

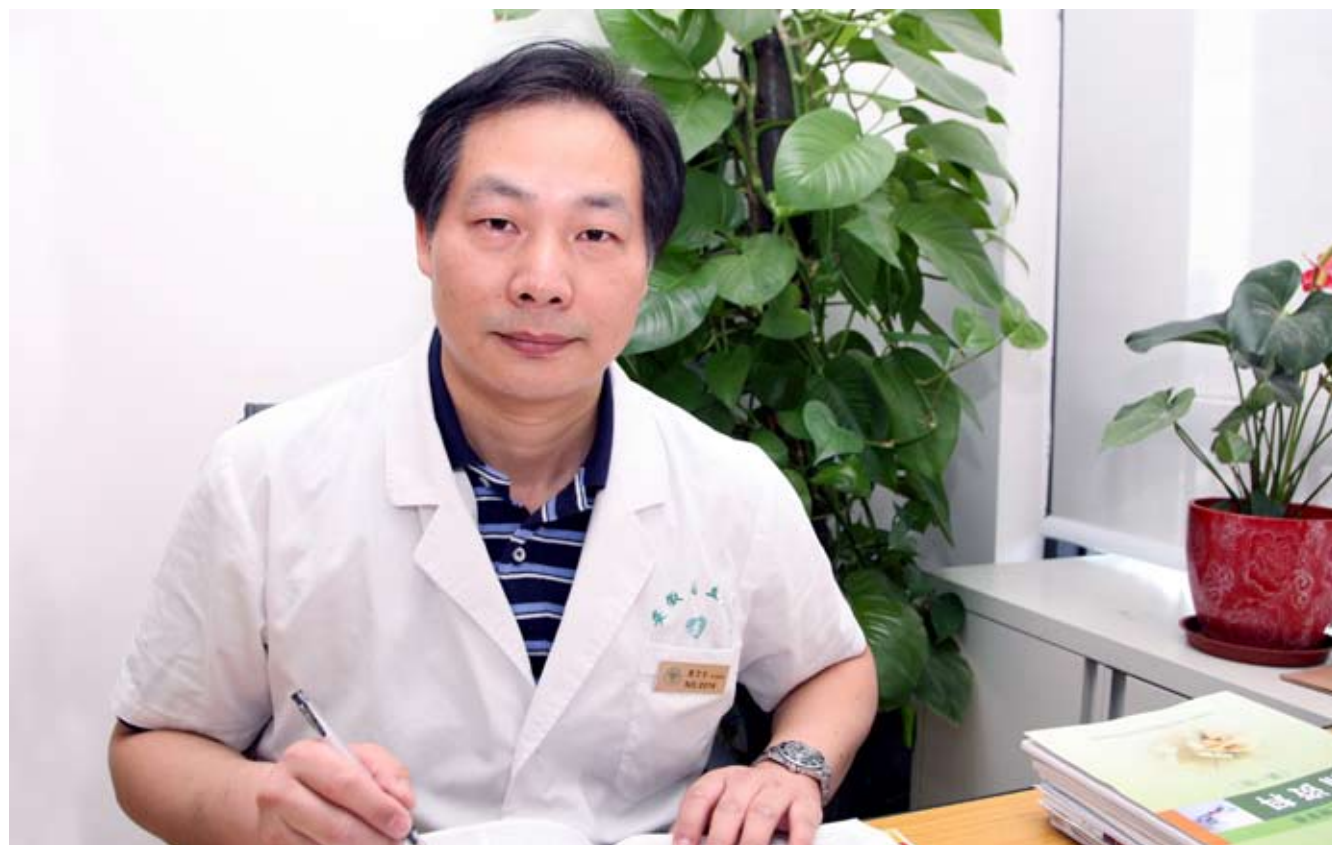
ISSN 1009-3079 (print)
ISSN 2219-2859 (online)
CN 14-1260/R

世界华人消化杂志®

WORLD CHINESE JOURNAL OF DIGESTOLOGY

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

2012 年 8 月 8 日 第 20 卷 第 22 期 (Volume 20 Number 22)



22 / 2012

ISSN 1009-3079



《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
崔云甫教授
戴朝六教授
戴冬秋教授
丁义涛教授
杜顺达副教授
房林教授
傅红副教授
傅华群教授
傅志仁主任医师
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
王道荣主任医师
王德盛副主任医师
王凤山教授
王刚副研究员
王健生教授
王蒙副教授
王石林主任医师
王文跃主任医师
王悦华副主任医师
王振宁教授
王铮副研究员
王正康教授
王志刚副主任医师
王忠裕教授
吴泰璜教授
伍晓汀教授
谢敏主任医师
徐迅迪教授
徐洪副主任医师
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
李璠教授
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
阴赅宏研究员
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8月8日 第20卷 第22期 (总第390期)

述 评	2019 根治性肝切除联合索拉非尼治疗肝细胞癌的研究进展 莫卫东
基 础 研 究	2024 HBV <i>preS1</i> 反基因锁核酸的设计及体外对病毒复制的抑制 邓益斌, 温旺荣 2030 大鼠结肠上皮细胞分离及培养方法的建立 祁燕, 李燕舞, 王汝俊, 唐立海, 米红
临 床 研 究	2036 聚乙二醇干扰素 α -2a联合阿德福韦酯对HBeAg阳性慢性乙型肝炎的治疗 丁洋, 吴发玲, 盛秋菊, 赵连荣, 夏婷婷, 王静艳, 石理兰, 王淑兰, 单红, 安萍, 段红岩, 窦晓光
文 献 综 述	2043 血清microRNAs在胃肠道疾病中的意义 熊青, 徐龙 2050 胃肠道间质瘤的临床特征及治疗进展 胡其欣, 高青 2058 隐匿性肝性脑病的诊疗进展 杨慧艳, 陈东晖, 宫洪涛, 郑鹏远 2063 MRI分子与功能成像诊断胰腺癌的研究新进展 王小会, 程英升 2070 人巨细胞病毒感染与炎症性肠病的相关研究进展 吉阳, 黎锐平, 王明丽
研 究 快 报	2075 高温对SGC7901/ADM细胞多药耐药蛋白表达的影响和意义 彭楠, 焦伟国, 黎春华, 陈蔚, 王秋华, 李晓璇 2081 NF- κ B在鼠肝纤维化组织中的表达及其与 α -SMA、Ⅲ型胶原的相关性 朱净, 范建荣, 潘亮, 黄华, 肖明兵, 江枫, 陆翠华 2086 siRNA沉默Cyclin E基因对肝癌HepG2、SMMC-7721和BEL-7402细胞增殖和侵袭能力的影响 刘慧涛, 王娜, 李敏, 臧文巧, 吴睿, 赵国强
临 床 经 验	2092 不同原发部位胃转移癌12例 刘艳萍, 金博, 王琦三 2097 非淤胆型婴儿巨细胞病毒性肝炎治疗68例 辜芳, 罗晓明 2101 腹腔镜联合胆道镜在重症急性胰腺炎继发胰腺脓肿中的应用 赵林, 秦鸣放, 李宁, 勾承月, 郑明伟, 戴其利 2106 选择性5-羟色胺再摄取抑制剂治疗肠易激综合征疗效的系统评价 赖瑞敏, 曹立颖, 乔丽娜, 胡东平, 周永宁 2111 TGF- β 1在腹膜转移癌与结核性腹膜炎的表达及意义 王四维, 王学梅, 张义侠, 陶春梅, 李银燕, 张震, 陈波
病 例 报 告	2115 腹膜后腺泡状软组织肉瘤1例 时林森, 王峰, 汪灏, 管文贤

附 录	2118 《世界华人消化杂志》投稿须知 2123 2012年国内国际会议预告
志 谢	2124 志谢世界华人消化杂志编委
消 息	2023 《世界华人消化杂志》性质、刊登内容及目标 2035 2011年度《世界华人消化杂志》发文情况 2042 《世界华人消化杂志》正文要求 2049 《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) 2062 《世界华人消化杂志》2011年开始不再收取审稿费 2074 《世界华人消化杂志》被评为中国精品科技期刊 2080 《世界华人消化杂志》参考文献要求 2085 《世界华人消化杂志》栏目设置 2091 《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》 2096 WJG成功通过评审被PMC收录 2100 WJG总被引频次排名位于第174名 2105 《世界华人消化杂志》外文字符标准 2110 《世界华人消化杂志》修回稿须知 2117 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
封面故事	《世界华人消化杂志》编委: 英卫东, 教授, 230001, 安徽省合肥市, 安徽医科大学附属医院省立医院肝脏外科
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 李军亮, 田滢; 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>世界华人消化杂志</p> <p>Shijie Huaren Xiaohua Zazhi</p> <p>吴阶平 题写封面刊名 陈可冀 题写版权刊名 (旬刊)</p> <p>创 刊 1993-01-15 改 刊 1998-01-25 出 版 2012-08-08 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

August 2012 Contents in Brief Volume 20 Number 22

EDITORIAL	2019 Adjuvant sorafenib after radical liver resection for the treatment of hepatocellular carcinoma: Recent research advances <i>Jia WD</i>
BASIC RESEARCH	2024 Antiviral effects of locked nucleic acid antisense oligonucleotides targeting the HBV <i>preS1</i> gene in HepG2 2.2.15 cells <i>Deng YB, Wen WR</i> 2030 Establishment of a method for isolation and primary culture of rat colonic epithelial cells <i>Qi Y, Li YW, Wang RJ, Tang LH, Mi H</i>
CLINICAL RESEARCH	2036 Combination therapy with peginterferon α -2a and adefovir dipivoxil for HBeAg-positive chronic hepatitis B: A prospective multicenter cohort study <i>Ding Y, Wu FL, Sheng QJ, Zhao LR, Xia TT, Wang JY, Shi LL, Wang SL, Shan H, An P, Duan HY, Dou XG</i>
REVIEW	2043 Significance of serum microRNAs in patients with gastrointestinal diseases <i>Xiong Q, Xu L</i> 2050 Clinical features and treatment of gastrointestinal stromal tumors: Recent advances <i>Hu QX, Gao Q</i> 2058 Advances in diagnosis and treatment of minimal hepatic encephalopathy <i>Yang HY, Chen DH, Gong HT, Zheng PY</i> 2063 Advances in magnetic resonance molecular and functional imaging to diagnose pancreatic cancer <i>Wang XH, Cheng YS</i> 2070 Progress in understanding the relationship between inflammatory bowel disease and human cytomegalovirus infection <i>Ji Y, Li RP, Wang ML</i>
RAPID COMMUNICATION	2075 Effect of hyperthermia on the expression of multidrug resistance markers in adriamycin-resistant human gastric cancer cell line SGC-7901/ADM <i>Peng N, Jiao WG, Li CH, Chen W, Wang QH, Li XY</i> 2081 Correlation of nuclear factor κ B expression with α -SMA and collagen III expression in hepatic fibrosis in rats <i>Zhu J, Fan JR, Pan L, Huang H, Xiao MB, Jiang F, Lu CH</i> 2086 RNAi-mediated silencing of the Cyclin E gene inhibits the proliferation and invasion of HepG2, SMMC-7721 and BEL-7402 cells <i>Liu HT, Wang N, Li M, Zang WQ, Wu R, Zhao GQ</i>
CLINICAL PRACTICE	2092 Metastatic carcinoma to the stomach from different primary sites: An analysis of 12 cases <i>Liu YP, Jin B, Wang QS</i> 2097 Treatment of non-cholestatic cytomegalovirus hepatitis in infants: An analysis of 68 cases <i>Gu F, Luo XM</i> 2101 Laparoscopy combined with cholangioscopy for the treatment of pancreatic abscess after severe acute pancreatitis <i>Zhao L, Qin MF, Li N, Gou CY, Zheng MW, Dai QL</i> 2106 Efficacy and safety of selective serotonin reuptake inhibitor antidepressants in patients with irritable bowel syndrome: A systematic review <i>Lai RM, Cao LY, Qiao LN, Hu DP, Zhou YN</i> 2111 Significance of expression of TGF- β 1 in peritoneal carcinomatosis and tuberculous peritonitis <i>Wang SW, Wang XM, Zhang YX, Tao CM, Li YY, Zhang Z, Chen B</i>

CASE REPORT	2115 Retroperitoneal alveolar soft-part sarcoma: A case report <i>Shi LS, Wang F, Wang H, Guan WX</i>
APPENDIX	2118 Instructions to authors of <i>World Chinese Journal of Digestology</i> 2123 Meeting events calendar in 2012
ACKNOWLEDGMENT	2124 Acknowledgments to reviewers of <i>World Chinese Journal of Digestology</i>
COVER	Editorial Board Member of <i>World Chinese Journal of Digestology</i> , Wei-Dong Jia, Professor, Department of Hepatic Surgery, Affiliated Provincial Hospital, Anhui Medical University, Hefei 230001, Anhui 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>Jun-Liang Li, Ying Tian</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 August 8, 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*

根治性肝切除联合索拉非尼治疗肝细胞癌的研究进展

英卫东

英卫东, 安徽医科大学附属医院肝胆外科 安徽省合肥市 230001

英卫东, 教授, 主任医师, 博士生导师, 主要从事肝癌临床与基础研究.

安徽省“115”产业创新团队-肝细胞癌转移复发研究团队基金资助项目

安徽省卫生厅医学科研重点基金资助项目, No. 2010A006

安徽省科技攻关重点基金资助项目, No. 11010402163

通讯作者: 英卫东, 教授, 主任医师, 230001, 安徽省合肥市, 安徽医科大学附属医院肝胆外科. jwd1968@sina.com

电话: 0551-2283740 传真: 0551-2282121

收稿日期: 2012-05-02 修回日期: 2012-06-30

接受日期: 2012-07-20 在线出版日期: 2012-08-08

Adjuvant sorafenib after radical liver resection for the treatment of hepatocellular carcinoma: Recent research advances

Wei-Dong Jia

Wei-Dong Jia, Department of Hepatic Surgery, Affiliated Provincial Hospital, Anhui Medical University, Hefei 230001, Anhui Province, China

Supported by: the 115 Industrial Innovation Group Foundation of Anhui Province; the Clinical Medical Key Project of the Health Department of Anhui Province, No. 2010A006; and the Key Scientific and Technological Project of Anhui Province, No. 11010402163

Correspondence to: Wei-Dong Jia, Professor, Chief Physician, Department of Hepatic Surgery, Affiliated Provincial Hospital, Anhui Medical University, Hefei 230001, Anhui Province, China. jwd1968@sina.com

Received: 2012-05-02 Revised: 2012-06-30

Accepted: 2012-07-20 Published online: 2012-08-08

Abstract

Radical liver resection is still the major treatment for hepatocellular carcinoma (HCC) in recent years. However, postoperative recurrence and metastasis are major obstacles that lead to poor therapeutic benefits. Treatments to prevent recurrence are important for effectively prolonging the survival of HCC patients. Currently, various treatment options, such as transcatheter hepatic arterial chemoembolization, have been comprehensively assessed in clinical practice; however, evidence from large multicenter, randomized controlled trials is still lacking. The emergence of sorafenib, a molecular targeted drug, has opened a new avenue for improving the prog-

nosis of HCC prognosis. Sorafenib might be an effective adjuvant treatment for HCC patients who received curative liver resection.

Key Words: Hepatocellular carcinoma; Hepatectomy; Sorafenib

Jia WD. Adjuvant sorafenib after radical liver resection for the treatment of hepatocellular carcinoma: Recent research advances. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2012; 20(22): 2019-2023

摘要

根治性肝切除仍然是肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)的主要治疗手段, 但术后转移复发导致肝切除的疗效进入瓶颈期. 探索术后复发的治疗措施是有效延长患者生存时间的重要课题. 目前, 以经皮肝动脉化疗栓塞为代表的多种治疗措施已在临床广泛开展, 但尚缺乏大规模、多中心随机对照临床试验的循证医学证据. 分子靶向药物索拉非尼的出现为改善HCC预后开辟了新局面, 对于已接受过根治性肝切除治疗的HCC患者, 索拉非尼可能是一种有效的辅助治疗方法, 值得深入探索.

关键词: 肝细胞癌; 肝切除术; 索拉非尼

英卫东. 根治性肝切除联合索拉非尼治疗肝细胞癌的研究进展. *世界华人消化杂志* 2012; 20(22): 2019-2023

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/2019.asp>

0 引言

肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)是世界第3位的癌症死亡原因, 位列我国癌症死亡原因的第2位. 根治性肝切除仍然是目前HCC最主要的治疗手段之一, 但术后转移复发严重影响HCC总体外科疗效. 肿瘤是全身性疾病的局部表现, 在肿瘤生长的早期可能已开始转移, 对癌症患者进行全身性的干预, 具有提高外科疗效、延长患者生存的实用价值, 研究者已开展了许多临床研究来探索术后辅助治疗策略以降低复发的风险^[1]. 系统性药物索拉非尼是一种口服多激酶抑制剂, 多通路抑制肿瘤细胞增殖及

■背景资料

根治性肝切除术后转移复发严重影响肝细胞癌(HCC)总体外科疗效. 对癌症患者进行全身性的干预, 具有提高外科疗效和延长患者生存时间的实用价值. 对于已接受过根治性肝切除治疗的HCC患者, 积极探索索拉非尼辅助治疗降低复发风险的价值及潜力, 具有极其重要的临床意义.

■同行评议者

吴泰璜, 教授, 山东省立医院肝胆外科

■研发前沿

鉴于肝切除治疗HCC仅是针对影像学可见病灶,实际临床治疗中有其不能解决的问题.如何降低复发率和延长患者生命是根治性肝切除治疗HCC面临的挑战.

血管生成,具有双重抗肿瘤效应,是目前唯一可显著延长HCC患者生存时间的有效治疗药物^[2,3].因此,对于已接受过根治性肝切除治疗的HCC患者,积极探索索拉非尼辅助治疗降低复发风险的价值及潜力具有极其重要的临床意义^[4].

1 根治性肝切除治疗HCC面临的挑战

巴塞罗那临床肝癌分期系统(BCLC)是目前HCC临床治疗的标准分期系统,根据BCLC分期与治疗策略,早期HCC(BCLC分期0期和A期)是肝切除最佳的获益人群^[5],即: ECOG评分0-2, Child-Pugh肝功能分级A-B级,单个结节或3个结节≤3 cm.根治性肝切除术后,早期HCC患者5年生存率显著延长,最高达61.2%,几乎可与肝移植的疗效相媲美^[6].

尽管根治性肝切除术在HCC治疗中的地位不可替代,但术后复发致早期HCC的根治性切除疗效进入瓶颈期,5年复发率高达70%左右. Portolani等^[7]报道213例早期HCC患者行根治性肝切除,术后5年的复发率达72.8%, 82.5%的患者死亡原因是HCC术后复发. Imamura等^[8]研究表明, 249例HCC患者接受根治性肝切除,术后1年、3年和5年总体复发率分别高达30%、62%和79%. 国内复旦大学中山医院的资料显示: 20世纪60-90年代, HCC手术治疗后生存率明显提高. 但90年代至今, 尽管诊断、治疗和手术技术等均有改善, 但HCC生存率未再有明显提高. 根治性肝切除术后的高复发率严重影响HCC总体外科疗效, 如何降低复发率, 延长患者生命是根治性肝切除治疗HCC面临的挑战^[9].

2 术后复发的因素

影响HCC根治性肝切除术后复发的因素很多, 从细胞起源的角度来说有两种不同的机制, 即多中心发生、单中心发生或肝内转移, 涉及癌基因、抑癌基因、转移基因、生长因子及受体、黏附分子及细胞外基质、肿瘤血管生成以及肝脏功能状态及机体免疫状态等多个因素, 目前的研究主要聚焦在以下方面.

2.1 循环肿瘤细胞 1996年Mori等^[10]首次发现在恶性肿瘤早期即已存在循环肿瘤细胞(circulating tumour cell, CTC), 与肿瘤转移复发和预后密切相关, 证明肿瘤是全身性疾病的局部表现. 由于肝癌细胞恶性度高, 癌组织生长迅速, 而肝脏的血液供应又丰富, 所以癌细胞容易侵犯到肝脏血管内, 通过血流转移到肝内其他部位或者

形成CTC. 另外, 肝切除手术过程中, 游离肝脏挤压肝脏实质, 也可引起癌细胞进入血管内形成CTC而发生转移复发. Umeda等^[11]研究表明CTC与HCC根治性肝切除术后肝内复发密切相关, 是独立的预后因素.

2.2 肝癌干细胞 肿瘤干细胞是存在于肿瘤组织中的, 少数具有干细胞性质的细胞群体, 在肿瘤发生、发展、转移、复发以及预后中起决定性作用. 近年来, 肝癌干细胞(liver cancer stem cell, LCSC)被认为是了解HCC侵袭转移原因的新途径之一(归巢性肝转移). Fan等^[12]研究82例行根治性肝切除的HCC患者预后生存情况, 发现循环中的肿瘤干细胞>0.01%可以预测术后肝内播散和远处转移, 是术后肝癌复发的独立危险因素. Lee等^[13]研究发现肿瘤内有高量CD24⁺标志的LCSC的HCC患者, 术后一年复发率较肿瘤内只有低量LCSC的患者高3倍、肿瘤转移的机会亦较高且生存率明显较低.

2.3 门静脉浸润 HCC早期发生显微镜下门静脉浸润是HCC根治性肝切除术后复发的因素之一. Kojiro等^[14]研究显示, 直径<2 cm的肝癌患者中, 结节边界清晰者中有5%发生显微镜下门静脉浸润, 而边界模糊者门静脉浸润的发生率为27%.

2.4 肝内微小病灶和微小转移灶 Llovet等^[1]研究显示: 60%-70%HCC根治性肝切除术后复发是由于在手术时已经存在的影像学不可发现的肝内微小病灶, 切除主要肿块时未能发现肝内微小病灶. 一般而言, 肝癌细胞的倍增时间平均只有33 d, 手术后残留的癌细胞在肝细胞生长因子(hepatocyte growth factor, HGF)、VEGF等作用下迅速增殖.

2.5 多中心发生的新发病灶 80%-90%的HCC患者合并有肝硬化, 而肝硬化影响复发的原因可能是限制了切缘的大小, 从而降低了根治性切除率. 此外, 肝硬化与肝癌的发生密切相关, 可能是肝癌切除术后多中心复发的根源, 30%-40%的HCC术后复发与之相关^[1].

3 术后复发的预防策略

根治性肝切除术后的高复发率严重影响HCC总体外科疗效, 临床亟待解决的难题是如何降低复发风险, 延长根治术后HCC患者的生存期. 研究者已开展了许多研究来探索根治术后辅助治疗以降低复发风险.

3.1 经皮肝动脉化疗栓塞 HCC根治性切除术后

■相关报道

索拉非尼治疗晚期HCC的Ⅲ期临床试验证实索拉非尼是目前唯一被证明可以显著延长晚期HCC患者生存时间的分子靶向药物. 其独特的作用机制以及在晚期HCC患者中已取得的卓越疗效, 促使研究者开始探索其降低HCC切除术后复发风险的价值.

经皮肝动脉化疗栓塞(transcatheter hepatic arterial chemoembolization, TACE)对预防HCC复发的价值至今尚存在争论。回顾性资料中较多持肯定态度,术后预防性TACE可以减少复发转移的机会,提高生存率。但前瞻性包括小样本随机对照研究结果却显示:术后应用预防性TACE不仅预后更差,且肝外复发也相对更多^[15,16]。临床上影响HCC早期复发的因素很多,而预防性TACE对具有不同复发高危因素的患者作用可能有所不同,这可能是导致既往研究中结论不甚一致的重要因素。

3.2 系统化疗 传统的化疗药物单药治疗HCC有效率低、不良反应明显并且生存时间无改善,迄今尚无标准的化疗方案用于根治性肝切除术后系统化疗。随机对照研究显示根治性肝切除术后联合化疗(替加氟-尿嘧啶)对患者无获益,化疗有降低患者总体生存时间的趋势^[17]。系统性综述结果也表明根治性肝切除术后联合化疗不能降低复发风险^[18]。以奥沙利铂为代表的新一代细胞毒性药物的临床探索提示其可控制晚期HCC病情发展、减轻症状并且可能延长生存期,与根治性肝切除术后联合治疗以降低复发风险值得探索。

3.3 免疫治疗 一些小规模临床研究结果提示,免疫治疗可提高患者的生活质量,减少术后复发率。Takayama等^[19]采用经白介素-2体外活化的自体淋巴细胞实施过继免疫治疗,结果显示治疗组肿瘤复发率比对照组降低(57% vs 77%),且治疗组能延长患者的无复发生存期。Peng等^[20]报道使用灭活的自体肿瘤疫苗能明显提高术后患者生存率,预防肝癌切除术后复发。 α 干扰素在部分RCT中表现出一定的抗复发作用^[21-23],但Mazzaferro等^[24]开展的RCT研究却显示:术后应用 α 干扰素不能降低根治性肝切除术后复发率。与其他实体瘤相比较,由于HCC存在明确的HBV或者HCV感染背景,而 α 干扰素对HBV和HCV具有抑制作用。因此,其抗复发作用可能与抑制多中心发生的新发病灶有关。

3.4 其他治疗 维甲酸类药物能抑制癌前状态高增生结节的细胞增殖和癌变,术后口服维甲酸能预防HCC复发以及延长HCC根治术后的生存期,其抗复发作用可能与抑制多中心发生的新发病灶有关^[25]。碘-131短距离放射线束可以杀灭肝内及血管内残余癌细胞,采用碘-131进行肝内放射性治疗可有效减低术后复发率,改善HCC根治术后生存期^[26],但仍需进一步研究。

尽管以TACE、干扰素 α 为代表的多种治疗已在临床广泛开展,但均没有大规模和多中心随机对照临床试验的循证医学证据,迄今临床尚缺乏有效的术后辅助治疗策略降低复发风险。

4 术后联合索拉非尼降低复发风险的价值及潜力

索拉非尼是口服多激酶抑制剂,具有双重抗肿瘤效应,一方面他可以通过抑制RAF/MEK/ERK信号传导通路,直接抑制肿瘤生长;另一方面,他又可通过抑制VEGFR和PDGFR,阻断肿瘤新生血管的形成,间接抑制肿瘤细胞的生长。索拉非尼治疗晚期HCC的III期临床试验-SHARP和Oriental为研究提供了高级别的循证医学证据。证实索拉非尼是目前唯一被证明可以显著延长晚期HCC患者生存时间的分子靶向药物^[2,3]。其独特的作用机制以及在晚期HCC患者中已取得的卓越疗效,促使研究者开始探索其降低HCC切除术后复发风险的价值。对于已接受过根治性治疗的HCC患者,索拉非尼被认为是一种有效的辅助治疗方法^[4]。

动物实验证实,肝切除术联合索拉非尼可减少肿瘤复发、转移,并且延长生存期,其疗效优于单独切除术组^[27]。目前,索拉非尼作为辅助性治疗预防HCC切除术后高复发转移的III期临床试验(TORM研究)正在全球开展,拟入组1 100例成功手术切除或局部消融后的HCC患者,探索索拉非尼400 mg每日2次治疗是否比安慰剂能显著延长患者的无复发生存期^[28]。研究预计在2014年底结束。日本肝病学会密切关注STORM研究进展,若该项RCT研究获得阳性结果,即将索拉非尼列为早期肝癌切除术或局部消融术后的一线辅助性治疗药物^[29]。根据已有的部分临床资料,Kudo^[29]推测根治术后联合索拉非尼具有降低复发的潜力,辅助性治疗预计可使早期HCC切除术后OS延长至7.5-10年。

5 结论

根治性肝切除仍然是目前HCC最主要的治疗手段之一,鉴于肝切除治疗HCC仅是针对影像学可见病灶,实际临床治疗中有其不能解决的问题,包括:CTC、LCSC、病灶早期门静脉浸润、微小转移灶以及多中心发生的新发病灶等诸多难题。如何降低复发率、延长患者生命是根治性肝切除治疗HCC面临的挑战。尽管术后TACE治疗、过继免疫治疗、干扰素和维甲酸类药物等可能延长HCC根治术后生存期,并且降低复

■创新盘点

本文对影响HCC根治性肝切除术后复发的因素、术后复发的预防策略和术后联合索拉非尼降低复发风险的价值及潜力进行了综述。

■应用要点

本文对积极探索根治性肝切除联合索拉非尼治疗HCC具有一定的指导意义。

■名词解释

循环肿瘤细胞 (CTC): 通常把进入人体外周血的肿瘤细胞称为循环肿瘤细胞。

发率, 但缺乏大规模和多中心随机对照临床试验的循证医学证据, 仍需进一步研究. 以索拉非尼为代表的分子靶向药物已经被证实可控制晚期HCC病情发展, 延长患者生存, 与根治性肝切除术后联合治疗以降低复发风险值得临床深入探索. 正在进行中的STROM研究, 将挖掘出索拉非尼在根治术后预防复发的更多潜力, 结果令人期待.

