L ± 134.71 U/L、AST 121.57 U/L ± 119.61 U/L、GGT 536.51 U/L ± 452.97 U/L、TBIL 62.22 μmol/L ± 69.50 μmol/L、ALP 430.66 U/L ± 285.140 U/L等指标均存在不同程度的异常, ALT及AST轻度升高, GGT及ALP明显升高, TBIL也高于正常. 血脂指标中血清胆固醇6.37 mmol/L ± 3.68 mmol/L、甘油三酯1.52 mmol/L ± 0.90 mmol/L, 其中血清胆固醇明显升高, 甘油三酯无升高. 免疫球蛋白指标IgG 17.71 g/L ± 5.52 g/L、IgM 4.06 g/L ± 2.35 g/L、IgA 3.70 g/L ± 1.81 g/L, 其中以IgM升高最为明显, 114例患者中有110例患者的IgM均高于正常值上限.

2.3 血清抗体指标及分组后各组生化指标的比较 本114例患者血清自身抗体中, ANA 100例(87.72%)、AMA 95例(83.33%)、M2型105例(92.11%)的检出率较高, AMA属于PBC患者的特异性抗体, M2在AMA的9个亚型抗体中特异性最高, 因此, 对PBC患者AMA以及M2抗体的检测对PBC的诊断有重要意义^[5]. 其他自身抗体M4阳性38例(33.33%)、M9 20例(17.54%)、pANCA 4例(22.22%, 其中有18例患者进行此项检查)、SSA 5例(4.39%)、SSB 6例(5.26%)、ds-DNA 4例(3.51%), 其中有2例AMA兼M4阳性, 1例AMA兼M9阳性, 1例单纯M4阳性, 余M4及M9阳性均同时合并M2阳性.

在105例M2阳性的PBC患者中, 根据M4及M9是否阳性分为4组, 即单纯M2阳性者61例、

M2-M9阳性者9例、M2-M4阳性者25例、M2-M4-M9阳性者10例, 并比较其生化及免疫学指标的差异. 发现M2-M4阳性者的ALP及IgM较单纯M2阳性者升高, 并具有统计学意义(P<0.05), M2-M4-M9阳性者的AST、TBIL及IgG较M2-M9阳性者升高, 并具有统计学意义(P<0.05), 与单纯M2阳性者的TBIL相比较, M2-M4-M9阳性者明显升高, 并有统计学意义(P<0.05), 单纯M2阳性者的IgG较M2-M9阳性者的升高, 有统计学意义(P<0.05, 表1).

2.4 各组并发症的比较 PBC患者的并发症中脾大51例, 腹水31例, 食管胃底静脉曲张21例, 单纯门静脉增宽而无食管胃底静脉曲张者10例, 消化道出血9例, 肝性脑病1例. AMA-M2均阳性的PBC患者分组中并发症的比较, 其中M2-M4、M2-M4-M9组的脾大、腹水、经静脉曲张的所占比重较其他两组大, 单纯M2阳性组中有1例肝性脑病患者(表2).

2.5 肝穿刺组织学特点 19例患者行肝脏穿刺, 主要组织学表现为汇管区纤维性扩大, 肝细胞水肿样变性, 可见点灶状坏死, 汇管区可见炎细胞浸润, 部分汇管区叶间胆管缺失, 小胆管成不典型增生, 4例可见肉芽肿样改变, 2例可见腔内有淤胆及胆栓形成. 其中病理组织处于I期的患者6例, 处于II期的患者1例, 处于II-III期的患者3例, 处于III期的患者8例, 处于III-IV期的患者1例.

3 讨论

PBC的发病机制尚不完全清楚, 他可能与自身免疫耐受机制被打破有关. 由免疫损害介导的慢性进展性肝内胆汁淤积性自身免疫性肝病, 好发于中年的妇女, 临床表现主要为乏力、黄疸及皮肤瘙痒等特点. 其病理特征是累及肝内小

表 2 M2阳性患者分组中并发症的比较 (n)

分组	n	脾大	腹水	静脉曲张	门脉高压	消化道出血	肝性脑病
M2-M9	9	3	1	1	0	1	0
M2	61	28	15	11	2	4	1
M2-M4	25	11	9	4	0	2	0
M2-M4-M9	10	6	7	5	1	0	0

■应用要点

通过临床分析可以提高PBC的检出率, 并通过分析M2、M4、M9等抗体判断PBC病情的轻重, 对治疗和预后的判断有指导意义。

叶间胆管及中隔胆管, 出现非化脓性、破坏性的炎症, 导致小胆管变得狭窄、闭塞甚至消失, 常伴有门脉周围汇管区的炎症、形成肉芽肿及出现肝实质碎屑样坏死, 最终导致肝纤维化及肝硬化, 中晚期只有肝移植才能免于死亡, 因此, 早期诊断与治疗至关重要^[2,6]。

PBC患者的血清生化学指标中主要以ALP及GGT升高为主的肝功异常, 对疾病的诊断有提示作用, 还伴有胆红素的不同程度的升高, 血脂指标中胆固醇升高。与低密度脂蛋白胆固醇相比, 高密度脂蛋白胆固醇不成比例的升高, PBC患者并不因动脉粥样硬化而增加死亡风险, 甘油三酯升高不升高或轻度升高。PBC患者的血清免疫球蛋白中IgG和IgM升高, 尤其IgM显著升高, 提示有体液免疫参与。因此, 相关生化学指标的升高对疾病的诊断有一定的提示作用。

PBC患者的血清自身抗体检测中检出率较高的有ANA 100例(87.72%)、AMA 95例(83.33%)、M2抗体105例(92.11%), ANA阳性虽无特异性, 但ANA阳性可作为PBC的辅助诊断, 对病情进展、预后判断有着重要价值^[7,8]。而ANA阳性在AMA阴性的PBC患者诊断中则更显得重要^[9]。AMA属于PBC患者的特异性抗体, M2抗体在AMA的9个亚型抗体中特异性最高, 其抗原本质是线粒体内膜上的丙酮酸脱氢酶和 α -酮酸脱氢酶的复合体, M2抗体可与多个抗原发生反应。有文献报道PBC患者在出现临床症状、生物化学指标和组织学特征变化数年前就出现了M2抗体^[6,10]。由此可见, AMA和M2抗体的检测对于PBC的早期诊断有重要意义。但是我们也发现3例患者AMA、M2抗体均阴性, 行病理穿刺后显示肝细胞点灶状坏死、胆管胆汁淤积, 符合PBC III-IV期表现, 故建议临床疑诊PBC的AMA阴性的患者应结合病理确诊, 不可轻易排除诊断。M4和M9抗体的抗原本质区别是亚硫酸盐氧化酶及糖原磷酸化酶, 对于M4及M9抗体阳性对病情的评价, 国外文献报道^[11,12], M2和M4抗体阳性的PBC患者病情较重, 预后不好。而仅有M2

或M9抗体阳性的PBC患者, 则病情较轻, 预后较好。国内姚定康等^[13]研究发现M2、M4抗体均阳性者血清ALP、GGT、TBIL和ALT等指标均高于M2抗体阳性、M4抗体阴性者, M4抗体阳性者的病情相对较重。唐乐等^[14]对52例PBC患者研究表明, M4和M9抗体的检测对判断PBC的病情有意义, 说明AMA亚型的检测对于PBC患者的病情判断以及与疾病进展有一定的关系。我们对M2阳性的患者根据M4及M9抗体是否阳性进行分组, 并比较生化指标及并发症, 发现M2、M4阳性者的ALP及IgM较单纯M2抗体阳性者升高, 并具有统计学意义($P<0.05$)。M2-M4-M9阳性者的AST、TBIL及IgG较M2-M9阳性者升高, 并具有统计学意义($P<0.05$)。与单纯M2阳性者的TBIL相比较, M2-M4-M9阳性者明显升高, 并具有统计学意义($P<0.05$)。单纯M2阳性者的IgG较M2-M9阳性者升高, 有统计学意义($P<0.05$)。并发病的比较中, M2-M4、M2-M4-M9组的脾大、腹水、静脉曲张的所占比重较其他两组大。我们已明确M4抗体阳性的PBC患者处于疾病的晚期, 病情较重, M9抗体阳性的PBC患者处于疾病的早期, 病情较轻。本组中有10例M2-M4-M9抗体阳性的患者, 生化学指标均有明显异常及并发症较多, 表明该组患者可能处于疾病的不同阶段, 关于其对病情的判断现在无相关文献报道, 故抗体亚型的转化与疾病进展和预后的关系还有待于进一步研究。

PBC为一种慢性、进行性疾病, 随着病情发展, 可出现肝硬化、腹水、食管胃底静脉曲张、消化道出血、腹膜炎、肝脑病及肝衰竭等严重并发症, 由于发现时大多已进入肝硬化期, 因此预后较差。故如能对该病早期发现及早期干预, 不仅能延缓病程的进展, 还能减少肝移植率及在一定程度上改善患者预后。

总之, 对于胆道酶(ALP, GGT)和/或TBIL升高为主的高胆红素血症, 应高度怀疑PBC。对转氨酶及免疫学检查轻度异常的病例也不能完全除外本病, 肝脏穿刺病理检查对本病确诊至关

■同行评价

本文通过在M2抗体阳性者中,根据M4及M9是否阳性进行分组,并比较各组间的血清学指标及其并发症情况,判断病情的轻重程度,有一定创新。

重要,AMA亚型检测对于PBC的诊断与病情的判断具有一定的临床价值,抗M2抗体对于诊断PBC的敏感性和特异性均较高,具有诊断意义。对已确诊PBC的患者,检测抗M4和M9抗体对疾病的病情判断有一定的临床意义。

4 参考文献

- 1 Leuschner U. Primary biliary cirrhosis--presentation and diagnosis. *Clin Liver Dis* 2003; 7: 741-758
- 2 Parés A, Rodés J. Natural history of primary biliary cirrhosis. *Clin Liver Dis* 2003; 7: 779-794
- 3 EASL Clinical Practice Guidelines: management of cholestatic liver diseases. *J Hepatol* 2009; 51: 237-267
- 4 Lindor KD, Gershwin ME, Poupon R, Kaplan M, Bergasa NV, Heathcote EJ. Primary biliary cirrhosis. *Hepatology* 2009; 50: 291-308
- 5 Leung PS, Van de Water J, Coppel RL, Nakanuma Y, Munoz S, Gershwin ME. Molecular aspects and the pathological basis of primary biliary cirrhosis. *J Autoimmun* 1996; 9: 119-128
- 6 Metcalf JV, Mitchison HC, Palmer JM, Jones DE, Bassendine MF, James OF. Natural history of early primary biliary cirrhosis. *Lancet* 1996; 348: 1399-1402
- 7 Agmon-Levin N, Shapira Y, Selmi C, Barzilai O, Ram M, Szyper-Kravitz M, Sella S, Katz BS, Youinou P, Renaudineau Y, Larida B, Invernizzi P, Gershwin ME, Shoenfeld Y. A comprehensive evaluation of serum autoantibodies in primary biliary cirrhosis. *J Autoimmun* 2010; 34: 55-58
- 8 Muratori L, Granito A, Muratori P, Pappas G, Bianchi FB. Antimitochondrial antibodies and other antibodies in primary biliary cirrhosis: diagnostic and prognostic value. *Clin Liver Dis* 2008; 12: 261-276; vii
- 9 Selmi C, Zuin M, Bowlus CL, Gershwin ME. Anti-mitochondrial antibody-negative primary biliary cirrhosis. *Clin Liver Dis* 2008; 12: 173-185, ix
- 10 Koizumi H, Onozuka Y, Shibata M, Sano K, Ooshima Y, Morizane T, Ueno Y. [Positive rate of anti-mitochondrial antibody in Japanese corporate workers]. *Rinsho Byori* 2000; 48: 966-970
- 11 Flisiak R, Pelszynska M, Prokopowicz D, Rogalska M, Grygoruk U. High concentration of antimitochondrial antibodies predicts progressive primary biliary cirrhosis. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 5706-5709
- 12 Klein R, Pointner H, Zilly W, Glässner-Bittner B, Breuer N, Garbe W, Fintelmann V, Kalk JF, Mütting D, Fischer R, Tittor W, Pausch J, Maier KP, Berg PA. Antimitochondrial antibody profiles in primary biliary cirrhosis distinguish at early stages between a benign and a progressive course: a prospective study on 200 patients followed for 10 years. *Liver* 1997; 17: 119-128
- 13 姚定康, 谢渭芬, 陈伟忠, 刘海英, 屠小卿, 范丽英. 抗线粒体抗体及其分型对原发性胆汁性肝硬化的诊断价值. *中华肝脏病杂志* 2005; 13: 9-11
- 14 唐乐, 闫惠平, 冯霞, 刘妍, 檀玉芬. 原发性胆汁性肝硬化患者线粒体抗体亚型. *中国实验诊断学* 2006; 10: 621-623

编辑 曹丽鸥 电编 闫晋利

ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) CN 14-1260/R 2012年版权归世界华人消化杂志

• 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。

腹腔镜保胆取石术和息肉切除术临床分析53例

徐新保, 张辉, 张洪义, 刘承利, 何晓军, 肖梅, 张宏义, 冯志强

徐新保, 张辉, 张洪义, 刘承利, 何晓军, 肖梅, 张宏义, 冯志强, 中国人民解放军空军总医院肝胆外科 北京市 100142
徐新保, 副主任医师, 主要从事肝胆胰脾疾病的诊断治疗及微创外科治疗方面的研究。

作者贡献分布: 徐新保为本文的主要贡献者, 是该单位腹腔镜保胆手术的倡导者和主要推动人, 同时负责文章设计、临床资料收集整理及文章撰写; 张辉、张洪义、刘承利、何晓军、肖梅、张宏义及冯志强也积极实施了该项手术并协助完成此文。

通讯作者: 徐新保, 副主任医师, 100142, 北京市海淀区阜成路30号, 中国人民解放军空军总医院肝胆外科。

xu_xinbao@sohu.com

电话: 010-68410099-6312

收稿日期: 2012-04-17 修回日期: 2012-05-28

接受日期: 2012-06-28 在线出版日期: 2012-07-18

Laparoscopic cholelithotomy and polypectomy of gallbladder polyps for cholelithiasis and/or cholecystic polyps: An analysis of 53 cases

Xin-Bao Xu, Hui Zhang, Hong-Yi Zhang, Cheng-Li Liu, Xiao-Jun He, Mei Xiao, Hong-Yi Zhang, Zhi-Qiang Feng

Xin-Bao Xu, Hui Zhang, Hong-Yi Zhang, Cheng-Li Liu, Xiao-Jun He, Mei Xiao, Hong-Yi Zhang, Zhi-Qiang Feng, Department of Hepatobiliary Surgery, General Hospital of Airforce of Chinese PLA, Beijing 100142, China
Correspondence to: Xin-Bao Xu, Associate Chief Physician, Department of Hepatobiliary Surgery, General Hospital of Airforce of Chinese PLA, 30 Fucheng Road, Haidian District, Beijing 100142, China. xu_xinbao@sohu.com
Received: 2012-04-17 Revised: 2012-05-28
Accepted: 2012-06-28 Published online: 2012-07-18

Abstract

AIM: To discuss the indications, methods, and therapeutic effect of laparoscopic cholelithotomy and polypectomy in treating cholecystolithiasis and polyps.

METHODS: The clinical data for 53 patients with cholelithiasis and cholecystic polyps who were treated by laparoscopic cholelithotomy and polypectomy between January 2009 and September 2011 were analyzed. Of the 53 patients, 39 suffered from only cholecystolithiasis (including 12 with a single stone and 27 with multiple stones), 8 suffered from cholecystic polyps (including 3 with adenomatous polyps and 5 with cholesterol polyps), and 6 simultaneously suffered from

cholecystolithiasis and cholecystic polyps. Of 39 patients suffering from cholecystolithiasis, 2 had liver cirrhosis, 1 had primary hepatocellular carcinoma, and 3 had acute cholecystitis. Before the stones were removed, the bottom of the gallbladder was incised in 37 of 39 cases with cholelithiasis, and the neck of the gallbladder was incised in the remaining two patients. Of 8 patients with cholecystic polyps, 5 had cholesterol polyps and underwent polyp removal, and the other 3 had adenomas of the gallbladder and underwent partial cholecystectomy around the adenoma. In six patients with combined cholecystolithiasis and cholecystic polyps, the bottom of the gallbladder was excised to remove the stones and polyps. The incisions were sutured continuously with a 4/0 prolene suture in 10 cases, and interrupted or continuous suturing was performed with a 3/0 absorption suture in the other 43 cases. Both choledochoscopy and laparoscopy were used in 33 cases, and only laparoscopy was used in the other 20 patients during operation to see if the stones and polyps had been removed. Celiac drainage tube was placed under the right hepatic lobe in 19 cases during operation and was removed one to five days later. Thirty-three patients with cholecystolithiasis took choleretic drugs for one week to 4 weeks after operation, and the other 12 cases with cholecystolithiasis did not take choleretic drugs.