6 参考文献

- Llovet JM, Bruix J. Novel advancements in the management of hepatocellular carcinoma in 2008. *J Hepatol* 2008; 48 Suppl 1: S20-S37
- Llovet JM, Ricci S, Mazzaferro V, Hilgard P, Gane E, Blanc JF, de Oliveira AC, Santoro A, Raoul JL, Forner A, Schwartz M, Porta C, Zeuzem S, Bolondi L, Greten TF, Galle PR, Seitz JF, Borbath I, Häussinger D, Giannaris T, Shan M, Moscovici M, Voliotis D, Bruix J. Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med* 2008; 359: 378-390
- Cheng AL, Kang YK, Chen Z, Tsao CJ, Qin S, Kim JS, Luo R, Feng J, Ye S, Yang TS, Xu J, Sun Y, Liang H, Liu J, Wang J, Tak WY, Pan H, Burock K, Zou J, Voliotis D, Guan Z. Efficacy and safety of sorafenib in patients in the Asia-Pacific region with advanced hepatocellular carcinoma: a phase III randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet Oncol* 2009; 10: 25-34
- Kudo M. Hepatocellular carcinoma 2009 and beyond: from the surveillance to molecular targeted therapy. *Oncology* 2008; 75 Suppl 1: 1-12
- Forner A, Llovet JM, Bruix J. Hepatocellular carcinoma. *Lancet* 2012; 379: 1245-1255
- Morris-Stiff G, Gomez D, de Liguori Carino N, Prasad KR. Surgical management of hepatocellular carcinoma: is the jury still out? *Surg Oncol* 2009; 18: 298-321
- Portolani N, Coniglio A, Ghidoni S, Giovannelli M, Benetti A, Tiberio GA, Giulini SM. Early and late recurrence after liver resection for hepatocellular carcinoma: prognostic and therapeutic implications. *Ann Surg* 2006; 243: 229-235
- Imamura H, Matsuyama Y, Tanaka E, Ohkubo T, Hasegawa K, Miyagawa S, Sugawara Y, Minagawa M, Takayama T, Kawasaki S, Makuuchi M. Risk factors contributing to early and late phase intrahepatic recurrence of hepatocellular carcinoma after hepatectomy. *J Hepatol* 2003; 38: 200-207
- Poon RT. Differentiating early and late recurrences after resection of HCC in cirrhotic patients: implications on surveillance, prevention, and treatment strategies. *Ann Surg Oncol* 2009; 16: 792-794
- Mori M, Mimori K, Ueo H, Karimine N, Barnard GF, Sugimachi K, Akiyoshi T. Molecular detection of circulating solid carcinoma cells in the peripheral blood: the concept of early systemic disease. *Int J Cancer* 1996; 68: 739-743
- Umeda Y, Matsuda H, Sadamori H, Matsukawa H, Yagi T, Fujiwara T. A prognostic model and treatment strategy for intrahepatic recurrence of hepatocellular carcinoma after curative resection. *World J Surg* 2011; 35: 170-177
- Fan ST, Yang ZF, Ho DW, Ng MN, Yu WC, Wong J. Prediction of posthepatectomy recurrence of hepatocellular carcinoma by circulating cancer stem cells: a prospective study. *Ann Surg* 2011; 254: 569-576
- Lee TK, Castilho A, Cheung VC, Tang KH, Ma S, Ng IO. CD24(+) liver tumor-initiating cells drive self-renewal and tumor initiation through STAT3-mediated NANOG regulation. *Cell Stem Cell* 2011; 9: 50-63
- Kojiro M. Focus on dysplastic nodules and early hepatocellular carcinoma: an Eastern point of view. *Liver Transpl* 2004; 10: S3-S8
- Kohn H, Nagasue N, Hayashi T, Yamanoi A, Uchida M, Ono T, Yukaya H, Kimura N, Nakamura T. Postoperative adjuvant chemotherapy after radical hepatic resection for hepatocellular carcinoma (HCC). *Hepatogastroenterology* 1996; 43: 1405-1409
- Poon RT, Fan ST, Lo CM, Ng IO, Liu CL, Lam CM, Wong J. Improving survival results after resection of hepatocellular carcinoma: a prospective study of 377 patients over 10 years. *Ann Surg* 2001; 234: 63-70
- Hasegawa K, Takayama T, Ijichi M, Matsuyama Y, Imamura H, Sano K, Sugawara Y, Kokudo N, Makuuchi M. Uracil-tegafur as an adjuvant for hepatocellular carcinoma: a randomized trial. *Hepatology* 2006; 44: 891-895
- Lau WY, Lai EC, Lau SH. The current role of neo-adjuvant/adjuvant/chemoprevention therapy in partial hepatectomy for hepatocellular carcinoma: a systematic review. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2009; 8: 124-133
- Takayama T, Sekine T, Makuuchi M, Yamasaki S, Kosuge T, Yamamoto J, Shimada K, Sakamoto M, Hirohashi S, Ohashi Y, Kakizoe T. Adoptive immunotherapy to lower postsurgical recurrence rates of hepatocellular carcinoma: a randomised trial. *Lancet* 2000; 356: 802-807
- Peng B, Liang L, Chen Z, He Q, Kuang M, Zhou F, Lu M, Huang J. Autologous tumor vaccine lowering postsurgical recurrent rate of hepatocellular carcinoma. *Hepatogastroenterology* 2006; 53: 409-414
- Lin SM, Lin CJ, Hsu CW, Tai DI, Sheen IS, Lin DY, Liaw YF. Prospective randomized controlled study of interferon-alpha in preventing hepatocellular carcinoma recurrence after medical ablation therapy for primary tumors. *Cancer* 2004; 100: 376-382
- Sun HC, Tang ZY, Wang L, Qin LX, Ma ZC, Ye QH, Zhang BH, Qian YB, Wu ZQ, Fan J, Zhou XD, Zhou J, Qiu SJ, Shen YF. Postoperative interferon alpha treatment postponed recurrence and improved overall survival in patients after curative resection of HBV-related hepatocellular carcinoma: a randomized clinical trial. *J Cancer Res Clin Oncol* 2006; 132: 458-465
- Lo CM, Liu CL, Chan SC, Lam CM, Poon RT, Ng IO, Fan ST, Wong J. A randomized, controlled trial of postoperative adjuvant interferon therapy after resection of hepatocellular carcinoma. *Ann Surg* 2007; 245: 831-842
- Mazzaferro V, Romito R, Schiavo M, Mariani L, Camerini T, Bhoori S, Capussotti L, Calise F, Pellicci R, Belli G, Tagger A, Colombo M, Bonino F, Majno P, Llovet JM. Prevention of hepatocellular carcinoma recurrence with alpha-interferon after liver resection in HCV cirrhosis. *Hepatology* 2006; 44: 1543-1554
- Muto Y, Moriawaki H, Saito A. Prevention of second primary tumors by an acyclic retinoid in patients

- with hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med* 1999; 340: 1046-1047
- 26 Boucher E, Bouguen G, Garin E, Guillygomarch A, Boudjema K, Raoul JL. Adjuvant intraarterial injection of ¹³¹I-labeled lipiodol after resection of hepatocellular carcinoma: progress report of a case-control study with a 5-year minimal follow-up. *J Nucl Med* 2008; 49: 362-366
- 27 Feng YX, Wang T, Deng YZ, Yang P, Li JJ, Guan DX, Yao F, Zhu YQ, Qin Y, Wang H, Li N, Wu MC, Wang HY, Wang XF, Cheng SQ, Xie D. Sorafenib suppresses postsurgical recurrence and metastasis of hepatocellular carcinoma in an orthotopic mouse model. *Hepatology* 2011; 53: 483-492
- 28 Sorafenib as adjuvant treatment in the prevention of recurrence of hepatocellular carcinoma (STORM). Available from: <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00692770>
- 29 Kudo M. The 2008 Okuda lecture: Management of hepatocellular carcinoma: from surveillance to molecular targeted therapy. *J Gastroenterol Hepatol* 2010; 25: 439-452

■同行评价

本文论述了根治性肝切除联合索拉非尼治疗HCC的研究进展,表明索拉非尼与根治性肝切除术后联合治疗以降低复发风险值得临床深入探索。文章分析合理,条理分明,参考文献恰当。

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。

HBV *preS1* 反基因锁核酸的设计及体外对病毒复制的抑制

邓益斌, 温旺荣

■背景资料

锁核酸(LNA)是近几年来新发现的带环状结构的核苷酸衍生物, 具有稳定性好, 分子杂交能力强, 抗核酸酶降解能力高, 脂溶性好和低细胞毒性等特点, 因而具有广阔的研究与应用前景。

邓益斌, 右江民族医学院临床学院医学检验中心 广西壮族自治区百色市 533000

温旺荣, 暨南大学第一临床医学院医学检验中心 广东省广州市 510070

邓益斌, 副教授, 2010年暨南大学博士研究生, 主要从事基因诊断与治疗研究。

广西壮族自治区教育厅资助项目, No. 200911MS187

作者贡献分布: 本研究由邓益斌设计; 实验过程由邓益斌操作完成; 研究经费来源于邓益斌主持的广西教育厅课题; 数据分析由邓益斌完成; 论文写作由邓益斌完成, 温旺荣提出修改意见。

通讯作者: 邓益斌, 副教授, 533000, 广西壮族自治区百色市右江区中山二路18号, 右江民族医学院临床学院医学检验中心。

enbin0776@sina.com

电话: 0776-2829434

收稿日期: 2012-05-08 修回日期: 2012-06-30

接受日期: 2012-07-20 在线出版日期: 2012-08-08

Antiviral effects of locked nucleic acid antisense oligonucleotides targeting the HBV *preS1* gene in HepG2 2.2.15 cells

Yi-Bin Deng, Wang-Rong Wen

Yi-Bin Deng, Center for Medical Laboratory Science, the Clinical College of Youjiang Medical University for Nationalities, Baise 533000, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China

Wang-Rong Wen, Center for Medical Laboratory Science, the First Clinical College of Jinan University, Guangzhou 510070, Guangdong Province, China

Supported by: the Foundation of Department of Education of Guangxi Zhuang Autonomous Region, No. 200911MS187

Correspondence to: Yi-Bin Deng, Associate Professor, Center for Medical Laboratory Science, the Clinical College of Youjiang Medical University for Nationalities, 18 Zhongshan 2nd Road, Youjiang District, Baise 533000, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China. enbin0776@sina.com
Received: 2012-05-08 Revised: 2012-06-30
Accepted: 2012-07-20 Published online: 2012-08-08

Abstract

AIM: To investigate the inhibitory effects of locked nucleic acid (LNA) antisense oligonucleotides targeting the purine region of the hepatitis B virus (HBV) *preS1* gene in HepG2 2.2.15 cells, and to screen effective LNA anti-gene oligonucleotides.

METHODS: LNA anti-gene oligonucleotides of different lengths that were complementary to the purine-abundant regions (2 941-2 962 nt,

3 015-3 036 nt and 3 089-3 110 nt) of the HBV *preS1* gene were designed, synthesized, and introduced into HepG2 2.2.15 cells by cationic liposome-mediated transfection. Hepatitis B surface antigen (HBsAg) and HBV DNA levels in cell supernatants were tested by time-resolved fluorescence immune assay (TRFIA) and fluorescent quantitative polymerase chain reaction (FQ-PCR) 1, 3, 5 and 7 d after transfection. The cell toxicity of LNA anti-gene oligonucleotides was detected by methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) assay.

RESULTS: LNA anti-gene oligonucleotides targeting the HBV *preS1* gene showed strong inhibitory effects on HBV DNA replication and HBsAg expression *in vitro*, and the effects were time-dependent. Seven days after transfection, the reduced rates of HBV DNA and HBsAg levels were 64.32% and 67.51%, respectively. The inhibitory effects were significantly different between each experimental group and control group (all $P < 0.05$). The inhibitory effect of the LNA anti-gene oligonucleotide targeting the region 2 941-2 962 nt was most strong. The optimal length of LNA anti-gene oligonucleotides ranges from 20 to 30 bases. No obvious cell toxicity was observed with LNA anti-gene oligonucleotides.

CONCLUSION: LNA anti-gene oligonucleotides targeting the HBV *preS1* gene showed strong inhibitory effects on HBV replication *in vitro*. The inhibitory effect of the LNA anti-gene oligonucleotide targeting the region 2 941-2 962 nt was most strong, and the optimal length of LNA anti-gene oligonucleotides ranges from 20 to 30 bases.

Key Words: Cationic liposomes; Hepatitis B virus; Locked nucleic acid; Anti-gene therapy

Deng YB, Wen WR. Antiviral effects of locked nucleic acid antisense oligonucleotides targeting the HBV *preS1* gene in HepG2 2.2.15 cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2012; 20(22): 2024-2029

摘要

目的: 探讨针对乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV) *preS1* dsDNA同聚嘌呤区设计反

■同行评议者

朱传武, 主任医师, 苏州市第五人民医院

基因锁核酸分子, 并观察其在HepG2 2.2.15细胞内抑制病毒复制的效果。

方法: 针对HBV *preS1* dsDNA的2 941-2 962 nt、3 015-3 036 nt和3 089-3 110 nt三个同聚嘌呤区, 利用RNA structure软件分别设计合成锁核酸、硫代寡核苷酸、未修饰寡核苷酸及无关对照序列, 以阳离子脂质体介导转染HepG2 2.2.15细胞, 采用荧光定量聚合酶链反应技术(FQ-PCR)和时间分辨免疫荧光技术(TRFIA)分别监测1、3、5和7 d细胞培养上清液中HBV DNA和HBsAg的含量; 四甲基偶氮唑蓝(MTT)法检测锁核酸对细胞代谢的影响。

结果: 反基因锁核酸对细胞内的HBV DNA复制与HBsAg表达有明显的抑制作用, 且抑制率随时间呈增高趋势, 7 d后抑制率分别为64.32%和67.51%。各实验组与对照组比较差异均具有统计学意义(均 $P<0.05$), 而封闭2 941-2 962 nt同聚嘌呤靶区的LNA抑制作用最强, 且最适序列长度为20-30 bp。LNA对细胞代谢无明显影响。

结论: 针对*preS1* dsDNA同聚嘌呤区的反基因锁核酸分子, 体外能有效抑制HBV的复制, 以封闭2 941-2 962 nt靶位效果最强, 且合适序列长度为20-30 bp。

关键词: 脂质体; 乙型肝炎病毒; 锁核酸; 反基因治疗

邓益斌, 温旺荣. HBV *preS1*反基因锁核酸的设计及体外对病毒复制的抑制. 世界华人消化杂志 2012; 20(22): 2024-2029
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/2024.asp>

0 引言

反基因治疗(anti-gene therapy)是由特定寡聚脱氧核苷酸与靶双链DNA同聚嘧啶或同聚嘌呤区专一性结合形成局部三螺旋结构, 阻止靶DNA与聚合酶、转录因子等蛋白结合, 抑制靶基因的复制与表达, 实现“反基因”抑制之目的。由于遗传信息从DNA流向RNA是一个遗传信息放大的过程, 而反基因治疗是在转录水平发挥作用, 因而比在翻译水平发挥作用的反义核酸疗法更为有效。锁核酸(locked nucleic acid, LNA)是新发现的一种带环状结构的核苷酸衍生物^[1-4], 与其他寡核苷酸相比, 具有更高的热稳定性^[5-8]、更好的分子杂交能力^[9-12]、更强的抗核酸酶降解能力^[13-16]、更好的脂溶性^[17-20]和低细胞毒性^[21-25]等优势。前期研究表明, 针对乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV) *S*^[26-29]和*preS2*^[30]mRNA

单链的反义锁核酸片段可到达肝细胞质内, 发挥抑制HBV复制的作用。为了进一步观察锁核酸能否进入肝细胞核内, 抑制病毒cccDNA的复制与表达, 本研究针对HBV *preS1* dsDNA三个同聚嘌呤区分别设计合成“反基因”锁核酸序列, 脂质体介导转染HepG2 2.2.15细胞株, 并观察其抗病毒效果, 旨在寻找新型抗HBV药物分子。

1 材料和方法

1.1 材料 HepG2 2.2.15细胞为HBV DNA(ayr亚型)全基因转染肝癌细胞株, 能稳定分泌HBV表面抗原(HBsAg), 由中国人民解放军广州军区空军医院刘光泽博士惠赠, 右江民族医学院临床生化与分生教研室常规培养于含G418(380 IU/ml)、100 mL/L胎牛血清的DMEM培养基中, 37℃、50 mL/L CO₂条件下每5-6 d传代1次; DMEM培养基、G418等购自GIBCO公司; 胎牛血清购自杭州四季清公司; Lipofectamine™2000购自美国Invitrogen公司; 荧光定量PCR检测HBV DNA试剂盒购自深圳匹基公司; HBV表面抗原(HBsAg)定量检测试剂盒购自苏州新波生物技术有限公司; 时间分辨免疫荧光测定仪购自美国Wallac公司; 实时定量PCR仪购自美国ABI公司。

1.2 方法

1.2.1 反基因LNA与反义LNA的合成与修饰: 从NCBI基因库中搜索到HBV ayr亚型全基因组序列(3.2 kb DNA, NC: 003977.1, GI: 21326584), 利用RNA structure软件针对编码链的2 941-2 962 nt、3 015-3 036 nt和3 089-3 110 nt三个同聚嘌呤区分别设计5条长度不等的反基因寡核苷酸序列: (1)2 941-2 962 nt同聚嘌呤区: 5'-gAAcg-cAgggAccaA-3'(15 bp, 定义为SQ I 1), 5'-gAAcg-cAggggtccaActggA-3'(20 bp, 定义为SQ I 2), 5'-gAAcg-cAggggt ccaA ctgg tgAcgg-3'(25 bp, 定义为SQ I 3), 5'-gaAAcg-cAggggtccaActggtgAcg-gtAagc-3'(30 bp, 定义为SQ I 4), 5'-gaAAcg-cAggggtccaActggtgAcggtaAgcttacc-3'(35 bp, 定义为SQ I 5); (2)3 015-3 036 nt同聚嘌呤区: 5'-AaaTgcTccgcTccT-3'(15 bp, 定义为SQ II 1), 5'-aaaTgcTccgcTccTaccT-3'(20 bp, 定义为SQ II 2), 5'-aaaTgcTccgcTccTaccTgaacg-3'(25 bp, 定义为SQ II 3), 5'-aaaTgcTccgcTccttacc TgaacgAg-gca-3'(30 bp, 定义为SQ II 4), 5'-aaaTgcTccgcTccttaccTgaacgAggcaggcat-3'(35 bp, 定义为SQ II 5); (3)3 089-3 110 nt同聚嘌呤区: 5'-AgTgtTgt-

■ 研究前沿

反基因技术是在反义核酸技术基础上发展起来的一种新型基因治疗技术, 因其能在复制和转录水平发挥阻断作用, 从而成为目前基因治疗研究的热点。但由于外源性寡核苷酸分子在细胞内易被核酸酶降解, 因而寻找增强外源性核酸药物分子稳定性的修饰方法成为目前亟待解决的问题。

■创新盘点

本研究尝试将LNA分子引入针对dsDNA的反基因寡核苷酸分子结构内,以期通过增强外源核酸分子的稳定性以及寻找有效抑制HBV复制的反基因治疗靶位,为HBV反基因治疗研究提供理论与实验依据。

表 1 封闭不同靶位的反基因锁核酸抑制HBV DNA复制的效果 ($\times 10^6$ copies/mL, mean \pm SD, $n = 6$)

分组	0 d	1 d	3 d	5 d	7 d
空白对照	6.102 \pm 0.321	6.105 \pm 0.325	6.110 \pm 0.316	6.108 \pm 0.320	6.112 \pm 0.322
无关序列对照	6.110 \pm 0.332	6.058 \pm 0.360	6.120 \pm 0.352	6.118 \pm 0.348	6.201 \pm 0.355
非同聚嘌呤区序列	6.106 \pm 0.318	5.915 \pm 0.405	5.923 \pm 0.418	6.012 \pm 0.401	5.951 \pm 0.422
2941-2962 nt靶区	6.113 \pm 0.325 ^b	5.024 \pm 0.423 ^b	4.251 \pm 0.434 ^b	3.025 \pm 0.402 ^b	2.181 \pm 0.388 ^b
3015-3036 nt靶区	6.120 \pm 0.344 ^c	5.524 \pm 0.431 ^c	5.102 \pm 0.435 ^c	4.612 \pm 0.429 ^c	3.910 \pm 0.441 ^c
3089-3110 nt靶区	6.118 \pm 0.335 ^e	5.382 \pm 0.415 ^e	4.850 \pm 0.421 ^e	4.258 \pm 0.418 ^e	3.621 \pm 0.425 ^e

^b $P < 0.01$ vs 空白对照、无关序列与非同聚嘌呤区序列; ^c $P < 0.05$ vs 2941-2962 nt靶区; ^e $P < 0.05$ vs 3015-3036 nt靶区。

caAtaTg-3'(15 bp, 定义为SQIII1), 5'-AgTgtTgt-caataTgcccTg-3'(20 bp, 定义为SQIII2), 5'-AgTgtTgtcaataTgcccTgagcct-3'(25 bp, 定义为SQIII3), 5'-agTgtTgtcaataTgcccTgagccTggggc-3'(30 bp, 定义为SQIII4), 5'-agTgtgtgca ataTgcccTgagccTggggcAatg-3'(35 bp, 定义为SQIII5); (4)结合非同聚嘌呤区序列: 5'-AttgggA acagaAagaTtcgTggc-3'(25 bp, 定义为SQIV); (5)无关序列: 5'-ac-taattctgggtatccctaggccg-3'(25 bp, 定义为SQV)。以上各序列中, 5个大写字母代表LNA或硫代修饰, 其余小写字母代表DNA, 下划线部分互补于dsDNA的同聚嘌呤区。各序列经BLAST排除与人同源后由美国Genelink公司合成修饰并纯化。

1.2.2 实验分组与脂质体转染: 本实验设对照组和实验组。对照组包括空白对照组、无关序列组、未修饰寡核苷酸组和结合非同聚嘌呤区序列组。实验组包括: (1)互补2 941-2 962 nt同聚嘌呤区序列(SQ I 1-5): 脂质体-LNA组、脂质体-硫代修饰寡核苷酸组; (2)互补3 015-3 036 nt同聚嘌呤区序列(SQ II 1-5): 脂质体-LNA组、脂质体-硫代修饰寡核苷酸组; (3)互补3 089-3 110 nt同聚嘌呤区序列(SQ III 1-5): 脂质体-LNA组、脂质体-硫代修饰寡核苷酸组。将HepG2 2.2.15细胞按 1×10^5 个/mL接种于96孔培养板, 每孔100 μ L, 共设定34个组, 每组各设6个复孔, 待细胞贴壁后吸取上清液(-20 $^{\circ}$ C保存备用), 分别在各组每孔中一次性加入含LNA或DNA量为10 μ mol/L的DMEM混合液1 mL, 分别于1、3、5、7 d收集各孔培养上清液500 μ L, 保存于-20 $^{\circ}$ C待测。转染按脂质体说明书操作。

1.2.3 培养上清液HBsAg含量测定: 采用时间分辨免疫荧光技术检测, 每个样品重复3次, 取均值, 严格按试剂盒说明书和仪器说明书操作, HBsAg浓度以 μ g/L表示。

1.2.4 培养上清液HBV DNA含量测定: 采用实时

荧光定量聚合酶链反应(FQ-PCR)法检测。取培养上清液50 μ L, 加等量体积DNA提取液, 充分混匀, 100 $^{\circ}$ C恒温处理10 min, 1 200 r/min离心5 min, 取2 μ L上清于PCR反应管中并加入反应液, 总体积共25 μ L。各反应管放入荧光定量PCR仪, 扩增条件: 37 $^{\circ}$ C保温2 min, 94 $^{\circ}$ C预变性3 min, 94 $^{\circ}$ C 5 s, 60 $^{\circ}$ C 40 s, 共35个循环。由计算机软件自动分析所收集的荧光信号并计算出定量结果, 采用计算对数平均值的方法计算HBV DNA平均拷贝数。

1.2.5 LNA对细胞的毒性检测: 采用四甲基偶氮唑盐(MTT)比色法检测LNA对细胞代谢活性的影响。

统计学处理 所有数据均采用mean \pm SD表示, 应用SPSS13.0统计软件处理, 组间比较采用重复测量设计方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。抑制率(%) = (用药前P/N-用药后P/N)/(用药前P/N-2.1) \times 100%。其中P/N表示阳性孔数值/阴性孔数值。

2 结果

2.1 封闭不同靶位的反基因锁核酸抑制HBV DNA复制的效果 LNA加入1 d后, HBV DNA的复制即开始受抑制, 且抑制率随时间呈增高趋势, 7 d后抑制率最高可达64.32%。各实验组与对照组比较差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$), 而封闭2 941-2 962 nt同聚嘌呤区的反基因LNA对HBV DNA复制的抑制效果最明显(表1, 图1)。

2.2 封闭同一靶位的不同反基因寡核苷酸抑制HBV DNA复制的效果 封闭2 941-2 962 nt同一靶位的不同反基因寡核苷酸加入1 d后, 硫代修饰寡核苷酸、锁核酸对HBV DNA的复制开始出现抑制作用, 且抑制率均随时间呈增高趋势。各实验组与对照组比较差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$), 其中, 锁核酸对HBV DNA复制的抑制能力最强(表2, 图2)。

2.3 封闭同一靶位的不同序列长度反基因锁核

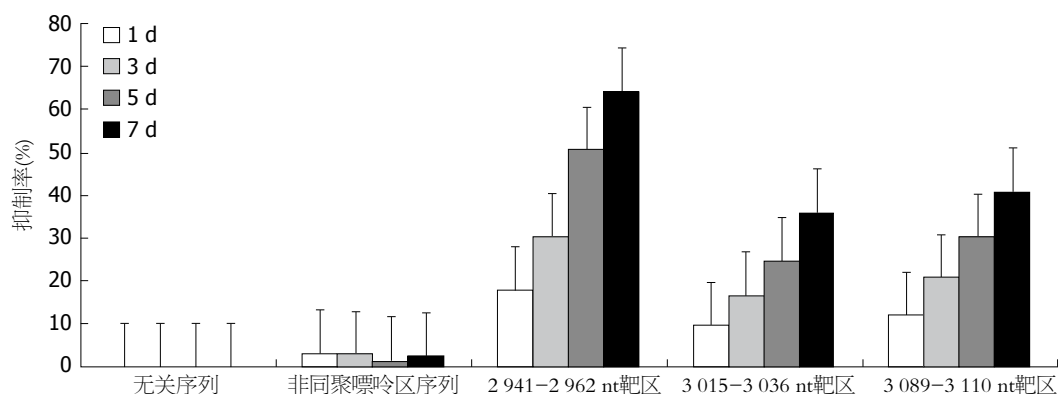


图 1 不同时间内封闭不同靶位的反基因锁核酸对HBV DNA复制的抑制率(%)。

■应用要点

本研究针对HBV *preS1* dsDNA同聚嘌呤区设计合成的反基因锁核酸序列, 体外能有效抑制HBV *preS1*基因的复制与表达, 并筛选出有效治疗靶位和适宜序列长度范围, 可为抗HBV反基因治疗的进一步研究提供理论和实验依据。

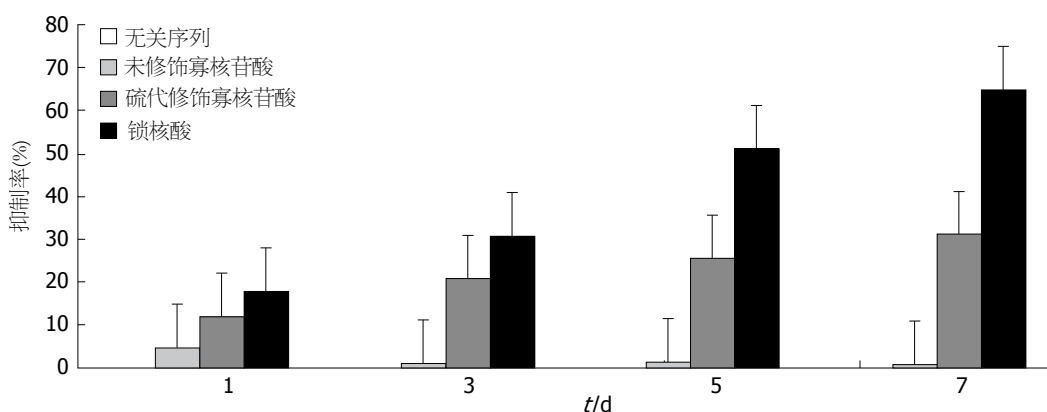


图 2 不同反基因寡核苷酸对HBV DNA复制的抑制率(%)。

表 2 封闭同一靶位的不同反基因寡核苷酸抑制HBV DNA复制的效果 ($\times 10^6$ copies/mL, mean \pm SD, $n = 6$)

分组	0 d	1 d	3 d	5 d	7 d
空白对照	6.102 \pm 0.321	6.105 \pm 0.325	6.110 \pm 0.316	6.108 \pm 0.320	6.112 \pm 0.322
无关序列	6.110 \pm 0.332	6.058 \pm 0.360	6.120 \pm 0.352	6.118 \pm 0.348	6.201 \pm 0.355
未修饰寡核苷酸	6.106 \pm 0.318	5.815 \pm 0.405	6.023 \pm 0.418	6.013 \pm 0.401	6.051 \pm 0.422
硫代修饰寡核苷酸	6.118 \pm 0.335 ^a	5.382 \pm 0.415 ^a	4.850 \pm 0.421 ^a	4.558 \pm 0.418 ^a	4.221 \pm 0.425 ^a
锁核酸	6.113 \pm 0.325 ^c	5.024 \pm 0.423 ^c	4.251 \pm 0.434 ^c	3.025 \pm 0.402 ^c	2.181 \pm 0.388 ^c

^a $P < 0.05$ vs 空白对照、无关序列与未修饰寡核苷酸; ^c $P < 0.05$ vs 硫代修饰寡核苷酸。

酸抑制HBV DNA复制的效果 封闭2 941-2 962 nt同一靶位的不同序列长度反基因锁核酸加入1 d后, 开始对HBV DNA的复制发挥抑制作用, 且抑制率均随时间呈增高趋势, 7 d后抑制率最高可达65.91%。各实验组与对照组比较差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$), 而对HBV DNA复制的抑制作用最强在SQ I 2-SQ I 4组, 即锁核酸序列长度在20-30 bp之间时有最好的抑制效果(表3, 图3)。

2.4 反基因锁核酸对乙型肝炎病毒表面抗原(HBsAg)表达的抑制作用 封闭2 941-2 962 nt同一靶位的不同反基因寡核苷酸加入3 d后, 锁核酸对HBsAg的表达开始发挥抑制作用, 且抑制率均随

时间呈增高趋势, 7 d后抑制率达67.51%。各实验组与对照组比较差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$), 而锁核酸对HBsAg表达的抑制作用最强(表4)。

2.5 MTT法检测锁核酸对细胞代谢的影响 用药7 d后, 采用MTT比色法检测锁核酸组A值为 1.184 ± 0.043 , 与对照组(A值为 1.205 ± 0.038)比较差异无统计学意义($P > 0.05$), 表明实验范围内锁核酸脂质体混合物对细胞代谢基本无影响。

3 讨论

S区是HBV基因的一个重要开放读码框, 包括*preS1*、*preS2*和*S*三个基因, 共同编码的大蛋白

■名词解释

反基因治疗(anti-gene therapy): 由特定寡聚脱氧核苷酸与靶dsDNA同聚嘧啶或同聚嘌呤区专一性结合形成局部三螺旋结构, 阻止靶DNA与聚合酶、转录因子等蛋白结合, 从而实现抑制靶基因复制与表达的目的。为了跟以mRNA单链分子为作用靶位的反义核酸技术相区别, 故称之为反基因技术(或疗法)。

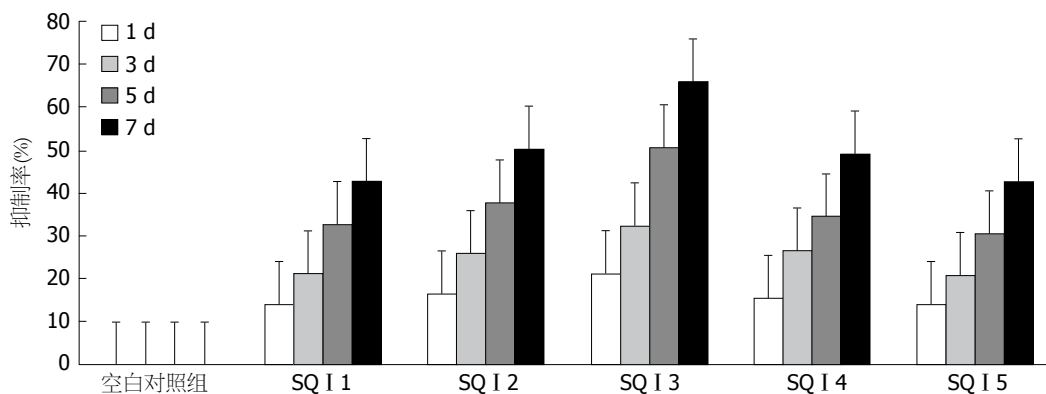


图 3 不同序列长度反基因锁核酸对HBV DNA复制的抑制率(%).

表 3 封闭同一靶位的不同序列长度反基因锁核酸抑制HBV DNA复制的效果 ($\times 10^6$ copies/mL, mean \pm SD, $n = 6$)

分组	0 d	1 d	3 d	5 d	7 d
空白对照	6.102 \pm 0.321	6.105 \pm 0.325	6.110 \pm 0.316	6.108 \pm 0.320	6.112 \pm 0.322
SQ I 1	6.110 \pm 0.332 ^a	5.258 \pm 0.360 ^a	4.820 \pm 0.352 ^a	4.118 \pm 0.348 ^a	3.501 \pm 0.355 ^a
SQ I 2	6.106 \pm 0.318 ^c	5.115 \pm 0.405 ^c	4.523 \pm 0.418 ^c	3.812 \pm 0.401 ^c	3.051 \pm 0.422 ^c
SQ I 3	6.113 \pm 0.325 ^e	4.824 \pm 0.423 ^e	4.151 \pm 0.434 ^e	3.025 \pm 0.402 ^e	2.081 \pm 0.388 ^e
SQ I 4	6.120 \pm 0.344 ^g	5.180 \pm 0.431 ^g	4.502 \pm 0.435 ^g	4.012 \pm 0.429 ^g	3.110 \pm 0.441 ^g
SQ I 5	6.118 \pm 0.335 ⁱ	5.282 \pm 0.415 ⁱ	4.850 \pm 0.421 ⁱ	4.258 \pm 0.418 ⁱ	3.521 \pm 0.425 ⁱ

^{a-ig} $P < 0.05$ vs 空白对照组; ^e $P < 0.05$ vs SQ I 1, SQ I 2, SQ I 4与SQ I 5.

表 4 封闭同一靶位的不同反基因寡核苷酸对HBsAg表达的抑制作用 (μ g/L, mean \pm SD, $n = 6$)

分组	0 d	1 d	3 d	5 d	7 d
空白对照	223.45 \pm 2.321	222.38 \pm 2.325	223.64 \pm 2.316	227.41 \pm 2.320	224.31 \pm 2.322
无关序列	226.51 \pm 2.332	225.48 \pm 2.360	224.71 \pm 2.352	223.87 \pm 2.348	224.55 \pm 2.355
未修饰寡核苷酸	225.45 \pm 2.318	221.32 \pm 2.405	230.15 \pm 2.418	226.78 \pm 2.401	224.55 \pm 2.422
硫代修饰寡核苷酸	224.46 \pm 2.335 ^a	201.11 \pm 2.415 ^a	169.41 \pm 2.421 ^a	154.33 \pm 2.418 ^a	125.28 \pm 2.425 ^a
锁核酸	226.5 \pm 2.325 ^c	186.30 \pm 2.423 ^c	154.50 \pm 2.434 ^c	110.40 \pm 2.402 ^c	73.62 \pm 2.388 ^c

^a $P < 0.05$ vs 空白对照、无关序列与未修饰寡核苷酸; ^c $P < 0.05$ vs 硫代修饰寡核苷酸。

质分子是HBV表面抗原(hepatitis B virus surface antigen, HBsAg)的主要组成部分, 不仅参与病毒的复制、转录、装配和分泌过程, 还与病毒感染引起的细胞及体液免疫应答反应有密切关系。本研究针对HBV *preS1* dsDNA编码链的2 941-2 962 nt、3 015-3 036 nt和3 089-3 110 nt三个同聚嘌呤区设计合成5条序列长度不等的反基因锁核酸分子, 由阳离子脂质体介导转染HepG2 2.2.15细胞株, 通过检测细胞培养上清液中的HBV DNA和HBsAg含量等指标来评价其疗效。结果显示, 封闭2 941-2 962 nt同聚嘌呤区的反基因锁核酸分子, 体外抑制*preS1*基因复制与表达的作用最强, 抑制率分别为HBV DNA 65.91%、HBsAg 67.51%, 且抑制作用随时间呈递

增趋势。不同序列长度锁核酸对HBV DNA复制的抑制效果实验结果显示, 锁核酸分子的序列长度在20-30 bp时有最好的抑制效果, 这说明只有序列长度合适的锁核酸分子, 才能有效通过核孔进入细胞核内, 识别并结合到HBV dsDNA的同聚嘌呤或同聚嘧啶靶区形成三链杂交分子, 从而“封闭”病毒靶基因的复制和表达, 这为HBV反基因治疗研究提供了理论与实验依据。然而, 由于HBV DNA聚合酶缺乏校对功能, 在病毒复制过程中容易产生变异株而导致病毒对药物治疗敏感性下降或耐药现象, 因此, 尚需要研究多基因靶位抗HBV药物或疗法。此外, MTT检测结果证实锁核酸对细胞的代谢活性无明显毒性作用。

总之, 针对*preS1* dsDNA同聚嘌呤区的反基

因锁核酸分子, 体外能有效抑制HBV的复制, 以封闭2 941-2 962 nt靶位效果最强, 且合适序列长度在20-30 bp之间, 这既为HBV治疗提供有效靶位, 也为反基因治疗提供理论和实验依据。

4 参与文献

- 1 Crouzier L, Dubois C, Edwards SL, Lauridsen LH, Wengel J, Veedu RN. Efficient reverse transcription using locked nucleic acid nucleotides towards the evolution of nuclease resistant RNA aptamers. *PLoS One* 2012; 7: e35990
- 2 Hildebrandt-Eriksen ES, Aarup V, Persson R, Hansen HF, Munk ME, Orum H. A Locked Nucleic Acid Oligonucleotide Targeting MicroRNA 122 Is Well-Tolerated in Cynomolgus Monkeys. *Nucleic Acid Ther* 2012; 22: 152-161
- 3 Mishra S, Ghosh S, Mukhopadhyay R. Ordered self-assembled locked nucleic acid (LNA) structures on gold(111) surface with enhanced single base mismatch recognition capability. *Langmuir* 2012; 28: 4325-4333
- 4 Robertson KL, Vora GJ. Locked nucleic acid flow cytometry-fluorescence in situ hybridization (LNA flow-FISH): a method for bacterial small RNA detection. *J Vis Exp* 2012; (59): e3655
- 5 Hull C, Szewczyk C, St John PM. Effects of locked nucleic acid substitutions on the stability of oligonucleotide hairpins. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* 2012; 31: 28-41
- 6 Owczarzy R, You Y, Groth CL, Tataurov AV. Stability and mismatch discrimination of locked nucleic acid-DNA duplexes. *Biochemistry* 2011; 50: 9352-9367
- 7 Bhattacharyya J, Maiti S, Muhuri S, Nakano S, Miyoshi D, Sugimoto N. Effect of locked nucleic acid modifications on the thermal stability of noncanonical DNA structure. *Biochemistry* 2011; 50: 7414-7425
- 8 Doessing H, Vester B. Locked and unlocked nucleosides in functional nucleic acids. *Molecules* 2011; 16: 4511-4526
- 9 Zhang Y, Qu Z, Kim S, Shi V, Liao B, Kraft P, Bandaru R, Wu Y, Greenberger LM, Horak ID. Downmodulation of cancer targets using locked nucleic acid (LNA)-based antisense oligonucleotides without transfection. *Gene Ther* 2011; 18: 326-333
- 10 Chabot S, Orio J, Castanier R, Bellard E, Nielsen SJ, Golzio M, Teissie J. LNA-based Oligonucleotide Electrotransfer for miRNA Inhibition. *Mol Ther* 2012 May 22. [Epub ahead of print]
- 11 Johannsen MW, Veedu RN, Madsen AS, Wengel J. Enzymatic polymerisation involving 2'-amino-LNA nucleotides. *Bioorg Med Chem Lett* 2012; 22: 3522-3526
- 12 Chaubey AK, Dubey KD, Ojha RP. Stability and free energy calculation of LNA modified quadruplex: a molecular dynamics study. *J Comput Aided Mol Des* 2012; 26: 289-299
- 13 Sun Z, Xiang W, Guo Y, Chen Z, Liu W, Lu D. Inhibition of hepatitis B virus (HBV) by LNA-mediated nuclear interference with HBV DNA transcription. *Biochem Biophys Res Commun* 2011; 409: 430-435
- 14 Moschos SA, Frick M, Taylor B, Turnpenny P, Graves H, Spink KG, Brady K, Lamb D, Collins D, Rockel TD, Weber M, Lazari O, Perez-Tosar L, Fancy SA, Laphorn C, Green MX, Evans S, Selby M, Jones G, Jones L, Kearney S, Mechiche H, Gikunju D, Subramanian R, Uhlmann E, Jurk M, Vollmer J, Ciaramella G, Yeadon M. Uptake, efficacy, and systemic distribution of naked, inhaled short interfering RNA (siRNA) and locked nucleic acid (LNA) antisense. *Mol Ther* 2011; 19: 2163-2168
- 15 Ivanova MI, Shivarov VS, Hadjiev EA, Naumova EJ. Novel multiplex bead-based assay with LNA-modified probes for detection of MPL exon 10 mutations. *Leuk Res* 2011; 35: 1120-1123
- 16 Seth PP, Allerson CR, Siwkowski A, Vasquez G, Berdeja A, Migawa MT, Gaus H, Prakash TP, Bhat B, Swayze EE. Configuration of the 5'-Methyl Group Modulates the Biophysical and Biological Properties of Locked Nucleic Acid (LNA) Oligonucleotides. *J Med Chem* 2010 Nov 8. [Epub ahead of print]
- 17 Diercks S, Gescher C, Metfies K, Medlin LK. Evaluation of locked nucleic acids for signal enhancement of oligonucleotide probes for microalgae immobilized on solid surfaces. *J Appl Phycol* 2009; 21: 657-668
- 18 Chlebowski R. Lifestyle change including dietary fat reduction and breast cancer outcome. *J Nutr* 2007; 137: 233S-235S
- 19 Yang CJ, Wang L, Wu Y, Kim Y, Medley CD, Lin H, Tan W. Synthesis and investigation of deoxyribonucleic acid/locked nucleic acid chimeric molecular beacons. *Nucleic Acids Res* 2007; 35: 4030-4041
- 20 Brunet E, Corgnani M, Cannata F, Perrouault L, Giovannangeli C. Targeting chromosomal sites with locked nucleic acid-modified triplex-forming oligonucleotides: study of efficiency dependence on DNA nuclear environment. *Nucleic Acids Res* 2006; 34: 4546-4553
- 21 Levin JD, Fiala D, Samala MF, Kahn JD, Peterson RJ. Position-dependent effects of locked nucleic acid (LNA) on DNA sequencing and PCR primers. *Nucleic Acids Res* 2006; 34: e142
- 22 Johnson MP, Haupt LM, Griffiths LR. Locked nucleic acid (LNA) single nucleotide polymorphism (SNP) genotype analysis and validation using real-time PCR. *Nucleic Acids Res* 2004; 32: e55
- 23 Crinelli R, Bianchi M, Gentilini L, Palma L, Sørensen MD, Bryld T, Babu RB, Arar K, Wengel J, Magnani M. Transcription factor decoy oligonucleotides modified with locked nucleic acids: an in vitro study to reconcile biostability with binding affinity. *Nucleic Acids Res* 2004; 32: 1874-1885
- 24 Sørensen JJ, Nielsen JT, Petersen M. Solution structure of a dsDNA: LNA triplex. *Nucleic Acids Res* 2004; 32: 6078-6085
- 25 Hertoghs KM, Ellis JH, Catchpole IR. Use of locked nucleic acid oligonucleotides to add functionality to plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 2003; 31: 5817-5830
- 26 邓益斌, 张梁, 王燕菲. HBV S基因反义锁核酸抑制病毒体外复制. *基础医学与临床* 2010; 30: 360-363
- 27 邓益斌, 农乐根, 黄炜, 潘国刚, 王燕菲. 乙型肝炎病毒 S/C基因位点反义锁核酸在小鼠体内抗病毒疗效研究. *中华肝脏病杂志* 2009; 17: 900-904
- 28 邓益斌, 农乐根, 王燕菲. HBV S基因的反义锁核酸对乙型肝炎转基因小鼠HBV复制和表达的影响. *世界华人消化杂志* 2009; 17: 2338-2445
- 29 邓益斌, 王燕菲. 针对HBV S基因mRNA反义锁核酸设计及其在2.2.15细胞内的抗病毒作用. *世界华人消化杂志* 2009; 17: 3497-3501
- 30 张梁, 邓益斌, 邓巧莹. HBV preS2反义锁核酸在HepG2 2.2.15细胞内的抗病毒效果. *世界华人消化杂志* 2009; 17: 3720-3724

同行评价

本研究发现反基因LNA分子能够有效抑制HepG2.2.15细胞的HBV复制和病毒蛋白表达, 对开展HBV的反基因治疗具有一定的意义, 具有较好的学术价值。

大鼠结肠上皮细胞分离及培养方法的建立

祁燕, 李燕舞, 王汝俊, 唐立海, 米红

■背景资料

细胞模型是研究结肠黏膜生理及病理的重要手段, 目前研究采用的细胞株在形态及功能方面和正常结肠上皮细胞存在差异, 不利于机体生理病理反应及药物作用的分析。

祁燕, 李燕舞, 王汝俊, 唐立海, 米红, 广州中医药大学脾胃研究所 广东省广州市 510405

祁燕, 在读博士, 主要从事中药药理研究。

国家自然科学基金资助项目, No. 30772754

作者贡献分布: 此课题由王汝俊设计; 操作过程由祁燕、李燕舞、唐立海及米红完成; 祁燕与李燕舞完成论文的撰写。

通讯作者: 王汝俊, 教授, 510405, 广东省广州市机场路12号, 广州中医药大学脾胃研究所. pwwrj123456@yahoo.com.cn
电话: 020-36585078

收稿日期: 2012-04-09 修回日期: 2012-06-26

接受日期: 2012-07-20 在线出版日期: 2012-08-08

Establishment of a method for isolation and primary culture of rat colonic epithelial cells

Yan Qi, Yan-Wu Li, Ru-Jun Wang, Li-Hai Tang, Hong Mi

Yan Qi, Yan-Wu Li, Ru-Jun Wang, Li-Hai Tang, Hong Mi, Piwei Institute, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, Guangdong Province, China
Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30772754

Correspondence to: Ru-Jun Wang, Professor, Piwei Institute, Guangzhou University of Chinese Medicine, 12 Jichang Road, Guangzhou 510405, Guangdong Province, China. pwwrj123456@yahoo.com.cn
Received: 2012-04-09 Revised: 2012-06-26

Accepted: 2012-07-20 Published online: 2012-08-08

Abstract

AIM: To establish a method for isolation and primary culture of rat colonic epithelial cells which can be used as an ideal cell model for the study of colonic epithelial morphology and function *in vitro*.

METHODS: Colons obtained from suckling rats (6-15 d) were cut into small pieces, washed, and digested with 0.1% collagenase I and hyaluronidase for 25 min at 37 °C to separate colonic epithelial cell clusters. After digestion, the supernatant was transferred into a new tube and DMEM medium was added. After centrifuging 3 times, cells were cultured in DMEM solution containing 100 mL/L fetal bovine serum in a CO₂ incubator with a saturated humidity at 37 °C. Fibroblasts were removed using phase difference digestion and adherence. When 80%-90% of the cells were adherent to culture plates, cells were passaged by trypsin digestion.

RESULTS: Colonic epithelial cell clusters were successfully obtained, which showed high viability and became adherent after 24 hours of culture. The cells were typically polygonal in shape and grew into pavement-like monolayers gradually in 4-8 days, showing excellent proliferative ability. Fibroblasts were significantly decreased after several passages. The colonic epithelial cells were identified by the ways of immunofluorescence staining and TEM observation. The cells were in good condition after being frozen and thawed.

CONCLUSION: The above mentioned method allows establishing stable primary colonic epithelial cell lines, which could provide an *in vitro* platform for the study of colonic epithelial physiology and pathology.

Key Words: Colonic epithelial cells; Primary culture; Cell lines

Qi Y, Li YW, Wang RJ, Tang LH, Mi H. Establishment of a method for isolation and primary culture of rat colonic epithelial cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2012; 20(22): 2030-2035

摘要

目的: 建立大鼠结肠上皮细胞的原代培养方法, 为结肠上皮形态及功能研究提供理想的细胞模型。

方法: 采用6-15日龄乳鼠, 取结肠剪碎、反复清洗后, 弃上清, 加10 mL、0.1% I型胶原酶和透明质酸酶联合配制的消化液, 37 °C消化25 min, 分离上皮细胞团; 吹打消化液, 取上清, 加入培养基重悬反复离心3次后, 细胞沉淀接种于含100 mL/L胎牛血清的完全培养基中, 37 °C、50 mL/L CO₂细胞培养箱中培养。采用差速贴壁法及相差消化法去除成纤维细胞, 细胞贴壁长满瓶80%-90%后用2.5 g/L的胰酶消化液消化并传代。

结果: 成功分离结肠上皮细胞团且活力较高。24 h后可见部分细胞团贴壁, 贴壁细胞为多角形, 4-8 d逐渐融合成片, 呈现明显的“铺路石”样。细胞经传代处理后成纤维细胞明显减

■同行评议者

许剑民, 教授, 上海市复旦大学附属中山医院普外科

少. 免疫荧光染色及透射电镜观察鉴定为上皮细胞. 冻存处理复苏后细胞状态较佳.

结论: 通过该法可建立较稳定的大鼠结肠上皮细胞原代培养体系, 为结肠上皮生理、病理及药物作用机制提供了体外研究平台.

关键词: 结肠上皮细胞; 原代培养; 细胞系

祁燕, 李燕舞, 王汝俊, 唐立海, 米红. 大鼠结肠上皮细胞分离及培养方法的建立. 世界华人消化杂志 2012; 20(22): 2030-2035
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/2030.asp>

0 引言

结肠上皮细胞是结肠黏膜屏障的主要结构基础, 是内外信息传导的重要组成部分, 能分泌多种细胞因子, 促进结肠黏膜损伤后的修复及促进免疫耐受. 结肠上皮细胞受损及功能的缺失会导致多种疾病的产生. 目前, 对肠上皮细胞的离体实验研究多采用细胞株进行^[1-5], 如: colorectal cancer cell line(Caco2)、human colon adenocarcinoma(HT-29)、intestinal epithelial cells(IEC-6)等, 这些细胞株或来源于肿瘤细胞, 或经过永生化处理, 在形态及功能方面和正常结肠上皮细胞存在差异, 不利于机体生理病理反应及药物作用的分析. 原代细胞具有直接来源于机体组织, 生物性状尚未发生变化的优势, 然而分离培养技术是一个难题, 限制了其应用. 因此, 建立可靠稳定的结肠上皮细胞原代培养方法, 在一定周期内使之成为研究结肠上皮生理和病理机制的实验平台, 对结肠疾病的病机及防治研究具有重要意义. 本实验室在参考国内外文献的基础上, 建立了较稳定的大鼠结肠上皮细胞原代培养方法.

1 材料和方法

1.1 材料 出生6-15日龄SD大鼠, 购自广东省实验动物中心, 许可证号SCXK(粤)2008-0002, 每次培养取5只新生乳鼠, 雌雄均可. DMEM高糖培养基(Gibco), 重组人表皮生长因子(PeproTech), 肝素钠(Sigma), 胰岛素(sigma), 牛垂体提取物(Gibco), 透明质酸酶(Sigma), I型胶原酶(Gibco), 兔抗大鼠多克隆角蛋白CK-20抗体(Bioworld). 3110 Series II二氧化碳培养箱(美国thermo公司), HITACHI H-600电子显微镜(日本日立)TH4-200型荧光倒置显微镜(日本OLYMPUS).

1.2 方法

1.2.1 完全培养基配制^[6,7]: DMEM高糖培养基添

加100 mL/L胎牛血清, 10 μ g/L重组人表皮生长因子, 100 mg/L肝素钠, 青、链霉素混合液, 200 U/L胰岛素, 5 mg/L牛垂体提取物, 混匀后4 $^{\circ}$ C保存. 酶消化液: 透明质酸酶及I型胶原酶混合配制, 终浓度为0.1%, 现用现配.

1.2.2 大鼠结肠上皮细胞分离、培养及传代: 参照翟荣林和叶章群等^[8,9]的方法并加以改进. 取6-15日龄乳鼠5只, 脱颈椎处死, 无菌条件下取出结肠, 置于培养皿中去除肠系膜, 纵向剖开结肠去除肠内容物, 清洗液反复清洗结肠组织并剪碎成约1 mm³大小的组织块, 转移至50 mL离心管中, 反复吹打清洗至澄清, 吸弃上清, 再加入适量清洗液室温静置30 min; 弃上清, 加10 mL酶消化液, 37 $^{\circ}$ C水浴震荡消化25 min; 消化完毕吸管反复吹打5 min, 见消化液变浑浊, 室温静置1 min; 取上清, 加等量培养基于上清中, 1 000 r/min离心5 min, 弃上清, 沉淀加10 mL培养基重悬后同速离心; 如此重复3次后, 沉淀加适量培养基重悬, 台盼蓝染色, 光镜下观察细胞活力并计数后, 适当浓度接种于25 cm²细胞培养瓶, 37 $^{\circ}$ C、50 mL/L CO₂培养箱中培养. 90 min后吸出未贴壁的细胞及培养基转移至另1培养瓶中, 于第1瓶培养瓶中添加培养基后, 2瓶均放回培养箱继续培养, 约第5-6天见大量细胞贴壁后更换培养液. 约10 d细胞贴壁长满瓶80%-90%. 传代时加入0.25%胰酶消化, 光镜下观察到成纤维细胞快速收缩变圆飘起时, 倒弃消化液, 并用PBS清洗培养瓶后, 加入0.25%胰酶再次消化后传代接种于新培养瓶. 此过程进一步去除成纤维细胞^[10]. 光镜下观察细胞形态及生长状态.

1.2.3 大鼠结肠上皮细胞鉴定: (1)免疫荧光染色法鉴定^[7,11,12]: CK-20是肠上皮细胞表面特异性标记物之一, 本实验采用免疫荧光化学法鉴定结肠上皮细胞. 将结肠上皮细胞接种在6孔板中培养爬片, 待玻片铺满细胞后取出, PBS洗细胞爬片3次, 中性甲醛固定30 min, 免疫组织化学笔画圈. PBS洗涤3次, 加入2 g/L Triton X-100作用15 min, 山羊血清封闭30 min, 滴加兔抗大鼠多克隆角蛋白CK20抗体(1:50)稀释, 4 $^{\circ}$ C过夜. PBS洗涤3次, 加入二抗为生物素化羊抗兔IgG, 室温孵育2 h后, 加荧光标记SABC-Cy3室温避光孵育1 h, PBS洗涤3次, DAPI避光染色15 min, PBS洗涤3次, 缓冲甘油封片, 荧光显微镜观察; (2)透射电镜观察^[13,14]: 常规消化收集细胞, 高速离心, 弃尽上清, 加入2.5%戊二醛, 固定管底细胞团块, 24 h后移入磷酸盐缓冲液(pH 7.2)中漂洗2次, 每次10 min,

■ 研究前沿

原代结肠上皮细胞培养体系的建立是结肠黏膜相关研究的基础, 也是一个难题. 建立可靠稳定的结肠上皮细胞原代培养方法, 在一定周期内使之成为研究结肠上皮生理和病理机制的实验平台, 对结肠疾病的病机及防治研究具有重要意义.

■相关报道

在对肠道上皮细胞的分离培养研究中,目前多集中在小肠上皮细胞的培养方面,结肠上皮细胞的分离培养报道相对较少。翟荣林等采用嗜热菌蛋白酶法分离大鼠结肠上皮细胞并培养,但未见细胞传代及后续报道。

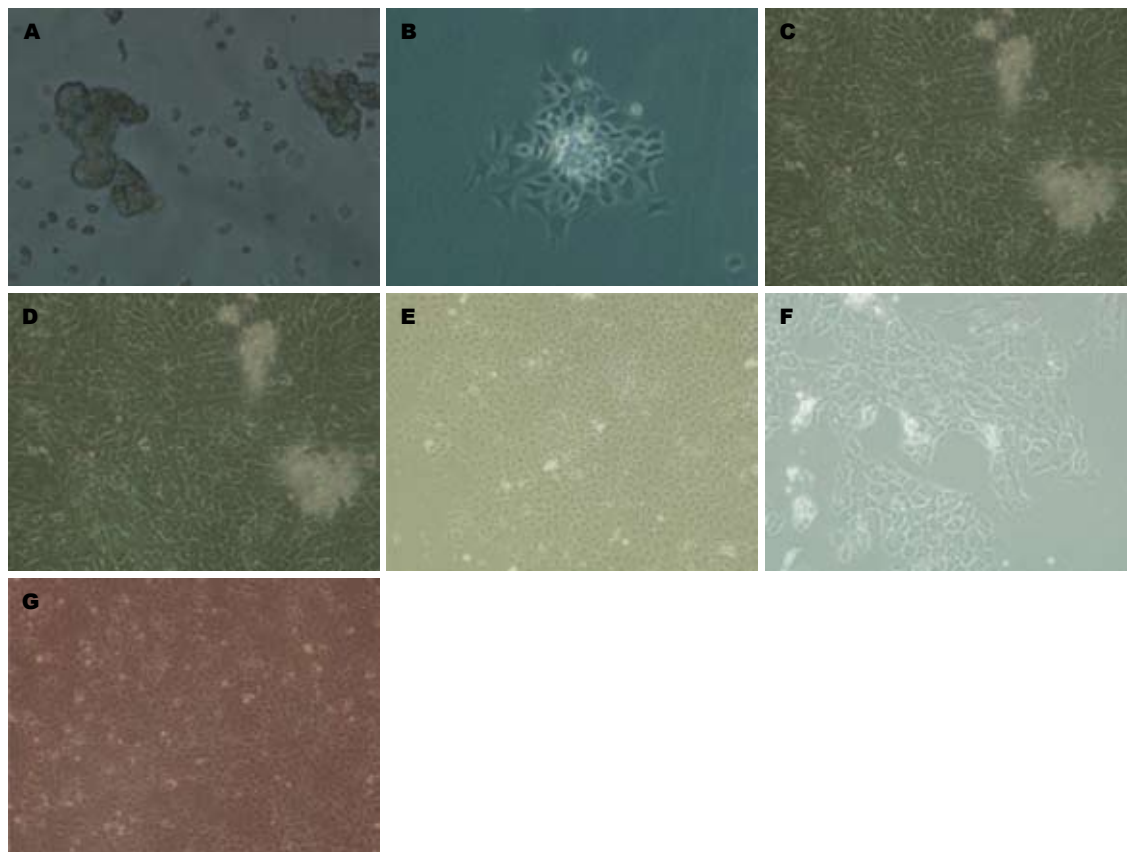


图1 大鼠结肠上皮细胞. A: 分离细胞及细胞团($\times 200$); B: 24 h后细胞团贴壁($\times 200$); C: 铺路石样上皮细胞($\times 200$); D: 少量成纤维细胞混杂($\times 200$); E: 传代后上皮细胞($\times 100$); F: 传代后上皮细胞($\times 200$); G: 冻存复苏后上皮细胞($\times 100$).

再将标本置于1%锇酸溶液中后固定1-2 h, 以前法漂洗后, 乙醇、丙酮梯度脱水, 100%丙酮、环氧树脂Epon812包埋剂置换40 min, 包埋、超薄切片机切片、染色后透射电镜观察并拍照($\times 5\,000$).

1.2.4 大鼠结肠上皮细胞生长曲线: 采用MTT法建立原代结肠上皮细胞生长曲线^[15,16]. 取第2代原代培养的结肠上皮细胞, 以 $2 \times 10^4/\text{mL}$ 的密度接种于96孔板中, 每孔200 μL , 5个平行复孔. 同时设不含细胞的空白对照孔, 在37 $^{\circ}\text{C}$ 、50 mL/L CO_2 培养箱中分别培养24、48、72、96、120、144 h后, 弃原培养基, 更换不含血清培养基180 μL 并每孔加入5 g/L MTT溶液20 μL , 37 $^{\circ}\text{C}$ 继续孵育4 h后, 小心吸弃孔内培养上清液, 每孔加入150 μL 二甲基亚砜, 室温振荡10 min使结晶物充分溶解. 在570 nm波长, 酶联免疫检测仪上测定各孔吸光度(A)值, 记录结果. 以时间为横轴, 细胞孔测定A平均值减空白孔测定A平均值为纵轴绘制细胞生长曲线.

2 结果

2.1 结肠上皮细胞形态学观察 采用I型胶原酶和透明质酸酶联合消化分离大鼠结肠上皮细胞,

光镜下观察可见分离的单个细胞及细胞团透亮, 细胞活力较高; 24 h后可见部分细胞团贴壁生长; 4-8 d形成小片状集落, 并逐渐融合成片, 细胞多呈明显的“铺路石”样, 也可见细胞多角形或短梭形, 细胞界限清晰, 胞浆丰富, 胞核较大, 核仁1-2个, 部分可见成纤维细胞和上皮细胞夹杂生长. 第1代细胞经传代纯化处理后上皮细胞纯度大为提高, 细胞以1:2传至第2代时仍然生长良好, 传代后的细胞贴壁生长较快, 第6天即可贴壁长满培养瓶80%-90%; 第2代细胞经冻存、复苏后, 细胞状态较佳, 形态规则, 次日细胞即大量贴壁生长(图1).

2.2 结肠上皮细胞鉴定

2.2.1 免疫荧光鉴定: 通过免疫荧光染色, 采用荧光显微镜观察, 绝大多数细胞胞浆呈现出亮红色荧光, 为细胞角蛋白表达阳性的上皮细胞, 胞核呈现蓝色荧光(图2).

2.2.2 电镜观察: 透射电镜下观察可见细胞表面有丰富细长微绒毛, 胞质丰富, 胞质内细胞器较丰富, 可见内质网、线粒体、核糖体, 并有高、中等电子密度分泌颗粒(图2).

2.2.3 结肠上皮细胞生长曲线: 细胞接种后2-5 d

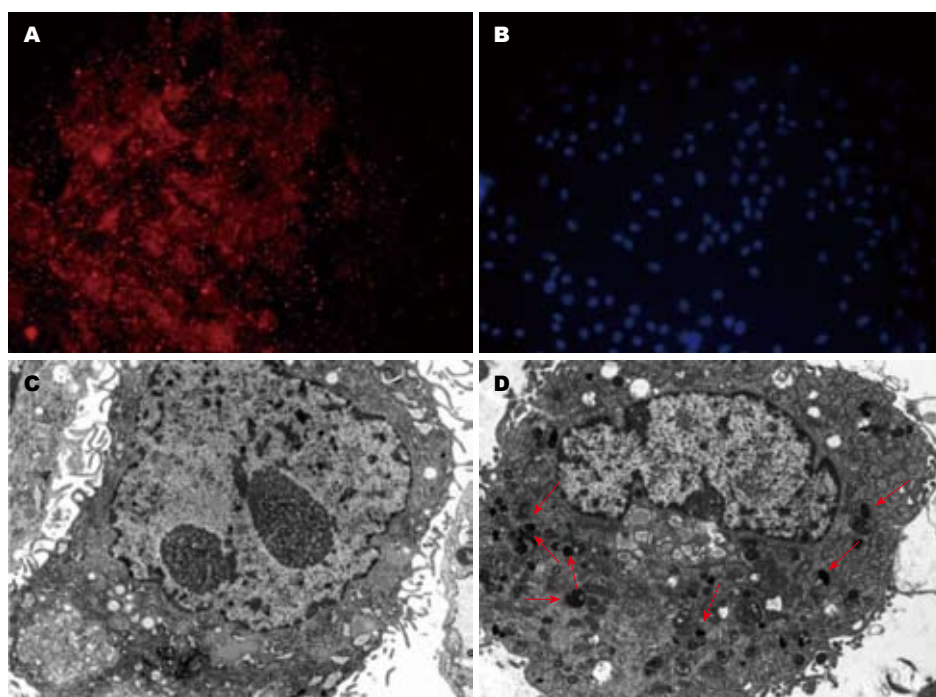


图2 大鼠结肠上皮细胞鉴定图. A: 胞浆角蛋白阳性染色(红色 $\times 200$); B: 细胞核染色($\times 200$); C: 上皮细胞超微结构, 可见丰富的微绒毛、线粒体及内质网($\times 5\,000$); D: 上皮细胞超微结构, 箭头示分泌颗粒($\times 5\,000$).

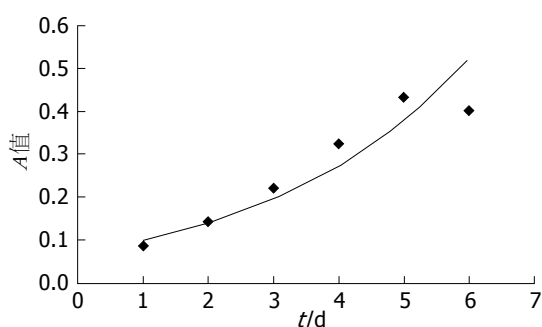


图3 大鼠结肠上皮细胞生长曲线.

处于指数增生期, 第6天开始细胞增殖基本处于停滞状态. 提示细胞接种后2-5 d是一代细胞活性最好的阶段, 是进行各种实验的最佳时机(图3).

3 讨论

在对肠道上皮细胞的分离培养研究中, 目前多集中在小肠上皮细胞的培养方面^[17-19], 结肠上皮细胞的分离培养报道相对较少^[20,21]. 本实验室参考国内外文献, 建立了较为稳定的大鼠结肠上皮细胞原代培养体系. 有以下方面值得注意.

首先, 动物的选择. 采用出生6-15日龄乳鼠, 此时为肠上皮细胞发育早期, 上皮细胞主要为干细胞和短暂分裂细胞, 细胞较易贴壁、增殖生长^[22]; 出生6 d的大鼠已形成钝绒毛, 隐窝尚未发育好, 在联合酶消化后再轻轻吹打, 即可释放大量的绒毛隐窝单位^[23], 且由于肠腔内微生物

相对较少, 可减少细胞消化分离过程中微生物的污染. 在本研究的前期试验中, 我们也采用了成年大鼠结肠进行分离培养, 但细胞贴壁较慢, 状态欠佳, 在培养过程中, 细胞逐渐崩解为碎片, 死亡.

第二, 消化酶的选择. 分离肠上皮细胞多选用的酶有嗜热菌蛋白酶、中性蛋白酶、胶原酶、透明质酸酶等. 不同酶单一或者联合运用, 经过不同的消化时间, 均能达到不同的分离效果. 此外, 也有报道用DTT及EDTA处理获取肠上皮细胞团^[24]. 胶原酶作用温和, 且能抑制成纤维细胞的生长, 因此在肠上皮细胞的分离中常和不同的酶联合运用, 可分离获取较多肠上皮细胞团^[25-27]. 本实验室采用I型胶原酶和透明质酸酶联合37℃震荡消化25 min后, 通过反复吹打从而促进上皮细胞团从组织脱离; 同时利用重复静置沉降、离心等步骤, 有利于去除组织及细胞碎片获得大量活力较好的单个细胞或细胞团.

第三, 上皮细胞的生长. 肠腔对外开放且富含微生物, 细胞分离及培养过程中一定要避免污染. 取材时, 要用含双抗的清洗液反复冲洗结肠组织, 直至上清液澄清, 整个操作过程在超净台内进行. 上皮细胞贴壁生长对培养基底物要求甚高, 使用适当的细胞黏附基质是促进其体外增殖和保持分化特性的重要因素. 多聚赖氨

■创新盘点

本实验室建立了较稳定的大鼠结肠上皮细胞培养方法, 并从动物、消化酶的选择、细胞纯化、鉴定、生长及传代、细胞冻存及复苏等多个方面进行了探讨, 结果可靠.