RESULTS: The operation had been performed successfully in all the cases, and none of them was converted to celiotomy. The operation time was 80 to 200 (109 ± 33) minutes. One case whose gallbladder neck had been cut and sutured developed upper abdominal pain after operation, with about 15 mL of yellow fluid drained a day due to mild bile leakage. Ultrasonic examination showed small amount of fluid in the lesser omentum cavity of the patient. Five days later, the patient's upper abdominal pain relieved, with no fluid in the drainage tube, and then the tube was pulled out. The rest cases recovered smoothly. All the patients were cured and their mean postoperative hospital stay was 2 to 10 (3.8 ± 2.2) days. Postoperative follow-up period ranged from 3 to 36 months. Only one case had muddy

■背景资料

随着人们健康意识的提高, 体检越来越普及, 胆囊结石(息肉)发现的越来越早, 此时, 患者的胆囊功能大多正常或者接近正常, 临床症状也往往较轻, 因此, 这类患者的保胆愿望比较强烈。

■同行评议者

智绪亭, 教授, 山东大学齐鲁医院普外科; 宋振顺, 教授, 西京医院肝胆外科

■相关报道

多年以来,部分临床医师观察到了胆囊切除术后出现十二指肠液的胃反流及胃液食管返流、消化不良性腹泻、胆总管结石和结肠癌的发生率增加等各种不良并发症,也对胆囊切除的临床应用进行了反思,开展了腹腔镜保胆取石(息肉)术,获得了满意疗效。

stone recurrence 12 months postoperatively, and his stone disappeared after taking choleretic and calculus-removing drugs for one month.

CONCLUSION: Laparoscopic cholelithotomy and polypectomy allow preserving gallbladder function and maintaining normal digestive function in patients with cholelithiasis and/or cholecystic polyps. If the size, wall thickness, and function of the gallbladder are nearly normal and cholecystic malignancies are excluded, laparoscopic cholelithotomy and polypectomy can be performed in patients with cholelithiasis and/or cholecystic polyps.

Key Words: Gallstones; Cholecystic polyps; Laparoscopy; Choledochoscopy; Cholelithotomy; Polypectomy

Xu XB, Zhang H, Zhang HY, Liu CL, He XJ, Xiao M, Zhang HY, Feng ZQ. Laparoscopic cholelithotomy and polypectomy of gallbladder polyps for cholelithiasis and/or cholecystic polyps: An analysis of 53 cases. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2012; 20(20): 1889-1894

摘要

目的: 探讨腹腔镜下保胆取石和取息肉的手术适应证、方法和疗效。

方法: 2009-01/2011-09我们完成了53例腹腔镜下保胆取石和取息肉术。单纯胆囊结石患者39例,其中12例为单发结石,27例为多发胆囊结石;胆囊息肉患者8例,其中3例为腺瘤性息肉,5例为胆固醇性息肉;胆囊结石合并息肉患者6例,均为胆固醇性息肉;胆囊结石合并肝硬化2例,合并肝癌1例;胆囊结石伴急性胆囊炎3例。39例结石患者中37例行胆囊底部切开取石,2例行胆囊颈部切开取石成形术;8例胆囊息肉患者中5例胆固醇性息肉行胆囊底部切开取息肉术,3例腺瘤性息肉患者行息肉周围胆囊部分切除术;6例胆囊结石合并息肉的患者均行胆囊底部切开取石(息肉)术,其息肉均为胆固醇性息肉。胆囊切口采用4-0 prolene缝线连续缝合10例,采用3-0可吸收线间断缝合或连续缝合43例。术中使用胆道镜33例,20例未用胆道镜,用腹腔镜代替胆道镜查看胆囊内结石或息肉是否取净。术后放置腹腔引流管19例,其余均未放置腹腔引流管。胆囊结石(包括合并胆囊息肉)患者术后服用利胆药物者33例,服药时间为1 wk-1 mo不等,另12例未服利胆药物。

结果: 53例保胆患者手术均获成功,没有1例中转剖腹手术。手术时间80-200 min,平均109 min \pm 33 min。1例颈部切开取石患者术后

出现上腹疼痛,腹腔引流管每日引出约15 mL淡黄色腹水,超声检查显示小网膜腔少量积液,考虑少量胆漏所致,术后5 d腹痛缓解,腹腔引流管无液体引出,拔除腹腔引流管后无不适。其余患者术后均恢复顺利,术后住院2-10 d,平均3.8 d \pm 2.2 d,均治愈出院。所有患者均获随访,随访时间3-36 mo,1例患者术后12 mo胆囊泥沙样结石复发,给予利胆排石药物治疗1 mo后复查腹部超声显示胆囊结石消失。

结论: 腹腔镜下保胆取石和取息肉术保留了胆囊及胆囊功能,有利于维护患者消化系统的正常功能。只要胆囊大小基本正常、胆囊壁增厚不明显、胆囊功能基本正常,排除了胆囊恶性病变,并且患者及家属保胆愿望强烈,均可进行腹腔镜保胆取石(息肉)术。

关键词: 胆囊结石; 胆囊息肉; 腹腔镜; 胆道镜; 胆囊切开取石术; 息肉切除术

徐新保, 张辉, 张洪义, 刘承利, 何晓军, 肖梅, 张宏义, 冯志强. 腹腔镜保胆取石术和息肉切除术临床分析53例. *世界华人消化杂志* 2012; 20(20): 1889-1894

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/1889.asp>

0 引言

胆囊是人体一个重要的消化器官,具有存储、浓缩、排出胆汁和调节胆道压力的作用,还具有复杂的化学和免疫功能。但是近100多年来胆囊常因一些良性疾病如胆囊结石、胆囊息肉而被切除,腹腔镜胆囊切除术的快速普及使得该技术成了治疗胆囊结石(息肉)的“金标准”。多年以来,部分临床医师观察到了胆囊切除术后出现十二指肠液的胃反流及胃液食管返流^[1,2]、消化不良性腹泻^[3,4]、胆总管结石^[5,6]和结肠癌^[7-9]的发生率增加等各种不良并发症,也对胆囊切除的临床应用进行了反思,开展了腹腔镜保胆取石(息肉)术,获得了满意疗效。但是,针对腹腔镜保胆取石(息肉)术的手术适应证、方法和疗效,尚存在较大争议^[10]。2009-01/2011-09我们有选择性地进行了腹腔镜下保胆取石和取息肉术53例,取得较好的效果,获得了初步经验,现予报告如下。

1 材料和方法

1.1 材料 本组53例,男27例,女26例,年龄16-71岁,平均年龄42.0岁 \pm 14.1岁,均为择期手术病例。单纯胆囊结石患者39例,其中12例为单发结石,27例为多发胆囊结石,胆囊结石合并肝硬

化2例, 合并肝癌1例, 胆囊结石伴急性胆囊炎3例. 胆囊结石小者为泥沙样结石, 大者可达2.8 cm. 胆囊息肉患者8例, 其中3例为腺瘤性息肉, 单发, 直径1.0-1.5 cm; 5例为胆固醇性息肉, 直径1.0-1.3 cm, 多发. 胆囊结石合并息肉患者6例. 所有胆囊结石(包括结石合并息肉)患者均有上腹或右上腹痛症状, 无黄疸病史. 术前诊断主要依据腹部超声, 个别胆囊结石患者曾行腹部CT或者MRI检查, 以排除肝内外胆管结石. 所有患者术前腹部超声检查均显示胆囊大小正常, 囊壁厚度正常或者不大于0.6 cm. 设备用德国Storz腹腔镜、Olympus电子胆道镜及取石网、活检钳和其他抓钳、吸引器等.

1.2 方法

1.2.1 术前治疗: 平诊患者入院后常规术前检查. 胆囊结石伴急性胆囊炎患者入院后首先给予禁食、输液、抗感染、保肝及对症治疗, 患者腹痛及腹部压痛消失、莫菲氏征阴性、肝功能及血象正常后, 如果复查腹部超声显示胆囊大小正常或者基本正常、胆囊壁厚度<0.6 cm者可以施行腹腔镜保胆取石(息肉)术. 术前须向患者本人及家属详细交代术后胆囊结石或息肉具有复发的可能性, 患者本人和家属具有强烈保胆愿望者, 方可手术.

1.2.2 手术操作: 全身麻醉下采用腹腔镜胆囊切除术标准三孔或者四孔法, 采取头高足低、右侧抬高体位. 51例患者(包括39例胆囊结石、6例胆囊结石合并息肉及8例胆囊息肉患者)采用电钩在胆囊底部切开0.5-2.0 cm, 另2例胆囊颈部结石嵌顿的患者采用颈部切口, 切口处采用电凝止血, 出血明显者采用可吸收线缝扎止血. 首先吸净胆囊内胆汁, 用细弱水流轻柔冲洗胆囊腔, 直至冲洗液清亮. 对于胆囊结石患者, 位于胆囊底部切口附近的结石用取石钳直接取出, 剩余结石可用弯钳从胆囊管开始向胆囊底部切口方向轻轻挤压推移, 块状结石大多可被推移出胆囊底部切口, 或者被推移到胆囊底部后再钳夹取出, 泥沙样结石可用冲洗器冲吸干净, 2例胆囊颈部结石嵌顿患者直接从颈部切口取出结石. 随后将腹腔镜或者胆道镜置入胆囊内, 如有残余块状结石可用取石网篮取出, 残余细小结石及泥沙样结石可用吸引器冲吸干净. 胆囊息肉患者术前需行超声检查定位. 8例单纯性胆囊息肉患者中5例为胆固醇性息肉, 经胆囊底部切口吸净胆汁并冲洗干净胆囊腔, 置入腹腔镜或者胆道镜确定息肉位置, 距切口较近者可用弯

钳直接夹取, 位置较深者(尤其是胆囊颈部息肉)需通过胆道镜用活检钳或者取石网篮夹取; 另3例腺瘤性息肉位于胆囊底部, 在腹腔镜直视引导下用电钩沿息肉基底部切除部分胆囊壁, 边缘轻轻电凝止血, 如止血不满意则用4-0可吸收线缝扎止血. 6例结石合并胆固醇息肉者在腹腔镜或者胆道镜引导下采用推挤、钳夹、网篮套扎、活检钳夹取或水流冲吸等方式取净结石及息肉. 所取出的结石或者息肉放入标本袋中一并经脐部切口取出或者直接夹出. 将胆囊腔冲吸干净, 置入腹腔镜或者胆道镜仔细观看, 确定无结石或者息肉残留, 胆囊管开口处通畅并见胆汁流入.

53例患者中, 33例术中使用了胆道镜, 其中仅5例使用了取石网篮, 2例使用了活检钳; 另20例未用胆道镜, 仅用腹腔镜代替胆道镜置入胆囊腔观察, 效果满意. 43例以3-0可吸收线间断“8”字缝扎胆囊切口, 另10例以4-0 prolene缝线连续缝合胆囊切口, 针距3-4 mm, 边距4-5 mm, 每针打结4-6个, 首结为外科结, 确定缝合严密无胆汁渗漏, 将腹腔冲洗干净. 胆囊结石合并肝硬化(2例)、肝癌(1例)、急性胆囊炎(3例), 以及腺瘤性息肉行胆囊部分切除(3例)、颈部切取石(2例), 总计11例患者, 均在Winslow孔放置了1根腹腔引流管, 另8例术中留置Winslow孔腹腔引流管者系开展腹腔镜保胆取石(息肉)术的早期阶段所放置的; 其余34例未放置腹腔引流管.

1.2.3 术后随访: 胆囊结石(包括合并胆囊息肉)患者术后服用利胆药物者33例, 服药时间为1 wk-1 mo不等, 另12例未服利胆药物. 单纯胆囊息肉患者术后未服利胆药物. 嘱患者平时低脂饮食. 所有患者术后均得到规律随访, 术后1、3、6 mo复查腹部超声, 此后每半年复查1次.

2 结果

53例保胆患者手术均获成功, 没有1例中转剖腹手术. 手术时间80-200 min, 平均109 min±33 min. 在45例胆囊结石(包括结石合并息肉)患者中, 胆固醇性结石30例, 结石直径0.1-2.8 cm, 单发者均为胆固醇结石, 多发者从细砂粒到块状不等, 难以计数, 其中胆色素混合结石约15例. 经病理证实, 6例单发息肉有3例为腺瘤性息肉, 其余3例为胆固醇性息肉; 2例多发息肉及6例合并结石者均为胆固醇性息肉. 1例颈部切取石患者术后出现上腹痛, 腹腔引流管每日引出约15 mL淡黄色腹水. 超声检查显示小网膜腔少

■创新盘点

本文就该科室近年来保胆手术经验和体会作了较为详尽的报道, 为胆囊相关疾病的临床治疗提供了一些经验和技巧.

■名词解释

胆囊息肉:指胆囊息肉样病变(PLG),在病理上有良性息肉和恶性息肉之分。良性息肉又分为肿瘤性和非肿瘤性息肉,非肿瘤性息肉中以胆固醇息肉(CPs)最为多见,占PLG的46%-70%,其他类型包括炎性息肉、胆囊腺肌增生症等非肿瘤性息肉和腺瘤、平滑肌瘤、脂肪瘤等肿瘤性息肉。

量积液,考虑少量胆漏所致,术后5 d腹痛缓解,腹腔引流管无液体引出,拔除腹腔引流管后无不适。其余患者均无胆漏,术后恢复顺利,腹腔引流管大多于术后1-2 d拔除,其中1例胆囊结石合并肝硬化、肝癌患者术后7 d拔除腹腔引流管,术后10 d出院。平均拔管时间为术后 $2.6\text{ d}\pm 2.0\text{ d}$,术后住院2-10 d,平均 $3.8\text{ d}\pm 2.2\text{ d}$,均治愈出院。术后随访时间3-36 mo,1例患者于术后12 mo超声检查发现胆囊腔内有少量泥沙样结石,该患者术中采用4-0 prolene线连续缝合,术后未服利胆药物,给予该例结石复发患者服用利胆排石药物1 mo后复查超声未见胆囊结石,考虑其少量泥沙样结石溶解或者排入肠道。其余患者未见胆囊结石或息肉复发。所有患者术后饮食及大小便正常,无明显不适。目前随访仍在继续中。

3 讨论

胆囊结石及息肉都是常见病、多发病,胆囊结石的发病率占正常人群中的10%。通常临床上所称胆囊息肉,实际上是指胆囊息肉样病变(polypoid lesion of gallbladder, PLG),这一概念在55年前由Jones提出而沿用至今^[11]。PLG可在4.0%-9.5%的接受腹部超声检查的成年人中发现^[12,13],邓绍庆等^[14]报道我国健康成人中PLG的患病率约为5%。随着人民生活水平的提高,胆囊结石和胆囊息肉样病变的发病率还有增高趋势。目前,胆囊结石(息肉)的外科治疗分两大类,一类是传统的切除胆囊术,包括开腹胆囊切除术和腹腔镜胆囊切除术;另一类就是保胆取石(息肉)术,同样也包括开腹小切口保胆取石(息肉)术和腹腔镜保胆取石(息肉)术。1991年腹腔镜胆囊切除术的成功实施,使胆囊切除术进入了微创外科时代,大大推动了胆囊切除手术的广泛开展。因此,当前外科医师主流观点仍然是施行胆囊切除术。支持胆囊切除的主要依据有两种:一是胆囊结石复发^[15,16],二是胆囊息肉可能癌变^[17]。

对于胆囊结石患者,过去由于保胆取石的技术手段有限,手术后胆囊结石的残留率^[18]、复发率较高^[15,16],也促使人们普遍采用胆囊切除术治疗胆囊结石。但是,随着腹腔镜、内镜广泛应用于临床,外科医生可以直视胆囊腔内和肝内外胆管腔内的病变,在直视下清楚地取净结石,大大降低了残留率。所以,现在新式保胆取石治疗与以前旧式保胆取石治疗有着根本区别:旧式保胆取石外科医生不能真正看到胆囊内部情况,所以不能保证取石彻底,结石遗漏在所难

免,形成胆囊结石残留,所谓的结石复发率,主要就是结石残留率;但现在新式保胆取石手术全过程是在胆道镜下操作,克服了外科手术盲区,并且采取了许多防止复发的措施,使术后5-10年复发率从以前的30%-40%降低到2%-6%或更低^[19]。我们的资料显示术后近期结石复发率仅为2.22%(1/45),而且该例患者胆囊内仅有少量泥沙样结石,服用利胆溶石药物1 mo后结石消失。因此,目前以结石残留与复发为依据一概施行胆囊切除已经不合时宜。