■应用要点

大鼠结肠上皮细胞原代培养方法的建立及其传代培养为结肠上皮屏障功能及药物作用机制的研究提供了较好的平台。原代结肠上皮细胞来源于体内组织,更能真实反应机体生理和病理变化,对结肠疾病的病机及防治研究具有重要意义。

酸、I型鼠尾胶原常用来包被细胞培养瓶或皿以促进上皮细胞的贴壁生长。在实验中,我们采用了含200 mL/L血清的培养基留置培养瓶于培养箱中,使用时倒弃培养基。细胞接种后也可促进上皮细胞贴壁生长,且操作相对其他包被方式简单。培养基的质量及成分是促进上皮细胞生长的关键因素,在含100 mL/L胎牛血清的基础培养基中添加表皮生长因子、胰岛素、牛垂体提取物,可协同促进细胞有丝分裂从而促进上皮细胞的增殖,添加肝素可抑制平滑肌样细胞的生长。经过原代培养期、传代培养期的观察,发现大鼠(乳鼠)结肠上皮细胞体外培养并传代,这可能与培养基中添加了各种有利于促进上皮细胞生长增殖的营养物质有关。同时在细胞培养传代操作中动作轻缓,尽量减少吹打或其他操作对细胞的损伤。对细胞的原代培养至第1次传代前可持续2 wk。培养细胞的一代生存期为6 d左右,其中2-5 d为细胞指数增殖期,是进行各种实验的最佳时期。

第四,上皮细胞的纯化。在上皮细胞的培养中常存在成纤维细胞的混杂,因此纯化过程是上皮细胞培养中的关键环节。首先,我们在接种细胞90 min后,将原瓶培养基及未贴壁细胞转移至另1培养瓶;成纤维细胞和上皮细胞对酶的耐受性有差异,在细胞传代时,采用胰酶消化,镜下见细胞收缩后,立即终止消化,PBS清洗培养瓶后,加入胰酶再次消化后传代接种于新培养瓶。经上述步骤处理后,可显著减少成纤维细胞,上皮细胞出现铺路石样生长。实验中我们发现,当第1代细胞培养瓶中存在适量成纤维细胞时,上皮细胞的贴壁生长相对较快,且上皮细胞多在成纤维细胞周围贴壁生长,可见成纤维细胞的存在可促进上皮细胞的增殖生长。这和肠细胞培养的相关报道一致^[28]。其原因在于基质中的成纤维细胞能分泌一种基质成纤维细胞因子,他能特异性促进角膜上皮细胞DNA的起始合成和细胞增生,并提供上皮基底细胞贴附和分化的物理底物如胶原和纤黏素等^[29]。同时我们对90 min后转瓶的细胞和不转瓶的细胞进行比较,发现转瓶后成纤维细胞量明显较少,原瓶中也见上皮细胞贴壁生长。传代后的细胞在生长过程,形态不一,或大或小、或呈多角形、或呈短梭形,提示上皮隐窝干细胞可分化为不同的结肠上皮,更有利于反应机体的生理性状。

第五,上皮细胞的冻存、复苏。在培养过程中细胞传至第2代时对细胞进行冻存处理,以观

察细胞复苏后细胞生长状态及活力。复苏后第2天即可看到细胞贴壁生长,且状态较佳。在整个细胞培养过程中细胞生长周期已超过1 mo。这可能与乳鼠细胞增殖分化能力强,且培养基中含有能促进及维持上皮细胞生长的多种生长因子相关。原代结肠上皮细胞冻存、复苏的成功为后续的相关实验研究提供较好的基础。

总之,大鼠结肠上皮细胞原代培养方法的建立及其传代培养为结肠上皮屏障功能及药物作用机制的研究提供了较好的平台。原代结肠上皮细胞来源于体内组织,更能真实反应机体生理和病理变化,对结肠疾病的病机及防治研究具有重要意义。该培养方法仍需不断完善和优化,为后续开展是否能继续传代及其活力和功能研究,以及多细胞共培养及结肠上皮形态、功能研究提供基础。

4 参考文献

- 1 Degagné E, Grbic DM, Dupuis AA, Lavoie EG, Langlois C, Jain N, Weisman GA, Sévigny J, Gendron FP. P2Y2 receptor transcription is increased by NF-kappa B and stimulates cyclooxygenase-2 expression and PGE2 released by intestinal epithelial cells. *J Immunol* 2009; 183: 4521-4529
- 2 Duany RK, Rajput YS, Batish VK, Grover S. Assessing the adhesion of putative indigenous probiotic lactobacilli to human colonic epithelial cells. *Indian J Med Res* 2011; 134: 664-671
- 3 Gao Q, Qi L, Wu T, Wang J. An important role of interleukin-10 in counteracting excessive immune response in HT-29 cells exposed to *Clostridium butyricum*. *BMC Microbiol* 2012; 12: 100
- 4 Iizuka M, Sasaki K, Hirai Y, Shindo K, Konno S, Itou H, Ohshima S, Horie Y, Watanabe S. Morphogenic protein epimorphin protects intestinal epithelial cells from oxidative stress by the activation of EGF receptor and MEK/ERK, PI3 kinase/Akt signals. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2007; 292: G39-G52
- 5 Vermeulen MA, de Jong J, Vaessen MJ, van Leeuwen PA, Houdijk AP. Glutamate reduces experimental intestinal hyperpermeability and facilitates glutamine support of gut integrity. *World J Gastroenterol* 2011; 17: 1569-1573
- 6 刘芳宁, 张彦明. 哺乳动物肠上皮细胞的原代培养. *动物医学进展* 2007; 28: 53-57
- 7 郝维平, 姚友生, 王家伟, 邓毕华, 吕夷松. 人类膀胱移行上皮细胞的体外培养与鉴定. *中国组织工程研究与临床康复* 2011; 15: 9348-9352
- 8 翟荣林, 王国斌, 蔡开琳, 田元, 许飞. 正常SD新生大鼠结肠上皮细胞体外分离的培养与鉴定研究. *中华肿瘤防治杂志* 2008; 15: 1365-1367
- 9 叶章群, 刘冠琳, 陈志强, 孔德波, 姚林方, 余斌, 郭辉. 小鼠肠干细胞群的构建. *华中科技大学学报(医学版)* 2006; 35: 828-830
- 10 刘飞飞, 车东升, 穆成龙, 张海全, 王波, 孙泽威, 秦贵信. 兔小肠上皮细胞体外分离培养. *吉林农业大学学报* 2011; 33: 429-432
- 11 谢秀雯, 周建强, 崔红平. Dispace II 消化法原代培

- 养兔结膜上皮细胞及鉴定. 眼科新进展 2011; 31: 312-316
- 12 Ren HJ, Cui J, Wang ZQ, Liu RD. Normal mouse intestinal epithelial cells as a model for the in vitro invasion of *Trichinella spiralis* infective larvae. *PLoS One* 2011; 6: e27010
 - 13 张秋月, 富建东, 薛辛东. 新生鼠肺泡 II 型上皮细胞分离培养与鉴定. 中国新生儿科杂志 2010; 25: 339-341
 - 14 Birkner S, Weber S, Dohle A, Schmahl G, Föllmann W. Growth and characterisation of primary bovine colon epithelial cells in vitro. *Altern Lab Anim* 2004; 32: 555-571
 - 15 刘武, 樊粤光, 夏雄智, 刘建仁, 王海彬, 曾毅荣. 六味地黄丸含药血清对人成骨样细胞 OS-732 增殖的影响. 中药材 2010; 33: 417-419
 - 16 张广静, 卓金士, 金岩, 卢涛. 人的原代上皮角质形成细胞和永生化的上皮角质形成细胞 HaCaT 的增殖能力的比较. 现代生物医学进展 2011; 11: 68-70
 - 17 王莉, 段相林. 大鼠小肠上皮细胞的体外原代培养. 军事医学科学院院刊 2004; 28: 61-63
 - 18 Aldhous MC, Shmakov AN, Bode J, Ghosh S. Characterization of conditions for the primary culture of human small intestinal epithelial cells. *Clin Exp Immunol* 2001; 125: 32-40
 - 19 纪华英, 陈其奎, 曾晖. 小鼠小肠上皮细胞的体外原代培养. 医学综述 2010; 16: 1417-1419
 - 20 Hofmann C, Lippert E, Falk W, Schölmerich J, Rogler G, Obermeier F. Primary human colonic epithelial cells are transiently protected from anoikis by a Src-dependent mechanism. *Biochem Biophys Res Commun* 2009; 390: 908-914
 - 21 Pedersen G, Saermark T, Giese B, Hansen A, Drag B, Brynskov J. A simple method to establish short-term cultures of normal human colonic epithelial cells from endoscopic biopsy specimens. Comparison of isolation methods, assessment of viability and metabolic activity. *Scand J Gastroenterol* 2000; 35: 772-780
 - 22 Slorach EM, Campbell FC, Dorin JR. A mouse model of intestinal stem cell function and regeneration. *J Cell Sci* 1999; 112: 3029-3038
 - 23 戴定威, 吴圣梢, 李敏廖, 贤平辛, 刘再涌. 新生大鼠小肠上皮细胞分离培养研究. 细胞生物学杂志 1997; 19: 31-35
 - 24 Grossmann J, Walther K, Artinger M, Kiessling S, Steinkamp M, Schmautz WK, Stadler F, Bataille F, Schultz M, Schölmerich J, Rogler G. Progress on isolation and short-term ex-vivo culture of highly purified non-apoptotic human intestinal epithelial cells (IEC). *Eur J Cell Biol* 2003; 82: 262-270
 - 25 张安平, 刘宝华, 张连阳, 王亚旭, 李春穴. 正常人结肠上皮细胞体外培养和鉴定. 世界华人消化杂志 2004; 12: 1966-1968
 - 26 Evans GS, Flint N, Somers AS, Eyden B, Potten CS. The development of a method for the preparation of rat intestinal epithelial cell primary cultures. *J Cell Sci* 1992; 101: 219-231
 - 27 Föllmann W, Weber S, Birkner S. Primary cell cultures of bovine colon epithelium: isolation and cell culture of colonocytes. *Toxicol In Vitro* 2000; 14: 435-445
 - 28 Furuya K, Sokabe M, Furuya S. Characteristics of subepithelial fibroblasts as a mechano-sensor in the intestine: cell-shape-dependent ATP release and P2Y1 signaling. *J Cell Sci* 2005; 118: 3289-3304
 - 29 石妍, 杨帆, 葛红岩, 刘平. 改良兔角膜上皮细胞原代培养及纯化的方法. 眼科新进展 2010; 30: 612-615

■同行评价

本研究设计严谨合理, 科学性强, 结果可靠, 结论恰当, 讨论内容丰富, 条理清晰, 对研究工作有较好的参考价值。

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 •

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)

聚乙二醇干扰素 α -2a联合阿德福韦酯对HBeAg阳性慢性乙型肝炎的治疗

丁洋, 吴发玲, 盛秋菊, 赵连荣, 夏婷婷, 王静艳, 石理兰, 王淑兰, 单红, 安萍, 段红岩, 窦晓光

■背景资料

Peg-IFN α -2a是慢性乙型肝炎(CHB)抗病毒治疗的一线用药,具有抗病毒和调节免疫的双重作用,但治疗中应答不佳的情况时有发生。对于这类患者,专家建议联合核苷(酸)类似物优化治疗。

丁洋, 吴发玲, 盛秋菊, 赵连荣, 夏婷婷, 王静艳, 石理兰, 窦晓光, 中国医科大学附属盛京医院感染科 辽宁省沈阳市 110004

王淑兰, 大连市第六人民医院传染科 辽宁省大连市 116001

单红, 辽宁省人民医院传染科 辽宁省沈阳市 110015

安萍, 沈阳市第六人民医院传染科 辽宁省沈阳市 110006

段红岩, 盘锦辽河油田第二医院 辽宁省盘锦市 124011

丁洋, 副教授, 主要从事病毒性肝炎的分子生物学和抗病毒治疗的研究。

国家自然科学基金资助项目, No. 30972612

国家科技重大专项“十一五”计划病毒性肝炎基金资助项目, No. 2008ZX10002

辽宁省科学技术计划重大、重点基金资助项目, No. 2009225010-7

中国肝炎防治基金会光辉基金资助项目, No. GHF2010203

作者贡献分布: 本文的主要实验、临床资料整理、数据分析、文章起草由丁洋与吴发玲完成; 病例选择、样本取材由盛秋菊、赵连荣、夏婷婷、王静艳、石理兰、王淑兰、安萍及段红岩完成; 课题设计、文章修改和审阅由窦晓光完成。

通讯作者: 窦晓光, 教授, 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感染科。douxg@sj-hospital.org
电话: 024-96615-62211 传真: 024-96615-62222

收稿日期: 2012-05-11 修回日期: 2012-07-02

接受日期: 2012-07-20 在线出版日期: 2012-08-08

Combination therapy with peginterferon α -2a and adefovir dipivoxil for HBeAg-positive chronic hepatitis B: A prospective multicenter cohort study

Yang Ding, Fa-Ling Wu, Qiu-Ju Sheng, Lian-Rong Zhao, Ting-Ting Xia, Jing-Yan Wang, Li-Lan Shi, Shu-Lan Wang, Hong Shan, Ping An, Hong-Yan Duan, Xiao-Guang Dou

Yang Ding, Fa-Ling Wu, Qiu-Ju Sheng, Lian-Rong Zhao, Ting-Ting Xia, Jing-Yan Wang, Li-Lan Shi, Xiao-Guang Dou, Department of Infectious Diseases, Shengjing Hospital of China Medical University, Shenyang 110004, Liaoning Province, China

Shu-Lan Wang, Department of Infectious Diseases, the Sixth People's Hospital of Dalian, Dalian 116001, Liaoning Province, China

Hong Shan, Department of Infectious Diseases, the People's Hospital of Liaoning, Shenyang 110015, Liaoning Province, China

Ping An, Department of Infectious Diseases, the Sixth People's Hospital of Shenyang, Shenyang 110006, Liaoning Province, China

Hong-Yan Duan, the Second Oil Field Hospital of Panjin, Panjin 124011, Liaoning Province, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30972612; the Viral Hepatitis Program of the

National Key Science and Technology Foundation of China during the 11th Five-Year Plan Period, No. 2008ZX10002; the Foundation of Liaoning Provincial Department of Science and Technology, No. 2009225010-7; the Guanghui Fund of Chinese Foundation for Hepatitis Prevention and Control, No. GHF2010203

Correspondence to: Xiao-Guang Dou, Professor, Department of Infectious Diseases, Shengjing Hospital of China Medical University, 36 Sanhao Street, Heping District, Shenyang 110004, Liaoning Province, China. douxg@sj-hospital.org

Received: 2012-05-11 Revised: 2012-07-02

Accepted: 2012-07-20 Published online: 2012-08-08

Abstract

AIM: To analyze the efficacy and safety of adefovir dipivoxil (ADV) as an add-on therapy in patients with HBeAg-positive chronic hepatitis B (CHB) who have a suboptimal response to peginterferon α -2a (Peg-IFN α -2a) treatment for 48 weeks, and to evaluate the predictors of response to the combination therapy.

METHODS: Ninety HBeAg-positive CHB patients who had been being treated with Peg-IFN α -2a for 24 weeks and had HBV DNA $\geq 2.0 \times 10^3$ IU/mL and HBV DNA decrease $\geq 2 \log_{10}$ IU/mL were randomly assigned either to add on ADV (group A1, 45 patients) or to continue Peg-IFN α -2a monotherapy (group A2, 45 patients). Other 55 patients with HBV DNA $< 2.0 \times 10^3$ IU/mL were assigned to continue Peg-IFN α -2a monotherapy. The levels of HBV DNA, HBsAg, HBeAg and ALT at baseline and during treatment were compared among the three groups.

RESULTS: The rates of undetectable serum HBV DNA at weeks 36 and 48 were highest in group B, followed by group A1 and group A2 ($P < 0.01$). HBV DNA level at week 36 declined more significantly in group B than in group A1, and in group A1 than in group A2 (both $P < 0.01$). At week 48, HBV DNA level declined more significantly in groups A1 than in group A2 ($P < 0.01$), while there was no significant difference between group A1 and B. Rates of HBeAg loss and HBeAg seroconversion in groups A1, A2 and B were not statistically different at weeks

■同行评议者

赵秀英, 副教授, 首都医科大学附属北京佑安医院; 周霞秋, 教授, 上海瑞金医院感染科

36 and 48. Amplitude of HBeAg seroconversion rate from week 24 to week 48 in group A1 was higher than those in group A2 and group B (both $P < 0.01$). There were 4, 1 and 2 cases of HBsAg reduction in group A1, group A2 and group B at week 48, respectively. Rates of ALT normalization in group A1, group A2 and group B were not statistically different at weeks 36 and 48. All the patients finished 48-week therapy without severe adverse effects. Rate of undetectable serum HBV DNA in group A1 was only associated with the amplitude of HBV DNA level at week 36. HBV DNA reduction levels at week 36 from baseline or week 24 could predict undetectable serum HBV DNA at week 48 with a PPV of 90.5% and 95.7%, respectively.

CONCLUSION: ADV as an add-on therapy in patients with HBeAg-positive CHB who have a suboptimal response to Peg-IFN α -2a treatment for 48 weeks could improve HBeAg seroconversion rate and undetectable HBV DNA rate with tolerable adverse effects. HBV DNA reduction levels at week 36 from baseline or week 24 could predict the viral response to the combination therapy at week 48.

Key Words: Hepatitis B; Peginterferon α -2a; Adefovir dipivoxil; Hepatitis therapy

Ding Y, Wu FL, Sheng QJ, Zhao LR, Xia TT, Wang JY, Shi LL, Wang SL, Shan H, An P, Duan HY, Dou XG. Combination therapy with peginterferon α -2a and adefovir dipivoxil for HBeAg-positive chronic hepatitis B: A prospective multicenter cohort study. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2012; 20(22): 2036-2042

摘要

目的: 分析聚乙二醇干扰素 α -2a(peginterferon α -2a, Peg-IFN α -2a)治疗HBeAg阳性慢性乙型肝炎应答不佳者联合阿德福韦酯(adeфовir dipivoxil, ADV)治疗48 wk的疗效、安全性, 并评价48 wk疗效预测指标。

方法: 140例患者初始均接受Peg-IFN α -2a每周1次皮下注射单药治疗, 根据24 wk时HBV DNA水平进行分组。A组90例患者治疗24 wk时HBV DNA $\geq 2.0 \times 10^3$ IU/mL且HBV DNA下降 $\geq 2 \log_{10}$ IU/mL, 其中A1组45例患者加用ADV治疗至48 wk, A2组45例患者继续Peg-IFN α -2a单药治疗至48 wk; B组50例患者治疗24 wk时HBV DNA $< 2.0 \times 10^3$ IU/mL, 继续Peg-IFN α -2a治疗至48 wk。比较各组基线及治疗中HBV DNA、HBsAg、HBeAg及ALT水平。

结果: 治疗36、48 wk时HBV DNA转阴率B组

>A1组>A2组($P < 0.01$)。治疗36 wk时HBV DNA下降值B组>A1组>A2组($P < 0.01$)。48 wk时HBV DNA下降值A1组>A2组($P < 0.01$)。A1、B组之间差异无统计学意义。治疗24-48 wk期间, A1组HBeAg血清转换率升高幅度>A2组和B组($P < 0.01$)。治疗48 wk时HBsAg下降A1组4例、A2组1例、B组2例。治疗36、48 wk时A1与A2、B组ALT复常率差异无统计学意义。A1组治疗48 wk时HBV DNA阴转与治疗36 wk HBV DNA下降值有关。治疗36 wk时HBV DNA较基线下降值对48 wk时HBV DNA阴转的阳性预测值为90.5%, 较24 wk时下降值对48 wk时HBV DNA阴转的阳性预测值为95.7%。

结论: Peg-IFN α -2a治疗HBeAg阳性慢性乙型肝炎应答不佳者联合ADV治疗提高病毒应答、HBeAg血清转换率, 其中治疗36 wk时HBV DNA下降值可预测48 wk疗效。

关键词: 乙型肝炎; 聚乙二醇干扰素 α -2a; 阿德福韦酯; 肝炎治疗

丁洋, 吴发玲, 盛秋菊, 赵连荣, 夏婷婷, 王静艳, 石理兰, 王淑兰, 单红, 安萍, 段红岩, 窦晓光. 聚乙二醇干扰素 α -2a联合阿德福韦酯对HBeAg阳性慢性乙型肝炎的治疗. *世界华人消化杂志* 2012; 20(22): 2036-2042
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/2036.asp>

0 引言

慢性乙型肝炎(chronic hepatitis B, CHB)是由乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)在体内持续高水平复制、机体发生免疫应答引起的慢性进展性疾病。治疗策略是最大限度地长期抑制病毒复制或通过增强机体免疫反应, 使机体自发清除病毒, 延缓疾病进展, 减少肝硬化、肝癌等的发生, 方法包括抗病毒、免疫调节、抗氧化、抗纤维化和对症治疗, 其中抗病毒治疗是关键^[1-3]。目前国内外公认的有效抗病毒药物主要包括干扰素(interferon, IFN)类和核苷(酸)类似物[Nucleos(t)ide, NUC]类, 2者各有优缺点, 当一种治疗方法效果不明显甚至无效时改用或联合应用另一种方法可能仍然有效。对于初始应用IFN治疗的CHB患者, 经一段时间治疗后应答不佳者联合NUC理论上不会影响后续治疗的疗效, 而且应用IFN所致基础免疫状态发生改变可能会提高机体对NUC的应答^[4], 但实际上临床疗效如何目前尚无定论。本临床观察通过对聚乙二醇干扰素 α -2a(peginterferon α -2a, Peg-IFN α -2a)治疗HBeAg阳性CHB应答不佳者联合阿德福韦

■研究前沿

目前国内外学者分别对联合治疗开始时机、药物种类、剂量、治疗终点等方面进行深入研究, 以期为患者提供合理的治疗策略。

■相关报道

Bart等研究发现Peg-IFN α -2a联合ADV治疗CHB能提高病毒学应答率, Wurstthorn等研究发现延长疗程可逐渐降低肝内cccDNA水平. Takkenberg等研究发现2者联合治疗能提高HBeAg血清转化率、阴转率.

表 1 两组患者治疗前基线特征

分组	<i>n</i>	年龄(岁)	男性(<i>n</i>)	ALT(U/L)	HBV DNA(log10 IU/mL)	HBeAg(s/co)
A组	90	36.1 \pm 8.5	67	163.9 \pm 75.3 ^a	6.9 \pm 0.9 ^b	599.3 \pm 605.6
B组	50	37.3 \pm 11.2	32	198.0 \pm 79.1	6.2 \pm 1.2	445.7 \pm 531.2

^a*P*<0.05, ^b*P*<0.01 vs B组.

酯(adefovir dipivoxil, ADV)或继续Peg-IFN α -2a单药治疗, 比较治疗中的各指标差异, 评价48 wk疗效, 为更多患者选择合适的联合治疗方案提供参考.

1 材料和方法

1.1 材料 采集2010-02/2012-02在中国医科大学附属盛京医院、辽宁省人民医院、沈阳市第六人民医院、大连市第六人民医院和盘锦辽河油田第二医院传染科就医并完成Peg-IFN α -2a治疗48 wk的180例HBeAg阳性CHB患者抗病毒治疗前和治疗中空腹静脉血血清, 排除治疗24 wk时HBV DNA $\geq 2.0 \times 10^3$ IU/mL且HBV DNA下降 $< 2 \log_{10}$ IU/mL的患者40例, 入选其余140例. 患者治疗前均符合下列入组条件: 年龄 > 18 岁、HBeAg阳性CHB、 $2 \times$ 正常上限 \leq ALT $\leq 10 \times$ 正常上限、总胆红素 $< 2 \times$ 正常上限、HBV DNA $\geq 2.0 \times 10^4$ IU/mL, 近6 mo无IFN或NUC用药史, 无IFN α 和ADV治疗禁忌证, 无甲型肝炎病毒(hepatitis A virus, HAV)、丙型肝炎病毒(hepatitis C virus, HCV)、人类免疫缺陷病毒(human immunodeficiency virus, HIV)重叠感染.

1.2 方法

1.2.1 治疗: 入组140例患者初始均接受Peg-IFN α -2a 135 μ g(体质量 ≤ 65 kg)或180 μ g(体质量 > 65 kg)每周1次皮下注射单药治疗, 根据24 wk时HBV DNA水平进行分组. A组90例患者治疗24 wk时HBV DNA $\geq 2.0 \times 10^3$ IU/mL且HBV DNA下降 $\geq 2 \log_{10}$ IU/mL, 其中A1组45例患者加用ADV 10 mg, 每日1次口服治疗至48 wk, A2组45例患者继续Peg-IFN α -2a单药治疗至48 wk; B组50例患者治疗24 wk时HBV DNA $< 2.0 \times 10^3$ IU/mL, 继续Peg-IFN α -2a治疗至48 wk. 比较各组基线及治疗中HBV DNA、HBsAg、HBeAg及ALT水平.

1.2.2 ALT检测: 采用美国Beckman全自动生化仪及其配套试剂检测, 检测标本为空腹静脉血血清.

1.2.3 HBV DNA检测: 采用Real Time PCR法, 试

剂由深圳匹基生物工程有限公司生产, 敏感度为 10^3 IU/mL, 检测标本为空腹静脉血血清.

1.2.4 HBsAg、HBeAg检测: 采用Achtitect(Abbott)微粒子化学发光免疫分析法、两步法原理, HBsAg assay定量检测敏感度为0.05 IU/mL, HBeAg assay定量检测敏感度为1.0 s/co, 检测标本为空腹静脉血血清.

统计学处理 采用SPSS18.0统计软件进行统计分析, 两组间均数的比较采用*t*检验; 多组间均数比较采用单因素方差分析(ANOVA)和组间两两比较; 组间计数资料的比较采用 χ^2 检验. 以 $\alpha = 0.05$ 作为检验水准. 疗效预测采用ROC曲线, AUC为曲线下面积, PPV为阳性预测值, NPV为阴性预测值.

2 结果

患者治疗前基线材料见表1.

2.1 治疗前、治疗24 wk分组时的基线特征 A、B两组患者平均年龄、性别分布及基线HBeAg水平差异无统计学意义, A组基线ALT水平低于B组(*P*<0.05), 基线HBV DNA水平高于B组(*P*<0.01, 表1); 3组患者治疗24 wk分组时平均年龄、性别分布及ALT水平差异无统计学意义, A1、A2组HBV DNA、HBeAg水平高于B组(*P*<0.01), 但A1、A2组之间差异无统计学意义(表2).

2.2 病毒学应答 治疗36、48 wk时HBV DNA转阴率B组 $>$ A1组 $>$ A2组, 差异有统计学意义(*P*<0.01). 治疗36 wk HBV DNA下降值B组 $>$ A1组 $>$ A2组, 差异有统计学意义(*P*<0.01). 48 wk HBV DNA下降值A1 $>$ A2, 差异有统计学意义(*P*<0.01); 但A1与B组之间差异无统计学意义(表3). B组发生HBV DNA阴转时间较A1组早, A1组较A2组早(图1A).

2.3 血清学应答 治疗36、48 wk时A1组与A2组、B组HBeAg转阴率、血清转化率差异无统计学意义(表3). 治疗24-48 wk间, A1组HBeAg血清转化率升高幅度 $>$ A2组、B组(*P*<0.01). 治疗48 wk, HBsAg下降: A1组4例、A2组1例、B组2

表 2 治疗24 wk分组时的基线特征

分组	<i>n</i>	年龄(岁)	男性(<i>n</i>)	ALT(U/L)	HBV DNA(log10 IU/mL)	HBeAg(s/co)
A1组	45	36.8 \pm 8.2	33	80.1 \pm 46.2	4.7 \pm 1.0 ^b	326.1 \pm 48.6 ^b
A2组	45	35.4 \pm 8.9	34	75.1 \pm 54.4	4.4 \pm 0.8 ^b	237.0 \pm 35.3 ^a
B组	50	37.3 \pm 11.2	32	72.7 \pm 49.9	0	136.2 \pm 19.2

^a*P*<0.05, ^b*P*<0.01 vs B组.

表 3 3组患者治疗中应答情况

应答		治疗36 wk			治疗48 wk		
		A1组(<i>n</i> = 45)	A2组(<i>n</i> = 45)	B组(<i>n</i> = 50)	A1组(<i>n</i> = 45)	A2组(<i>n</i> = 45)	B组(<i>n</i> = 50)
病毒学应答							
HBV DNA转阴	<i>n</i> (%)	12(26.7)	2(4.4) ^b	50(100) ^b	30(66.7)	16(35.6) ^b	50(100) ^b
HBV DNA下降	(log10 IU/mL)	4.0 ± 1.9	2.9 ± 0.9 ^b	6.2 ± 1.2 ^b	5.7 ± 2.0	4.2 ± 2.0 ^b	6.2 ± 1.2
血清学应答							
HBeAg转阴	<i>n</i> (%)	13(28.9)	12(26.7)	21(42)	19(42.2)	13(28.9)	31(62)
HBeAg血清转换	<i>n</i> (%)	10(22.2)	9(20)	17(34)	15(33.3)	11(24.4)	20(40)
HBsAg下降	<i>n</i> (%)				4(8.9)	1(2.2)	2(4)
生化学应答							
ALT复常	<i>n</i> (%)	15(33.3)	16(35.6)	21(42)	26(57.8)	19(42.2)	25(50)

^b*P*<0.01 vs 相同治疗时间A1组.

例, 差异无统计学意义(图1B).

2.4 生化学应答 治疗36、48 wk时A1组与A2、B组ALT复常率差异无统计学意义, 3组ALT复常率随时间延长而升高(表3, 图1C).

2.5 安全性 除40例患者因24 wk时HBV DNA \geq 2.0 \times 10³ IU/mL, 且HBV DNA下降<2 log10 IU/mL中途退出本临床试验外, 其余140例患者均完成了48 wk治疗. 大多数患者应用Peg-IFN α -2a早期出现发热、头痛、全身肌肉酸痛等流感样症状, 一般应用3-4针后症状好转或消失. 大多数患者有白细胞、中性粒细胞下降, 一般不需要特殊处理, 少数患者加用粒细胞集落刺激因子, 且停药后逐渐恢复到基线水平. 未发现ADV导致的明显不良反应.

2.6 疗效预测 分析A1组患者情况发现, 治疗48 wk时HBV DNA阴转与基线、治疗24 wk时ALT、HBeAg、HBV DNA水平无关, 与治疗36 wk HBV DNA下降值有关. 采用ROC曲线分析发现, 治疗36 wk HBV DNA较基线下降3.6 log10 IU/mL对48 wk HBV DNA阴转预测的PPV 90.5%、NPV 54.2%, AUC 0.822; 而治疗36 wk HBV DNA较24 wk下降0.8 log10 IU/mL对48 wk HBV DNA阴转预测的PPV 95.7%、NPV 63.6%, AUC 0.876(图2).

3 讨论

Peg-IFN α -2a有抗病毒和调节免疫双重作用, 且疗程相对固定, 被推荐作为CHB治疗的一线用药^[5]. 但难治性基因型如C型、D型HBV对Peg-IFN α -2a敏感性较差^[6], 治疗中应答不佳或治疗后病毒反弹时有发生. 研究发现, 病毒反弹与应答不佳有关, 早期病毒应答者能获得更高的持久应答率^[7]. 目前对于难治性CHB, 专家建议根据优化治疗原则选择联合治疗方案^[8], 但由于个体差异大, 联合抗病毒药物种类、剂量、时机、治疗终点不一, 目前尚无统一方案. 曾有报道初始Peg-IFN α -2a联合拉米夫定治疗难治性基因D型CHB能提高联合应答率(即病毒学应答+生化学应答)^[9], 然而全球性大样本试验证实联合治疗48 wk的病毒应答率、HBeAg血清转换率并不优于Peg-IFN α -2a单药治疗^[10,11]. Peg-IFN α -2a联合替比夫定增加周围神经病变的发生风险^[12], 不推荐使用. ADV虽起效慢, 却是体内唯一能降低肝内cccDNA的NUC, 标准量治疗病毒变异率低, 耐药发生较晚^[13]. 研究显示Peg-IFN α -2a联合ADV治疗CHB能提高病毒学应答率^[14-16], 延长疗程可逐渐降低肝内cccDNA^[17].

HBV DNA阴转是CHB治疗的基本目标, 治疗中HBV DNA变化水平是评价疗效的基本指

■应用要点

Peg-IFN α -2a治疗CHB应答不佳者联合ADV治疗可提高病毒应答率、HBeAg血清转换率, 治疗36 wk HBV DNA下降值可预测远期疗效, 该方案安全、有效, 可供临床医师参考.

■名词解释

应答不佳: 治疗24 wk血清HBV DNA $\geq 2.0 \times 10^3$ IU/mL 且较基线下降 ≥ 2 log₁₀ IU/mL.

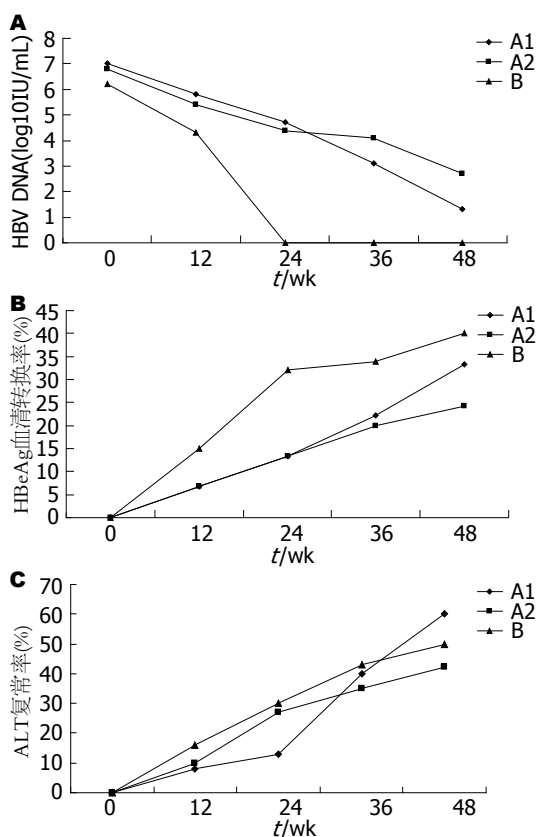


图1 治疗中HBV DNA、HBeAg血清转换率、ALT复常率随时间变化曲线。A: HBV DNA; B: HBeAg血清转换率; C: ALT复常率。

标^[18]。Piccolo等^[19]研究发现, Peg-IFN α -2a联合ADV治疗HBeAg阴性患者24 wk HBV DNA阴转率可达73.3%。本研究发现, Peg-IFN α -2a治疗HBeAg阳性CHB 24 wk应答不佳者联合ADV治疗至36、48 wk时HBV DNA下降值、阴转率均较继续Peg-IFN α -2a单药治疗显著提高, 且发生阴转的时间早于单药组, 说明联合治疗可迅速、显著抑制病毒复制, 提高病毒学应答。分析可能原因是IFN改变机体免疫状态, 调动机体免疫功能, 联合ADV后机体免疫程度与病毒下降速度相匹配, 发生疗效叠加。观察HBV DNA变化曲线并进行疗效相关性分析发现, 48 wk病毒转阴与36 wk(即联合治疗12 wk)HBV DNA下降值显著相关, 与基线、24 wk(联合治疗初)ALT、HBeAg、HBV DNA水平无关。36 wk HBV DNA下降值对48 wk病毒应答有预测价值, 其中较24 wk下降0.8 log₁₀ IU/mL比较基线下降3.6 log₁₀ IU/mL更有意义。我们由此推测, HBV DNA下降值对Peg-IFN α -2a治疗HBeAg阳性CHB 24 wk应答不佳者联合ADV治疗的远期疗效有一定预测意义, 具体价值还有待进一步研究。

既往研究发现, 病毒低载量, ALT升高, 肝

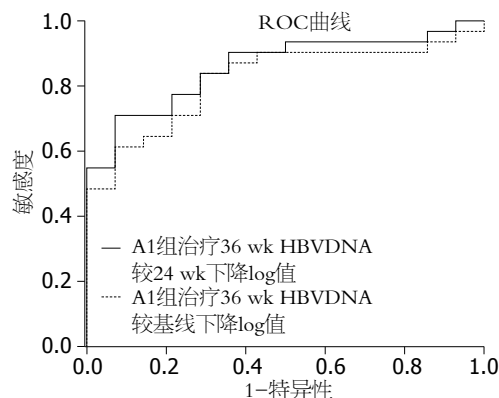


图2 A1组治疗36 wk HBV DNA下降值预测48 wk HBV DNA阴转的ROC曲线。

细胞炎症活动度大, 机体进入免疫清除期, 此时行抗病毒治疗能获得更好疗效^[20]。本研究发现, Peg-IFN α -2a治疗HBeAg阳性CHB早期能否发生完全病毒学应答与基线ALT、HBV DNA水平有关, 基线ALT水平高, 病毒低载量, 治疗中HBV DNA下降显著, 疗效佳。

既往研究发现, HBeAg水平与患者远期愈后、生存率、肝脏组织病理改变有关^[21], 是评价HBeAg阳性患者抗病毒疗效的关键指标, Peg-IFN α 联合ADV治疗CHB能提高HBeAg血清转换率、阴转率^[14,22,23]。国内专家基于持续缓解CHB进展的考虑, 建议以HBeAg血清转换作为IFN治疗目标^[7]。本研究发现, 24 wk时病毒应答佳者24 wk时的HBeAg血清转换率、阴转率均较应答不佳者高, 说明HBV DNA早期下降与HBeAg血清转换相关, 这与Janssen等^[24]的研究结果相一致, 考虑可能原因为HBV DNA早期下降者对IFN的作用敏感性强, 一方面IFN达到血药浓度后抑制病毒复制能力强, 使HBV DNA快速下降; 另一方面免疫调节作用强, 使HBeAg迅速发生血清转换。而应答不佳者加用ADV治疗至36、48 wk时HBeAg血清转换率、阴转率均较前明显升高, 但较单药治疗者未见明显升高, 考虑与样本量少、联合治疗时间短有关, 建议扩大样本量、延长疗程并定期随访以进一步研究。

HBsAg转阴是公认的理想治疗目标, 往往发生率低, 在IFN停药后随访24 wk时为3%, 3年时增加至8%^[25]。而治疗中HBsAg定量变化也是较好的疗效预测指标, 尤其对HBeAg阴性CHB患者^[26]。国外学者发现24 wk血清HBsAg ≤ 1500 IU/mL, 继续治疗至48 wk并停药24 wk观察HBeAg血清转换率升高。本研究发现, 治疗48 wk HBsAg <250 IU/mL, 联合组4(45)例、单

药组3(105)例,对于上述患者我们建议延长疗程以提高HBsAg转阴率。

本研究中除40例因24 wk HBV DNA $\geq 2.0 \times 10^3$ IU/mL且HBV DNA下降 $< 2 \log_{10}$ IU/mL中途退出临床试验外,其余140例患者均完成了48 wk治疗,未发生因严重不良反应停药失访或等事件。治疗中出现的不适症状或血清学异常与既往IFN单药治疗出现的一样^[10],且对症治疗或停药后逐渐恢复到基线水平,说明该治疗方案安全可行。

总之, Peg-IFN α -2a治疗CHB应答不佳者联合ADV治疗可提高病毒应答率、HBeAg血清转换率,治疗36 wk HBV DNA下降值可预测48 wk疗效,该方案安全、有效,可供临床医师参考。

志谢 衷心感谢中国医科大学附属盛京医院、辽宁省人民医院、沈阳市第六人民医院、大连市第六人民医院和盘锦辽河油田第二医院感染科、检验科全体医师、护士在本研究过程中给予的大力支持,感谢中国医科大学附属盛京医院感染科冯国和教授、李智伟教授在论文书写过程中提供的中肯意见!

4 参考文献

- Lok AS, McMahon BJ. Chronic hepatitis B: update 2009. *Hepatology* 2009; 50: 661-662
- Lai CL, Ratziu V, Yuen MF, Poynard T. Viral hepatitis B. *Lancet* 2003; 362: 2089-2094
- 白茵, 张桂珍. 抗病毒治疗在慢性乙型肝炎治疗中的重要性. 世界华人消化杂志 2008; 16: 5-9
- Hui CK, Leung N, Yuen ST, Zhang HY, Leung KW, Lu L, Cheung SK, Wong WM, Lau GK. Natural history and disease progression in Chinese chronic hepatitis B patients in immune-tolerant phase. *Hepatology* 2007; 46: 395-401
- 中华医学会肝病学会. 中华医学会感染病学分会. 慢性乙型肝炎防治指南(2010年版). 中华肝脏病学杂志 2011; 19: 13-24
- Craxi A, Di Bona D, Cammà C. Interferon-alpha for HBeAg-positive chronic hepatitis B. *J Hepatol* 2003; 39 Suppl 1: S99-S105
- ter Borg MJ, van Zonneveld M, Zeuzem S, Senturk H, Akarca US, Simon C, Hansen BE, Haagmans BL, de Man RA, Schalm SW, Janssen HL. Patterns of viral decline during PEG-interferon alpha-2b therapy in HBeAg-positive chronic hepatitis B: relation to treatment response. *Hepatology* 2006; 44: 721-727
- 万谟彬, 翁心华. 干扰素治疗慢性乙型肝炎专家建议(2010年更新). 中华传染病杂志 2010; 28: 193-200
- Bonino F, Marcellin P, Lau GK, Hadziyannis S, Jin R, Piratvisuth T, Germanidis G, Yurdaydin C, Diago M, Gurel S, Lai MY, Brunetto MR, Farci P, Popescu M, McCloud P. Predicting response to peginterferon alpha-2a, lamivudine and the two combined for HBeAg-negative chronic hepatitis B. *Gut* 2007; 56: 699-705
- Lau GK, Piratvisuth T, Luo KX, Marcellin P, Thongsawat S, Cooksley G, Gane E, Fried MW, Chow WC, Paik SW, Chang WY, Berg T, Flisiak R, McCloud P, Pluck N. Peginterferon Alfa-2a, lamivudine, and the combination for HBeAg-positive chronic hepatitis B. *N Engl J Med* 2005; 352: 2682-2695
- Marcellin P, Lau GK, Bonino F, Farci P, Hadziyannis S, Jin R, Lu ZM, Piratvisuth T, Germanidis G, Yurdaydin C, Diago M, Gurel S, Lai MY, Button P, Pluck N. Peginterferon alfa-2a alone, lamivudine alone, and the two in combination in patients with HBeAg-negative chronic hepatitis B. *N Engl J Med* 2004; 351: 1206-1217
- Risk of peripheral neuropathy in patients treated with telbivudine (SEBIVO) and interferon-For Health Professionals. Available from: http://www.hc-sc.gc.ca/dhp-mpps/medeff/advisories-avis/public/_2008/sebivo_pc-cp-eng.php
- Werle-Lapostolle B, Bowden S, Locarnini S, Wursthorn K, Petersen J, Lau G, Trepo C, Marcellin P, Goodman Z, Delaney WE, Xiong S, Brosgart CL, Chen SS, Gibbs CS, Zoulim F. Persistence of cccDNA during the natural history of chronic hepatitis B and decline during adefovir dipivoxil therapy. *Gastroenterology* 2004; 126: 1750-1758
- Takkenberg B, Terpstra V, Zaaijer H, Weegink C, Dijkgraaf M, Jansen P, Beld M, Reesink H. Intra-hepatic response markers in chronic hepatitis B patients treated with peginterferon alpha-2a and adefovir. *J Gastroenterol Hepatol* 2011; 26: 1527-1535
- 陈禄彪, 舒欣, 揭育胜, 杨小安, 张卡, 李刚, 徐启恒. 聚乙二醇干扰素 α -2a加用阿德福韦酯治疗HBeAg阳性慢性乙肝的短期疗效观察. 中华实验和临床病毒学杂志 2010; 24: 39-41
- Ingiliz P, Valantin MA, Thibault V, Duvivier C, Dominguez S, Katlama C, Poynard T, Benhamou Y. Efficacy and safety of adefovir dipivoxil plus pegylated interferon-alpha2a for the treatment of lamivudine-resistant hepatitis B virus infection in HIV-infected patients. *Antivir Ther* 2008; 13: 895-900
- Wursthorn K, Lutgehetmann M, Dandri M, Volz T, Buggisch P, Zollner B, Longerich T, Schirmacher P, Metzler F, Zankel M, Fischer C, Currie G, Brosgart C, Petersen J. Peginterferon alpha-2b plus adefovir induce strong cccDNA decline and HBsAg reduction in patients with chronic hepatitis B. *Hepatology* 2006; 44: 675-684
- Hansen BE, Buster EH, Steyerberg EW, Lesaffre E, Janssen HL. Prediction of the response to peg-interferon-alfa in patients with HBeAg positive chronic hepatitis B using decline of HBV DNA during treatment. *J Med Virol* 2010; 82: 1135-1142
- Piccolo P, Lenci I, Demelia L, Bandiera F, Piras MR, Antonucci G, Nosotti L, Mari T, De Santis A, Ponti ML, Sorbello O, Iacomini F, Angelico M. A randomized controlled trial of pegylated interferon-alpha2a plus adefovir dipivoxil for hepatitis B e antigen-negative chronic hepatitis B. *Antivir Ther* 2009; 14: 1165-1174
- Erhardt A, Blondin D, Hauck K, Sagir A, Kohnle T, Heintges T, Häussinger D. Response to interferon alfa is hepatitis B virus genotype dependent: genotype A is more sensitive to interferon than genotype D. *Gut* 2005; 54: 1009-1013
- Fattovich G, Rugge M, Brollo L, Pontisso P, Novetta F, Guido M, Alberti A, Real di G. Clinical, virologic and histologic outcome following seroconversion from HBeAg to anti-HBe in chronic hepatitis type B. *Hepatology* 1986; 6: 167-172

■同行评价

本文设计较科学, 数据分析合理, 结果较为客观, 对临床有一定指导意义和实用价值。

- 22 Chen EQ, Tang H. Hepatitis B e antigen as a predictor for hepatitis B e antigen-positive chronic hepatitis B patients with peginterferon alfa-2a therapy. *Hepatology* 2009; 50: 1677; author reply 1677-1679
- 23 Chan HL, Wong VW, Tse AM, Tse CH, Chim AM, Chan HY, Wong GL, Sung JJ. Serum hepatitis B surface antigen quantitation can reflect hepatitis B virus in the liver and predict treatment response. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2007; 5: 1462-1468
- 24 Janssen HL, van Zonneveld M, Senturk H, Zeuzem S, Akarca US, Cakaloglu Y, Simon C, So TM, Gerken G, de Man RA, Niesters HG, Zondervan P, Hansen B, Schalm SW. Pegylated interferon alfa-2b alone or in combination with lamivudine for HBeAg-positive chronic hepatitis B: a randomised trial. *Lancet* 2005; 365: 123-129
- 25 Marcellin P, Bonino F, Lau GK, Farci P, Yurdaydin C, Piratvisuth T, Jin R, Gurel S, Lu ZM, Wu J, Popescu M, Hadziyannis S. Sustained response of hepatitis B e antigen-negative patients 3 years after treatment with peginterferon alpha-2a. *Gastroenterology* 2009; 136: 2169-2179.e1-e4
- 26 Fried MW, Piratvisuth T, Lau GK, Marcellin P, Chow WC, Cooksley G, Luo KX, Paik SW, Liaw YF, Button P, Popescu M. HBeAg and hepatitis B virus DNA as outcome predictors during therapy with peginterferon alfa-2a for HBeAg-positive chronic hepatitis B. *Hepatology* 2008; 47: 428-434

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》正文要求

本刊讯 本刊正文标题层次为 0 引言; 1 材料和方法, 1.1 材料, 1.2 方法; 2 结果; 3 讨论; 4 参考文献。序号一律左顶格写, 后空1格写标题; 2级标题后空1格接正文。以下逐条陈述: (1)引言 应包括该研究的目的和该研究与其他相关研究的关系。(2)材料和方法 应尽量简短, 但应让其他有经验的研究者能够重复该实验。对新的方法应该详细描述, 以前发表过的方法引用参考文献即可, 有关文献中或试剂手册中的方法的改进仅描述改进之处即可。(3)结果 实验结果应合理采用图表和文字表示, 在结果中应避免讨论。(4)讨论 要简明, 应集中对所得的结果做出解释而不是重复叙述, 也不应是大量文献的回顾。图表的数量要精选。表应有表序和表题, 并有足够具有自明性的信息, 使读者不查阅正文即可理解该表的内容。表内每一栏均应有表头, 表内非公知通用缩写应在表注中说明, 表格一律使用三线表(不用竖线), 在正文中该出现的地方应注出。图应有图序、图题和图注, 以使其容易被读者理解, 所有的图应在正文中该出现的地方注出。同一个主题内容的彩色图、黑白图、线条图, 统一用一个注解分别叙述。如: 图1 萎缩性胃炎治疗前后病理变化。A: …; B: …; C: …; D: …; E: …; F: …; G: …。曲线图可按●、○、■、□、▲、△顺序使用标准的符号。统计学显著性用: ^a $P<0.05$, ^b $P<0.01$ ($P>0.05$ 不注)。如同一表中另有一套 P 值, 则^c $P<0.05$, ^d $P<0.01$; 第3套为^e $P<0.05$, ^f $P<0.01$ 。 P 值后注明何种检验及其具体数字, 如 $P<0.01$, $t=4.56$ vs 对照组等, 注在表的左下方。表内采用阿拉伯数字, 共同的计量单位符号应注在表的右上方, 表内个位数、小数点、±、-应上下对齐。“空白”表示无此项或未测, “-”代表阴性未发现, 不能用同左、同上等。表图勿与正文内容重复。表图的标目尽量用 t/min , $c/(\text{mol/L})$, p/kPa , V/mL , $t/^\circ\text{C}$ 表达。黑白图请附黑白照片, 并拷入光盘内; 彩色图请提供冲洗的彩色照片, 请不要提供计算机打印的照片。彩色图片大小 $7.5\text{ cm}\times 4.5\text{ cm}$, 必须使用双面胶条粘贴在正文内, 不能使用浆糊粘贴。(5)志谢 后加冒号, 排在讨论后及参考文献前, 左齐。

血清microRNAs在胃肠道疾病中的意义

熊青, 徐龙

熊青, 徐龙, 南昌大学第一附属医院消化内科 江西省南昌市 330006

作者贡献分布: 本文综述由熊青完成; 徐龙审校。

国家自然科学基金资助项目, No. 81060037

通讯作者: 徐龙, 副教授, 主治医师, 330006, 江西省南昌市, 南昌大学第一附属医院消化内科. dlxulong@yahoo.com.cn

电话: 0791-88692705

收稿日期: 2012-05-15 修回日期: 2012-07-10

接受日期: 2012-07-20 在线出版日期: 2012-08-08

Significance of serum microRNAs in patients with gastrointestinal diseases

Qing Xiong, Long Xu

Qing Xiong, Long Xu, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang 330006, Jiangxi Province, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 81060037

Correspondence to: Long Xu, Associate Professor, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang 330006, Jiangxi Province, China. dlxulong@yahoo.com.cn

Received: 2012-05-15 Revised: 2012-07-10

Accepted: 2012-07-20 Published online: 2012-08-08

Abstract

MicroRNAs (miRNAs) are a class of small single RNAs 19-23 nucleotides in length that regulate target gene expression at the post-transcriptional level and participate in normal biological processes and tumorigenesis. Some evidence proves that various miRNAs are involved in the pathogenesis of gastrointestinal diseases. MiRNAs that are expressed abnormally in lesions can be used as biomarkers for the specific diagnosis of gastrointestinal diseases. But testing miRNAs in the tissue for early diagnosis has its limitations. Serum miRNAs also can be used potentially for diagnosis of gastrointestinal diseases. They provide a new non-invasive detection method for early diagnosis, prognostic assessment, monitoring, and treatment of gastrointestinal diseases. This article reviews the source, features, detection methods for serum miRNAs, as well as the significance of serum miRNAs in patients with gastrointestinal diseases.

Key Words: Gastrointestinal tract; Serum miRNAs;

Diagnosis; Tumor

Xiong Q, Xu L. Significance of serum microRNAs in patients with gastrointestinal diseases. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2012; 20(22): 2043-2049

摘要

microRNAs(miRNAs)是一类长19-23个核苷酸的小分子单链RNAs, 在转录后水平调节靶基因的表达, 参与调控多种正常细胞过程以及肿瘤发生. 已有证据证实, 不少miRNAs参与胃肠道疾病的发生和发展, 病变组织中异常表达的miRNAs, 可作为胃肠道疾病特异性诊断的分子标志, 但检测组织中的miRNAs用于早期诊断疾病有其自身的局限性. 血清miRNAs也具有用于诊断胃肠道疾病的潜能, 为胃肠道疾病的早期诊断提供一种新的非侵入性检测方法, 并可能应用于疾病的预后评估、监测和治疗等领域. 现就血清miRNAs的来源、特点、检测方法以及在胃肠道疾病的意义作一综述.

关键词: 胃肠道; 血清miRNAs; 诊断; 肿瘤

熊青, 徐龙. 血清microRNAs在胃肠道疾病中的意义. *世界华人消化杂志* 2012; 20(22): 2043-2049

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/2043.asp>

0 引言

临床实践中, 任何一种疾病的治疗效果都与其早期诊断率有关, 尤其是癌症的疗效. 目前组织病理学检查和细胞学检查是确诊疾病的常用金标准, 往往在患者出现症状后或疾病晚期参与诊断, 并不能在早期预测和筛查疾病. 部分胃肠道疾病, 如消化性溃疡, 典型的临床表现或经内镜检查, 较容易被早期发现, 得到及时治疗, 预后较好. 但一些胃肠道疾病临床表现不典型, 症状隐匿, 如: 自身免疫性疾病、肿瘤, 晚期预后较差. 要做到早期发现及治疗胃肠道疾病, 就需要有能早期筛查疾病的检验方法. 最近, miRNAs成为研究的新切入点. 研究表明: miRNAs参与了很多基本生命过程的调控, 除了与许多

■背景资料

近年来, 人们对miRNAs表达谱与疾病诊断的关系进行了广泛的研究, 亦包括miRNAs与胃肠道疾病. 由于检测组织中的miRNAs早期诊断胃肠道疾病在临床实践中难于实现, 故血清miRNAs的诊断价值逐渐引起人们的重视.

■同行评议者

邵先玉, 教授, 泰山医学院附属医院消化内科

■ 研发前沿

目前要实现早期诊断胃肠道疾病,特别是肿瘤性疾病,尚有困难.血清miRNAs在胃肠道疾病中的意义,特别是作为非侵入性诊断标志,一直是当前及今后的研究热点.

人类的正常生理活动相关,还与癌症的发生有千丝万缕的联系^[1,2]. miRNAs是一类长19-23个核苷酸的小分子单链RNAs,在转录后水平调节靶基因的表达,在不同的组织和疾病中miRNAs表达谱具有明显的特异性,尤其在肿瘤疾病中.因此,miRNAs有定性诊断的价值^[3,4].用于检测miRNAs的样本除了来源于病变组织自身,还可以来源于病变组织的外环境,如血液和其他组织液.由于有些病变解剖位置深入,不易获得组织标本,而血液在常规检查中易获得,在人体血液循环中稳定存在一定水平的miRNAs.因此,血清miRNAs已成为近年来疾病诊断标志的新研究热点.正因为血清miRNAs的种种特性,为预测、筛查和早期诊断疾病提供了研究基础.本文将对血清miRNAs在胃肠道疾病中的近期研究进展及意义作一综述.

1 血清miRNAs的一般研究现状

1.1 血清miRNAs的来源和稳定性 一个好的标志是能够以非侵入性的方式较易获得的.人类血清和其他体液是新生物标志检测的丰富来源,能在常规临床检查中检测到.近期有报道称血清中稳定存在一定水平的miRNAs^[5-7].关于血清miRNAs的来源,目前的主要观点为:血清miRNAs来源于凋亡或坏死细胞、细胞的主动分泌和循环细胞的裂解等^[4];成熟的miRNAs在细胞内被脂质或脂蛋白包被成外切酶体,分泌至胞外并进入血液,进入血液的外切酶体可经内吞作用进入受体细胞并去包被,释放出miRNAs发挥生物学功能^[8,9].

血清中的miRNAs多数是与蛋白和脂蛋白形成微粒而存在,游离形式存在的miRNAs为少数,外切酶体就是miRNAs在循环中稳定存在的微粒之一,miRNAs存在于小微粒中能免于被RNA水解酶降解^[4,10,11].miRNAs在血清中长期稳定存在,耐RNA酶降解.在煮沸、反复冻融、酸碱环境和长期保存等各种处理下均不会造成血清miRNAs的损失^[12].血清miRNAs的来源和稳定的特性为其成为诊断和监测疾病的新标志奠定了研究基础.

1.2 血清miRNAs的检测方法 既然已明确miRNAs稳定存在于血清或血浆中,故检测miRNAs的表达谱或表达水平意义重大.寻找一种敏感性高、操作简单,并且费用低的检测方法对今后疾病筛查和早期诊断的实现有着现实的意义.目前来说,检测miRNAs的方法有克隆测序、

Northern blot、实时定量PCR和芯片技术等^[13],其中实时定量PCR是最实用和有效的方法,能准确的定量分析miRNAs,芯片技术效率高,但准确性差,其结果需实时定量PCR和Northern blot等验证,多用于筛查^[4].此外,电化学传感器检测技术利用探针与靶miRNAs结合形成DNA/RNA双链所引发的电流,根据电流变化的幅度和miRNAs量的相关性,可以得出血清中miRNAs的含量,但应用于实践中还有待于进一步验证^[14,15].综上,血清miRNAs检测方法的成熟为其临床应用的研究创造了条件,实际应用应根据研究目的和实验方案选择检测方法.

1.3 血清miRNAs在不同组织或疾病的特异表达 目前血清miRNAs在疾病中的研究取得了一定的进展,以肝脏疾病、乳腺癌、前列腺癌和心脏疾病等研究相对较多^[16-23].血清miRNAs亦可以反映组织和疾病的特异性.miR-122、miR-133a和miR-124分别特异于肝、肌和大脑组织.血清miR-122表现出优于ALT的诊断敏感性,血清miR-124在脑损伤发生8 h后升高,其他两种miRNAs仍在基线水平,显示了组织特异性的miRNAs可作为组织损伤诊断性的敏感血清标志^[24].Chen等^[12]鉴定肺癌、结肠癌和糖尿病的miRNAs特异表达型,提供了血清miRNAs在不同疾病特异性表达的证据.

血清miRNAs的稳定性,血清miRNAs检测技术的成熟以及血清miRNAs的特异性表达等特点及优势,表明了血清miRNAs作为诊断全身疾病的一个新的非侵入性标志的可行性,胃肠道疾病也不例外.因此,血清miRNAs也可能作为胃肠道疾病早期诊断的新标志.

2 miRNAs与胃肠道肿瘤

2.1 miRNAs与食管癌 miRNAs对食管癌的意义很大程度上在于诊断肿瘤的组织学分型和良恶性程度.根据诊断结果采取针对性治疗从而提高患者生存率.有研究显示食管癌中miRNAs(miR-335、miR-181d、miR-25、miR-7和miR-495)与总的病理分型有关,miR-25和miR-30b与肿瘤的分化程度有关^[25].食管鳞状细胞癌(esophageal squamous cell carcinoma, ESCC)和腺癌中miR-203和miR-205的表达低于正常上皮组织2-10倍,miR-21的表达高于正常上皮组织3-5倍;对5例Barrett's食管(Barrett's esophagus, BE)行基因芯片预测分析,3例为BE,1例为腺癌,1例为正常上皮^[26].由此提示,miRNAs的表达谱可

以区别食管肿瘤的病理类型, 区分正常组织和肿瘤组织。miRNAs还可以鉴别BE存在和进展为腺癌的高风险患者。检测血清miRNAs, 对食管癌的鉴别诊断意义还有待于进一步深入研究。

目前已有研究报道ESCC患者血浆miR-21水平较正常者升高, 而miR-375则降低, 且ESCC患者手术后血浆miR-21水平较术前显著降低。由此提示循环中miR-21可能作为诊断ESCC新的辅助标志, 血浆miR-21水平反映了肿瘤水平, 且血浆miR-21升高者提示有更大的肿瘤血管侵袭性和复发可能^[27]。Kurashige等^[28]同样地证实了ESCC患者血清miR-21水平升高及ESCC患者术后血清miR-21较术前明显降低。此外, 对化疗有反应的ESCC患者血清miR-21水平较无反应者降低, 可将血清miR-21作为ESCC患者化疗期间反应性的标志。检测血清中相应miRNAs的表达量变化亦能在一定程度上反应食管癌的疾病变化, 且更为便捷, 更易于实现早期诊断。

Zhang等^[29]确定了7种诊断ESCC的血清miRNAs谱(miR-10a、miR-22、miR-100、miR-148b、miR-223、miR-133a和miR-127-3p), 这些血清miRNAs能早期诊断一期和二期ESCC, 为实现ESCC早期诊断提供新的血源性标志。目前的研究提示, 血清miRNAs对食管癌的诊断有一定的价值, 实现早期诊断的可行性是充分的, 他对食管癌的疾病监测也有一定意义, 但目前应积极完善食管癌的特异表达谱。

2.2 miRNAs与胃癌 参与胃癌发生的miRNAs, 一般来说, 其表达谱与正常组织有或高或低的水平差异。正是因为这种表达差异, 让miRNAs成为了胃癌诊断的标志。Song等^[30]将106份胃癌组织标本与相应的非肿瘤组织比较, 分析显示胃癌组织miRNAs水平显著下调。miRNAs表达还与胃癌进展有关, 因此可用作预后评估的标志, 如miR-125a-5p就是一个有意义的预后标志^[31,32]。

组织miRNAs在胃癌与非肿瘤组织中表达存在差异, 血清miRNAs也能反映胃癌的疾病状态, 可能作为胃癌治疗后的一个预后标志和早期诊断胃癌的一个非侵入性标志。Tsujiura等^[33]大规模分析胃癌患者血浆miRNAs表达, miR-17-5p、miR-21、miR-106a和miR-106b表达明显升高, let-7a则下降, 这些miRNAs水平在术后表达量明显减少。Zhou等^[34]研究发现miR-106a和miR-17的表达水平和胃癌细胞数量相关, 术前和术后患者的miR-106a和miR-17比正常人明显升高。由此提示了对外周血中miRNAs的检测可

作为监测胃癌患者手术前后循环肿瘤细胞变化的新工具。血清miRNAs(miR-221、miR-744和miR-423-5p)有对胃癌风险评估的价值, 其敏感性和特异性分别是82%和59%, 在胃癌发展过程中这些miRNAs表达呈升高的趋势, 有可能作为早期诊断胃癌的标志^[35]。血清miRNAs(miR-1、miR-20a、miR-27a、miR-34和miR-423-5p)在胃癌患者中表达明显升高, 2份血清样本ROC曲线下面积分别为0.879和0.831, 明显高于CEA和CA19-9。基于血清miRNAs表达水平的标志可预示肿瘤的进展阶段, 血清miRNAs诊断肿瘤的敏感性和特异性方面优于传统的标志^[36]。因此, 血清miRNAs在胃癌中的意义有待于我们进一步深入研究, 其意义很大程度上在于诊断方面, 尤其是实现早期诊断, 且有优于传统标志的优势。

2.3 miRNAs与大肠癌 许多miRNAs在大肠癌(colorectal cancer, CRC)组织有不同的表达^[37]。miR-133b和miR-145在CRC组织表达下调, miR-31、miR-96、miR-135b和miR-183表达上调; 此外, miR-31的表达水平与CRC的分期有关^[38]。有研究显示相同的结果, 认为在CRC中miR-31表达明显上调, 同样与TNM分期直接相关, 与肿瘤的深层侵袭有关^[39]。miRNAs表达与CRC的病理结果相匹配是诊断CRC的基础。Ba等^[40]筛查CRC和正常邻近组织的miRNAs表达谱, 结果发现在被检测的200多种miRNAs中47种miRNAs在CRC下调, CRC标本的定性结果与病理检查结果相近。由此提示通过检测miRNAs诊断CRC是充分可靠的。

那么通过检测血清miRNAs诊断CRC, 其结果意义如何? Huang等^[41]发现miR-29a和miR-92a在CRC患者的血浆中明显增高, 二者能有效地区分健康人、CRC患者和进展期结直肠腺瘤患者; 血浆中二者的含量与肿瘤TNM分期明显相关, TNM分期越高, miR-29a和miR-92a的水平越高。其中miR-29a有早期鉴别诊断肝转移性CRC和非转移性CRC的潜在价值^[42]。Pu等^[43]发现miR-221在CRC患者的血浆中表达升高, 且与P53表达相关联, 表达升高的血浆miR-221可作为CRC患者一个有意义的预后影响因子及诊断标志。Ng等^[44]发现血浆miR-17-3p和miR-92在CRC患者显著提高, 其血浆水平在患者术后显著减少; 血浆miR-92表达升高具有CRC特异性, miR-92对诊断CRC的敏感性达89%和特异性70%。因此, miR-92在CRC的患者血浆中显著提高, 显示了血浆miR-92可作为CRC筛查的潜在