PLG在病理上有良性息肉和恶性息肉之分。良性息肉又分为肿瘤性和非肿瘤性息肉,非肿瘤性息肉中以胆固醇息肉(cholecystic polyps, CPs)最为多见,占PLG的46%-70%^[20,21],良性非胆固醇性息肉的病理类型较多,包括炎性息肉、胆囊腺肌增生症等非肿瘤性息肉和腺瘤、平滑肌瘤、脂肪瘤等肿瘤性息肉。尽管胆囊腺瘤是公认的癌前病变,恶变率最高达30%,但根据文献报道^[22],恶性PLG的比例仅仅约占3%-8%。况且,现在的腹腔镜和胆道镜都进入了高清技术时代,术中可以清晰观察胆囊息肉样病变的性质,做出比较准确的判断,对有疑问的胆囊息肉样病变术中快速病理检查,可予以确诊。因此,现今的腹腔镜联合胆道镜保胆取息肉术不但可以避免切除92%以上的“无辜”胆囊,也可“揪出”3%-8%的“恶性PLG”加以切除。

此外,胆囊切除术可能出现以下不良影响:(1)胆囊壶腹括约肌协调机制丧失,容易引发反流性胃炎,导致消化不良;(2)胆囊切除术后胆总管结石的发生率可能增高^[22];(3)胆囊切除术后结肠癌发病率可能升高;(4)术中电刀、电凝损伤胆囊床附近肝组织;(5)由于胆囊切除术中必须处理胆囊三角,因此,有损伤肝门部胆管及血管的风险,据报道,其胆管损伤的发生率为0.6%-1.5%^[23],因胆管损伤引起的病死率高达6%^[24],如果粘连严重,尚有可能损伤结肠肝区、十二指肠、门静脉右支等,造成不应有的医源性损伤;(6)胆囊切除后胆汁酸的肠肝循环和患者的脂代谢发生变化,不能完全代偿恢复;(7)部分患者切除胆囊后症状仍不消失,可出现胆囊切除术后综合征;(8)现已发现胆囊具有某些免疫功能,胆囊切除对人体的长远影响尚需研究。

腹腔镜保胆取石(息肉)术仅在胆囊底部切开一个小口,远离了肝门部血管、胆管、神经及周围脏器,不会造成上述组织的损伤,具有良

好的安全性, 也避免了胆囊切除术所带来的不良反应. 现代社会, 人们及早定期体检, 即使发现患有胆囊结石(息肉), 往往胆囊大小正常, 囊壁不厚, 胆囊功能基本正常, 此类患者大多保胆愿望比较强烈, 因而适合保胆取石(息肉). 可以说, 时代的进步为保胆取石(息肉)术提供了广阔的开展空间.

在开始阶段, 我们对保胆取石术的手术适应证掌握的比较严格, 仅限于单发胆囊结石(息肉)及胆囊大小形态正常、囊壁不厚、功能正常的中青年患者, 随着经验积累, 加上要求保胆的患者日益增多, 适应证逐步放宽. 目前, 我们对腹腔镜保胆取石(息肉)术所掌握的适应证是: 胆囊单发或多发结石(息肉), 其中息肉 ≥ 0.6 cm; 胆囊大小基本正常, 胆囊壁厚度 ≤ 0.5 cm; 急性胆囊炎得到控制; 排除胆囊恶性病变或者重度不典型增生, 必要时行术中快速病理检查决定; 患者本人保胆愿望强烈. 符合以上条件者均可实行腹腔镜保胆取石(息肉)术.

我们认为, 保胆取石术不应该设年龄限制, 由于老年人整体消化器官功能减退, 保留胆囊对维护他们的消化功能更为有利. 急性胆囊炎伴胆囊结石患者最好在急性炎症得到控制后再行腹腔镜保胆取石术. 我们对多发胆囊结石(息肉)及结石合并息肉患者施行腹腔镜保胆取石(息肉)术后, 并未见明显的结石及息肉复发现象, 因此, 这部分患者只要保胆愿望强烈, 也完全可以施行保胆手术.

此外, 对一些特殊病例也有施行保胆手术的必要. 我们的资料中有2例(男、女各1例)乙型病毒性肝炎后肝硬化、门脉高压患者, 其中1例男性患者还同时患有原发性肝癌, 但他们的肝硬化经保肝、抗病毒治疗病情稳定, 其中男性肝癌患者经肝动脉化疗栓塞、射频消融等治疗, 其肝癌病变获得较好控制. 此2位患者因结石性胆囊炎反复发作, 平时无法正常进食, 严重影响生活质量, 经腹腔镜保胆取石术后, 患者能够正常进食, 生活质量明显改善, 有利于控制肝硬化、肝癌的病情发展. 遗传性球形红细胞增多症患者因其红细胞变形性差, 通过脾脏时易遭破坏, 出现不同程度的贫血、脾肿大和黄疸, 因胆汁中游离胆红素增加, 可与钙等金属离子络合沉积在胆囊内形成结石, 此类患者往往胆囊无明显病理改变, 在施行脾切除及保胆取石术后可不再出现溶血, 一般也不会继续形成胆囊结石. 我们对1例遗传性球形红细胞增多症合并

胆囊结石的患者同时施行了腹腔镜脾切除及保胆取石术, 术后效果满意, 随访1年余未见胆囊结石复发.

对于单发块状结石患者, 我们一般采用LC标准三戳孔法, 而对于其余患者, 采用四孔法比较理想. 胆囊的切口部位最好选择胆囊底部少血管区, 用细径电钩顺胆囊长轴切开胆囊壁全层, 必要时可沿胆囊长轴向胆囊体部适当延长切口. 切缘渗血可电凝止血, 出血较多时采用3-0可吸收线缝扎止血. 不推荐采用胆囊颈部切口, 因此处血管、神经密集, 在胆囊收缩时承受的压力较大, 术后容易出现疼痛、胆漏等并发症, 我们的1例患者术后出现少量胆漏及腹痛患者, 就是采用了胆囊颈部切口所致. 一般情况下交替使用腹腔镜血管钳、取石钳, 采用直接钳夹、推挤等方式将块状结石取出, 用吸引器将细小颗粒结石及泥沙样结石冲吸干净. 胆囊底部及体部的胆固醇息肉大多可在腹腔镜直视下钳夹取出, 腺瘤性窄蒂息肉也可直接从根部夹取, 位于胆囊底部且基底较宽的腺瘤性息肉需要沿息肉基底连同部分胆囊壁一同切除, 胆囊颈部的胆固醇性息肉, 大多需要在胆道镜辅助下采用网篮或活检钳取出. 位于胆囊体部及颈部的广基腺瘤性息肉患者我们不推荐施行保胆手术. 当胆囊底部切口达到1 cm以上时, 可将胆囊腔内充满生理盐水, 用腹腔镜直接插入胆囊内观察是否取净结石或息肉, 调节腹腔镜方向, 大多可清晰观察到胆囊管及胆囊腔内全貌, 如果腹腔镜实在难以观察到胆囊管开口, 或者胆囊底部切口较小腹腔镜难以插入时, 则换用胆道镜观察. 我们的53例患者中, 33例术中使用了胆道镜, 其中仅5例使用了取石网篮, 2例使用了活检钳; 另20例用腹腔镜代替胆道镜置入胆囊腔观察, 效果良好. 随着技术熟练程度增加, 对胆道镜、取石网篮、活检钳的依赖会逐渐减少, 多数患者仅采用一般的腹腔镜手术器械即可完成手术, 手术时间也逐渐缩短. 有报道采用硬质胆道镜取石保胆^[25,26], 我们认为采用软质胆道镜较好, 可以灵活地调节方向, 不容易损伤胆囊黏膜, 如果术中同时采用胆道镜导引器则效果更佳. 值得注意的是, 术中必须清晰观察到胆囊管开口有胆汁飘逸进入胆囊, 证实胆囊管开口通畅. 至于胆囊切口的缝合, 我们推荐采用3-0可吸收线全层“8”字间断缝合, 边距约3-4 mm, 针距约4-5 mm, 这样既能保证严密缝合, 将来也不会残留异物, 对胆囊外观、形态及功能无明显

■同行评价

本研究针对当前保胆手术趋势进行了有益探索, 所得出的经验体会值得借鉴. 在讨论中也对当前的发展趋势动向进行了阐述, 做到有理有据.

影响. 对于是否放置腹腔引流管, 我们的经验是: 除了胆囊颈部切开取石、急性胆囊炎患者、肝硬化或肝癌患者等特殊病例切开取石后需要放置腹腔引流管外, 其余患者如果缝扎可靠, 可不必放置腹腔引流管. 我们的53例患者中, 近19例放置了腹腔引流管, 其余的34例患者均未放置腹腔引流管, 也都恢复良好.

术后嘱患者半月内清淡饮食, 此后可恢复正常进食. 对于胆囊结石(包括息肉合并结石)患者, 术后规律服用利胆药物1 mo, 胆囊息肉患者术后服用1-2 wk. 术后1、3、6 mo分别复查肝胆超声, 此后每半年复查1次, 如发现有胆囊结石复发迹象(如胆汁淤积、泥沙样结石)等, 立即服用利胆溶石药物, 可望溶解、排除结石, 遏制结石再生^[27]. 胆囊息肉患者如果血脂较高, 应予以控制, 平时进食低胆固醇食物.

总之, 随着外科设备的更新, 技术水平的提高, 人们健康意识的提高, 健康体检的普及, 胆囊结石(息肉)越来越早被发现, 医患之间充分沟通, 有计划、有选择地施行腹腔镜保胆取石(息肉)术会被越来越多的医生和患者所接受. 当然, 我们的病例数量较少, 随访时间还短, 希望将我们有限的经验教训呈现给同仁, 起到抛砖引玉的作用, 共同推动腹腔镜保胆取石(息肉)技术的进步和推广.

4 参考文献

- 1 荣万水, 刘京山, 曾庆敏, 孔德明. 内镜微创保胆取石术与胆囊切除术后综合征. 中国普通外科杂志 2011; 20: 273-275
- 2 郑树国, 王小军. 胆囊切除术后综合征. 中国实用外科杂志 2008; 28: 510-512
- 3 孙飞, 彭海燕. 胆囊切除术后综合征的中医认识和治疗进展. 世界华人消化杂志 2010; 18: 1694-1700
- 4 葛长青, 李全福, 刘建辉, 张阳德, 张宝善, 邵青龙, 郭超, 钟永刚, 许旭. 腹腔镜辅助胆道镜保胆取石术与腹腔镜胆囊切除术的比较. 中国内镜杂志 2012; 18: 199-202
- 5 孔静, 吴硕东. Oddi括约肌功能失调与胆囊结石及胆囊切除术后胆总管结石的关系. 肝胆外科杂志 2002; 10: 75-77
- 6 张阳德, 乔铁, 冯禹阳, 王兴强, 王小峰, 黄毅敏. 内镜微创外科是治愈疾病及保留器官与器官功能的最佳途径——论内镜下保留胆囊取石或摘除息肉. 中国内镜杂志 2008; 14: 449-453
- 7 Siddiqui AA, Kedika R, Mahgoub A, Patel M, CIPHER DJ, Bapat V. A previous cholecystectomy increases the risk of developing advanced adenomas of the colon. *South Med J* 2009; 102: 1111-1115
- 8 Xu YK, Zhang FL, Feng T, Li J, Wang YH. [Meta-analysis on the correlation of cholecystectomy or cholecystolithiasis to risk of colorectal cancer in Chinese population]. *Ai Zheng* 2009; 28: 749-755
- 9 孙绳墨, 林汉庭. 胆囊结石、胆囊切除与结肠癌相关性的病例对照研究. 吉林医学 2012; 33: 908-909
- 10 王惠群, 傅贤波. 我国内镜微创保胆取石术的发展现状分析. 中国微创外科杂志 2010; 10: 481-485
- 11 JONES HW, WALKER JH. Correlation of the pathologic and radiographic findings in tumors and pseudotumors of the gallbladder. *Surg Gynecol Obstet* 1957; 105: 599-609
- 12 Jørgensen T, Jensen KH. Polyps in the gallbladder. A prevalence study. *Scand J Gastroenterol* 1990; 25: 281-286
- 13 Lin WR, Lin DY, Tai DI, Hsieh SY, Lin CY, Sheen IS, Chiu CT. Prevalence of and risk factors for gallbladder polyps detected by ultrasonography among healthy Chinese: analysis of 34 669 cases. *J Gastroenterol Hepatol* 2008; 23: 965-969
- 14 邓绍庆, 周孝思, 张武. 胆囊息肉样病变肿瘤和癌前病变的识别. 实用外科杂志 1992; 12: 600-602
- 15 王艳芬, 张昕昕. 优思弗对预防保胆取石术后结石复发的临床研究. 肝胆外科杂志 2011; 19: 210-212
- 16 骆助林, 陈理国, 苗建国, 闫洪涛, 任建东, 肖乐, 田伏洲. 口服溶石预防保胆取石术后结石复发的临床观察. 中国内镜杂志 2012; 18: 166-168
- 17 乐问津, 丁佑铭, 易佐慧子, 胡海涛, 宋湧. 胆囊息肉样病变恶变危险因素Meta分析. 临床肝胆病杂志 2011; 27: 934-938
- 18 姚建龙, 史和平, 王保全, 董山湖, 侯峰强, 王旭. 残留胆囊结石的再认识. 肝胆外科杂志 2007; 15: 196-197
- 19 王旭, 王翔翔, 唐彤, 孙建明. 内镜保胆取石术临床研究现状. 中国普外基础与临床杂志 2009; 16: 773-776
- 20 Lee KF, Wong J, Li JC, Lai PB. Polypoid lesions of the gallbladder. *Am J Surg* 2004; 188: 186-190
- 21 Csendes A, Burgos AM, Csendes P, Smok G, Rojas J. Late follow-up of polypoid lesions of the gallbladder smaller than 10 mm. *Ann Surg* 2001; 234: 657-660
- 22 张阳德. 外科学总论. 北京: 人民卫生出版社, 2007: 579-580
- 23 王秋生. LC胆管损伤的发生与防范. 中华消化外科杂志 2008; 7: 78-80
- 24 黄志强. 医源性胆管狭窄: 胆道外科之痛. 中华消化外科杂志 2008; 7: 1-5
- 25 乔铁, 张宝善, 冯禹阳, 王兴强, 王小峰, 黄毅敏. 硬性胆道镜保胆取石(息肉)80例报告. 中国内镜杂志 2007; 13: 1302-1304
- 26 张宝善, 刘京山. 内镜微创保胆取石1520例临床分析. 中华普外科手术学杂志(电子版) 2009; 3: 410-414
- 27 韩天权, 张圣道. 保胆取石术后的复发及预防. 中华肝胆外科杂志 2009; 15: 4-5

编辑 张姗姗 电编 闫晋利

多学科协作诊治模式下治疗不可切除结直肠癌67例

赵国刚, 冯富星, 运涛, 白雪巍

赵国刚, 冯富星, 运涛, 天津市第五中心医院肛肠外科 天津市 300450

白雪巍, 哈尔滨医科大学第一临床医学院肝胆外科 黑龙江省哈尔滨市 150001

赵国刚, 主治医师, 主要从事结直肠癌的分子生物学机制方面的研究。

国家自然科学基金资助项目, No. 30901437

教育部高等学校博士学科点专项科研基金资助项目, No. 20102307120002

黑龙江省普通高等学校青年学术骨干支持计划基金资助项目, No. 1155G35

黑龙江省青年科学基金资助项目, No. QC08C63

哈尔滨市科技创新人才研究专项基金资助项目, No. 2010RFQ059

作者贡献分布: 此课题由赵国刚与白雪巍设计; 资料由赵国刚、冯富星、运涛及白雪巍完成; 数据分析和论文写作由赵国刚完成; 审阅由白雪巍完成。

通讯作者: 白雪巍, 副教授, 硕士生导师, 150001, 黑龙江省哈尔滨市邮政街23号, 哈尔滨医科大学附属第一医院肝胆外科。willwhite007@sohu.com

电话: 0451-85555734

收稿日期: 2011-12-30 修回日期: 2012-05-24

接受日期: 2012-06-28 在线出版日期: 2012-07-18

Management of unresectable colorectal cancer by multimodality therapy: An analysis of 67 cases

Guo-Gang Zhao, Fu-Xing Feng, Tao Yun, Xue-Wei Bai

Guo-Gang Zhao, Fu-Xing Feng, Tao Yun, Department of Anorectal Surgery, the Fifth Central Hospital of Tianjin, Tianjin 300450, China

Xue-Wei Bai, Department of Pancreatic and Biliary Surgery, the Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150001, Heilongjiang Province, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30901437; the Research Fund For the Doctoral Program of Higher Education of China, No. 20102307120002; the Natural Science Foundation of Heilongjiang Province, No. QC08C63; the Foundation For Key University Teachers of Heilongjiang Province, No. 1155G35; and the Innovative Science and Technology Research Fund of Harbin, No. 2010RFQ059

Correspondence to: Xue-Wei Bai, Associate Professor, Department of Pancreatic and Biliary Surgery, the Affiliated Hospital of Harbin Medical University, 23 Youzheng Street, Harbin 150001, Heilongjiang Province, China. willwhite007@sohu.com

Received: 2011-12-30 Revised: 2012-05-24

Accepted: 2012-06-28 Published online: 2012-07-18

Abstract

AIM: To summary our experience with multimodality

therapy of unresectable colorectal cancer.