■ 相关报道

目前研究发现, 血清miRNAs在其他各系统疾病中存在有表达谱的变化, 因此血清miRNAs表达异常对诊断胃肠道疾病亦有一定的现实意义。

■创新盘点

本文总结了血清miRNAs的来源、稳定性和特异性表达等特点,以及检测方法,血清miRNAs在各类胃肠道疾病的近期研究进展。

非侵入性分子标志,还可作为监测CRC患者手术治疗后复查的一个非侵入性分子标志,以实现早期诊断及治疗。

3 miRNAs与胃肠道免疫性疾病

最近研究发现miRNAs在自身免疫性疾病(autoimmune disease, AID)有不同的表达,调控miRNAs对AID的发展和预防有效果,包括炎症性肠病(inflammatory bowel disease, IBD)^[45]。IBD如溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)和克罗恩病(Crohn's disease, CD)的致病过程都与参与炎症和组织重塑的异常基因表达有关。miRNAs异常表达在IBD患者炎症静止状态肠黏膜的发作和复发中可能起关键作用,静止状态肠黏膜中miRNAs表达差异可能有助于UC和CD新的诊断标志的研究;静止期和活动期IBD中miRNAs表达的不同可以鉴别IBD所处的疾病状态;CD结肠和回肠中miRNAs的表达差异表明了miRNAs可影响IBD亚型^[46,47]。

血清miRNAs同样地对IBD的疾病状态及疾病类型有鉴别意义。Wu等^[48]分析了活动性或非活动性UC和CD患者外周血miRNAs表达,结果发现活动性CD患者5种miRNAs升高,2种(miR-149*、miRplus-F1065)下降;活动性UC患者12种miRNAs升高,miR-505*下降;与活动性CD相比较,活动性UC患者外周血10种miRNAs升高,miR-505*下降。由此提示外周血miRNAs在IBD中有差异表达,可作为诊断IBD的依据。Paraskevi等^[49]研究发现CD患者血循环miRNAs(miR-16、miR-23a、miR-29a、miR-106a、miR-107、miR-126、miR-191、miR-199a-5p、miR-200c、miR-362-3p和miR-532-3p)表达显著升高,UC患者血循环miRNAs(miR-16、miR-21、miR-28-5p、miR-151-5p、miR-155和miR-199a-5p)表达显著升高,miR-155是血循环中UC相关的miRNAs中表达水平最高的,由此提示通过实时定量PCR分析miRNAs表达以鉴别CD和UC。临床实践中,IBD诊断主要依靠内镜下表现为依据,对于内镜表现不典型者诊断困难,血清miRNAs为实现早期诊断IBD提供了一种非侵入检测方法,对IBD有辅助诊断意义,并可进一步诊断疾病状态及表现型。

4 miRNAs与非特异性炎症性胃肠病

萎缩性胃炎是胃癌的癌前病变,对萎缩性胃炎的

监测和治疗意义重大。研究表明miRNAs的多态性与萎缩性胃炎和胃癌发生的风险性增加有关系。日本学者将179例排除胃恶性疾病的患者纳入研究,结果显示miR-27a G等位基因的出现频率在消化性溃疡和严重的黏膜萎缩中都增加,miR-27a的基因多态性在胃黏膜萎缩中显示与性别有关,只有男性患者的miR-27a基因多态性与胃黏膜萎缩有关,在G/G组萎缩和化生都明显高于其他组^[50]。此外,miR-146等位基因G/C(rs2910164)和TLR4+3725 G/C(rs11536889)的联合作用将增加幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *H. pylori*)感染的日本人群发生重度胃萎缩的风险性^[51]。

关于血清miRNAs与萎缩性胃炎的报道目前尚未见到。miRNAs参与消化性溃疡及其他炎症疾病的报道目前尚未见到。

5 miRNAs与功能性胃肠病

肠易激综合征(irritable bowel syndrome, IBS)是与5-HT功能失调相关的综合征。有学者研究女性腹泻型IBS(IBS-D)患者的HTR3E的3'非翻译区变体C端其C端76位碱基出现G的几率大于A,影响miR-510与HTR3E3'-UTR区域的结合,导致荧光素酶的高表达,显示HTR3E和miR-510共同位于肠上皮细胞。这是首次发现miRNAs通过顺式调节变体影响5-HT受体基因的表达,这种调节作用与女性IBS-D患者相关^[52]。Zhou等^[53]研究发现肠黏膜通透性增高的IBS患者其谷氨酰胺合成酶(glutamine synthetase, GLUL)水平相对于黏膜通透性正常的IBS患者低,miR-29a在肠黏膜通透性增高的IBS小肠和结肠组织表达增高,表明了miR-92a是通过调节GLUL影响肠黏膜通透性的。综上,miRNAs参与到IBS疾病过程,但对于诊断IBS的意义尚未见到报道。

关于血清miRNAs与IBS的报道目前尚未见到。miRNAs参与功能性消化不良的报道目前尚未见到。

6 miRNAs与动力障碍性胃肠病

miRNAs参与胃肠道动力障碍的报道较为少见。其中Saito等^[54]的研究发现慢性感染*H. pylori*的小鼠其胃排空过程是明显加快的;组织学检查发现*H. pylori*感染后小鼠胃肌层增生明显;慢性*H. pylori*感染下调胃部肌肉特异性的miRNAs(miR-1、miR-133),上调其靶基因去乙酰化酶-4和血清反应因子的表达;这些结果有助于我们对胃动力异常及功能性消化不良的分子

机制进行深入理解. 关于血清miRNAs与胃排空异常的报道目前尚未见到. miRNAs参与其他动力障碍性胃肠道疾病如食管反流病的报道目前尚未见到.

7 结论

因血循环流经全身各处组织脏器, 其中的代谢产物和细胞因子等能反映组织脏器的不同病理生理学水平的改变, 甚至基因水平的改变. 相对于组织miRNAs而言, 血清miRNAs的优势在于无创便捷和水平稳定. 血清miRNAs诊断疾病的可行性是充分可靠的, 为胃肠道疾病的早期诊断提供一种新的非侵入性检测方法. 血清miRNAs在胃肠道肿瘤性疾病和免疫性疾病中的研究已被报道, 但其他疾病中血清miRNAs的具体研究尚未见报道; 胃肠道组织中miRNAs研究早于血清miRNAs, 血清miRNAs不及组织miRNAs深入和广泛, 但血清miRNAs的研究更具临床及现实意义. 目前血清miRNAs的研究主要集中在诊断方面, 尤其是早期诊断胃肠道疾病, 其他领域如治疗和预后等有待于进一步研究. 目前通过检测血清miRNAs的方法实现早期诊断胃肠道疾病, 还有许多有待于解决的问题. 我们应积极开拓思路, 从各个方面着手解决血清miRNAs诊断应用的难点问题, 特别是组织特异miRNAs的确定、miRNAs检测方法的标准化和标准化的miRNAs诊断阈值的确定等. 伴随研究水平的提高和应用难题的解决, 相信血清miRNAs在今后临床无创诊断和监测疾病中会有广阔的应用前景.

8 参考文献

- Esquela-Kerscher A, Slack FJ. Oncomirs-microRNAs with a role in cancer. *Nat Rev Cancer* 2006; 6: 259-269
- Calin GA, Croce CM. MicroRNA signatures in human cancers. *Nat Rev Cancer* 2006; 6: 857-866
- 陈熹, 张峻峰, 曾科, 张辰宇. 血清microRNA-一种非侵入性的肿瘤标志物. *生命科学* 2010; 22: 649-654
- 铁铁, 付汉江, 郑晓飞. 循环microRNA与肿瘤诊断. *中国科学(C辑: 生命科学)* 2009; 39: 64-68
- Brase JC, Wuttig D, Kuner R, Sültmann H. Serum microRNAs as non-invasive biomarkers for cancer. *Mol Cancer* 2010; 9: 306
- Gilad S, Meiri E, Yogev Y, Benjamin S, Lebanony D, Yerushalmi N, Benjamin H, Kushnir M, Cholak H, Melamed N, Bentwich Z, Hod M, Goren Y, Chajut A. Serum microRNAs are promising novel biomarkers. *PLoS One* 2008; 3: e3148
- Shih KK, Levine DA. Exosomal microRNAs step into the biomarker arena. *Gynecol Oncol* 2008; 110: 1-2
- Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, Fritz BR, Wyman SK, Pogossova-Agadjanyan EL, Peterson A, Noteboom J, O'Brian KC, Allen A, Lin DW, Urban N, Drescher CW, Knudsen BS, Stirewalt DL, Gentleman R, Vessella RL, Nelson PS, Martin DB, Tewari M. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 105: 10513-10518
- Valadi H, Ekström K, Bossios A, Sjöstrand M, Lee JJ, Lötvall JO. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol* 2007; 9: 654-659
- Zhang Y, Liu D, Chen X, Li J, Li L, Bian Z, Sun F, Lu J, Yin Y, Cai X, Sun Q, Wang K, Ba Y, Wang Q, Wang D, Yang J, Liu P, Xu T, Yan Q, Zhang J, Zen K, Zhang CY. Secreted monocytic miR-150 enhances targeted endothelial cell migration. *Mol Cell* 2010; 39: 133-144
- Arroyo JD, Chevillet JR, Kroh EM, Ruff IK, Pritchard CC, Gibson DF, Mitchell PS, Bennett CF, Pogossova-Agadjanyan EL, Stirewalt DL, Tait JF, Tewari M. Argonaute2 complexes carry a population of circulating microRNAs independent of vesicles in human plasma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011; 108: 5003-5008
- Chen X, Ba Y, Ma L, Cai X, Yin Y, Wang K, Guo J, Zhang Y, Chen J, Guo X, Li Q, Li X, Wang W, Zhang Y, Wang J, Jiang X, Xiang Y, Xu C, Zheng P, Zhang J, Li R, Zhang H, Shang X, Gong T, Ning G, Wang J, Zen K, Zhang J, Zhang CY. Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases. *Cell Res* 2008; 18: 997-1006
- Hafner M, Landgraf P, Ludwig J, Rice A, Ojo T, Lin C, Holoch D, Lim C, Tuschl T. Identification of microRNAs and other small regulatory RNAs using cDNA library sequencing. *Methods* 2008; 44: 3-12
- 许建, 武治印, 于典科. 血清microRNA在肿瘤诊断和预后评估中的应用. *中国科学科学通报* 2010; 55: 2-6
- Lusi EA, Passamano M, Guarascio P, Scarpa A, Schiavo L. Innovative electrochemical approach for an early detection of microRNAs. *Anal Chem* 2009; 81: 2819-2822
- Gui J, Tian Y, Wen X, Zhang W, Zhang P, Gao J, Run W, Tian L, Jia X, Gao Y. Serum microRNA characterization identifies miR-885-5p as a potential marker for detecting liver pathologies. *Clin Sci (Lond)* 2011; 120: 183-193
- Qu KZ, Zhang K, Li H, Afdhal NH, Albitar M. Circulating microRNAs as biomarkers for hepatocellular carcinoma. *J Clin Gastroenterol* 2011; 45: 355-360
- Li LM, Hu ZB, Zhou ZX, Chen X, Liu FY, Zhang JF, Shen HB, Zhang CY, Zen K. Serum microRNA profiles serve as novel biomarkers for HBV infection and diagnosis of HBV-positive hepatocarcinoma. *Cancer Res* 2010; 70: 9798-9807
- Wang F, Zheng Z, Guo J, Ding X. Correlation and quantitation of microRNA aberrant expression in tissues and sera from patients with breast tumor. *Gynecol Oncol* 2010; 119: 586-593
- Zhu W, Qin W, Atasoy U, Sauter ER. Circulating microRNAs in breast cancer and healthy subjects. *BMC Res Notes* 2009; 2: 89
- Heneghan HM, Miller N, Kelly R, Newell J, Kerin MJ. Systemic miRNA-195 differentiates breast cancer from other malignancies and is a potential biomarker for detecting noninvasive and early stage disease. *Oncologist* 2010; 15: 673-682

■应用要点

如能明确各类胃肠道疾病特异性的血清miRNAs, 可为实现疾病基因水平的早期诊断提供一种非侵入性的标志. 从长远来看, 血清miRNAs应用于临床实践可改善患者的治疗效果及预后.

■名词解释

miRNAs: 一类长度约为19-23个核苷酸的非编码RNAs, 由具有发夹结构的、70-90个碱基大小的单链miRNA前体(pre-miRNA)经Dicer加工产生, 通过和靶mRNA的3'端非翻译区互补结合诱导靶mRNA的翻译抑制或剪切降解。目前发现, miRNAs对30%以上的基因具有的调控作用, 与人类多种疾病的发生息息相关。

- 22 Wang GK, Zhu JQ, Zhang JT, Li Q, Li Y, He J, Qin YW, Jing Q. Circulating microRNA: a novel potential biomarker for early diagnosis of acute myocardial infarction in humans. *Eur Heart J* 2010; 31: 659-666
- 23 Tijssen AJ, Creemers EE, Moerland PD, de Windt LJ, van der Wal AC, Kok WE, Pinto YM. MiR423-5p as a circulating biomarker for heart failure. *Circ Res* 2010; 106: 1035-1039
- 24 Laterza OF, Lim L, Garrett-Engle PW, Vlasakova K, Muniappa N, Tanaka WK, Johnson JM, Sina JF, Fare TL, Sistare FD, Glaab WE. Plasma MicroRNAs as sensitive and specific biomarkers of tissue injury. *Clin Chem* 2009; 55: 1977-1983
- 25 Guo Y, Chen Z, Zhang L, Zhou F, Shi S, Feng X, Li B, Meng X, Ma X, Luo M, Shao K, Li N, Qiu B, Mitchelson K, Cheng J, He J. Distinctive microRNA profiles relating to patient survival in esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Res* 2008; 68: 26-33
- 26 Feber A, Xi L, Luketich JD, Pennathur A, Landreneau RJ, Wu M, Swanson SJ, Godfrey TE, Litle VR. MicroRNA expression profiles of esophageal cancer. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2008; 135: 255-260; discussion 260
- 27 Komatsu S, Ichikawa D, Takeshita H, Tsujiura M, Morimura R, Nagata H, Kosuga T, Iitaka D, Konishi H, Shiozaki A, Fujiwara H, Okamoto K, Otsuji E. Circulating microRNAs in plasma of patients with oesophageal squamous cell carcinoma. *Br J Cancer* 2011; 105: 104-111
- 28 Kurashige J, Kamohara H, Watanabe M, Tanaka Y, Kinoshita K, Saito S, Hiyoshi Y, Iwatsuki M, Baba Y, Baba H. Serum microRNA-21 is a novel biomarker in patients with esophageal squamous cell carcinoma. *J Surg Oncol* 2012; 106: 188-192
- 29 Zhang C, Wang C, Chen X, Yang C, Li K, Wang J, Dai J, Hu Z, Zhou X, Chen L, Zhang Y, Li Y, Qiu H, Xing J, Liang Z, Ren B, Yang C, Zen K, Zhang CY. Expression profile of microRNAs in serum: a fingerprint for esophageal squamous cell carcinoma. *Clin Chem* 2010; 56: 1871-1879
- 30 Song YX, Yue ZY, Wang ZN, Xu YY, Luo Y, Xu HM, Zhang X, Jiang L, Xing CZ, Zhang Y. MicroRNA-148b is frequently down-regulated in gastric cancer and acts as a tumor suppressor by inhibiting cell proliferation. *Mol Cancer* 2011; 10: 1
- 31 Nishida N, Mimori K, Fabbri M, Yokobori T, Sudo T, Tanaka F, Shibata K, Ishii H, Doki Y, Mori M. MicroRNA-125a-5p is an independent prognostic factor in gastric cancer and inhibits the proliferation of human gastric cancer cells in combination with trastuzumab. *Clin Cancer Res* 2011; 17: 2725-2733
- 32 Wu WK, Lee CW, Cho CH, Fan D, Wu K, Yu J, Sung JJ. MicroRNA dysregulation in gastric cancer: a new player enters the game. *Oncogene* 2010; 29: 5761-5771
- 33 Tsujiura M, Ichikawa D, Komatsu S, Shiozaki A, Takeshita H, Kosuga T, Konishi H, Morimura R, Deguchi K, Fujiwara H, Okamoto K, Otsuji E. Circulating microRNAs in plasma of patients with gastric cancers. *Br J Cancer* 2010; 102: 1174-1179
- 34 Zhou H, Guo JM, Lou YR, Zhang XJ, Zhong FD, Jiang Z, Cheng J, Xiao BX. Detection of circulating tumor cells in peripheral blood from patients with gastric cancer using microRNA as a marker. *J Mol Med (Berl)* 2010; 88: 709-717
- 35 Song MY, Pan KF, Su HJ, Zhang L, Ma JL, Li JY, Yuasa Y, Kang D, Kim YS, You WC. Identification of serum microRNAs as novel non-invasive biomarkers for early detection of gastric cancer. *PLoS One* 2012; 7: e33608
- 36 Liu R, Zhang C, Hu Z, Li G, Wang C, Yang C, Huang D, Chen X, Zhang H, Zhuang R, Deng T, Liu H, Yin J, Wang S, Zen K, Ba Y, Zhang CY. A five-microRNA signature identified from genome-wide serum microRNA expression profiling serves as a fingerprint for gastric cancer diagnosis. *Eur J Cancer* 2011; 47: 784-791
- 37 Wu WK, Law PT, Lee CW, Cho CH, Fan D, Wu K, Yu J, Sung JJ. MicroRNA in colorectal cancer: from benchtop to bedside. *Carcinogenesis* 2011; 32: 247-253
- 38 Bandrés E, Cubedo E, Agirre X, Malumbres R, Zárate R, Ramirez N, Abajo A, Navarro A, Moreno I, Monzó M, García-Foncillas J. Identification by Real-time PCR of 13 mature microRNAs differentially expressed in colorectal cancer and non-tumoral tissues. *Mol Cancer* 2006; 5: 29
- 39 Wang CJ, Zhou ZG, Wang L, Yang L, Zhou B, Gu J, Chen HY, Sun XF. Clinicopathological significance of microRNA-31, -143 and -145 expression in colorectal cancer. *Dis Markers* 2009; 26: 27-34
- 40 Ba Y, Cai X, Chen X, Yin Y, Zhang Y, Zhang CY. [Down-regulative expression of microRNAs cluster in human colon tumorigenesis]. *Zhonghua Yixue Zazhi* 2008; 88: 1683-1686
- 41 Huang Z, Huang D, Ni S, Peng Z, Sheng W, Du X. Plasma microRNAs are promising novel biomarkers for early detection of colorectal cancer. *Int J Cancer* 2010; 127: 118-126
- 42 Wang LG, Gu J. Serum microRNA-29a is a promising novel marker for early detection of colorectal liver metastasis. *Cancer Epidemiol* 2012; 36: e61-e67
- 43 Pu XX, Huang GL, Guo HQ, Guo CC, Li H, Ye S, Ling S, Jiang L, Tian Y, Lin TY. Circulating miR-221 directly amplified from plasma is a potential diagnostic and prognostic marker of colorectal cancer and is correlated with p53 expression. *J Gastroenterol Hepatol* 2010; 25: 1674-1680
- 44 Ng EK, Chong WW, Jin H, Lam EK, Shin VY, Yu J, Poon TC, Ng SS, Sung JJ. Differential expression of microRNAs in plasma of patients with colorectal cancer: a potential marker for colorectal cancer screening. *Gut* 2009; 58: 1375-1381
- 45 Iborra M, Bernuzzi F, Invernizzi P, Danese S. MicroRNAs in autoimmunity and inflammatory bowel disease: crucial regulators in immune response. *Autoimmun Rev* 2012; 11: 305-314
- 46 Fasseu M, Tréton X, Guichard C, Pedruzzi E, Cazals-Hatem D, Richard C, Aparicio T, Daniel F, Soulé JC, Moreau R, Bouhnik Y, Laburthe M, Groyer A, Ogier-Denis E. Identification of restricted subsets of mature microRNA abnormally expressed in inactive colonic mucosa of patients with inflammatory bowel disease. *PLoS One* 2010; 5: e13160
- 47 Wu F, Zhang S, Dassopoulos T, Harris ML, Bayless TM, Meltzer SJ, Brant SR, Kwon JH. Identification of microRNAs associated with ileal and colonic Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis* 2010; 16: 1729-1738
- 48 Wu F, Guo NJ, Tian H, Marohn M, Gearhart S, Bayless TM, Brant SR, Kwon JH. Peripheral blood microRNAs distinguish active ulcerative colitis and Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis* 2011; 17: 241-250
- 49 Paraskevi A, Theodoropoulos G, Papaconstantinou

- I, Mantzaris G, Nikiteas N, Gazouli M. Circulating MicroRNA in inflammatory bowel disease. *J Crohns Colitis* 2012 Feb 28. [Epub ahead of print]
- 50 Arisawa T, Tahara T, Shibata T, Nagasaka M, Nakamura M, Kamiya Y, Fujita H, Hasegawa S, Takagi T, Wang FY, Hirata I, Nakano H. A polymorphism of microRNA 27a genome region is associated with the development of gastric mucosal atrophy in Japanese male subjects. *Dig Dis Sci* 2007; 52: 1691-1697
- 51 Hishida A, Matsuo K, Goto Y, Naito M, Wakai K, Tajima K, Hamajima N. Combined effect of miR-146a rs2910164 G/C polymorphism and Toll-like receptor 4 +3725 G/C polymorphism on the risk of severe gastric atrophy in Japanese. *Dig Dis Sci* 2011; 56: 1131-1137
- 52 Kapeller J, Houghton LA, Mönnikes H, Walstab J, Möller D, Bönsch H, Burwinkel B, Autschbach F, Funke B, Lasitschka F, Gassler N, Fischer C, Whorwell PJ, Atkinson W, Fell C, Büchner KJ, Schmidtman M, van der Voort I, Wisser AS, Berg T, Rapold G, Niesler B. First evidence for an association of a functional variant in the microRNA-510 target site of the serotonin receptor-type 3E gene with diarrhea predominant irritable bowel syndrome. *Hum Mol Genet* 2008; 17: 2967-2977
- 53 Zhou Q, Souba WW, Croce CM, Verne GN. MicroRNA-29a regulates intestinal membrane permeability in patients with irritable bowel syndrome. *Gut* 2010; 59: 775-784
- 54 Saito Y, Suzuki H, Tsugawa H, Suzuki S, Matsuzaki J, Hirata K, Hibi T. Dysfunctional gastric emptying with down-regulation of muscle-specific microRNAs in Helicobacter pylori-infected mice. *Gastroenterology* 2011; 140: 189-198

■同行评价
本研究选题新颖,
有潜在临床意义.

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》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、被引量、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)。

胃肠道间质瘤的临床特征及治疗进展

胡其欣, 高青

■背景资料

胃肠道间质瘤是消化系统最常见的间叶组织源性肿瘤。近年来, 由于相关学科的发展, 对其发病机制、临床特点都有较深入的认识, 基于基因分析的分子靶向药物在胃肠道间质瘤的治疗中更是受到广泛关注, 并成为研究的热点之一。

胡其欣, 高青, 重庆医科大学附属第一医院消化内科 重庆市 400016

作者贡献分布: 本文综述由胡其欣完成; 高青审校。

通讯作者: 高青, 主任医师, 400016, 重庆市, 重庆医科大学附属第一医院消化内科. gaoqing27@yahoo.com

收稿日期: 2012-05-17 修回日期: 2012-07-10

接受日期: 2012-07-20 在线出版日期: 2012-08-08

Clinical features and treatment of gastrointestinal stromal tumors: Recent advances

Qi-Xin Hu, Qing Gao

Qi-Xin Hu, Qing Gao, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China

Correspondence to: Qing Gao, Chief Physician, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China. gaoqing27@yahoo.com.cn

Received: 2012-05-17 Revised: 2012-07-10

Accepted: 2012-07-20 Published online: 2012-08-08

Abstract

Gastrointestinal stromal tumors (GISTs) are the most common gastrointestinal mesenchymal tumors. The development of molecular biology, pathology and clinical medicine in recent years has deepened our understanding of GISTs. The combination of traditional surgery and molecular targeted drugs is particularly important for the treatment of GISTs. Multi-target and multi-kinase inhibitors such as imatinib and sunitinib have been used for the treatment of unresectable and recurrent GISTs. This paper provides a brief review of gene analysis, pathological characteristics, operational and adjuvant therapy of GISTs.

Key Words: Gastrointestinal stromal tumors; Diagnosis; Therapy

Hu QX, Gao Q. Clinical features and treatment of gastrointestinal stromal tumors: Recent advances. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2012; 20(22): 2050-2057

摘要

胃肠道间质瘤(gastrointestinal stromal tumor,

GIST)是胃肠道最常见的间叶性肿瘤, 近年来随着分子生物学、组织病理学和临床医学的研究进展, 对其认识不断加深。传统手术与分子靶向药物相结合对GIST的治疗显得尤为重要, 以伊马替尼和舒尼替尼等药物为代表的多靶点和多激酶抑制剂在治疗不可切除及复发性GIST中更是受到高度关注。本文主要对该病的基因分析、病理组化特点、手术及辅助治疗相关进展作一综述。

关键词: 胃肠道间质瘤; 诊断; 治疗

胡其欣, 高青. 胃肠道间质瘤的临床特征及治疗进展. *世界华人消化杂志* 2012; 20(22): 2050-2057

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/2050.asp>

0 引言

胃肠道间质瘤(gastrointestinal stromal tumor, GIST)是最常见的胃肠道间叶源性肿瘤。20世纪90年代以前, 由于病理技术的限制, 曾被认为是平滑肌源性或神经源性肿瘤, 归类为平滑肌瘤或平滑肌母细胞瘤^[1]。90年代后的一系列相关研究显示, 其发育依赖于KIT激酶调控的干细胞因子, 并表达Kit蛋白(CD-117)及CD34, 此类肿瘤可通过免疫组化的方法作出诊断。近年来, 酪氨酸激酶抑制剂成为治疗GIST的有力手段, 与其相关的基因型分析也为临床实践及药物研究领域带来了新的突破方向。本文主要对胃肠道间质瘤的病理组织学标志物及辅助治疗相关进展作一综述。

1 起源与发病机制

病理学超微结构和免疫组织化学(免疫组化)研究显示: GIST起源于胃肠道间质干细胞-Cajal细胞(intestinal cell of Cajal, ICC)可能性大或向Cajal细胞分化, 大多数GIST表达干细胞因子受体KIT蛋白(CD117)或PDGFR α (胎盘源性生长因子 α)^[2]。约有85%的GIST具有酪氨酸激酶基因 $c-kit$ 或PDGFR α 突变^[3,4]。通常, GIST被看做是KIT表达阳性, 并具有 $c-kit$ 或PDGFR基因突变的间质肿瘤。

■同行评议者

王江滨, 教授, 吉林大学中日联谊医院

1.1 发病机制

1.1.1 *c-kit*基因突变型: *c-kit*是一种原癌基因, 编码具有酪氨酸激酶活性的跨膜蛋白, 该蛋白受体受干细胞因子(stemcell factor, SCF)调节, SCF/KIT通过多种信号因子将细胞外信号传至细胞内, 启动正常细胞增殖分化或其他基因表达. *c-kit*基因发生突变时, 不能精确地调节细胞分化、增殖和凋亡, 使更多的细胞由静止期进入增生期, 可能是引起GIST恶性转化的关键机制之一. GIST中, KIT基因突变约占80%-85%, 这也解释了大多数GIST高度表达CD117(KIT蛋白)的原因. 其基因突变的主要形式包括缺失、插入和点突变, 在恶性GIST病例中是发病的起始机制^[5]. 最常见的为11号外显子突变, 突变率为50%-60%^[6], 其次为9号外显子突变, 另有少部分突变位于13和17号外显子^[7,8].

1.1.2 PDGFRA基因突变型: 约有20%的GIST缺少KIT基因突变, 而这些病例的30%(即所有GIST的6%)存在血小板源性生长因子受体A(PDGFR A)基因的突变, PDGFRA与*c-kit*同属于III型酪氨酸激酶家族, 且结构相似, 其最常见的突变位于18号外显子上, 其他的变异包括外显子12和14^[9]. *c-kit*与PDGFRA变异是互斥的, 同时存在变异的十分罕见^[10]. PDGFRA基因突变率较*c-kit*基因低, 多见于CD117阴性的GIST^[11], 且几乎总是发生于胃GIST.

1.1.3 野生型及其他基因突变: 除KIT与PDGFRA基因突变以外, 另有一小部分GIST已发现有BRAF基因突变(约占1%)^[12]. Nakajima等^[13]采用显微切割技术获得了GIST肿瘤旁的Cajal细胞, 却没有发现有*c-kit*或PDGFRA- α 的突变, 这类GIST被称为野生型(wild type, WT)^[14]. 儿童野生型GIST与成人不同, 有研究发现其存在琥珀酸脱氢酶B亚单位(SDHB)相关基因突变^[15], 目前WT型GIST的发病机制尚不明确, 这提示GIST的发生可能是肿瘤细胞获得性多基因突变及多个事件共同参与的结果^[16].

众多突变基因的发现, 不仅在病理组织学上为GIST的准确诊断提供了可能, 而且在许多病例中, 基因分析也是指导GIST治疗的重要依据.

2 病理特点

2.1 组织学形态 肿瘤最大直径可达35 cm, 中位大小5 cm, 肉眼观: 呈肉红色或黄白色, 多为局限性生长, 边界清楚, 有假包膜形成, 其血供丰富, 常发生中心缺血性坏死或囊样变性. 镜下: 根

据细胞学形态, 可将GIST分为3种主要亚型: 梭状细胞型(70%)、上皮细胞型(20%)和混合细胞型(10%). 3种亚型均见细胞有异型性, 间质可有硬化、纤维化和黏液淀粉样变. 胃的GIST多为梭形细胞为主型及上皮样细胞为主型. 小肠的GIST则大多数为梭形细胞型, 多包含有特征性的圆形、椭圆形或长形的嗜酸性的细胞和PAS染色阳性的沉积在细胞外的胶原纤维^[17].

2.2 组织化学特点 GIST的标志物中, CD117是诊断GIST的最重要指标, GIST中CD117阳性率高达90%-95%^[18], 并与GIST的预后有关. 组织学符合典型GIST, CD117阳性的病例可做出GIST的诊断, CD117在GIST肿瘤细胞的阳性表达应定位在胞膜和(或)胞质, 在接受伊马替尼治疗的GIST患者中, CD117的表达下降和丢失则可能与GIST的复发有关^[19].

DOG1是一种C蛋白激酶, 也称为TME-M16A. Espinosa等^[20]研究发现, DOG1有DOG1.1与DOG1.3两种亚型. DOG1在GIST中普遍呈阳性表达, 尤其是PDGFRA突变的GIST中, 其表达率明显高于CD117与CD34. 其与*c-kit*在GIST中的灵敏度几乎相同(94.7%和94.7%), 在胃梭形细胞GIST中, 两者均一致呈阳性表达. 但在胃上皮样GIST中, 前者表达稍高于后者, 在小肠GIST中, *c-kit*灵敏度稍高于DOG1. DOG1在PDGFR- α 突变间质瘤、胃肠道外GIST和转移性GIST中也普遍呈阳性表达, 发生于胃肠道的GIST中只有2.6%的病例DOG1和*c-kit*均呈阴性表达^[21], 最近DOG1单抗的应用更加确定了DOG1诊断的准确性和特异性. 约36%CD117阴性的GIST中DOG1呈阳性表达^[18].

其他敏感性及特异度稍差的标志物有平滑肌肌动蛋白抗体(SMA)、波形纤维蛋白(Vimentin)、神经元特异性烯醇化酶(NSE)和S-100蛋白、结蛋白(Desmin)、Actin、h-钙调素结合蛋白(h-caldesmon). 一般而言, GIST的CD117阳性率为95%-100%, Vimentin阳性率为80%-90%, CD34为60%-70%, SMA为40%, S-100<5%, Desmin<2%^[22,23]. 另外, 部分GIST中PKC- θ 阳性表达率为70%, 可与DOG1联合进行检测以提高CD117阴性的GIST诊断率^[24].

3 临床特点

3.1 流行病学 GIST的流行病学特征尚不清楚, 确切的发病情况难以统计. 据相关文献报道, GIST的发病率为1.4-1.96/100 000^[11], 发病年龄通常在

■研发前沿

胃肠道间质瘤的手术治疗是常规手段, 但对于无法切除或转移性GIST, 明确患者基因型, 并选择合适的靶向药物进行个体化治疗显得尤为重要, 对耐药突变的进一步研究, 是以后药物研发及治疗的重要方向.