METHODS: A total of 67 patients were included in this study, including 15 patients with right-sided colon cancer, 9 with left-sided colon cancer, and 43 with rectal cancer. All cases were assessed as unresectable by the multidisciplinary team and histologically confirmed as colorectal cancer. Multimodality therapy was performed by colorectal specialists and the multidisciplinary team.

RESULTS: Of all 67 patients, no patients achieved complete remission, 43 achieved partial remission, 16 had stable disease, and 8 had progressive disease. The short-term remission rate was 100%. The survival duration ranged from 10 to 38 months, with an average of 24 months. Nine (13.4%) patients underwent radical surgery. The total complication rate was 52.2% (35/67).

CONCLUSION: Multimodality therapy allows improving quality of life and prolonging survival time in patients with unresectable colorectal cancer.

Key Words: Colorectal cancer; Multidisciplinary team; Multimodality therapy

Zhao GG, Feng FX, Yun T, Bai XW. Management of unresectable colorectal cancer by multimodality therapy: An analysis of 67 cases. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2012; 20(20): 1895-1899

摘要

目的: 总结多学科协作诊治模式下治疗不可切除结直肠癌的经验。

方法: 本研究纳入67例符合条件的患者, 其中男38例, 女29例, 平均年龄为55.62岁, 右半结肠癌15例, 左半结肠癌9例, 直肠癌43例。67例患者均经综合治疗小组评估为不可切除, 且组织学证实为结直肠癌。患者的治疗由结直肠专科医师与多学科组成的综合治疗小组完成。

结果: 67例患者中, 无完全缓解(CR)病例, 部

■背景资料

结直肠癌的发病率一直居高不下, 有很多结直肠癌患者在发现时已无法行手术切除。采用何种方式对不可切除结直肠癌进行干预, 是目前的热点和难点。

■同行评议者

郝立强, 副教授, 上海长海医院普外科

■研究前沿

针对不可切除结肠直肠癌患者的具体情况,应联合应用多种方式并提倡进行多学科合作。手术、放疗、化疗、靶向治疗等的联合应用使治疗进入一个新阶段。

分缓解(PR)43例,稳定(ND)16例,进展(PD)8例;近期症状缓解率100%;生存期10-38 mo,平均24 mo;9例患者实施了根治性手术,外科干预比例为13.4%(9/67);总并发症发生率为52.2%(35/67)。

结论:采用综合治疗方式,包括全身化疗、介入化疗、局部放疗、分子靶向治疗、中医中药治疗、手术治疗以及针对病灶的局部治疗,可提高不可切除结肠直肠癌患者的生存质量,延长存活时间。

关键词: 结肠直肠癌;多学科协作;综合治疗

赵国刚, 冯富星, 运涛, 白雪巍. 多学科协作诊治模式下治疗不可切除结肠直肠癌67例. 世界华人消化杂志 2012; 20(20): 1895-1899

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/1895.asp>

0 引言

结肠直肠癌的发病率居全球第2位,在发展中国家已经成为第3大致死癌症^[1]。有很多结肠直肠癌患者在发现时已属晚期,无法行手术切除。随着对不可切除结肠直肠癌认识地深入,其治疗理念经历了姑息手术、非手术治疗(放疗、化疗、靶向治疗等)、综合治疗等数次转变。Mathis等^[2]在对146例原发局部不可切除结肠直肠癌的治疗研究中发现,单纯使用一种方法治疗的效果通常很差(治疗无效的比例占68%),采用综合治疗方式,包括外部放射治疗、化学治疗、外科切除以及联合术中放射治疗等可极大地提高原发局部不可切除结肠直肠癌患者的存活率并延长患者存活时间。目前,对于不可切除结肠直肠癌,已形成了以“个体化治疗方案”为基础,按不同病期进行处理的综合治疗。而多种医学技术的进步又为这一理念注入了新的活力。我们结合2006年以来治疗不可切除结肠直肠癌的经验及对现代理念实践的体会,现就不可切除结肠直肠癌的综合治疗进行总结,愿与同道交流、商榷。

1 材料和方法

1.1 材料 本研究纳入了67例符合条件的患者,其中男38例,女29例,平均年龄为55.62岁,右半结肠癌15例,左半结肠癌9例,直肠癌43例。67例患者均经综合治疗小组评估为不可切除,且组织学证实为结肠直肠癌。治疗前血常规、尿常规、

肝功能和心电图、胸片正常,预计生存期大于3 mo,有可供测量的指标如CT、MRI、B超、结肠镜等。

1.2 方法 不可切除结肠直肠癌的综合治疗包括建立结肠直肠专科队伍与多学科合作的综合治疗模式、全身化疗、介入化疗、局部放疗、分子靶向治疗、中医中药治疗、手术治疗以及针对病灶的局部治疗如射频消融、无水酒精注射等。

1.2.1 建立结肠直肠专科队伍与多学科合作的综合治疗模式: 我院于2006年建立了结肠直肠专科队伍与多学科合作的综合治疗模式,形成了多个结肠直肠肿瘤相关专业医生组成的治疗小组,集中收治结肠直肠肿瘤患者,包括外科医师、内镜医师、影像专业医师、介入医师和中西医结合医师等。如遇病情复杂或治疗发生重大变化时由治疗小组讨论,讨论形成方案由各个专业医生分别实施。

1.2.2 综合治疗方案: 综合治疗开始前采用多学科参与模式,充分评估患者的身体状况和肿瘤分期,事先规划好患者的后续治疗和有严重不良反应时方案的调整。开始治疗时必须考虑有效的个体化治疗、治疗的安全性、有效性以及将来手术治疗的可能性。

(1)全身化疗:化疗方案为CapeOX方案:第1天,奥沙利铂130 mg/m²,卡培他滨850-1 000 mg/m²,每日2次,持续14 d,每3 wk重复。每2周期评估1次,如可行治愈性切除则考虑手术。术后继续CapeOX方案化疗;(2)介入化疗(动脉灌注):所有病例均接受2-6次不等的介入化疗,间隔3-4 wk。将抗癌药物(奥沙利铂75 mg/m², FUDR 650 mg/m², 丝裂霉素8 mg/m²)直接注入肿瘤供血动脉,肿瘤组织内的局部高浓度抗癌药可起到最大限度杀灭癌细胞作用。对有肝转移灶患者视情况加用超液化碘油8-15 mL栓塞;(3)局部放疗:对于无法手术切除的患者,可考虑进行局部放射治疗。但不作常规推荐使用。放疗剂量总量为45-54 Gy,采用常规分割剂量(通常为35 d),同时接受化疗治疗;(4)分子靶向治疗:结肠直肠癌肝转移分子靶向治疗为西妥昔单抗+含5-FU方案,即西妥昔单抗首次剂量400 mg/m²输注,输注时间为120 min,然后每周250 mg/m²,输注时间为60 min,加FOLFIRI或FOLFOX。结肠直肠癌原发灶检测*k-ras*基因野生型的患者建议使用;(5)中医中药治疗:所有病例放化疗期间及治疗间期均联用中医中药治疗。化疗期间针

对化疗药物对消化功能的影响, 行健脾胃治疗; 放化疗后期针对骨髓抑制、血细胞减少等, 予益气养血补血治疗; 治疗间期针对身体虚弱状态予扶正治疗; 对伴腹胀、腹痛患者行活血消瘀止痛治疗; (6) 手术治疗: 对经综合治疗后有手术指征的患者经治疗小组评估、讨论后行外科手术; (7) 射频消融治疗(radiofrequency ablation, RFA): 对一般情况不适宜、或不愿意接受手术的可切除结直肠癌肝转移者可考虑射频消融治疗; 对预期术后残余肝脏体积过小者, 可先切除部分较大的肝转移灶, 对剩余直径小于3 cm的转移病灶进行射频消融; (8) 其他治疗方法: 包括无水酒精肿瘤内注射、冷冻治疗等, 但其疗效并不优于上述各项治疗, 仅作为综合治疗的一部分, 单独使用可能会失去其治疗意义。

1.2.3 评价标准: 近期疗效按RECIST(Response Evaluation Criteria in Solid Tumors)标准进行评价, 分为完全缓解(complete remission, CR)、部分缓解(partial remission, PR)、稳定(ND)、进展(PD), 所有病例放疗后2 wk行疗效评价。

2 结果

2.1 治疗方式 全身化疗43例, 介入化疗(动脉灌注)26例, 局部放疗48例, 分子靶向治疗12例, 中医中药治疗35例, 手术治疗9例, 射频消融治疗16例, 无水酒精肿瘤内注射6例。

2.2 不良反应 发生并发症的患者总数35人, 同时发生2种并发症的患者22例, 同时发生3种并发症的患者9例, 共计75例次。其中, 23例发生轻度消化系反应, 3例有末梢神经炎症状, 白细胞减少15例, 外周神经毒性反应31例, 外科手术并发症: 术后出血2例, 吻合口漏1例。

2.3 随访 对经外科干预的9例患者进行随访。随访0.5-2年, 平均1.4年, 4例复发, 1例复发伴肝转移, 3例出现间断性肠梗阻表现。

2.4 治疗效果 (1)67例患者中, 无CR病例, PR 43例, ND 16例, PD 8例; (2)患者住院天数14-66 d, 平均23.6 d; (3)近期疗效: 症状缓解率为100%; (4)生存期10-38 mo, 平均24 mo; (5)总并发症发生率为52.2%(35/67); (6)外科干预: 9例患者实施了根治性手术13.4%(9/67)。

3 讨论

对不可切除结直肠癌患者实施综合治疗已得到业界公认。综合治疗可明显延长无法手术的结

直肠癌肝转移患者的中位生存期, 明显改善生存质量^[3]。不可切除结直肠癌病程进展复杂、多变; 过去是以结直肠外科、肿瘤内科、介入科和中西医结合科等单一专业为基础的、分散的患者管理模式。由于对不可切除结直肠癌的认识角度不同、治疗条件和手段各异, 彼此间常缺乏有效地沟通合作, 使得不可切除结直肠癌的治疗缺乏完整性和连贯性。2006年以来, 我们建立了结直肠外科专科队伍与多学科合作的治疗模式, 由相关专业的医务人员进行处理, 对于病情复杂的重症病例, 组织有经验的专家会诊、讨论, 形成方案由各专业医生分别实施。有报道指出, 通过多学科合作团队(multidisciplinary team, MDT)开展积极的综合治疗, 有望预防结直肠癌肝转移的发生, 提高肝转移灶手术切除率和术后5年生存率^[4,5]。

Alberts等^[6]应用FOLFOX4方案达到40%的切除率, 其中完全切除率为32%。随着化疗药物和新的靶向药物的逐渐应用, 一些治疗方案可以使肿瘤缓解率高达50%, 不仅使患者的无进展生存期延长, 而且使一部分开始诊断为不可切除的结直肠癌肝转移患者肿瘤降期并获得治愈性切除^[7]。Adam等^[8]应用FOLFOX方案化疗后, 1 104例起初不可切除的结直肠癌肝转移患者中约有12.5%的患者获得治愈性切除, 5年总生存率和无病生存率分别达到了33%和22%。现认为新辅助化疗可以增加切除率, 而且有效的化疗可以预示生存期延长。

将抗癌药物直接注入肿瘤供血动脉, 肿瘤组织内的局部高浓度抗癌药物起到最大限度杀灭癌细胞的作用, 且使用剂量仅为全身药量的1/2-1/5, 有效减轻不良反应, 多次施治患者亦能耐受。曹志宇等^[9]对不能行手术切除的晚期结直肠癌患者采用动脉置泵灌注化疗, 改善了病期, 使不能手术患者变成可能手术患者, 提高了手术切除率。

放射治疗对晚期结直肠癌及局部复发起到良好的姑息效果, 近期止血止痛缓解症状效果确切, 对部分病例可降低分期, 变成可手术病例。

在结直肠癌肝转移的治疗中加入分子靶向药物, 其有效性已得到广泛证实^[10]。现有研究显示, 西妥昔单抗单用或联合应用伊立替康治疗结直肠癌肝转移有良好的临床效果, 其中西妥昔单抗和伊立替康联合应用具有更高的局部缓解率^[11]。目前认为, 化疗联合应用靶向分子药物

■ 相关报道

采用综合治疗, 并应用个体化治疗方案, 国内外很多报道均证实效果良好, 可提高患者的存活率并改善生存质量。

■应用要点

有条件的医疗中心应建立以患者为中心、以多学科专家组为依托的MDT模式,进行多学科、多手段、有机协同研究,以提高治疗水平。

治疗是提高肝转移灶切除率的最有前景的治疗方法^[12]。

中医学是祖国的传统医学,在提高不可切除结直肠癌患者的生存质量、增强机体免疫能力及延长生存期等方面取得了很好的效果。但缺乏随机对照研究,其效果不十分肯定,需要进一步研究。

对经综合治疗后有手术指征的患者经治疗小组评估、讨论后行外科手术治疗。如对于结直肠癌肝转移的患者,手术切除是有效的治疗手段,5年生存率为30%-40%,但仅有6.1%-20.0%的肝转移患者可以获得治愈性切除。部分初步诊断为无法切除的结直肠癌肝转移患者,经过系统的综合治疗后可转为适合行外科手术切除^[13]。

射频消融术使用方便,且能高效破坏肝转移灶的肿瘤细胞,主要适用于结直肠癌肝转移的患者。但其在结直肠癌肝转移治疗中的地位仍有争议,目前仅作为化疗无效后的治疗选择或肝转移灶术后复发的治疗^[14]。消融形成坏死区域的大小决定了可以消融的肿瘤大小,对直径 ≤ 3 cm的肝脏肿瘤,RFA的效果可靠;而对于直径 > 3 cm的病灶是否能行RFA,研究者们尚持谨慎的态度^[15]。Kundsen等^[14]报道,36例不能手术的患者经过前期化疗后再应用RFA,可以提高患者的生存率,5年生存率达34%,中位生存时间达39 mo。

近十几年来,不可切除结直肠癌患者的治疗方法日渐丰富,疗效也日益得到肯定。从单一化疗到联合化疗再到联合靶向药物治疗,患者的生存时间和生活质量都得到明显延长和改善。但综合治疗尚无标准方案执行,有必要进行多学科、多手段、有机协同研究,以提高治疗水平。作为结直肠外科专科医生,不但要对外科干预的相关内容了如指掌,更要整体把握不可切除结直肠癌患者的全面治疗,主导多学科沟通协作,保证治疗的连贯性,提高不可切除结直肠癌患者整体治疗效果。有条件的医疗中心应建立以患者为中心、以多学科专家组为依托的MDT模式^[16]。

4 参考文献

- 1 Winawer SJ. The multidisciplinary management of gastrointestinal cancer. *Colorectal cancer screening. Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2007; 21: 1031-1048