■相关报道

Demetri等学者长期以来致力于伊马替尼等酪氨酸激酶抑制剂在临床应用中的研究,如具体用药剂量和疗程长短等,其提到对于伊马替尼治疗失败或者治疗中断的患者,苏尼替尼是较好的选择,联合使用下游信号通路抑制剂也能起到协同作用。

表 1 NIH原发GIST切除后的风险分级

危险度分级	肿瘤大小(cm)	核分裂(/50 HPF)	肿瘤复发部位
极低	≤2	≤5	任何部位
低	2.1-5.0	≤5	任何部位
中	2.1-5.0	>5	胃
	≤5	6-10	任何部位
	5.1-10.0	≤5	胃
高	任何大小	任意	肿瘤破裂
	>10	任意	任何部位
	任何大小	>10	任何部位
	>5.0	>5	任何部位
	2.1-5.0	>5	非胃来源
	5.1-10.0	≤5	非胃来源

50-70岁,无明显性别倾向。其中近10%的病例为尸检发现,20%经内镜活检发现,其他则通过外科手术病理证实和腹部影像学等途径诊断^[25]。

3.2 临床表现 GIST的临床表现缺乏特异性。最常见的症状为不明原因的腹部不适、隐痛或可扪及腹部肿块;其次是由肿瘤引起的消化道出血或仅表现为贫血。其他少见症状有食欲不振、体质量下降、恶心、腹泻、便秘和肠梗阻等^[26]。十二指肠的GIST能引起梗阻性黄疸。有患者以远处转移为首发症状,约近1/3的患者没有临床症状。近来,家族性GIST也见报道,其多伴有色素沉着及胃肠道功能紊乱,如吞咽困难和肠易激综合征等^[27]。GIST的复发率极高。通常为局部复发,少见周围淋巴结转移^[28,29]。

3.3 生物学行为 大约30%的GIST可明确为恶性,常远处转移至肝脏^[30],也见转移至淋巴结、肺、骨及皮肤的报道^[31],其余属于恶性潜能不能确定或良性。影响GIST生物学行为或危险指数的因素很多。较公认的是肿瘤大小和核分裂象计数,并应参考肿瘤部位,综合分析决定其生物学行为。

2008年,美国国立卫生研究院(NIH)重新讨论了原发GIST切除后的风险分级,并达成共识,与2006年分级标准相比,加入了原发肿瘤部位和肿瘤破裂两项预后评估指标(表1),将肿瘤破裂列为高度危险性GIST,认为不论肿瘤大小和核分裂数,一旦肿瘤发生了破裂即认为具有高度危险性^[32]。

近年来,国内外学者试图借助分子生物学指标的方法来完善GIST危险度评估。Kikuta与Kubota等^[33,34]通过对299例GIST病例进行研究发现,Pfetin是与GIST危险度呈负相关的标志之一,

Pfetin阳性的GIST患者5年无病生存率明显较阴性者高,并可能成为指导临床用药及预防GIST患者复发的潜在靶点。黏着斑激酶(FAK)与多种肿瘤的进展及恶化相关,伊马替尼耐药(*c-kit* 17号外显子突变)的GIST中,FAK明显上调,提示其可能也参与了GIST的发生发展及恶化^[35]。增殖指数Ki-67是预测GIST的侵袭行为和恶性潜能是非常有效的标志物,可作为GIST的一项独立预测指标^[36,37]。另有研究发现P53和P16表达阳性及抑癌基因Rb的丢失均可能与预后不良相关^[36,38]。

4 诊断

4.1 临床病理诊断 对于临床上发现的消化系(包括肠系膜、网膜和后腹膜)实体肿瘤,在排除了其他消化系常见肿瘤后,可考虑GIST,一般有以下诊断步骤: (1)CT扫描和内镜检查证实为实体性肿瘤; (2)肿瘤组织具有梭形细胞和上皮样细胞两种基本细胞成分的病理学特征; (3)CD117免疫活性的测定为阳性。对后者的测定可视为诊断GIST的“金标准”。

4.2 影像学检查 由于GIST的临床表现繁多,缺乏特异性,临床诊断具有一定难度,故联合多种影像学检查(X线造影、CT、MRI、PET和超声内镜引导下的经皮穿刺活检)及内镜活检可明显提高诊断的阳性率^[39,40]。

超声可描述原发和转移肿瘤的内部特征,通常表现为胃肠道紧密相连的均匀低回声团块,但由于GIST肿瘤往往较大,超声视野中不能观其全貌,无法获知肿瘤与周围组织的关系。单纯X线对GIST检测作用不大,胃肠道钡餐造影检测可显示GIST累及黏膜面和管腔改变。CT能直接观察肿瘤的大小、形态、密度、周围侵犯情况

及其他部位的转移灶,并可作为判断药物疗效的手段^[41]. GIST的MRI信号表现复杂,可提供更佳的软组织对比分辨率和直接多平面影像,有助于肿瘤的定位. PET检测可运用造影剂观测肿瘤的功能活动,从而可分辨良恶性,其对小肠肿瘤的敏感性较高,可提高对治疗反应的判断率^[42],并为临床随访和治疗措施提供依据. 血管造影主要用于明确GIST合并消化道出血的原因和部位,并协助栓塞止血或栓塞化疗的定位^[43]. 超声内镜引导下经皮穿刺活检(EUS-FNA)是一种安全有效的诊断方法,其准确性为91%^[29,44],多于进行新辅助治疗或姑息治疗需病理结果支持时采用,初发疑似GIST(如排除淋巴瘤)及术前需明确性质的,也首选(EUS-FNA)^[45].

5 治疗及随访

5.1 传统外科治疗 外科手术是原发未转移GIST的首要治疗手段,对于肿瘤病变局限和最大径线大于或等于2 cm者,原则上应手术行完整切除. 孤立性复发或转移病变,估计手术能完整切除且不严重影响相关脏器功能者,可以直接手术. 原难以完全切除的GIST,可经新辅助靶向治疗,待肿瘤缩小后切除. 因GIST极少有淋巴结转移,故通常手术切缘距肿瘤边缘2 cm已足够,除非有明确淋巴结转移迹象,一般不进行淋巴结的清扫. 而对于大部分的原发性GIST均不推荐术前活检或术中冷冻活检^[45]. 腹腔镜手术治疗GIST以<5 cm的肿瘤为宜. 但亦有学者认为,腹腔镜手术发生肿瘤破裂和腹腔种植的风险高于开腹手术,一般不建议选择,可在腔内肿瘤较小(≤2 cm)考虑使用腹腔镜手术^[46]. DeMatteo等^[47]分析了200例恶性GIST患者的术后生存情况,结果显示无转移的原发肿瘤患者根治性手术后中位生存期约为60 mo, 5年生存率为54%. Gold等^[48]对靶向治疗应用之前的119例复发转移的GIST病例进行分析,发现手术是改善患者预后的独立因素.

5.2 术前辅助治疗 GIST术前辅助治疗的应用能够降低手术风险,减小肿瘤体积,最大限度地保留重要脏器功能^[49]. McAuliffe等^[50]报道的一项II期临床试验结果显示,术前短期应用伊马替尼可使约70%的患者在影像学上表现为肿瘤代谢水平降低(≥40%)和肿瘤血流减少(>10%),肿瘤细胞凋亡率平均增加12%(0%-33%),并与术前伊马替尼应用时间呈正相关. Eisenberg等^[51]的研究也提示术前辅助化疗有助于改善原发性

GIST的预后.

对复发的GIST术前进行辅助治疗,能改善复发转移患者的预后,增加再次手术的机会,而再次手术不仅能提高其无进展生存期,也能降低肿瘤耐药的危险^[52,53]. Schurr等^[54]对41例复发转移患者进行分析,发现手术联合靶向治疗患者的预后优于单独行手术或靶向治疗者. 随着术后辅助治疗地位的确立,新辅助治疗也将有助于在术前筛选出对分子靶向治疗敏感的病例.

5.3 分子靶向治疗

5.3.1 伊马替尼: 传统化疗和放疗对进展期GIST(无法切除或发生转移)几乎无效,甲磺酸伊马替尼(imatinib)是一种小分子选择性酪氨酸激酶抑制剂,其作用靶点包括KIT、PDGFR(A和B)和BCR-ABL等,通过选择性抑制酪氨酸激酶活性,阻断磷酸基团向酪氨酸残基转移,进而抑制间质瘤细胞的增殖分化^[55]. 一系列多中心临床研究表明,作为一种分子靶向治疗药物,伊马替尼对胃肠道间质瘤疗效显著. 其推荐治疗方案为起始剂量400 mg/d,持续用药12 mo,这能使无进展生存期达到20-24 mo,并对高复发风险的GIST同样有效^[56]. 美国ACOSOG一项II期临床试验表明,对R₀/R₁外科手术切除的具有高危因素的胃肠道间质瘤患者给予12 mo的伊马替尼400 mg/d治疗,经过中位随访时间4年,结果提示与历史对照组相比,伊马替尼组能显著提高总生存率和无复发生存率^[57]. 另一个III期随机对照试验中,对于外科手术切除的肿瘤直径>3 cm的患者分别给予伊马替尼400 mg/d或者安慰剂治疗12 mo,结果显示辅助治疗能显著提高无复发生存率^[58]. Blanke等^[59]分析了147例进展期GIST患者对伊马替尼治疗(73例400 mg/d, 74例600 mg/d)的反应,中位随访期为63 mo. 患者总体中位生存期为57 mo,近50%的患者生存期超过5年.

最近研究表明, *c-kit*基因11号外显子突变的GIST对伊马替尼反应较好,9号外显子突变者敏感性稍差,而17号外显子突变及PDGFRA基因18号外显子突变(D842V)者则几乎无效^[60]. 虽然提高药物剂量并不能得到更多的益处,但对于9号外显子突变者,推荐标准治疗剂量可提高为800 mg/d^[61].

随着伊马替尼应用的增加,其耐药现象已引起临床医师和研究者的高度重视. 长期随访结果显示,伊马替尼治疗的中位有效时间为29 mo,大部分接受伊马替尼治疗的患者最终产生耐药.

■创新盘点

借助分子生物学标志物测定,可以对胃肠道间质瘤的侵袭行为和恶性潜能进行估计,同时也能更科学地应用辅助化疗药物,促进更好的预后.

■应用要点

此文对胃肠道间质瘤的临床病理特点、诊断、治疗及预后等进行了综述,其中着重于其发病机制及临床分子靶向药物的应用,对于临床制定辅助治疗方案和随访计划等有较强的指导意义。

伊马替尼的最佳疗程仍存在争议,需要通过进一步的研究确定^[62]。

关于伊马替尼耐药(包括原发和继发)的机制尚不十分明确,初步的研究提示有以下几种机制: (1)新的*c-kit*和PDGFR- α 基因位点获得性突变; (2)KIT基因扩增导致KIT受体过表达; (3)其他的受体酪氨酸激酶的激活; (4)近膜热点区域之外的突变导致*c-kit*和PDGFR- α 蛋白的激活。

5.3.2 舒尼替尼: 继伊马替尼后, 另一种多靶点酪氨酸激酶抑制剂—苹果酸舒尼替尼(sunitinib)进入研究者视线, 其可抑制多个与肿瘤的生长和血管生成相关的酪氨酸激酶受体。一项随机双盲试验中, 对手术无法切除且伊马替尼耐药的患者, 舒尼替尼能明显延长疾病的中位进展时间(6.3 wk vs 27.3 wk, 安慰剂组: 舒尼替尼组)^[63]。2006年, 舒尼替尼被FDA批准成为GIST的二线治疗用药。2008年ASCO年会上报告舒尼替尼治疗的部分缓解率14%, 疾病稳定率63%, 中位进展时间为37 wk^[64]。Demetri与Younus等^[63,65]及其他学者研究发现, 其对伊马替尼治疗失败或治疗中断的进展期GIST患者有较好的临床疗效, 且患者耐受性良好。另有证据显示, 伊马替尼耐药的复发病例经手术切除后, 仍可能对舒尼替尼有较好的敏感性^[66]。有学者提出, 接受舒尼替尼治疗的KIT9号外显子突变者的部分缓解率、无进展生存期及总生存期要显著长于KIT 11号外显子突变者, 而对PDGFRA-18号外显子的D842V突变无效^[64,67], 这表明基因型分析在预测分子靶向药物治疗效果及选择合适治疗人群上起着重要作用^[68]。

此外, 一些针对KIT和PDGFR靶点的其他酪氨酸激酶抑制剂, 如血管生成抑制剂索拉非尼和AMG 706, BCR-ABL激酶抑制剂如达沙替尼和尼洛替尼, 蛋白激酶C抑制剂-PKC412等药物, 通过分别作用于BCR-ABL、PDGFR, VEGFR2及蛋白激酶C、FLT3等靶点, 对伊马替尼、舒尼替尼耐药的GIST有较好的抗肿瘤活性。另有研究指出, 针对下游信号通路的抑制剂如依维莫司和转录抑制剂夫拉平度等, 与传统酪氨酸激酶抑制剂联用可产生协同作用, 共同抑制伊马替尼/舒尼替尼耐药的GIST细胞株生长, 但均仍待大规模长期临床研究的证明。

5.4 随访 对于经外科治疗后的原发性GIST患者, 目前暂无最佳的随访策略。欧洲及美国的相关指南建议: 对于中-高风险的患者, 每3-4 mo进行一次CT检查, 持续3年, 后每6 mo进行一次持续

至第5年, 后每年检查一次。对于低风险患者, 则每6 mo进行一次CT检查, 持续5年^[69,70]。一些证据表明, 发生GIST的同时, 可能并发其他恶性肿瘤, 这提示其可看做是某个综合征的一部分, 如神经节细胞瘤-胃间质瘤-肺软骨瘤(Carney三联征)^[71]。因此, 尽管非原位复发的GIST与其他恶性肿瘤相比较少见, 但延长随访时间不仅有利于发现复发肿瘤, 而且也能对其他恶性肿瘤进行早期诊断^[72]。

6 结论

随着近年来分子生物学、组织病理学和临床医学的发展, GIST的起源、发病机制、病理形态特征和临床特点等已得到较深入的阐述。手术治疗仍是其常规手段, 对于无法切除或转移性GIST, 酪氨酸激酶抑制剂的成功应用, 使其已成为实体瘤分子靶向治疗的经典模型, GIST的治疗已由原先简单的手术切除发展为针对不同病情采取包括手术、辅助治疗和术前辅助治疗在内的个体化治疗。在GIST患者的靶向药物治疗中, 明确其基因型并依据其进行治疗, 是以后药物的研发及治疗的重要方向, 并将对GIST的治疗带来重大变化。对于*c-kit*/PDGFRA野生型、PDGFRA(D842V)突变及其他少见的对伊马替尼/舒尼替尼耐药的突变型患者, 是否应放弃辅助治疗仅给予密切观察, 还是应尝试给予其他分子靶向药物治疗? 对于高复发风险患者, 伊马替尼/舒尼替尼辅助治疗的时限长短等一系列问题仍有待我们进一步探索。

7 参考文献

- 1 Fletcher CD, Berman JJ, Corless C, Gorstein F, Lasota J, Longley BJ, Miettinen M, O'Leary TJ, Remotti H, Rubin BP, Shmookler B, Sobin LH, Weiss SW. Diagnosis of gastrointestinal stromal tumors: A consensus approach. *Hum Pathol* 2002; 33: 459-465
- 2 Lasota J, Stachura J, Miettinen M. GISTs with PDGFRA exon 14 mutations represent subset of clinically favorable gastric tumors with epithelioid morphology. *Lab Invest* 2006; 86: 94-100
- 3 Benjamin RS, Debiec-Rychter M, Le Cesne A, Sleijfer S, Demetri GD, Joensuu H, Schöffski P, Poveda A. Gastrointestinal stromal tumors II: medical oncology and tumor response assessment. *Semin Oncol* 2009; 36: 302-311
- 4 Kwon JE, Kang HJ, Kim SH, Lee YC, Hyung WJ, Noh SH, Kim NK, Kim H. Pathological characteristics of gastrointestinal stromal tumours with PDGFRA mutations. *Pathology* 2009; 41: 544-554
- 5 Duensing A, Heinrich MC, Fletcher CD, Fletcher JA. Biology of gastrointestinal stromal tumors: KIT mutations and beyond. *Cancer Invest* 2004; 22: 106-116
- 6 Rubin BP. Gastrointestinal stromal tumours: an update. *Histopathology* 2006; 48: 83-96

- 7 Demetri GD, Benjamin RS, Blanke CD, Blay JY, Casali P, Choi H, Corless CL, Debiec-Rychter M, DeMatteo RP, Ettinger DS, Fisher GA, Fletcher CD, Gronchi A, Hohenberger P, Hughes M, Joensuu H, Judson I, Le Cesne A, Maki RG, Morse M, Pappo AS, Pisters PW, Raut CP, Reichardt P, Tyler DS, Van den Abbeele AD, von Mehren M, Wayne JD, Zalcberg J. NCCN Task Force report: management of patients with gastrointestinal stromal tumor (GIST)--update of the NCCN clinical practice guidelines. *J Natl Compr Canc Netw* 2007; 5 Suppl 2: S1-S29; quiz S30
- 8 Hornick JL, Fletcher CD. The role of KIT in the management of patients with gastrointestinal stromal tumors. *Hum Pathol* 2007; 38: 679-687
- 9 Miettinen M, Wang ZF, Lasota J. DOG1 antibody in the differential diagnosis of gastrointestinal stromal tumors: a study of 1840 cases. *Am J Surg Pathol* 2009; 33: 1401-1408
- 10 陈慧娟. C-kit和PDGFRA基因对胃肠间质瘤的影响. *中国生物化学与分子生物学报* 2009; 25: 697-701
- 11 Miettinen M, Lasota J. Histopathology of gastrointestinal stromal tumor. *J Surg Oncol* 2011; 104: 865-873
- 12 Agaram NP, Wong GC, Guo T, Maki RG, Singer S, DeMatteo RP, Besmer P, Antonescu CR. Novel V600E BRAF mutations in imatinib-naive and imatinib-resistant gastrointestinal stromal tumors. *Genes Chromosomes Cancer* 2008; 47: 853-859
- 13 Nakajima T, Miwa S, Ando T, Fujinami H, Kajiura S, Hosokawa A, Takano Y, Sugiyama T. Interstitial cells of Cajal do not harbor c-kit or PDGFRA gene mutations in patients with sporadic gastrointestinal stromal tumors. *J Gastroenterol* 2009; 44: 426-431
- 14 Lasota J, Miettinen M. Clinical significance of oncogenic KIT and PDGFRA mutations in gastrointestinal stromal tumours. *Histopathology* 2008; 53: 245-266
- 15 Janeway KA, Kim SY, Lodish M, Nosé V, Rustin P, Gaal J, Dahia PL, Liegl B, Ball ER, Raygada M, Lai AH, Kelly L, Hornick JL, O'Sullivan M, de Krijger RR, Dinjens WN, Demetri GD, Antonescu CR, Fletcher JA, Helman L, Stratakis CA. Defects in succinate dehydrogenase in gastrointestinal stromal tumors lacking KIT and PDGFRA mutations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011; 108: 314-318
- 16 Daniels M, Lurkin I, Pauli R, Erbstößer E, Hildebrandt U, Hellwig K, Zschille U, Lüders P, Krüger G, Knolle J, Stengel B, Prall F, Hertel K, Lobeck H, Popp B, Theissig F, Wünsch P, Zwarthoff E, Agaimy A, Schneider-Stock R. Spectrum of KIT/PDGFRA/BRAF mutations and Phosphatidylinositol-3-Kinase pathway gene alterations in gastrointestinal stromal tumors (GIST). *Cancer Lett* 2011; 312: 43-54
- 17 Miettinen M, Lasota J. Gastrointestinal stromal tumors: review on morphology, molecular pathology, prognosis, and differential diagnosis. *Arch Pathol Lab Med* 2006; 130: 1466-1478
- 18 Liegl B, Hornick JL, Corless CL, Fletcher CD. Monoclonal antibody DOG1.1 shows higher sensitivity than KIT in the diagnosis of gastrointestinal stromal tumors, including unusual subtypes. *Am J Surg Pathol* 2009; 33: 437-446
- 19 Mearadji A, den Bakker MA, van Geel AN, Eggermont AM, Sleijfer S, Verweij J, de Wilt JH, Verhoef C. Decrease of CD117 expression as possible prognostic marker for recurrence in the resected specimen after imatinib treatment in patients with initially unresectable gastrointestinal stromal tumors: a clinicopathological analysis. *Anticancer Drugs* 2008; 19: 607-612
- 20 Espinosa I, Lee CH, Kim MK, Rouse BT, Subramanian S, Montgomery K, Varma S, Corless CL, Heinrich MC, Smith KS, Wang Z, Rubin B, Nielsen TO, Seitz RS, Ross DT, West RB, Cleary ML, van de Rijn M. A novel monoclonal antibody against DOG1 is a sensitive and specific marker for gastrointestinal stromal tumors. *Am J Surg Pathol* 2008; 32: 210-218
- 21 Heinrich MC, Corless CL, Duensing A, McGreevey L, Chen CJ, Joseph N, Singer S, Griffith DJ, Haley A, Town A, Demetri GD, Fletcher CD, Fletcher JA. PDGFRA activating mutations in gastrointestinal stromal tumors. *Science* 2003; 299: 708-710
- 22 Blay P, Astudillo A, Buesa JM, Campo E, Abad M, García-García J, Miquel R, Marco V, Sierra M, Losa R, Lacave A, Braña A, Balbín M, Freije JM. Protein kinase C theta is highly expressed in gastrointestinal stromal tumors but not in other mesenchymal neoplasias. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 4089-4095
- 23 Motegi A, Sakurai S, Nakayama H, Sano T, Oyama T, Nakajima T. PKC theta, a novel immunohistochemical marker for gastrointestinal stromal tumors (GIST), especially useful for identifying KIT-negative tumors. *Pathol Int* 2005; 55: 106-112
- 24 Kang GH, Srivastava A, Kim YE, Park HJ, Park CK, Sohn TS, Kim S, Kang DY, Kim KM. DOG1 and PKC-θ are useful in the diagnosis of KIT-negative gastrointestinal stromal tumors. *Mod Pathol* 2011; 24: 866-875
- 25 Tryggvason G, Gíslason HG, Magnússon MK, Jónasson JG. Gastrointestinal stromal tumors in Iceland, 1990-2003: the icelandic GIST study, a population-based incidence and pathologic risk stratification study. *Int J Cancer* 2005; 117: 289-293
- 26 Scarpa M, Bertin M, Ruffolo C, Polese L, D'Amico DF, Angriman I. A systematic review on the clinical diagnosis of gastrointestinal stromal tumors. *J Surg Oncol* 2008; 98: 384-392
- 27 Agarwal R, Robson M. Inherited predisposition to gastrointestinal stromal tumor. *Hematol Oncol Clin North Am* 2009; 23: 1-13, vii
- 28 Mühlenberg T, Zhang Y, Wagner AJ, Grabellus F, Bradner J, Taeger G, Lang H, Taguchi T, Schuler M, Fletcher JA, Bauer S. Inhibitors of deacetylases suppress oncogenic KIT signaling, acetylate HSP90, and induce apoptosis in gastrointestinal stromal tumors. *Cancer Res* 2009; 69: 6941-6950
- 29 Yang WL, Yu JR, Wu YJ, Zhu KK, Ding W, Gao Y, Shen QY, Lv KZ, Zhang Q, Yang XJ. Duodenal gastrointestinal stromal tumor: clinical, pathologic, immunohistochemical characteristics, and surgical prognosis. *J Surg Oncol* 2009; 100: 606-610
- 30 Grignol VP, Termuhlen PM. Gastrointestinal stromal tumor surgery and adjuvant therapy. *Surg Clin North Am* 2011; 91: 1079-1087
- 31 Wang WL, Hornick JL, Mallipeddi R, Zelger BG, Rother JD, Yang D, Lev DC, Trent JC, Prieto VG, Brenn T, Robson A, Calonje E, Lazar AJ. Cutaneous and subcutaneous metastases of gastrointestinal stromal tumors: a series of 5 cases with molecular analysis. *Am J Dermatopathol* 2009; 31: 297-300
- 32 Joensuu H. Risk stratification of patients diagnosed with gastrointestinal stromal tumor. *Hum Pathol* 2008; 39: 1411-1419
- 33 Kikuta K, Gotoh M, Kanda T, Tochigi N, Shimoda T, Hasegawa T, Katai H, Shimada Y, Suehara Y, Kawai A, Hirohashi S, Kondo T. Pfetin as a prog-

同行评价

本文综述了胃肠道间质瘤的临床特征及诊治进展, 综述内容合理、全面, 论述思路清晰, 具有很好的可读性。

- nostic biomarker in gastrointestinal stromal tumor: novel monoclonal antibody and external validation study in multiple clinical facilities. *Jpn J Clin Oncol* 2010; 40: 60-72
- 34 Kubota D, Orita H, Yoshida A, Gotoh M, Kanda T, Tsuda H, Hasegawa T, Katai H, Shimada Y, Kaneko K, Kawai A, Kondo T. Pletin as a prognostic biomarker for gastrointestinal stromal tumor: validation study in multiple clinical facilities. *Jpn J Clin Oncol* 2011; 41: 1194-1202
 - 35 Sakurama K, Noma K, Takaoka M, Tomono Y, Watanabe N, Hatakeyama S, Ohmori O, Hirota S, Motoki T, Shirakawa Y, Yamatsuji T, Haisa M, Matsuoaka J, Tanaka N, Naomoto Y. Inhibition of focal adhesion kinase as a potential therapeutic strategy for imatinib-resistant gastrointestinal stromal tumor. *Mol Cancer Ther* 2009; 8: 127-134
 - 36 Neves LR, Oshima CT, Artigiani-Neto R, Yanagui-bashi G, Lourenço LG, Forones NM. Ki67 and p53 in gastrointestinal stromal tumors--GIST. *Arq Gastroenterol* 2009; 46: 116-120
 - 37 Menéndez P, Padilla D, Cubo T, Villarejo P, Gambi D, Menéndez JM, Colina F, García M, Lora D, Martín J. Biological behavior due to cell proliferation markers of gastrointestinal stromal tumors. *Hepato-gastroenterology* 2011; 58: 76-80
 - 38 Zhou W, Zeng X, Liu T. Aberrations of chromosome 13q in gastrointestinal stromal tumors: analysis of 91 cases by fluorescence in situ hybridization (FISH). *Diagn Mol Pathol* 2009; 18: 72-80
 - 39 Abbas M, Farouk Y, Nasr MM, Elsebae MM, Farag A, Akl MM, Hammam O. Gastrointestinal stromal tumors (GISTs): clinical presentation, diagnosis, surgical treatment and its outcome. *J Egypt Soc Parasitol* 2008; 38: 883-894
 - 40 Chamadol N, Laopaiboon V, Promsorn J, Bhudhisawasd V, Pagkhem A, Pairajkul C. Gastrointestinal stromal tumor: computed tomographic features. *J Med Assoc Thai* 2009; 92: 1213-1219
 - 41 Tang L, Sun YS, Shen L, Li J, Cao K, Qi LP, Cui Y, Zhang XP. [Association of CT image changes and prognosis in gastrointestinal stromal tumor after targeted therapy]. *Zhonghua Weichang Waike Zazhi* 2010; 13: 497-501
 - 42 Wong CS, Chu YC, Khong PL. Unusual features of gastrointestinal stromal tumor on PET/CT and CT imaging. *Clin Nucl Med* 2011; 36: e1-e7
 - 43 何裕隆. 胃肠间质瘤外科治疗的选择. 中华胃肠外科杂志 2006; 1: 15-16
 - 44 Fernández-Esparrach G, Sendino O, Solé M, Pellisé M, Colomo L, Pardo A, Martínez-Pallí G, Argüello L, Bordas JM, Llach J, Ginès A. Endoscopic ultrasound-guided fine-needle aspiration and trucut biopsy in the diagnosis of gastric stromal tumors: a randomized crossover study. *Endoscopy* 2010; 42: 292-299
 - 45 中国胃肠道间质瘤专家组. 中国胃肠道间质瘤诊断治疗共识(2008年版). 临床肿瘤学杂志 2009; 14: 746-754
 - 46 季加孚. 小肠间质瘤的诊断与治疗. 临床外科杂志 2008; 16: 509-511
 - 47 DeMatteo RP, Lewis JJ, Leung D, Mudan SS, Woodruff JM, Brennan MF. Two hundred gastrointestinal stromal tumors: recurrence patterns and prognostic factors for survival. *Ann Surg* 2000; 231: 51-58
 - 48 Gold JS, van der Zwan SM, Gönen M, Maki RG, Singer S, Brennan MF, Antonescu CR, De Matteo RP. Outcome of metastatic GIST in the era before tyrosine kinase inhibitors. *Ann Surg Oncol* 2007; 14: 134-142
 - 49 Sjölund K, Andersson A, Nilsson E, Nilsson O, Ahlman H, Nilsson B. Downsizing treatment with tyrosine kinase inhibitors in patients with advanced gastrointestinal stromal tumors improved resectability. *World J Surg* 2010; 34: 2090-2097
 - 50 McAuliffe JC, Hunt KK, Lazar AJ, Choi H, Qiao W, Thall P, Pollock RE, Benjamin RS, Trent JC. A randomized, phase II study of preoperative plus post-operative imatinib in GIST: evidence of rapid radiographic response and temporal induction of tumor cell apoptosis. *Ann Surg Oncol* 2009; 16: 910-919
 - 51 Eisenberg BL, Harris J, Blanke CD, Demetri GD, Heinrich MC, Watson JC, Hoffman JP, Okuno S, Kane JM, von Mehren M. Phase II trial of neoadjuvant/adjuvant imatinib mesylate (IM) for advanced primary and metastatic/recurrent operable gastrointestinal stromal tumor (GIST): early results of RTOG 0132/ACRIN 6665. *J Surg Oncol* 2009; 99: 42-47
 - 52 Choi WH, Kim S, Hyung WJ, Yu JS, Park CI, Choi SH, Noh SH. Long-surviving patients with recurrent GIST after receiving cytoreductive surgery with imatinib therapy. *Yonsei Med J* 2009; 50: 437-440
 - 53 Yeh CN, Chen TW, Tseng JH, Liu YY, Wang SY, Tsai CY, Chiang KC, Hwang TL, Jan YY, Chen MF. Surgical management in metastatic gastrointestinal stromal tumor (GIST) patients after imatinib mesylate treatment. *J Surg Oncol* 2010; 102: 599-603
 - 54 Schurr P, Kohrs D, Reichelt U, Kaifi J, Vashist Y, Bachmann K, Bogoevski D, Yekebas E, Izbicki J. Repeated surgery improves survival in recurrent gastrointestinal stromal tumors: a retrospective analysis of 144 patients. *Dig Surg* 2009; 26: 229-235
 - 55 Demetri GD, von Mehren M, Antonescu CR, DeMatteo RP, Ganjoo KN, Maki RG, Pisters PW, Raut CP, Riedel RF, Schuetz S, Sundar HM, Trent JC, Wayne JD. NCCN Task Force report: update on the management of patients with gastrointestinal stromal tumors. *J Natl Compr Canc Netw* 2010; 8 Suppl 2: S1-S41; quiz S42-S44
 - 56 Deshaies I, Cherenfant J, Gusani NJ, Jiang Y, Harvey HA, Kimchi ET, Kaifi JT, Staveley-O'Carroll KF. Gastrointestinal stromal tumor (GIST) recurrence following surgery: review of the clinical utility of imatinib treatment. *Ther Clin Risk Manag* 2010; 6: 453-458
 - 57 DeMatteo RP, Gold JS, Saran L, Gönen M, Liau KH, Maki RG, Singer S, Besmer P, Brennan MF, Antonescu CR. Tumor mitotic rate, size, and location independently predict recurrence after resection of primary gastrointestinal stromal tumor (GIST). *Cancer* 2008; 112: 608-615
 - 58 DeMatteo RP, Ballman KV, Antonescu CR, Maki RG, Pisters PW, Demetri GD, Blackstein ME, Blanke CD, von Mehren M, Brennan MF, Patel S, McCarter MD, Polikoff JA, Tan BR, Owzar K. Adjuvant imatinib mesylate after resection of localized, primary gastrointestinal stromal tumour: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet* 2009; 373: 1097-1104
 - 59 Blanke CD, Demetri GD, von Mehren M, Heinrich MC, Eisenberg B, Fletcher JA, Corless CL, Fletcher CD, Roberts PJ, Heinz D, Wehre E, Nikolova Z, Joensuu H. Long-term results from a randomized phase II trial of standard- versus higher-dose imatinib mesylate for patients with unresectable or metastatic gastrointestinal stromal tumors express-