- 2 Mathis KL, Nelson H, Pemberton JH, Haddock MG, Gunderson LL. Unresectable colorectal cancer can be cured with multimodality therapy. *Ann Surg* 2008; 248: 592-598
- 3 Hochster HS, Hart LL, Ramanathan RK, Childs BH, Hainsworth JD, Cohn AL, Wong L, Fehrenbacher L, Abubakr Y, Saif MW, Schwartzberg L, Hedrick E. Safety and efficacy of oxaliplatin and fluoropyrimidine regimens with or without bevacizumab as first-line treatment of metastatic colorectal cancer: results of the TREE Study. *J Clin Oncol* 2008; 26: 3523-3529
- 4 Fahy BN, D'Angelica M, DeMatteo RP, Blumgart LH, Weiser MR, Ostrovnaya I, Gonen M, Jarnagin WR. Synchronous hepatic metastases from colon cancer: changing treatment strategies and results of surgical intervention. *Ann Surg Oncol* 2009; 16: 361-370
- 5 Timmerman RD, Bizekis CS, Pass HI, Fong Y, Dupuy DE, Dawson LA, Lu D. Local surgical, ablative, and radiation treatment of metastases. *CA Cancer J Clin* 2009; 59: 145-170
- 6 Alberts SR, Horvath WL, Sternfeld WC, Goldberg RM, Mahoney MR, Dakhil SR, Levitt R, Rowland K, Nair S, Sargent DJ, Donohue JH. Oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin for patients with unresectable liver-only metastases from colorectal cancer: a North Central Cancer Treatment Group phase II study. *J Clin Oncol* 2005; 23: 9243-9249
- 7 Kemeny N. Presurgical chemotherapy in patients being considered for liver resection. *Oncologist* 2007; 12: 825-839
- 8 Adam R, Delvart V, Pascal G, Valeanu A, Castaing D, Azoulay D, Giacchetti S, Paule B, Kunstlinger F, Ghémard O, Levi F, Bismuth H. Rescue surgery for unresectable colorectal liver metastases downstaged by chemotherapy: a model to predict long-term survival. *Ann Surg* 2004; 240: 644-657; discussion 657-658
- 9 曹志宇, 蒲永东, 何建苗. 晚期结直肠癌置泵动脉灌注化疗的临床研究. *中国肿瘤临床与康复* 2006; 13: 75-77
- 10 Wolpin BM, Mayer RJ. Systemic treatment of colorectal cancer. *Gastroenterology* 2008; 134: 1296-1310
- 11 Tol J, Koopman M, Cats A, Rodenburg CJ, Creemers GJ, Schrama JG, Erdkamp FL, Vos AH, van Groenigen CJ, Sinnige HA, Richel DJ, Voest EE, Dijkstra JR, Vink-Börger ME, Antonini NF, Mol L, van Krieken JH, Dalesio O, Punt CJ. Chemotherapy, bevacizumab, and cetuximab in metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* 2009; 360: 563-572
- 12 Bokemeyer C, Bondarenko I, Makhson A, Hartmann JT, Aparicio J, de Braud F, Donea S, Ludwig H, Schuch G, Stroh C, Loos AH, Zube A, Koralewski P. Fluorouracil, leucovorin, and oxaliplatin with and without cetuximab in the first-line treatment of metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2009; 27: 663-671
- 13 Bentrém DJ, DeMatteo RP, Blumgart LH. Surgical therapy for metastatic disease to the liver. *Annu Rev Med* 2005; 56: 139-156
- 14 Knudsen AR, Kannerup AS, Mortensen FV, Nielsen DT. Radiofrequency ablation of colorectal liver metastases downstaged by chemotherapy. *Acta Radiol* 2009; 50: 716-721

- 15 Abitabile P, Hartl U, Lange J, Maurer CA. Radiofrequency ablation permits an effective treatment for colorectal liver metastasis. *Eur J Surg Oncol* 2007; 33:

- 67-71
16 叶颖江, 王杉. 重视普通外科恶性肿瘤多学科专家治疗模式. *中国实用外科杂志* 2009; 29: 713-716

编辑 张姗姗 电编 闫晋利

■同行评价

本文立意有新意, 符合当前大肠癌的治疗趋势, 对临床有明确的指导意义。

ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) CN 14-1260/R 2012年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

《世界华人消化杂志》出版流程

本刊讯 《世界华人消化杂志》[ISSN 1009-3079 (print), ISSN 2219-2859 (online), CN 14-1260/R]是一份同行评议性和开放获取(open access, OA)的旬刊, 每月8、18、28号按时出版. 具体出版流程介绍如下:

第一步 作者提交稿件: 作者在线提交稿件(<http://www.baishideng.com/wcjd/ch/index.aspx>), 提交稿件中出现问题可以发送E-mail至submission@wjgnet.com咨询, 编务将在1个工作日内回复.

第二步 审稿: 送审编辑对所有来稿进行课题查新, 并进行学术不端检测, 对不能通过预审的稿件直接退稿, 通过预审的稿件送交同行评议专家进行评议. 编辑部主任每周组织定稿会, 评估审稿人意见, 对评审意见较高, 文章达到本刊发表要求的稿件送交总编辑签发拟接受, 对不能达到本刊发表要求的稿件退稿.

第三步 编辑、修改稿件: 科学编辑严格根据编辑规范要求编辑文章, 包括全文格式、题目、摘要、图表科学性和参考文献; 同时给出退修意见送作者修改. 作者修改稿件中遇到问题可以发送E-mail至责任科学编辑, 责任科学编辑在1个工作日内回复. 为保证文章审稿意见公平公正, 本刊对每一篇文章均增加该篇文章的同行评议者和同行评论, 同时配有背景资料、研发前沿、相关报道、创新盘点、应用要点和名词解释, 供非专业人士阅读了解该领域的最新科研成果.

第四步 录用稿件: 作者将稿件修回后, 编辑部主任组织第2次定稿会, 评估作者修回稿件质量. 对修改不合格的稿件通知作者重修或退稿, 对修改合格的稿件送总编辑终审, 合格后发正式录用通知. 稿件正式录用后, 编务通知作者缴纳出版费, 出版费缴纳后编辑部安排生产, 并挂号将缴费发票寄出.

第五步 排版制作: 电子编辑对稿件基本情况进行审核, 核对无误后, 进行稿件排版及校对、图片制作及参考文献核对. 彩色图片保证放大400%依然清晰; 中文参考文献查找全文, 核对作者、题目、期刊名、卷期及页码, 英文参考文献根据本杂志社自主研发的“参考文献检测系统”进行检测, 确保作者、题目、期刊名、卷期及页码准确无误. 排版完成后, 电子编辑进行黑马校对, 消灭错别字及语句错误.

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

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

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

《世界华人消化杂志》从收稿到发行每一步都经过严格审查, 保证每篇文章高质量出版, 是消化病学专业人士发表学术论文首选的学术期刊之一. 为保证作者研究成果及时公布, 《世界华人消化杂志》保证每篇文章四月内完成. (编辑部主任: 李军亮 2010-01-18)

WCX磁珠联合MALDI-TOF-MS技术在结直肠癌诊断中的应用

王秀丽, 高春芳, 范乃军

■背景资料

结直肠癌的诊断及治疗发生了很大改进,但其发病率和死亡率并未发生根本的变化,主要原因在于缺乏高灵敏度、特异度的早期诊断方法。蛋白质组学具有高通量、高灵敏度等技术优势,为肿瘤早期诊断的研究开拓了新的视野。

王秀丽, 高春芳, 范乃军, 中国人民解放军第150中心医院全军肛肠外科研究所 河南省洛阳市 471000

王秀丽, 副主任技师, 主要从事细胞分子生物学以及消化系统肿瘤的早期诊断研究。

作者贡献分布: 王秀丽与范乃军对此文所作贡献均等; 此课题由高春芳设计; 研究过程和数据分析由王秀丽与范乃军完成; 本论文写作由王秀丽与范乃军完成。

通讯作者: 高春芳, 教授, 471000, 河南省洛阳市涧西区华夏西路2号, 中国人民解放军第150中心医院全军肛肠外科研究所。chunfanggao@126.com

电话: 0379-64169372

收稿日期: 2012-04-09 修回日期: 2012-05-11

接受日期: 2012-06-01 在线出版日期: 2012-07-18

Diagnosis of colorectal cancer by MALDI-TOF-MS combined with WCX magnetic beads

Xiu-Li Wang, Chun-Fang Gao, Nai-Jun Fan

Xiu-Li Wang, Chun-Fang Gao, Nai-Jun Fan, Institute of Anal-Colorectal Surgery, the 150th Central Hospital of Chinese PLA, Luoyang 471000, Henan Province, China

Correspondence to: Chun-Fang Gao, Professor, Institute of Anal-Colorectal Surgery, the 150th Central Hospital of Chinese PLA, 2 Huaxia West Road, Jianxi District, Luoyang 471000, Henan Province, China. chunfanggao@126.com

Received: 2012-04-09 Revised: 2012-05-11

Accepted: 2012-06-01 Published online: 2012-07-18

Abstract

AIM: To explore the difference in serum proteomic spectra between patients with colorectal cancer and healthy individuals, and to identify the specific protein biomarkers.

METHODS: Serum samples collected from 67 colorectal cancer patients and 66 healthy individuals were randomized into model construction group and validation group. Magnetic beads-based weak cation exchange (MB-WCX) kit and matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS) were used to profile serum proteome. Flex analysis software was used to analyze protein peaks for significant difference. A diagnostic model was then built using ClinproTools 2.2 software and evaluated blindly for reliability.

RESULTS: Thirty-three differentially expressed proteins in serum were screened between colorectal cancer patients and healthy individuals, including 25 up-regulated proteins and 8 down-regulated ones. Five proteins (759, 3316, 4645, 4248, and 2645 Da) were used for building a ClinProt model which was able to classify colorectal cancer patients and healthy individuals with a sensitivity of 94.12% (32/34) and a specificity of 96.97% (32/33). A double blind validation test showed that the ClinProt model yielded a sensitivity of 93.94 (31/33) and a specificity of 96.97% (32/33).

CONCLUSION: Combination of MALDI-TOF-MS with WCX kit allows to directly screen proteins differentially expressed in the serum of patients with colorectal cancer, and these proteins can be used to diagnose early-stage colorectal cancer.

Key Words: Colorectal cancer; Proteomics; Magnetic beads; Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry

Wang XL, Gao CF, Fan NJ. Diagnosis of colorectal cancer by MALDI-TOF-MS combined with WCX magnetic beads. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2012; 20(20): 1900-1905

摘要

目的: 比较结直肠癌与正常人血清蛋白质谱的变化, 筛选特异性蛋白标志物, 建立结直肠癌诊断分类树模型。

方法: 收集血清样本133例(其中结直肠癌67例, 正常人66例), 随机分为建模组和验证组。运用弱阳离子纳米磁珠(magnetic bead-weak cation exchange, MB-WCX)联合基质辅助激光解吸离子飞行质谱(matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry, MALDI-TOF-MS), 建立结直肠癌与正常人血清蛋白质谱。用Flex Analysis 2.4软件收集数据, 应用ClinproTools 2.2软件对建模组34例结直肠癌和33例正常人血清差异蛋白质谱进行定量分析, 应用Genetic Algorithm

■同行评议者

何敏, 教授, 广西医科大学医学科学实验中心

算法建立结直肠癌诊断模型,应用所获取的诊断模型对验证组样本(33例结直肠癌和33例正常人)进行分类诊断,以评价诊断模型的诊断价值。

结果:通过比较分析结直肠癌与正常人血清蛋白质谱,发现共有33个差异蛋白峰($P<0.05$),其中在结直肠癌中表达上调25个,表达下调8个。利用其中5个差异峰(M_r 分别为759, 3 316, 4 645, 4 248, 2 645 Da)建立诊断模型,获得了94.12%(32/34)敏感性和96.97%(32/33)的特异性,经独立样本双盲验证,其灵敏度为93.94%(31/33),特异度为96.97%(32/33)。

结论:基于磁珠分离和MALDI-TOF-MS技术能直接检测出结直肠癌患者血清差异表达蛋白,建立的诊断模型具有较高的敏感性和特异性,对提高结直肠癌的诊断具有一定的临床意义。

关键词:结直肠癌; 蛋白组学; 纳米磁珠; 基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱技术

王秀丽, 高春芳, 范乃军. WCX磁珠联合MALDI-TOF-MS技术在结直肠癌诊断中的应用. 世界华人消化杂志 2012; 20(20): 1900-1905
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/1900.asp>

0 引言

结直肠癌是常见恶性肿瘤之一,在北美、澳洲、西欧等地区高发^[1]。在我国,随着人们生活水平的提高、饮食结构及生活方式的改变,结直肠癌的发病率亦呈上升趋势,与肺癌、胃癌、肝癌、乳腺癌等各种恶性肿瘤一起,成为中国人口的第2大死因^[2]。早期患者及时手术治疗后5年生存率可到90%以上,但中晚期患者即使行以手术为主的综合治疗,仍有半数以上患者死于局部复发或转移^[3]。目前,结直肠癌诊断技术虽然大有提高,但仍有半数以上患者在首次就诊时已属中晚期,因此同其他恶性肿瘤一样,早期诊断是提高患者生存率和生活质量的关键^[4]。

本研究利用弱阳离子纳米磁珠(magnetic bead-weak cation exchange, MB-WCX)联合基质辅助激光解析离子化飞行时间质谱(matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry, MALDI-TOF-MS)技术对结直肠癌患者与健康志愿者血清蛋白质谱的变化进行分析对比,旨在发现可用于结直肠癌早期临床诊断的新方法,以期提高早期诊断水平,改善预后。

1 材料和方法

1.1 材料 本项目研究得到我院伦理委员会认证,所纳入病例及健康志愿者知情同意后行标本采集和相关检查。本组结直肠癌患者67例,术后经病理诊断为结直肠腺癌,其中TNM I期17例, TNM II期60例,男女比例为2.2:1.0,平均年龄56岁 \pm 4.7岁,术前经B超等影像学检查,除外肝转移。同时,收集健康志愿者血清66例,男女比例、年龄等与结直肠癌组差异无统计学意义,经结肠镜、B超等除外肠道、肝脏占位性病变。以上血清标本均由中国人民解放军150中心医院肛肠外科研究所及其门诊提供。按照完全随机化的方法,将结直肠癌患者与健康志愿者分为建模组与验证组,其中,建模组包括结直肠癌34例与健康志愿者33例,验证组健康志愿者与结直肠癌各33例。

采集志愿者清晨空腹静脉全血5 mL(不加抗凝剂),室温静置30 min后,以2 000 r/min离心15 min,将上层血清取出并分装,冻存于-80℃冰箱。实验时,样品常温解冻,待用。结直肠癌患者于术前当日清晨采集。MALDI-TOF-MS(Autoflex-III)、MB-WCX及其缓冲液体系、 α -氰基-4-羟基肉桂酸(α -cyano-4-hydroxycinnamic acid, HCCA)和混合标肽均购自Bruker公司。乙腈(ACN)、三氟乙酸(TFA)、SPA(Sinapinic acid)、尿素、DTT、CHAPS、Tris-HCl、NaAC等购自美国Sigma公司。

1.2 方法

1.2.1 WCX纯化多肽:(1)4℃冰箱取出磁珠试剂盒,取出弱阳离子磁珠悬浮液一管,手动上下摇动,完全混匀磁珠悬浮液,1 min;(2)取出10 μ L磁珠结合缓冲液(BS)加入200 μ L样品管中,再加入10 μ L磁珠及5 μ L血清,用加样枪上下吸打混匀,避免产生气泡;(3)室温静置5 min,将样品管放入磁珠分离器,使磁珠贴壁1 min,磁珠与悬浮液体分离,用加样枪吸去悬浮液体;(4)加入100 μ L磁珠清洗缓冲液(WS),在磁珠分离器前后相邻两孔间反复移动样品管10次,使样品管在磁珠分离器上静置,磁珠贴壁,用加样枪吸去悬浮液体,枪头应避免接触到磁珠,避免吸走磁珠,重复本步骤2次;(5)从磁珠分离器上取下样品管,并向样品管中加入5 μ L磁珠洗脱缓冲液(ES),混匀贴壁的磁珠,反复吸打10次,将样品管放入磁珠分离器,磁珠贴壁2 min,磁珠与悬浮液体充分分离后,将上清液移入干净的0.5 mL样品管(先在管内加入5 μ L稳定缓冲液(SS),用加样枪小心吸打

■ 研发前沿

应用磁珠分离结合MALDI-TOF-MS检测进行比较蛋白质组学研究,可以发现差异蛋白。通过软件分析,建立诊断模板,对疾病的筛查有重要价值,是疾病蛋白质组学研究的热点,但由于所发现的多肽多是低丰度、小分子量蛋白,其鉴定是一项具有挑战性的工作。

■ 相关报道

磁珠结合MALDI-TOF-MS技术已应用于食管癌、乳腺癌、类风湿等疾病诊断研究,通过软件分析,建立了具有较高诊断价值的诊断模型。

表 1 在结直肠癌与健康志愿者血清中差异表达的蛋白

差异蛋白质 荷比(M/Z)	峰曲线下面积(mean ± SD)		P值	在结直肠癌组 的表达变化
	结直肠癌组	健康志愿者		
759	72.04 ± 18.84	36.92 ± 15.49	<0.001	↑
785	47.78 ± 13.39	24.47 ± 10.21	<0.001	↑
797	21.85 ± 17.92	71.68 ± 23.65	<0.001	↓
810	27.66 ± 8.50	16.60 ± 9.31	<0.001	↑
824	13.64 ± 12.26	46.51 ± 16.94	<0.001	↓
1208	3.38 ± 1.91	2.49 ± 0.96	0.0485	↑
1467	27.51 ± 28.71	11.57 ± 8.64	<0.001	↑
1520	5.70 ± 3.87	2.98 ± 1.38	<0.001	↑
1618	38.31 ± 32.68	18.24 ± 11.60	0.00144	↑
1779	4.36 ± 2.14	2.70 ± 1.33	<0.001	↑
1866	12.07 ± 6.66	6.56 ± 4.72	<0.001	↑
2645	0.13 ± 0.24	0.08 ± 0.12	<0.001	↑
2661	42.47 ± 16.21	36.58 ± 20.65	0.0485	↑
2699	1.28 ± 1.33	3.47 ± 2.04	<0.001	↓
2724	2.08 ± 0.83	1.55 ± 0.98	0.00688	↑
3192	4.76 ± 2.18	3.50 ± 1.87	0.0168	↑
3241	15.70 ± 7.99	11.95 ± 10.44	0.0185	↑
3278	0.86 ± 0.41	1.42 ± 0.70	<0.001	↓
3316	0.59 ± 0.28	1.33 ± 0.76	<0.001	↓
3383	6.85 ± 2.56	2.48 ± 1.82	<0.001	↑
3936	2.59 ± 1.09	1.84 ± 1.00	0.00231	↑
3952	8.05 ± 4.83	5.34 ± 3.83	0.00687	↑
4055	7.16 ± 3.66	5.51 ± 4.68	0.0115	↑
4071	4.11 ± 1.53	2.77 ± 1.26	<0.001	↑
4092	26.00 ± 15.57	17.99 ± 8.85	0.0296	↑
4248	1.60 ± 0.70	3.81 ± 1.87	<0.001	↓
4645	13.76 ± 5.56	6.85 ± 4.78	<0.001	↑
5338	10.96 ± 5.72	7.74 ± 4.78	0.0184	↑
4964	7.46 ± 5.78	4.45 ± 5.00	0.00845	↑
5944	0.56 ± 0.53	1.51 ± 1.05	<0.001	↓
6635	0.26 ± 0.40	1.29 ± 1.88	<0.001	↓
7774	13.45 ± 6.46	2.98 ± 3.81	<0.001	↑
9298	16.81 ± 7.33	7.51 ± 6.65	<0.001	↑

混匀); (6)先点1 μL洗脱样品,室温放干后,再点1 μL基质(3 g/L CHCA, 50% ACN, 2% TFA),室温放干,准备质谱分析。

1.2.2 质谱检测与数据采集: 采用Autoflex-III MALDI-TOF-MS仪器,应用线性模式,采集范围为相对分子量范围600-18 000. 应用Flex Analysis 2.4软件收集数据, ClinproTools 2.2软件进行分析,包括质谱图的平滑、衰减及标峰处理,并输出含有质荷比值和峰强度的Excel格式数据,软件自动对数据进行统计学处理,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义. ClinproTools 2.2分析建模组样本质谱图,采用Genetic Algorithm算法建立诊断模板,计算灵敏度与特异度. 用诊断模板对验证组样本进行分组,以评价诊断模板的诊断价值。

2 结果

2.1 差异蛋白质定量分析 建立建模组样本(结直肠癌34例, 正常人33例)血清蛋白质谱,在分子量600-18 000范围内共检测到70个蛋白峰,代表性蛋白质谱见图1. 比较分析结直肠癌与健康志愿者之间差异蛋白质谱,共发现33个蛋白峰有显著性差异($P<0.05$). 其中在结直肠癌中表达上调峰25个,表达下调峰8个(表1). 从图2可见,以m/z 759, 3 316, 4 645, 4 248和2 645 5个差异蛋白峰为例,这5个质谱峰分别呈明显上调和下调趋势。

2.2 诊断模板的建立 利用ClinproTools 2.2中Genetic Algorithm算法建立了由上述5个差异表达蛋白(Mr分别为759, 3 316, 4 645, 4 248, 2 645

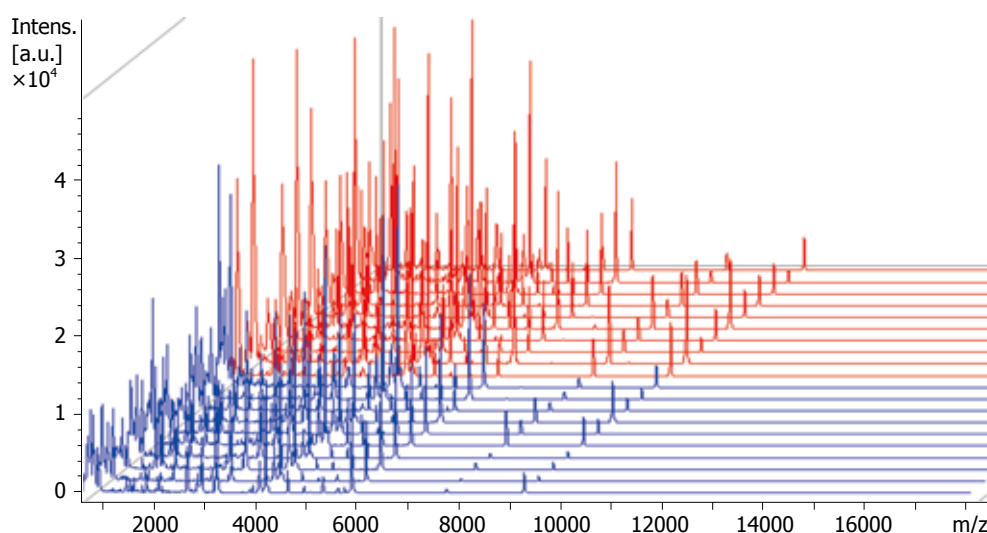


图1 结直肠癌与健康志愿者代表性蛋白质谱. 其中红色代表结直肠癌, 蓝色代表健康志愿者.

■创新盘点

利用磁珠结合MALDI-TOF-MS技术进行结直肠癌的比较蛋白质组学研究, 发现了多个有意义的蛋白, 通过软件分析建立了诊断模板, 通过双盲验证, 评价了诊断模型的临床应用价值.

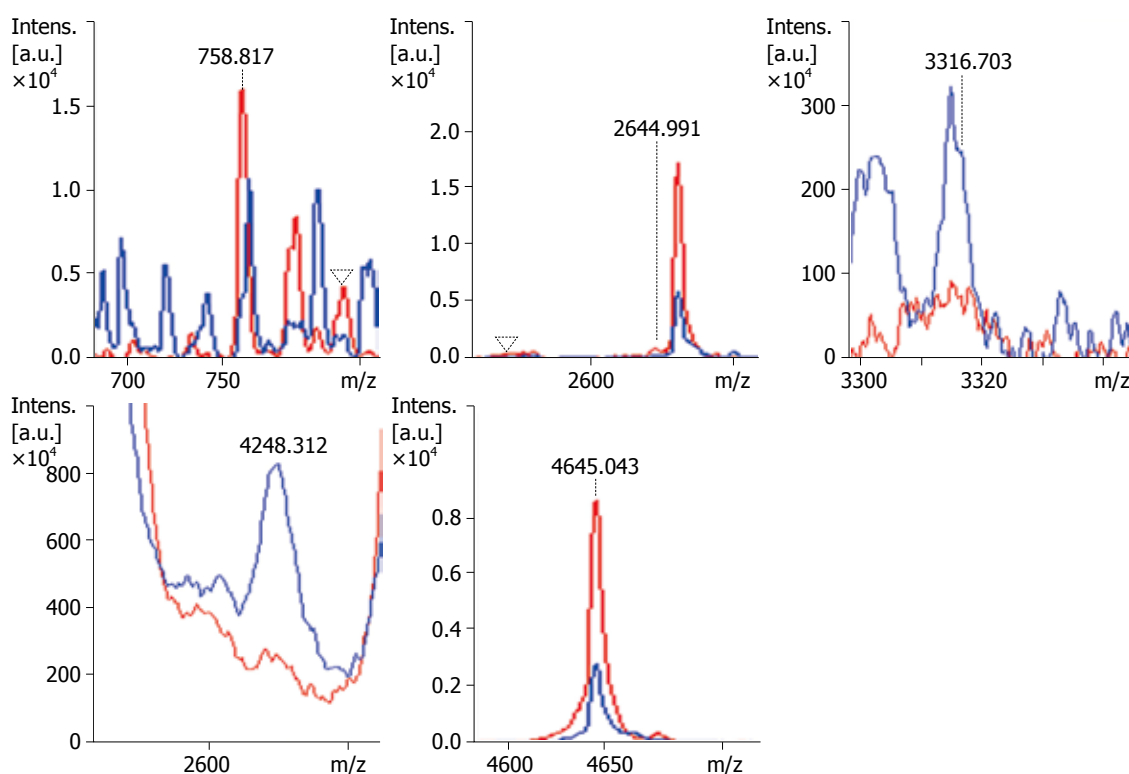


图2 质荷比为758、2645、3316、4248及4645 5个蛋白在结直肠癌中表达变化. 红色代表结直肠癌, 蓝色代表健康志愿者.

Dr)组成的诊断模型, 获得了94.12%(32/34)敏感性和96.97%(32/33)的特异性.

2.3 诊断模板的评价 为进一步评价本研究中所建立诊断模板的诊断价值, 我们将利用诊断模板对验证组样本进行双盲验证, 结果显示其灵敏度为93.94%(31/33), 特异度为96.97%(32/33), 约登指数为0.91.

3 讨论

结直肠癌为常见的恶性肿瘤之一, 据统计我国

结直肠癌发病率有升高趋势, 严重威胁着人们的身心健康. 患者如获得早期诊断和治疗, 5年生存率将达到90%^[5]. 遗憾的是, 大部分患者在确诊时已处于进展期或已有转移, 错过了极佳的治疗窗口期. 其原因是在无特异性高的早期诊断方法, 因此从血清中寻求特异生物标志物用于结直肠癌的诊断是临床急需解决的难题. 结直肠癌早期诊断方法如直肠指诊、粪潜血试验、肠黏膜脱落细胞学检查及影像学检查等均不同程度地存在敏感性与特异性不高的问题,

■应用要点

磁珠结合MALDI-TOF-MS技术可用于结直肠癌的初步筛查,为血清标志物的发现提供了目标蛋白。

而合适的肿瘤标志物将有利于癌症的检出。目前临床应用最为广泛的结直肠癌相关性肿瘤标志物癌胚抗原(carcinoembryonic antigen, CEA),敏感性为60.27%,特异性仅为23.2%,其敏感性与特异性较低,临床应用价值有限,目前血清CEA只是对结直肠癌的复发及转移有重要意义^[6]。

蛋白质组最早由澳大利亚Williams和Wilkins于1994年提出,指的是“一个细胞或组织所表达的全部蛋白质”。蛋白质组学是以蛋白质组为研究对象,从整体水平分析细胞内动态变化的蛋白质组成成分、表达水平与修饰状态,以及蛋白质之间的相互作用与联系,揭示蛋白质功能,从蛋白质水平进一步认识生命活动的机理和疾病发生机制^[7-10]。由于SELDI-TOF-MS技术本身具有较强的操作依赖性,实验结果可因样品来源和处理条件的不一致或操作过程的非标准化,造成实验结果批次之间或同类样本在不同检测单位之间的平行性与可重复性较差,使实验结果的可信度遭到质疑^[11]。MALDI-TOF-MS是目前蛋白质组学研究的核心技术,具有高灵敏度、高通量、重复性好等优点,纳米磁珠可以根据蛋白质组分的理化性质不同对蛋白质进行分离提纯,具有较好的重复性,两者结合为疾病蛋白组研究提供了有力的工具,目前已用于食管癌、肾移植、风湿类疾病、酒精中毒及乳腺癌等标志物的研究^[12-17]。

本研究采用纳米磁珠联合MALDI-TOF-MS技术对34例结直肠癌患者和33例健康志愿者进行了血清蛋白质谱对比分析研究,结果发现有70个蛋白质峰具有判断性差别,其中32个蛋白质峰具有显著性差异($P<0.05$)。将两组血清蛋白质谱建立数据库,利用ClinproTools统计软件对数据库进行分析,确立了以m/z为759, 3 316, 4 645, 4 248和2 645等5个蛋白质所组成的模板,能正确地将结直肠癌患者与正常人分组,正确分组率达97%。为进一步评价诊断模板的诊断价值,我们将收集的另外一组样本作为验证组,由建立的诊断模板对验证组样本在双盲的条件下进行分类,结果显示,该模板可以将33例结直肠癌中的31例正确分组,33例正常人中的32例进行正确分组,其灵敏度和特异度分别为93.94%(31/33)和96.97%(32/33),约登指数为0.91,具有较高的诊断价值。

总之,我们采用WCX磁珠结合MALDI质谱对结直肠癌血清蛋白质谱进行了研究,发现了一组差异蛋白质,并建立了具有较高灵敏度和

特异度的诊断模板。所发现的差异蛋白为结直肠癌发生、发展研究提供了新的线索,所建立的诊断模板为结直肠癌的诊断提供了新的有效方法,对提高诊断水平具有重要意义。

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
- 2 陈万青, 张思维, 郑荣寿, 雷正龙, 李光琳, 邹小农, 赵平. 中国肿瘤登记地区2007年肿瘤发病和死亡分析. *中国肿瘤* 2011; 20: 162-169
- 3 Kanemitsu Y, Kato T, Hirai T, Yasui K, Morimoto T, Shimizu Y, Kadera Y, Yamamura Y. Survival after curative resection for mucinous adenocarcinoma of the colorectum. *Dis Colon Rectum* 2003; 46: 160-167
- 4 Smith RA, Cokkinides V, Brooks D, Saslow D, Shah M, Brawley OW. Cancer screening in the United States, 2011: A review of current American Cancer Society guidelines and issues in cancer screening. *CA Cancer J Clin* 2011; 61: 8-30
- 5 Engwegen JY, Helgason HH, Cats A, Harris N, Bonfrer JM, Schellens JH, Beijnen JH. Identification of serum proteins discriminating colorectal cancer patients and healthy controls using surface-enhanced laser desorption/ionisation-time-of-flight mass spectrometry. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 1536-1544
- 6 Duffy MJ, van Dalen A, Haglund C, Hansson L, Holinski-Feder E, Klapdor R, Lamerz R, Peltomaki P, Sturgeon C, Topolcan O. Tumour markers in colorectal cancer: European Group on Tumour Markers (EGTM) guidelines for clinical use. *Eur J Cancer* 2007; 43: 1348-1360
- 7 Shin S, Cazares L, Schneider H, Mitchell S, Laronga C, Semmes OJ, Perry RR, Drake RR. Serum biomarkers to differentiate benign and malignant mammographic lesions. *J Am Coll Surg* 2007; 204: 1065-1071; discussion 1071-1073
- 8 Issaq HJ, Xiao Z, Veenstra TD. Serum and plasma proteomics. *Chem Rev* 2007; 107: 3601-3620
- 9 Cho WC. Contribution of oncoproteomics to cancer biomarker discovery. *Mol Cancer* 2007; 6: 25
- 10 Ikonomou G, Samiotaki M, Panayotou G. Proteomic methodologies and their application in colorectal cancer research. *Crit Rev Clin Lab Sci* 2009; 46: 319-342
- 11 Poon TC. Opportunities and limitations of SELDI-TOF-MS in biomedical research: practical advices. *Expert Rev Proteomics* 2007; 4: 51-65
- 12 Sui W, Huang L, Dai Y, Chen J, Yan Q, Huang H. Proteomic profiling of renal allograft rejection in serum using magnetic bead-based sample fractionation and MALDI-TOF MS. *Clin Exp Med* 2010; 10: 259-268
- 13 Liu LH, Shan BE, Tian ZQ, Sang MX, Ai J, Zhang ZF, Meng J, Zhu H, Wang SJ. Potential biomarkers for esophageal carcinoma detected by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clin Chem Lab Med* 2010; 48: 855-861
- 14 Du J, Yang S, Lin X, Bu L, Nan Y, Huo S, Shang W. Use of anchochip-time-of-flight spectrometry technology to screen tumor biomarker proteins in serum for small cell lung cancer. *Diagn Pathol* 2010; 5: 60
- 15 Dai Y, Hu C, Wang L, Huang Y, Zhang L, Xiao X, Tan Y. Serum peptidome patterns of human sys-

■名词解释

MALDI-TOF-MS: 激光解析离子化飞行时间质谱与蛋白质分离纯化技术(磁珠)相结合,经配套软件对结果定量分析,发现疾病差异蛋白,建立诊断模板,并可利用此模板对疾病进行筛查诊断,具有高通量、高灵敏度等技术优势。

- temic lupus erythematosus based on magnetic bead separation and MALDI-TOF mass spectrometry analysis. *Scand J Rheumatol* 2010; 39: 240-246
- 16 Sogawa K, Satoh M, Koderia Y, Tomonaga T, Iyo M, Nomura F. A search for novel markers of alcohol abuse using magnetic beads and MALDI-TOF/TOF mass spectrometry. *Proteomics Clin Appl* 2009; 3: 821-828
- 17 Fan NJ, Gao CF, Zhao G, Wang XL, Liu QY. Serum peptidome patterns of breast cancer based on magnetic bead separation and mass spectrometry analysis. *Diagn Pathol* 2012; 7: 45

编辑 张姗姗 电编 闫晋利

■同行评价

本研究利用磁珠结合MALDI-TOF-MS技术发现了一些有意义的蛋白, 对临床上结直肠癌的诊断和治疗提供了一定的参考价值。

ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) CN 14-1260/R 2012年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

《世界华人消化杂志》正文要求

本刊讯 本刊正文标题层次为 0引言; 1 材料和方法, 1.1 材料, 1.2 方法; 2 结果; 3 讨论; 4 参考文献. 序号一律左顶格写, 后空1格写标题; 2级标题后空1格接正文. 以下逐条陈述: (1)引言 应包括该研究的目的和该研究与其他相关研究的关系. (2)材料和方法 应尽量简短, 但应让其他有经验的研究者能够重复该实验. 对新的方法应该详细描述, 以前发表过的方法引用参考文献即可, 有关文献中或试剂手册中的方法的改进仅描述改进之处即可. (3)结果 实验结果应合理采用图表和文字表示, 在结果中应避免讨论. (4)讨论 要简明, 应集中对所得的结果做出解释而不是重复叙述, 也不应是大量文献的回顾. 图表的数量要精选. 表应有表序和表题, 并有足够具有自明性的信息, 使读者不查阅正文即可理解该表的内容. 表内每一栏均应有表头, 表内非公知通用缩写应在表注中说明, 表格一律使用三线表(不用竖线), 在正文中该出现的地方应注出. 图应有图序、图题和图注, 以使其容易被读者理解, 所有的图应在正文中该出现的地方注出. 同一个主题内容的彩色图、黑白图、线条图, 统一用一个注解分别叙述. 如: 图1 萎缩性胃炎治疗前后病理变化. A: …; B: …; C: …; D: …; E: …; F: …; G: … 曲线图可按●、○、■、□、▲、△顺序使用标准的符号. 统计学显著性用: ^a $P<0.05$, ^b $P<0.01$ ($P>0.05$ 不注). 如同一表中另有一套 P 值, 则^a $P<0.05$, ^d $P<0.01$; 第3套为^e $P<0.05$, ^f $P<0.01$. P 值后注明何种检验及其具体数字, 如 $P<0.01$, $t=4.56$ vs 对照组等, 注在表的左下方. 表内采用阿拉伯数字, 共同的计量单位符号应注在表的右上方, 表内个数、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)致谢 后加冒号, 排在讨论后及参考文献前, 左齐.

《世界华人消化杂志》投稿须知

《世界华人消化杂志》为保证期刊的学术质量, 对所有来稿均进行同行评议, 是一份被中国科技论文统计源核心期刊、中文核心期刊要目总览收录的学术类期刊。

1 投稿总则

1.1 性质 《世界华人消化杂志》[ISSN 1009-3079 (print), ISSN 2219-2859 (online), CN 14-1260/R]是一份同行评议性和开放获取(open access, OA)的旬刊。OA最大的优点是面向全国本领域专家及公众开放无需注册, 免费获取PDF等格式的全文, 切实破除了传统性期刊阻碍科学研究成果快速传播的障碍。OA是一项真正意义上的公益性科学传播工具, 编委、作者和读者利益的最大化的目标, 努力推进本学科的繁荣和发展。

《世界华人消化杂志》定价68.00元, 全年2448.00元, 邮发代号82-262, 由世界华人消化杂志编辑部出版。《世界华人消化杂志》主要报道胃肠病学、肝胆病学、胰腺病学、内镜介入与消化外科等多学科的评论及基础研究和临床实践等各类文章, 具体内容涉及: 食管疾病, 如反流性食管炎、Barret's食管、食管静脉曲张和食管癌等; 胃部疾病, 胃食管反流性疾病、胃炎、胃动力障碍、胃出血、胃癌和幽门螺杆菌感染等; 肠道疾病, 如肠道出血、肠穿孔、肠梗阻、肠道炎症(如IBD/CD等)、肠道感染、大肠癌和大肠腺瘤等; 肝胆部疾病如病毒性肝炎、肝硬化、脂肪肝、肝纤维化、肝衰竭、胆石病、胆汁郁积、梗阻性黄疸、肝癌、胆囊癌、胆管癌和门静脉高压等; 胰腺疾病, 如胰腺炎和胰腺癌等; 全身性疾病涉及消化系统, 如自身免疫性及瘀胆性疾病、腹腔疾病、消化不良和代谢性疾病等; 以及与以上疾病相关的基因及基因组学、微生物及分子生物学、病因学、流行病学、免疫学、临床内外科诊断与治疗(如影像、化疗、移植、营养等); 除以上外, 本刊也报道诊断与筛选、内窥镜检查法、影像及先进技术。

《世界华人消化杂志》被国际检索系统美国《化学文摘》(Chemical Abstracts, CA)、荷兰《医学文摘库/医学文摘(EMBase/Excerpta Medica, EM)》和俄罗斯《文摘杂志(Abstract Journal, AJ)》收录。国内为中国科技论文统计与分析期刊(科技部列选为中国科技论文统计源期刊)、《中文核心期刊要目总览》(2011年版)内科学类的核心期刊、《中国学术期刊评价研究报告-RCCS权威、核心期刊排行榜与指南》

和中国知识资源总库收录。《中国科技期刊引证报告(核心版)》统计显示, 2010年《世界华人消化杂志》总被引频次3 458次, 影响因子0.694, 综合评价总分60.6分, 分别位居内科学类49种期刊的第5位、第7位、第6位, 分别位居1 998种中国科技论文统计源期刊(中国科技核心期刊)的第79位、第320位、第190位; 其他指标: 他引率0.83, 被引半衰期4.9, 来源文献量712, 文献选出率0.90, 参考文献量17 963, 平均引文数25.23, 平均作者数4.35, 地区分布数29, 机构分布数349, 基金论文比0.45, 海外论文比0.01。

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

2 撰稿要求

2.1 总体标准 文稿撰写应遵照国家标准GB7713科学技术报告、学位论文和学术论文的编写格式, GB6447文摘编写规则, GB7714文后参考文献著录规则, GB/T 3179科学技术期刊编排格式等要求; 同时遵照国际医学期刊编辑委员会(International Committee of Medical Journal Editors)制定的《生物医学期刊投稿的统一要求(第5版)》(Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals)。见: *Ann Intern Med* 1997; 126: 36-47。

2.2 名词术语 应标准化, 前后统一, 如原词过长且多次出现者, 可于首次出现时写出全称加括号内注简称, 以后直接用简称。医学名词以全国自然科学名词审定委员会公布的《生理学术名词》、《生物化学名词与生物物理学名词》、《化学名词》、《植物学名词》、《人体解剖学名词》、《细胞生物学名词》及《医学名词》系列为准, 药名以《中华人民共和国药典》和卫生部药典委员会编的《药名词汇》为准, 国家食品药品监督管理局批准的新药, 采用批准的药名; 创新性新药, 请参照我国药典委员会的“命名原则”, 新译名词应附外文。公认习用缩略语可直接应用(建议第一次也写出全称), 如ALT, AST, mAb, WBC, RBC, Hb, T, P, R, BP,

PU, GU, DU, ACTH, DNA, LD50, HBsAg, HCV RNA, AFP, CEA, ECG, IgG, IgA, IgM, TCM, RIA, ELISA, PCR, CT, MRI等. 为减少排印错误, 外文、阿拉伯数字、标点符号必须正确打印在A4纸上. 中医药名词英译要遵循以下原则: (1)有对等词者, 直接采用原有英语词, 如中风stroke, 发热fever; (2)有对应词者应根据上下文合理选用原英语词, 如八法eight principal methods; (3)英语中没有对等词或相应词者, 宜用汉语拼音, 如阴yin, 阳yang, 阴阳学说yinyangology, 人中renzhong, 气功qigong; 汉语拼音要以词为单位分写, 如weixibao nizhuanwan(胃细胞逆转丸), guizhitang(桂枝汤). 通常应小写.

2.3 外文字符 注意大小写正斜体与上下角标. 静脉注射iv, 肌肉注射im, 腹腔注射ip, 皮下注射sc, 脑室注射icv, 动脉注射ia, 口服po, 灌胃ig. s(秒)不能写成S, kg不能写成Kg, mL不能写成ML, lcpm(应写为1/min)÷E%(仪器效率)÷60 = Bq, pH不能写PH或P^H, *H. pylori*不能写成HP, $T_{1/2}$ 不能写成tl/2或 $T_{1/2}^1$, 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-methylacetanilide(N-甲基乙酰苯胺), o-cresol(邻甲酚), 3-O-methyl-adrenaline(3-O-甲基肾上腺素), d-amphetamine(右旋苯丙胺), l-dopa(左旋多巴), p-aminosalicylic acid(对氨基水杨酸). 拉丁字及缩写in vitro, in vivo, in situ; Ibid, et al, po, vs; 用外文字母代表的物理量, 如m(质量), V(体积), F(力), p(压力), W(功), v(速度), Q(热量), E(电场强度), S(面积), t(时间), z(酶活性, kat), t(摄氏温度, °C), D(吸收剂量, Gy), A(放射性活度, Bq), ρ (密度, 体积质量, g/L), c(浓度, mol/L), ϕ (体积分数, mL/L), w(质量分数, mg/g), b(质量摩尔浓度, mol/g), l(长度), b(宽度), h(高度), d(厚度), R(半径), D(直径), T_{max} , C_{max} , Vd, $T_{1/2}$ CI等. 基因符号通常用小写斜体, 如ras, c-myc; 基因产物用大写正体, 如P16蛋白.

2.4 计量单位 采用国际单位制并遵照有关国家

标准, GB3100-3102-93量和单位. 原来的“分子量”应改为物质的相对分子质量. 如30 kD改为 M_r 30 000或30 kDa(M大写斜体, r小写正体, 下角标); “原子量”应改为相对原子质量, 即 A_r (A大写斜体, r小写正体, 下角标); 也可采用原子质量, 其单位是u(小写正体). 计量单位在+、-及后列出. 在±前后均要列出, 如37.6 °C ± 1.2 °C, 45.6岁 ± 24岁, 56.4 d ± 0.5 d. 3.56 ± 0.27 pg/ml应为3.56 ng/L ± 0.27 ng/L. BP用kPa(mmHg), RBC数用 $1 \times 10^{12}/L$, WBC数用 $1 \times 10^9/L$, WBC构成比用0.00表示, Hb用g/L. M_r 明确的体内物质以nmol/L或mmol/L表示, 不明确者用g/L表示. 1 M硫酸, 改为1 mol/L硫酸, 1 N硫酸, 改为0.5 mol/L硫酸. 长10 cm, 宽6 cm, 高4 cm, 应写成10 cm × 6 cm × 4 cm. 生化指标一律采用法定计量单位表示, 例如, 血液中的总蛋白、清蛋白、球蛋白、脂蛋白、血红蛋白、总脂用g/L, 免疫球蛋白用mg/L; 葡萄糖、钾、尿素、尿素氮、CO₂结合力、乳酸、磷酸、胆固醇、胆固醇酯、三酰甘油、钠、钙、镁、非蛋白氮、氯化物; 胆红素、蛋白结合碘、肌酸、肌酐、铁、铅、抗坏血酸、尿胆元、氨、维生素A、维生素E、维生素B1、维生素B2、维生素B6、尿酸; 氢化可的松(皮质醇)、肾上腺素、汞、孕酮、甲状腺素、睾酮、叶酸用nmol/L; 胰岛素、雌二醇、促肾上腺皮质激素、维生素B12用pmol/L. 年龄的单位有日龄、周龄、月龄和岁. 例如, 1秒, 1 s; 2分钟, 2 min; 3小时, 3 h; 4天, 4 d; 5周, 5 wk; 6月, 6 mo; 雌性♀, 雄性♂, 酶活性国际单位IU = 16.67 nkat, 对数log, 紫外uv, 百分比%, 升L, 尽量把 1×10^{-3} g与 5×10^{-7} g之类改成1 mg与0.5 mg, hr改成h, 重量γ改成mg, 长度m改成mm. 国际代号不用于无数值的文句中, 例如每天不写每d, 但每天8 mg可写8 mg/d. 在一个组合单位符号内不得有1条以上的斜线, 例如不能写成mg/kg/d, 而应写成mg/(kg·d), 且在整篇文章内应统一. 单位符号没有单、复数的区分, 例如, 2 min不是2 mins, 3 h不是3 hs, 4 d不是4 ds, 8 mg不是8 mgs. 半个月, 15 d; 15克, 15 g; 10%福尔马林, 40 g/L甲醛; 95%酒精, 950 mL/L乙醇; 5% CO₂, 50 mL/L CO₂; 1 : 1 000肾上腺素, 1 g/L肾上腺素; 胃黏膜含促胃液素36.8 pg/mg, 改为胃黏膜蛋白含促胃液素36.8 ng/g; 10%葡萄糖改为560 mmol/L或100 g/L葡萄糖; 45 ppm = 45×10^{-6} ; 离心的旋转频率(原称转速)用r/min, 超速者用g; 药物剂量若按体质量计算, 一律以“/kg”表示.

2.5 统计学符号 (1)t检验用小写t; (2)F检验用英

《世界华人消化杂志》为中国科技论文统计源核心期刊(2010年)和中文核心期刊要目总览(北京大学图书馆, 2011年版)收录的学术期刊.

《世界华人消化杂志》编辑部, 100025, 北京市朝阳区, 东四环中路62号, 远洋国际中心D座903室, 电话: 010-5908-0035, 传真: 010-8538-1893, Email: wjcd@wjgnet.com; http://www.wjgnet.com

文大写字 F ; (3)卡方检验用希文小写 χ^2 ; (4)样本的相关系数用英文小写 r ; (5)自由度用希文小写 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^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ ($P > 0.05$ 不注). 如同一表中另有一套 P 值, 则^c $P < 0.05$, ^d $P < 0.01$; 第三套为^e $P < 0.05$, ^f $P < 0.01$ 等.

2.6 数字用法 遵照国家标准GB/T 15835-1995出版物上数字用法的规定, 作为汉语词素者采用汉字数字, 如二氧化碳、十二指肠、三倍体、四联球菌、五四运动、星期六等. 统计学数字采用阿拉伯数字, 如1000-1500 kg, 3.5 mmol/L \pm 0.5 mmol/L等. 测量的数据不能超过其测量仪器的精密度, 例如6347意指6000分之一的精密度. 任何一个数字, 只允许最后一位有误差, 前面的位数不应有误差. 在一组数字中的 $\text{mean} \pm \text{SD}$ 应考虑到个体的变差, 一般以SD的1/3来定位数, 例如3614.5 g \pm 420.8 g, SD的1/3达一百多g, 平均数波动在百位数, 故应写成3.6 kg \pm 0.4 kg, 过多的位数并无意义. 又如8.4 cm \pm 0.27 cm, 其SD/3 = 0.09 cm, 达小数点后第2位, 故平均数也应补到小数点后第2位. 有效位数以后的数字是无效的, 应该舍. 末尾数字, 小于5则舍, 大于5则进, 如恰等于5, 则前一位数逢奇则进, 逢偶(包括“0”)且5之后全为0则舍. 末尾时只可1次完成, 不得多次完成. 例如23.48, 若不要小数点, 则应成23, 而不应该23.48 \rightarrow 23.5 \rightarrow 24. 年月日采用全数字表达法, 请按国家标准GB/T 7408-94书写. 如1985年4月12日, 可写作1985-04-12; 1985年4月, 写作1985-04; 从1985年4月12日23时20分50秒起至1985年6月25日10时30分止, 写作1985-04-12 T23:20:50/1985-06-25 T10:30:00; 从1985年4月12日起至1985年6月15日止, 写作1985-04-12/06-16, 上午8时写作08:00, 下午4时半写作16:30. 百分数的有效位数根据分母来定: 分母 ≤ 100 , 百分数到个位; $101 \leq \text{分母} \leq 1000$, 百分数到小数点后1位; 余类推. 小数点前后的阿拉伯数字, 每3位间空1/4阿拉伯数字距离, 如1486800.475 65. 完整的阿拉伯数字不移行!

2.7 标点符号 遵照国家标准GB/T 15834-1995标点符号用法的要求, 本刊论文中的句号都采用黑圆点; 数字间的起止号采用“-”字线, 并列的汉语词间用顿号分开, 而并列的外文词、阿拉伯数字、外文缩略词及汉语拼音字母拼写词间改用逗号分开, 参考文献中作者间一律用逗号分开; 表示终了的标点符号, 如句号、逗号、顿

号、分号、括号及书名号的后一半, 通常不用于一行之首; 而表示开头的标点符号, 如括号及书名号的前一半, 不宜用于一行之末. 标点符号通常占一格, 如顿号、逗号、分号、句号等; 破折号应占两格; 英文连字符只占一个英文字符的宽度, 不宜过长, 如5-FU. 外文字符下划一横线表示用斜体, 两横线表示用小写, 三横线表示用大写, 波纹线表示用黑体.

3 稿件格式

3.1 题名 简明确切地反映论文的特定内容, 鲜明而有特色, 阿拉伯数字不宜开头, 不用副题名, 一般20个字. 避免用“的研究”或“的观察”等非特定词.

3.2 作者 论文作者的署名, 按照国际医学杂志编辑委员会(ICMJE, International Committee of Medical Journal Editors)作者资格标准执行. 作者标准为: (1)对研究的理念和设计、数据的获得、分析和解读做出重大贡献; (2)起草文章, 并对文章的重要的知识内容进行批评性修改; (3)接受对准备发表文章的最后一稿. 作者应符合条件1, 2, 3, 对研究工作有贡献的其他人可放入志谢中. 作者署名的次序按贡献大小排列, 多作者时姓名间用逗号, 如是单名, 则在姓与名之间空1格(正文和参考文献中不空格). 《世界华人消化杂志》要求所有署名人写清楚自己对文章的贡献. 世界华人消化杂志不设置共同第一作者和共同通信作者.

3.3 单位 作者后写单位的全称空1格后再写省市及邮政编码. 格式如: 张旭晨, 梅立新, 承德医学院病理教研室 河北省承德市 067000

3.4 第一作者简介 格式如: 张旭晨, 1994年北京中医药大学硕士, 讲师. 主要从事消化系统疾病的病理研究.

3.5 作者贡献分布 格式如: 陈湘川与庞丽娟对此文所作贡献两均等; 此课题由陈湘川、庞丽娟、陈玲、杨兰、张金芳、齐妍及李洪安设计; 研究过程由陈玲、杨兰、张金芳、蒋金芳、杨磊、李锋及曹秀峰操作完成; 研究所用新试剂及分析工具由曹秀峰提供; 数据分析由陈湘川、杨兰及庞丽娟完成; 本论文写作由陈湘川、庞丽娟及李洪安完成.

3.6 同行评议者 为了确保刊出文章的质量, 本刊即将开始实行接受稿件的同行评议公开策略, 将同行评议者姓名, 职称, 机构的名称与文章一同在脚注出版. 格式如: 房静远, 教授, 上海交通大学医学院附属医院仁济医院, 上海市消化疾

病研究所。

3.7 基金资助项目 格式如: 国家自然科学基金资助项目, No. 30224801

3.8 通讯作者 格式如: 通讯作者: 黄缘, 教授, 330006, 江西省南昌市民德路1号, 南昌大学第二附属医院消化内科, 江西省分子医学重点实验室. huang9815@yahoo.com

电话: 0351-4078656 传真: 0351-4086337

收稿日期: 修回日期:

3.9 英文摘要

题名 文章的题名应言简意赅, 方便检索, 英文题名以不超过10个实词为宜, 应与中文题名一致。

作者 作者姓名汉语拼音拼写法规定为: 先名, 后姓; 首字母大写, 双名之间用半字线“-”分开, 多作者时姓名间加逗号。格式如: “潘伯荣”的汉语拼写法为“Bo-Rong Pan”。

单位 先写作者, 后写单位的全称及省市邮政编码。例如: Xu-Chen Zhang, Li-Xin Mei, Department of Pathology, Chengde Medical College, Chengde 067000, Hebei Province, China

基金资助项目 格式如: Supported by National Natural Science Foundation of China, No.30224801

通讯作者 格式如: Correspondence to: Dr. Lian-Sheng Ma, Taiyuan Research and Treatment Center for Digestive Diseases, 77 Shuangta Xijie, Taiyuan 030001, Shanxi Province, China. wcjd@wjgnet.com

收稿及修回日期 格式如: Received: Revised:

摘要 包括目的、方法、结果、结论, 书写要求与中文摘要一致。

3.10 中文摘要 必须在300字左右, 内容应包括目的(应阐明研究的背景和设想、目的), 方法(必须包括材料或对象、应描述课题的基本设计, 双盲、单盲还是开放性, 使用什么方法, 如何进行分组和对照, 数据的精确程度。研究对象选择条件与标准是否遵循随机化、齐同化的原则, 对照组匹配的特征。如研究对象是患者, 应阐明其临床表现, 诊断标准。如何筛选分组, 有多少例进行过随访, 有多少例因出现不良反应而中途停止研究), 结果(应列出主要结果, 包括主要数据, 有什么新发现, 说明其价值和局限, 叙述要真实、准确、具体, 所列数据经用何种统计学方法处理; 应给出结果的置信区间和统计学显著性检验的确切值; 概率写 P , 后应写出相应显著性检验值), 结论(全文总结, 准确无误的观点及价值)。

3.11 正文标题层次 0 引言; 1 材料和方法, 1.1 材料, 1.2 方法; 2 结果; 3 讨论; 4 参考文献。序号一

律左顶格写, 后空1格写标题; 2级标题后空1格接正文。正文内序号连排用(1), (2), (3)。以下逐条陈述。

0 引言 应包括该研究的目的和该研究与其他相关研究的关系。

1 材料和方法 应尽量简短, 但应让其他有经验的研究者能够重复该实验。对新的方法应该详细描述, 以前发表过的方法引用参考文献即可, 有关文献中或试剂手册中的方法的改进仅描述改进之处即可。

2 结果 实验结果应合理采用图表和文字表示, 在结果中应避免讨论。

3 讨论 要简明, 应集中对所得的结果做出解释而不是重复叙述, 也不应是大量文献的回顾。

图表的数量要精选。表应有表序和表题, 并有足够具有自明性的信息, 使读者不查阅正文即可理解该表的内容。表内每一栏均应有表头, 表内非公知通用缩写应在表注中说明, 表格一律使用三线表(不用竖线), 在正文中该出现的地方应注出。图应有图序、图题和图注, 以使其容易被读者理解, 所有的图应在正文中该出现的地方注出。同一个主题内容的彩色图、黑白图、线条图, 统一用一个注解分别叙述。如: 图1 萎缩性胃炎治疗前后病理变化。A: …; B: …; C: …; D: …; E: …; F: …; G: …。曲线图可按●、○、■、□、▲、△顺序使用标准的符号。统计学显著性用: ^a $P<0.05$, ^b $P<0.01$ ($P>0.05$ 不注)。如同一表中另有一套 P 值, 则^c $P<0.05$, ^d $P<0.01$; 第3套为^e $P<0.05$, ^f $P<0.01$ 。 P 值后注明何种检验及其具体数字, 如 $P<0.01$, $t = 4.56$ vs 对照组等, 注在表的左下方。表内采用阿拉伯数字, 共同的计量单位符号应注在表的右上方, 表内个位数、小数点、±、-应上下对齐。“空白”表示无此项或未测, “-”代表阴性未发现, 不能用同左、同上等。表图勿与正文内容重复。表图的标目尽量用 t/min , $c/(\text{mol/L})$, p/kPa , V/mL , $t/^\circ\text{C}$ 表达。

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

《世界华人消化杂志》自2006-01-01起改为旬刊发行, 每月8、18、28日出版。北京报刊发行局发行, 邮发代号: 82-262。

《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。

文叙述时, 用与正文同号的数字并排, 如本实验方法见文献[8]。所引参考文献必须以近2-3年SCIE, PubMed, 《中国科技论文统计源期刊》和《中文核心期刊要目总览》收录的学术类期刊为准, 通常应只引用与其观点或数据密切相关的国内外期刊中的最新文献。期刊: 序号, 作者(列出全体作者), 文题, 刊名, 年, 卷, 起页-止页, PMID和DOI编号; 书籍: 序号, 作者(列出全部), 书名, 卷次, 版次, 出版地, 出版社, 年, 起页-止页。

5 网络版的发表前链接 本刊即将开始实行网络版的每篇文章上都有该文发表前纪录的链接, 包括首次提交的稿件, 同行评议人报告, 作者给审稿人回信和作者修回稿, 以PDF格式上传。读者可以针对论文、审稿意见和作者的修改情况发表意见, 指出问题与不足; 作者也可以随时修改完善自己发表的论文, 使文章的发表成为一个编者、同行评议者、读者、作者互动的动态过程。

4 写作格式实例

4.1 述评写作格式实例

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

4.2 研究原著写作格式实例

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

4.3 焦点论坛写作格式实例

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

4.4 文献综述写作格式实例

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

4.5 研究快报写作格式实例

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

4.6 临床经验写作格式实例

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

4.7 病例报告写作格式实例

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

5 投稿方式

接受在线投稿, 不接受其他方式的投稿, 如E-mail、打印稿。在线投稿网址: <http://www.baishideng.com/wcjd/ch/index.aspx>。无法在线提交的通过submission@wjgnet.com, 电话: 010-8538-1892, 传真: 010-8538-1893寻求帮助。投稿须知下载网址<http://www.wjgnet.com/1009-3079/tgxz.pdf>。审稿过程平均时间需要14-28 d。所有的来

稿均经2-3位同行专家严格评审, 2位或以上通过为录用, 否则将退稿或修改后再审。接受后的稿件作者需缴纳稿件发表费, 文章发表后可获得1本样刊及10套单行本(稿酬)。

6 修回稿须知

6.1 修回稿信件 来稿包括所有作者签名的作者投稿函。内容包括: (1)保证无重复发表或一稿多投; (2)是否有经济利益或其他关系造成的利益冲突; (3)所有作者均审读过该文并同意发表, 所有作者均符合作者条件, 所有作者均同意该文代表其真实研究成果, 保证文责自负; (4)列出通讯作者的姓名、职称、地址、电话、传真和电子邮件; 通讯作者应负责与其他作者联系, 修改并最终审核复核稿; (5)列出作者贡献分布; (6)来稿应附有作者工作单位的推荐信, 保证无泄密, 如果是几个单位合作的论文, 则需要提供所有参与单位的推荐信; (7)愿将印刷版和电子版出版权转让给本刊编辑部。

6.2 稿件修改 来稿经同行专家审查后, 认为内容需要修改、补充或删除时, 本刊编辑部将把原稿连同审稿意见、编辑意见寄回给作者修改, 而作者必须于15 d内将单位介绍信、作者符合要点承诺书、版权转让信等书面材料寄回编辑部, 同时将修改后的电子稿件上传至在线办公系统; 逾期寄回, 所造成的问题由作者承担责任。

6.3 版权 本论文发表后作者享有非专有权, 文责由作者自负。作者可在本单位或本人著作集中汇编出版以及用于宣讲和交流, 但应注明发表于《世界华人消化杂志》××年; 卷(期): 起止页码。如有国内外其他单位和个人复制、翻译出版等商业活动, 须征得《世界华人消化杂志》编辑部书面同意, 其编辑版权属本刊所有。

《世界华人消化杂志》编辑部

北京百世登生物医学科技有限公司
100025, 北京市朝阳区东四环中路62号
远洋国际中心D座903室
电话: 010-5908-0035
传真: 010-8538-1893
E-mail: wcjd@wjgnet.com
<http://www.wjgnet.com>

2012年国内国际会议预告

2012-07-27/29

第十届全国胃病学术大会

会议地点: 哈尔滨市

联系方式: xiaohuahuiyi2012@163.com

2012-07-30/08-08

国际中医药与亚健康学术大会

会议地点: 加拿大蒙特利尔市

联系方式: wuping@126.com

2012-08-17/19

第九届中国人民解放军肿瘤学术大会(长征肿瘤大会)

会议地点: 重庆市

联系方式: huangxiaoyu@stapricot.com

2012-08-25/29

第八届世界华人药物化学研讨会

会议地点: 北京市

联系方式: liangren@bjmu.edu.cn

2012-08-29/09-01

中华医学会第十一次全国内分泌学学术会议

会议地点: 广州市

联系方式: lilyjia@163.com

2012-08-30/09-02

2012年中华医学会全国麻醉学术年会

会议地点: 重庆市

联系方式: csa2012@live.cn

2012-09-01/30

中华医学会第三次全国肝纤维化、肝硬化学术会议

会议地点: 郑州市

联系方式: lijuyi@cma.org.cn

2012-09-01/30

第十五届全国中西医结合大肠肛门病学术交流大会

会议地点: 济南市

联系方式: doclf@163.com

2012-09-06/09

第七届中国肿瘤学术大会暨第十一届海峡两岸肿瘤学术会议

会议地点: 北京市

联系方式: shengwangyan@163.com

2012-09-14/16

中华医学会第十二次全国超声医学学术会议

会议地点: 青岛市

联系方式: lilyjia@163.com

2012-09-20/23

2012中国消化病学大会

会议地点: 上海市

联系方式: abstract@ccdd2012.org

2012-09-21/30

2012中华影像技术第20次全国学术大会暨国际影像技术论坛

会议地点: 长春市

联系方式: ting@dxyer.com

2012-10-19/21

中欧胰腺外科专业新技术、新进展学术研讨会

会议地点: 长沙市

联系方式: yu198610@163.com

2012-10-19/10-21

2012年(第二届)中日国际消化疾病论坛暨挑战直肠癌-战略与艺术综合研讨会

会议地点: 北京市

联系方式: cjds@htbr.cn

2012-10-21/11-10

第十四次全国中医肛肠学术交流大会

会议地点: 长沙市

联系方式: gcfh2012@163.com

2012-10-25/28

第13届亚太临床微生物暨感染病会议(APCCMI)

会议地点: 北京市

联系方式: bianxiaoxue@mpco.cn

2012-10-31/11-03

第十届中国介入放射学学术大会(2012CSIR)暨2012国际栓塞会议

会议地点: 南京市

联系方式: liufang@cyberzone.cn

2012-11-25/27

第九届国际糖尿病联盟西太平洋地区学术大会暨第四届亚洲糖尿病学会学术年会

会议地点: 日本京都

联系方式: meeting@bimtdoctor.com

2012-11-25/30

2012北美放射学年会RSNA

会议地点: 美国芝加哥

联系方式: panting_expo@126.com

2012-12-21/23

2012生物医学工程生物信息学国际会议

会议地点: 昆明市

联系方式: beb2012@126.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!

蔡三军 主任医师
复旦大学附属肿瘤医院腹部外科

曹秀峰 教授
南京医科大学附属南京第一医院肿瘤中心

陈国忠 主任医师
广西中医学院第一附属医院消化内科

陈卫昌 教授
苏州大学附属第一医院消化内科

樊红 教授
东南大学基础医学院遗传与发育生物学系

樊晓明 主任医师
复旦大学附属金山医院消化科

顾国利 副主任医师
中国人民解放军空军总医院普通外科

何裕隆 教授
中山大学附属第一医院胃肠胰腺外科

黄昆 教授
华中科技大学同济药学院

黄文林 教授
中山大学附属肿瘤医院, 中山大学肿瘤防治中心

黄晓东 主任医师
武汉市中心医院消化内科

李华 副教授
中山大学附属第三医院肝脏外科

李健丁 教授
山西医科大学第一医院放射科CT室

李瑗 教授
广西肿瘤研究所

刘丽江 教授
江汉大学肿瘤研究所

龙学颖 副主任医师
中南大学湘雅医院放射科

禄韶英 副教授
西安交通大学医学院第一附属医院普外科

南极光 教授
延边大学药学院

牛英才 研究员
齐齐哈尔医学院医药科学研究所

邱伟华 主任医师
上海交通大学医学院附属瑞金医院普外科

宋振顺 教授
西京医院肝胆外科

孙学英 教授
哈尔滨医科大学第一附属医院黑龙江省肝脾外科中心

唐南洪 教授
福建医科大学附属协和医院肝胆外科研究所

王悦华 副主任医师
首都医科大学附属宣武医院外科

徐辉雄 教授
同济大学附属第十人民医院暨上海市第十人民医院超声科

杨柏霖 副主任医师
南京中医药大学附属医院肛肠科

于颖彦 教授
上海市瑞金医院消化外科研究所与器官移植中心

张凤春 教授
上海交通大学医学院附属仁济医院肿瘤中心

张国梁 主任医师
天津市第一中心医院消化内科

周晓武 副主任医师
中国人民解放军空军总医院普通外科