- ing KIT. *J Clin Oncol* 2008; 26: 620-625
- 60 Gajiwala KS, Wu JC, Christensen J, Deshmukh GD, Diehl W, DiNitto JP, English JM, Greig MJ, He YA, Jacques SL, Lunney EA, McTigue M, Molina D, Quenzer T, Wells PA, Yu X, Zhang Y, Zou A, Emmett MR, Marshall AG, Zhang HM, Demetri GD. KIT kinase mutants show unique mechanisms of drug resistance to imatinib and sunitinib in gastrointestinal stromal tumor patients. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009; 106: 1542-1547
- 61 Comparison of two doses of imatinib for the treatment of unresectable or metastatic gastrointestinal stromal tumors: a meta-analysis of 1,640 patients. *J Clin Oncol* 2010; 28: 1247-1253
- 62 Blay JY. A decade of tyrosine kinase inhibitor therapy: Historical and current perspectives on targeted therapy for GIST. *Cancer Treat Rev* 2011; 37: 373-384
- 63 Demetri GD, van Oosterom AT, Garrett CR, Blackstein ME, Shah MH, Verweij J, McArthur G, Judson IR, Heinrich MC, Morgan JA, Desai J, Fletcher CD, George S, Bello CL, Huang X, Baum CM, Casali PG. Efficacy and safety of sunitinib in patients with advanced gastrointestinal stromal tumour after failure of imatinib: a randomised controlled trial. *Lancet* 2006; 368: 1329-1338
- 64 Demetri GD, Heinrich MC, Fletcher JA, Fletcher CD, Van den Abbeele AD, Corless CL, Antonescu CR, George S, Morgan JA, Chen MH, Bello CL, Huang X, Cohen DP, Baum CM, Maki RG. Molecular target modulation, imaging, and clinical evaluation of gastrointestinal stromal tumor patients treated with sunitinib malate after imatinib failure. *Clin Cancer Res* 2009; 15: 5902-5909
- 65 Younus J, Verma S, Franek J, Coakley N. Sunitinib malate for gastrointestinal stromal tumour in imatinib mesylate-resistant patients: recommendations and evidence. *Curr Oncol* 2010; 17: 4-10
- 66 Raut CP, Wang Q, Manola J, Morgan JA, George S, Wagner AJ, Butrynski JE, Fletcher CD, Demetri GD, Bertagnolli MM. Cytoreductive surgery in patients with metastatic gastrointestinal stromal tumor treated with sunitinib malate. *Ann Surg Oncol* 2010; 17: 407-415
- 67 Heinrich MC, Maki RG, Corless CL, Antonescu CR, Harlow A, Griffith D, Town A, McKinley A, Ou WB, Fletcher JA, Fletcher CD, Huang X, Cohen DP, Baum CM, Demetri GD. Primary and secondary kinase genotypes correlate with the biological and clinical activity of sunitinib in imatinib-resistant gastrointestinal stromal tumor. *J Clin Oncol* 2008; 26: 5352-5359
- 68 Pantaleo MA, Astolfi A, Di Battista M, Heinrich MC, Paterini P, Scotlandi K, Santini D, Catena F, Manara MC, Nannini M, Maleddu A, Saponara M, Lolli C, Formica S, Biasco G. Insulin-like growth factor 1 receptor expression in wild-type GISTs: a potential novel therapeutic target. *Int J Cancer* 2009; 125: 2991-2994
- 69 Demetri GD, Antonia S, Benjamin RS, Bui MM, Casper ES, Conrad EU, DeLaney TF, Ganjoo KN, Heslin MJ, Hutchinson RJ, Kane JM, Letson GD, McGarry SV, O'Donnell RJ, Paz IB, Pfeifer JD, Pollock RE, Randall RL, Riedel RF, Schupak KD, Schwartz HS, Thornton K, von Mehren M, Wayne J. Soft tissue sarcoma. *J Natl Compr Canc Netw* 2010; 8: 630-674
- 70 Casali PG, Blay JY. Gastrointestinal stromal tumours: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* 2010; 21 Suppl 5: v98-v102
- 71 Stratakis CA, Carney JA. The triad of paragangliomas, gastric stromal tumours and pulmonary chondromas (Carney triad), and the dyad of paragangliomas and gastric stromal sarcomas (Carney-Stratakis syndrome): molecular genetics and clinical implications. *J Intern Med* 2009; 266: 43-52
- 72 Nannini M, Biasco G, Pallotti MC, Di Battista M, Santini D, Paterini P, Maleddu A, Mandrioli A, Lolli C, Saponara M, Di Scioscio V, Zompatori M, Catena F, Fusaroli P, Dei Tos AP, Pantaleo MA. Late recurrences of gastrointestinal stromal tumours (GISTs) after 5 years of follow-up. *Med Oncol* 2012; 29: 144-150

编辑 曹丽鸥 电编 闫晋利

隐匿性肝性脑病的诊疗进展

杨慧艳, 陈东晖, 宫洪涛, 郑鹏远

■背景资料

肝性脑病(HE)是慢性肝病基础上发生的以神经功能障碍为主的代谢紊乱性疾病,其发病机制尚未明确,防治也无特效疗法。隐匿性肝性脑病(MHE)为HE疾病进展的一个阶段。因此对于探知其发病机制、寻求诊断和治疗的方案,加强MHE的诊断、治疗和药物信息的系统性更新尤为重要。

杨慧艳, 宫洪涛, 河南中医学院第一附属医院 河南省郑州市 450008

陈东晖, 郑鹏远, 郑州大学第二附属医院 河南省郑州市 450001

杨慧艳, 中医师, 主要从事中医药治疗神经内科老年病(痴呆)方向的研究。

作者贡献分布: 本课题由陈东晖设计; 杨慧艳完成综述; 宫洪涛与郑鹏远共同审校。

通讯作者: 宫洪涛, 教授, 硕士生导师, 450008, 河南省郑州市人民路19号, 河南中医学院第一附属医院. ght5143@tom.com
电话: 0371-66221813

收稿日期: 2012-03-15 修回日期: 2012-06-12

接受日期: 2012-07-20 在线出版日期: 2012-08-08

Advances in diagnosis and treatment of minimal hepatic encephalopathy

Hui-Yan Yang, Dong-Hui Chen, Hong-Tao Gong, Peng-Yuan Zheng

Hui-Yan Yang, Hong-Tao Gong, the First Affiliated Hospital of Henan University of TCM, Zhengzhou 450008, Henan Province, China

Dong-Hui Chen, Peng-Yuan Zheng, the Second Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450001, Henan Province, China

Correspondence to: Hong-Tao Gong, Professor, the First Affiliated Hospital of Henan University of TCM, 19 Renmin Road, Zhengzhou 450008, Henan Province, China. ght5143@tom.com

Received: 2012-03-15 Revised: 2012-06-12

Accepted: 2012-07-20 Published online: 2012-08-08

Abstract

Minimal hepatic encephalopathy (MHE), also known as subclinical hepatic encephalopathy (SHE), is a common complex and potentially reversible neuropsychiatric syndrome secondary to chronic liver disease or cirrhosis. Although a clear pathogenesis is yet to be determined, elevated ammonia in serum and the central nervous system is the mainstay for pathogenesis and treatment of MHE. Patients with MHE, regardless of its cause, show a number of quantifiable neuropsychological defects, yet have a normal mental and neurological status on global clinical examination. Although ammonia is the main toxic substance involved in the pathogenesis of hepatic encephalopathy, other mechanisms, such as modifications of the blood-brain barrier, disruptions in neuro-

transmission and abnormalities in GABAergic and benzodiazepine pathways, may also play a role. Current treatments are based on reducing intestinal ammonia load by agents such as antibiotics, disaccharides and probiotics whose efficacy is yet to be clearly established. This paper summarizes the latest advances in the diagnosis and treatment of MHE.

Key Words: Minimal hepatic encephalopathy; Cognitive performance; Advances

Yang HY, Chen DH, Gong HT, Zheng PY. Advances in diagnosis and treatment of minimal hepatic encephalopathy. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2012; 20(22): 2058-2062

摘要

隐匿性肝性脑病(minimal hepatic encephalopathy, MHE)又称亚临床肝性脑病(subclinical hepatic encephalopathy, SHE),是慢性肝病和肝硬化最常见的严重并发症,是一种具有渐进性、可逆性的神经精神病学异常和运动功能失调特点的疾病。尽管其发病机制仍未明确,血清和中枢神经系统(central nervous system, CNS)血氨升高仍被认为是肝性脑病(hepatic encephalopathy, HE)的致病机制和治疗核心,并受血脑屏障改变、神经递质紊乱、氨基丁酸和苯二氮异常等因素影响。因此明确其诱发因素是HE治疗的关键。治疗药物包括抗生素、二糖类、益生菌、门冬氨酸鸟氨酸(L-ornithine-L-aspartate, LOLA)、苯甲/苯乙酸盐等。因此,对MHE的发病机制、临床诊断和治疗研究进展进行归纳,为临床诊疗提供前沿性、系统性信息,具有重要意义。

关键词: 隐匿性/亚临床型肝性脑病; 认知功能评价; 诊疗进展

杨慧艳, 陈东晖, 宫洪涛, 郑鹏远. 隐匿性肝性脑病的诊疗进展. *世界华人消化杂志* 2012; 20(22): 2058-2062

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/2058.asp>

0 引言

肝性脑病(hepatic encephalopathy, HE)是临床常见的一种以代谢紊乱为基础的精神神经异常综

■同行评议者

林志辉, 教授, 福建省立医院消化内科

合征, 是慢性肝病、肝硬化最常见并发症及死亡原因之一. 其特点是渐进性、可逆性, 从轻度认知和运动功能障碍到昏迷死亡范围内的神经精神病学异常和运动功能失调的疾病. 尽管其发病机制仍未明确, 血清和中枢神经系统(central nervous system, CNS)血氨升高仍被认为是HE致病机制和治疗的主要方向^[1-3].

隐匿性肝性脑病(minimal hepatic encephalopathy, MHE), 作为HE疾病进展的一个阶段, 像肝硬化其他并发症(黄疸、肝癌、肝肾综合征)一样, HE的诊断中, 肝功能和神经病学症状改变并不典型, 归因于多数患者代偿良好. 临床发现与脑功能的损害是一致的行为和神经心理检测异常, 典型表现如认知障碍、行为异常; 以及锥体外系受损的帕金森综合征(如扑翼样震颤、僵硬、智力损伤等), 然而神经学的表现经常影响临床诊断^[4-6]. 目前系统性神经心理检测和神经生理检测是评价神经认知功能的较为有效的方法, 在MHE诊断和评价严重程度上具有重要意义^[7]. 目前主要治疗手段包括临床早期诊断和及时准确消除致病因素; MHE治疗过程中已经建立起多种有效的临床检查和实验, 主要的药物有门冬氨酸鸟氨酸(L-ornithine-L-aspartate, LOLA)、苯甲酸盐等, 而肝移植是HE治疗的最有效方案^[8]. 因此, 加强MHE的诊断、治疗药物信息的系统性更新, 成为相关医疗研究的重心. 本综述主要介绍MHE的研究进展, 包括HE分级、诊断方法和治疗药物等^[9].

1 隐匿性肝性脑病分级

传统HE分为: 无认知功能障碍、MHE、I II-HE、III IV-HE. 现阶段的共识是神经认知功能损害是持续将认知障碍分级而不是绝对定量^[10,11]. 肝性脑病分级方法(hepatic encephalopathy classification method, HESA): 局限是分级标准未进行多中心大样本的研究, 优点是明确区分低度HE(I 和 II). 临床肝性脑病分级标准(clinical hepatic encephalopathy grading standards, CHES): 不是像先前一样人为地定义HE严重程度, 而是将HE分为线性分级(0-9, 无损伤到深昏迷), 其内部构成具有明确标准、重复性、诊断标准的有效性、外部反映的良好性, 尽管如此仍需要大样本、多中心的评估. CHES具有良好而简单的操作性, 但是CHES和HESA之间对诊断HE的敏感性并未进行比较. 并且从临床角度来看并不需要建立许多分级^[12].

2 隐匿性肝性脑病发病机制

血氨是参与HE致病机制中最主要的毒性物质, 致病机制还有血脑屏障改变、神经递质紊乱、氨基丁酸和苯二氮异常也起重要作用. 高血氨作用机制: 氨毒性主要干扰脑能量代谢, 影响中枢兴奋性递质与抑制性递质的平衡(谷氨酸-谷氨酰胺, GABA); 肠源性毒性物质升高; 支链氨基酸-芳香族氨基酸比例失衡; 脑细胞水肿、星状胶质细胞功能失调^[13]. 虽然高血氨是一个普遍接受的MHE致病因素, 由于代谢是复杂的过程, 其并不能够明确解释MHE的发病机制^[14-19].

“肠-肝-脑轴”在血氨作用机制中的意义: 慢性肝病患者肠道微生态系统紊乱可导致肠道产氨、肠源性毒物升高, 与HE的发生、发展密切相关. 包括: (1)氨、脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)、硫醇、苯二氮卓类药物等均由肠道菌群产生, 肝功异常导致菌群失调, 肠源性毒物生成增多; (2)肠道细菌易位和过度生长导致肠道渗透性增加, 通过肠道时间延长, 促进氨、LPS等其他肠源性毒物的吸收; (3)肝功能受损不能有效代谢毒物, 而蓄积的毒物进一步加重肝脏损害, 促进MHE的发生^[20].

门脉血流盗血可能是导致HE的另一核心机制, 动脉内有高度优先通过机制(氨), 主要依赖门脉血流, 这也是分流术可行性探索的理论依据. 口服谷氨酰胺测试是检测摄入谷氨酰胺后血浆氨水平的快速检测方法, 有助于临床评价MHE^[12].

3 隐匿性肝性脑病诊断

MHE缺乏典型的临床表现和异常生化指标, 而明确和治疗诱发因素是早期HE治疗的关键. 因此多数学者提出, 应将脑电图扫描(electroencephalogram, EEG)与数字连接试验(digital connection test, NCT)、数字符号试验(digital sign test, DST)等两种以上的心理智能测试联合, 结果更为客观评价^[21-24].

神经心理测试是一个低水平的注意力检测, 因此应该在进行神经生理检测前通过干扰评价方法(interference evaluation method, CAM)将其干扰排除. 通常使用肝性脑病临床系统评价(hepatic encephalopathy clinical evaluation system, CGA-HE)和患者患有痴呆表现的使用认知功能下降问卷(cognitive function decline questionnaire, IQCODE)^[25].

延伸的神经心理学测试评价(一系列短的神

■研发前沿

研究发现, 肝硬化患者出现MHE时, IL-6和氨之间具有明显相关性和相互增强作用, 表明IL-6与氨在导致MHE过程中可能有潜在的协同关系.

■相关报道

有学者通过对慢性重症肝炎并发肝肾综合征(HRS)患者的血氨水平生化指标、脑病发生率及分级进行研究, 发现慢性重型肝炎患者并发HRS加重血氨水平升高, 可促进HE的发生和发展.

■创新盘点

本文首次较为全面地对隐匿性肝性脑病的研究进展进行综述,并从发病机制、诊断方法、治疗药物等方面进行阐述。

经心理测试,相当于一个延长的心理评价,需要人数少、时间短),是明确认知功能缺陷的最好方法,患者经过一系列的测试后将结果同正常标准比较,并由经过神经心理系统学习后的相关医生进行分析^[26]。

目前较为完整的诊断标准: (1)各种病因导致的肝硬化患者病史; (2)无临床精神及神经系统体征的异常; (3)智力测验。

MHE评价主要包括: (1)心理智能测试类: NCT、DST、连续反应时间(continuous reaction time, CRT)测验、闪烁频率临界值测定(CFF)。NCT简单易操作,无年龄、教育因素干扰; 广域信息查询系统(wide area information system, WAIS)虽耗时长,但更能准确地反应MHE。研究发现MHE患者CRT明显延长,国外已出现改良版——“抑制对照试验(ICT)”^[27-29]; (2)神经电生理和神经心理检测类: 诱发电位(evoked potential, EP)包括视觉诱发电位(visual evoked potential, VEP)和躯体感觉诱发电位(sensory evoked potentials, SEP)。鉴于VEP高度敏感性,其对肝硬化的诊断价值也得到了广泛认可。与NCT相似,SEP不受教育程度和年龄影响。失匹配负波(mismatch negativity, MMN)是反映听觉诱发电位的高灵敏实验, NCT和定向注意力实验(Stroop tasks)检测中阴性的患者, MMN检测则表现出明显的认知功能、注意力受损症状^[30-33]; (3)成像检测类: 最有效的成像技术包括螺旋CT、MRI、内窥镜超声。CT主要通过肝硬化分级,进而对MHE进行预测,并能够准确反应MHE病变的部位、范围和程度^[34]。

MRI与¹H-MRS表明不同程度肝硬化患者脑内有锰的沉积与肌醇(mi)及胆碱复合物(Cho)的改变,表现为苍白球高信号。有症状患者脑内代谢产物明显降低,而无症状患者变化不明显。对于早期肝性脑病锥体外系受损的临床诊断具有重要意义,用其评价肝硬化患者脑实质内锰的沉积程度、MHE的发展过程、高危人群的筛选及治疗效果的判断很有价值。虽然T1信号密度与HE无显著相关性,但酒精性肝硬化患者时大脑萎缩尤其明显,具有一定的提示作用^[35,36]。

4 隐匿性肝性脑病治疗

临床防治MHE的理论基础是氨中毒学说: 清除胃肠道产氨的前体物质、减少肠道内氨生成和促进氨吸收。临床治疗包括: 口服不吸收双糖、植物蛋白饮食、补充支链氨基酸等。二糖类乳果糖和乳梨醇仍是目前治疗指南中推

荐治疗HE/MHE的首选药物; 其次为益生菌、LOLA、抗生素等。这些药物可以改善MHE患者智力水平和/或提高生活质量。主要应用的药物包括抗生素、二糖类、LOLA、苯甲/乙酸盐、AST-120、分子吸附再循环系统,然而肝移植是HE治疗的最终有效方案^[8,26,37]。

(1)二糖类: 乳果糖在小肠内被双歧杆菌及乳酸杆菌等分解为乳酸及醋酸。小肠液pH值降至6以下时可明显削弱尿素肠肝循环而降低血氨浓度,改善大脑的生理功能。其具有不被吸收及胶体特性,增加了小肠的渗透压,具有缓泻作用。将食物中未被消化吸收的多肽成分及时排出体外,减少大肠内有毒物质的吸收,提高了患者对蛋白饮食的耐受程度^[38-40]; (2)LOLA: 二肽类治疗HE的新药,通过促进体内氨的代谢而降低血氨。鸟氨酸是尿素循环的重要基质,直接参与尿素循环,还能增加氨基甲酰磷酸合成酶和鸟氨酸氨基甲酰转换酶的活性,促进尿素合成。门冬氨酸是谷氨酰胺合成的底物,在体内转化为谷氨酸和谷氨酰胺的过程中消耗血氨,还可增强谷氨酰胺合成酶的活性,参与肝细胞内核酸合成,促进三羧酸循环的代谢。LOLA还促进肝细胞能量的生成,增强肝细胞对胆红素的摄取、结合和排泄,具有降低转氨酶、恢复肝功能、促进胆红素代谢的作用^[41]; (3)抗生素: 能有效抑制肠道产尿素酶细菌,减少氨生成和其他肠道毒素。包括新霉素、甲硝唑、万古霉素、利福昔明等。尽管有效性确定,但其不良反应和安全性限制了应用,多作为对口服不吸收双糖不能耐受或有抵抗患者的替代治疗^[46]; (4)益生菌类药物: 主要作用为纠正肠道菌群失调,抑制细菌尿素酶活性、降低肠腔pH值、减少肠源性氨生成、改善肠道黏膜吸收营养的状态,从而降低门静脉血氨浓度; 抑制肝细胞炎症反应和氧化应激; 提高肝细胞解毒功能; 抑制其他肠源性毒物吸收,以减少肠道氨及其他毒性物质的产生及吸收,降低血氨、改善脑功能的作用^[47-50]。益生菌作为改善消化系统的药物,虽然其治疗效果有待进一步证实,但是在治疗MHE方面已受到医疗界的重视,整体作用潜力巨大,可能成为治疗为肠道功能异常、MHE等疾病的新型治疗药物^[51-53]。

5 结论

MHE作为HE疾病进展的一个阶段,其表现无精神或意识障碍等临床典型症状表现,常规检查正常,仅神经心理/生理学测验评价才可发现异

■应用要点

慢性肝病患者肠道微生态系统紊乱可导致肠道产氨、肠源性毒物升高,与HE的发生、发展密切相关。益生菌作为改善消化系统的药物,可能成为治疗MHE疾病的新型治疗药物。

常。然而, 像肝硬化其他并发症一样, HE的诊断中肝功能、神经病学症状并不是唯一和精确的。临床中需要能够量化和归纳成简单的评分, 使其有效地提高临床检查和评价疗效的效率。目前已有许多有效的神经学症状检查手段。系统性神经心理检测和神经生理检测是评价神经认知功能有效而客观的方法, 并不断有新的评价方法出现, 在MHE诊断和评价严重程度上具有重要意义。主要治疗手段包括: 临床早期诊断和及时准确消除致病因素治疗的主要方向; 主要药物有LOLA、苯甲/乙酸盐、益生菌以及肝移植等。由于MHE疾病临床表现的复杂性、特殊性, 使得临床随机对照试验(randomized controlled trial, RCT)研究面临一定困难, 缺乏多中心大宗流行病学调查。MHE是否需要治疗以及治疗后患者能否真正受益仍无法确定。早期治疗是否可减慢MHE的发展, 何种治疗方法才有效, 需进一步深入研究。

总之, MHE可合并多种因素导致机体代谢功能紊乱, 而炎症、感染、肠功能紊乱、门脉循环异常和高血氨是肝硬化、肝性脑病的重要发病机制。临床治疗中在积极清除诱因的基础上, 纠正低蛋白血症、高胆红素血症、低钠血症和氨基酸失衡, 改善肾功能和凝血功能, 降低和减缓HE进展。此外, 益生菌和炎症因子拮抗剂有可能是MHE未来治疗的研究方向。

6 参考文献

- Moriwaki H, Shiraki M, Iwasa J, Terakura Y. Hepatic encephalopathy as a complication of liver cirrhosis: an Asian perspective. *J Gastroenterol Hepatol* 2010; 25: 858-863
- Khungar V, Poordad F. Hepatic encephalopathy. *Clin Liver Dis* 2012; 16: 301-320
- Patel D, McPhail MJ, Cobbold JF, Taylor-Robinson SD. Hepatic encephalopathy. *Br J Hosp Med (Lond)* 2012; 73: 79-85
- Stewart CA, Smith GE. Minimal hepatic encephalopathy. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol* 2007; 4: 677-685
- 石虹. 肝性脑病的临床表现与诊断. *肝脏* 2008; 13: 421-423
- 曹召伦, 汪凯, 叶珺, 李家斌, 李旭. 亚临床肝性脑病的神经心理特征. *国际流行病学传染病学杂志* 2006; 33: 181-183
- 保志军, 马雄, 邱德凯. 轻微肝性脑病的诊断方法及其评价. *中华肝脏病杂志* 2005; 13: 878-880
- Toris GT, Bikis CN, Tsourouflis GS, Theocharis SE. Hepatic encephalopathy: an updated approach from pathogenesis to treatment. *Med Sci Monit* 2011; 17: RA53-RA63
- Stewart CA, Malinchoc M, Kim WR, Kamath PS. Hepatic encephalopathy as a predictor of survival in patients with end-stage liver disease. *Liver Transpl* 2007; 13: 1366-1371
- 中华医学会肝病学分会、感染病学分会. 慢性乙型肝炎防治指南. *中华肝脏病杂志* 2005; 13: 881-891
- 王宇明. 肝性脑病的定义、命名和诊断. *中华肝脏病杂志* 2004; 12: 305-306
- Córdoba J. New assessment of hepatic encephalopathy. *J Hepatol* 2011; 54: 1030-1040
- Montoliu C, Gonzalez-Escamilla G, Atienza M, Urios A, Gonzalez O, Wassel A, Aliaga R, Giner-Duran R, Serra MA, Rodrigo JM, Belloch V, Felipe V, Cantero JL. Focal cortical damage parallels cognitive impairment in minimal hepatic encephalopathy. *Neuroimage* 2012; 61: 1165-1175
- Wilkinson DJ, Smeeton NJ, Castle PC, Watt PW. Absence of neuropsychological impairment in hyperammonaemia in healthy young adults; possible synergism in development of hepatic encephalopathy (HE) symptoms? *Metab Brain Dis* 2011; 26: 203-212
- Al Sibae MR, McGuire BM. Current trends in the treatment of hepatic encephalopathy. *Ther Clin Risk Manag* 2009; 5: 617-626
- Poordad FF. Review article: the burden of hepatic encephalopathy. *Aliment Pharmacol Ther* 2007; 25 Suppl 1: 3-9
- 汪照涵, 刘沛. 氨假说和细胞因子在肝性脑病发病中的研究进展. *世界华人消化杂志* 2009; 17: 1638-1642
- Luo M, Li L, Yang EN, Cao WK. Relationship between interleukin-6 and ammonia in patients with minimal hepatic encephalopathy due to liver cirrhosis. *Hepatol Res* 2012 May 3. [Epub ahead of print]
- Yanovsky Y, Zigman JM, Kerndt A, Bein A, Sakata I, Osborne-Lawrence S, Haas HL, Sergeeva OA. Proton- and ammonium-sensing by histaminergic neurons controlling wakefulness. *Front Syst Neurosci* 2012; 6: 23
- Tarasów E, Panasiuk A, Siergiejczyk L, Orzechowska-Bobkiewicz A, Lewszuk A, Walecki J, Prokopowicz D. MR and 1H MR spectroscopy of the brain in patients with liver cirrhosis and early stages of hepatic encephalopathy. *Hepatogastroenterology* 2003; 50: 2149-2153
- Velissaris D, Karanikolas M, Kalogeropoulos A, Solomou E, Polychronopoulos P, Thomopoulos K, Labropoulou-Karatza C. Pituitary hormone circadian rhythm alterations in cirrhosis patients with subclinical hepatic encephalopathy. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 4190-4195
- 戴晓蓉, 陈杰, 郭亚萍, 古波, 徐燕萍, 李林辉. 亚临床肝性脑病早期诊断方法的探讨. *临床神经病学杂志* 2007; 20: 227-229
- Zhan T, Stremmel W. The diagnosis and treatment of minimal hepatic encephalopathy. *Dtsch Arztebl Int* 2012; 109: 180-187
- Marić D, Klasnja B, Filipović D, Brkić S, Ruzić M, Bugarski V. Minimal hepatic encephalopathy in patients with decompensated liver cirrhosis. *Acta Clin Croat* 2011; 50: 375-380
- 周莹群, 陈世耀, 姜林娣, 刘天舒, 王吉耀. 亚临床肝性脑病患者生命质量测定量表的制定及其评价. *中华医学杂志* 2004; 84: 1011-1013
- Bismuth M, Funakoshi N, Cadranet JF, Blanc P. Hepatic encephalopathy: from pathophysiology to therapeutic management. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2011; 23: 8-22
- Kircheis G, Wettstein M, Timmermann L, Schnitzler A, Häussinger D. Critical flicker frequency for quantification of low-grade hepatic encephalopa-

■名词解释

肝肾综合征(HRS): 是终末期肝脏疾病的常见严重的并发症之一, 表现为功能性的肾功能障碍。

■同行评价

该文综述了隐匿性肝性脑病的一些诊疗进展,基本体现了当前对MHE诊治的认识,有助于加强隐匿性肝性脑病的认识,提高其诊治水平。

- 28 thy. *Hepatology* 2002; 35: 357-366
- 28 Lauridsen MM, Grønbaek H, Næser EB, Leth ST, Vilstrup H. Gender and age effects on the continuous reaction times method in volunteers and patients with cirrhosis. *Metab Brain Dis* 2012 May 22. [Epub ahead of print]
- 29 Sharma P, Sharma BC, Agrawal A, Sarin SK. Primary prophylaxis of overt hepatic encephalopathy in patients with cirrhosis: An open labeled randomized controlled trial of lactulose versus no lactulose. *J Gastroenterol Hepatol* 2012; 27: 1329-1335
- 30 Felipo V, Ordoño JF, Urios A, El Mili N, Giménez-Garzó C, Aguado C, González-Lopez O, Giner-Duran R, Serra MA, Wassel A, Rodrigo JM, Salazar J, Montoliu C. Patients with minimal hepatic encephalopathy show impaired mismatch negativity correlating with reduced performance in attention tests. *Hepatology* 2012; 55: 530-539
- 31 Duarte-Rojo A, Estradas J, Hernández-Ramos R, Ponce-de-León S, Córdoba J, Torre A. Validation of the psychometric hepatic encephalopathy score (PHES) for identifying patients with minimal hepatic encephalopathy. *Dig Dis Sci* 2011; 56: 3014-3023
- 32 陈秀英, 张爱萍, 张磊. 亚临床肝性脑病患者多种形式诱发电位联合检测的临床意义. *现代电生理学杂志* 2007; 14: 12-13
- 33 Lindros KO, Järveläinen HA. Chronic systemic endotoxin exposure: an animal model in experimental hepatic encephalopathy. *Metab Brain Dis* 2005; 20: 393-398
- 34 邬海博, 马林, 蔡幼铨, 李涛. 亚临床肝性脑病患者脑MRI与¹H-MRS研究. *中国医学影像技术* 2007; 23: 1282-1284
- 35 Sarma MK, Huda A, Nagarajan R, Hinkin CH, Wilson N, Gupta RK, Frias-Martinez E, Sayre J, Guze B, Han SH, Thomas MA. Multi-dimensional MR spectroscopy: towards a better understanding of hepatic encephalopathy. *Metab Brain Dis* 2011; 26: 173-184
- 36 Qi R, Zhang L, Wu S, Zhong J, Zhang Z, Zhong Y, Ni L, Zhang Z, Li K, Jiao Q, Wu X, Fan X, Liu Y, Lu G. Altered Resting-State Brain Activity at Functional MR Imaging during the Progression of Hepatic Encephalopathy. *Radiology* 2012; 264: 187-195
- 37 Mittal VV, Sharma BC, Sharma P, Sarin SK. A randomized controlled trial comparing lactulose, probiotics, and L-ornithine L-aspartate in treatment of minimal hepatic encephalopathy. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2011; 23: 725-732
- 38 Luo M, Li L, Lu CZ, Cao WK. Clinical efficacy and safety of lactulose for minimal hepatic encephalopathy: a meta-analysis. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2011; 23: 1250-1257
- 39 邢全合, 刘连水. 乳果糖对亚临床肝性脑病的作用研究. *世界华人消化杂志* 2003; 11: 108-109
- 40 刘业丰, 王莹莹, 曹志国. 乳果糖临床应用体会. *中国现代药物应用* 2010; 4: 106-107
- 41 李瑜元. 门冬氨酸鸟氨酸治疗显性和轻微型肝性脑病. *临床肝胆病杂志* 2011; 27: 100-102
- 42 刘龙民, 陈建杰. 心理智能测试在亚临床肝性脑病中的应用. *肝脏* 2001; 6: 264-265
- 43 刘冠军, 王合群, 王良超. 门冬氨酸鸟氨酸治疗肝性脑病55例疗效观察. *临床医学* 2010; 30: 60-61
- 44 周莹群, 陈世耀, 郭传勇, 申振宇, 黄培新, 王吉耀. 左旋门冬氨酸鸟氨酸治疗亚临床肝性脑病的质量研究. *胃肠病学和肝病学杂志* 2009; 18: 48-51
- 45 Jiang Q, Jiang XH, Zheng MH, Chen YP. L-Ornithine-l-aspartate in the management of hepatic encephalopathy: a meta-analysis. *J Gastroenterol Hepatol* 2009; 24: 9-14
- 46 涂传涛, 王吉耀. 肝性脑病治疗的现代观点. *中国肝脏杂志* 2009; 14: 155-157
- 47 Portincasa P, Di Ciaula A, Wang HH, Palasciano G, van Erpecum KJ, Moschetta A, Wang DQ. Coordinate regulation of gallbladder motor function in the gut-liver axis. *Hepatology* 2008; 47: 2112-2126
- 48 舒敏, 车宇光. 地衣芽孢杆菌对肝硬化亚临床肝性脑病患者的影响. *中华全科医学* 2008; 6: 1119-1120
- 49 杨军, 全可国, 牛晓棠. 轻微型肝性脑病的诊治研究进展. *实用医药杂志* 2007; 24: 364-366
- 50 乔秀玲. 双歧三联活菌治疗亚临床肝性脑病的临床研究. *临床消化杂志* 2010; 4: 105-106
- 51 赵海英, 王惠吉, 吕治, 许淑珍. 肝硬化患者肠道菌群的研究. *中华消化杂志* 2003; 23: 407-409
- 52 华静, 李继强, 曾民德, 张达荣, 董晓旭, 陈成伟, 陈燕熙. 双歧三联活菌对肝硬化患者肠道菌群的调节作用及其对内毒素血症的影响. *中华消化杂志* 2000; 20: 136-138
- 53 Hooper LV, Gordon JI. Commensal host-bacterial relationships in the gut. *Science* 2001; 292: 1115-1118

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)

MRI分子与功能成像诊断胰腺癌的研究新进展

王小会, 程英升

王小会, 苏州大学附属第一人民医院 江苏省苏州市 215006
程英升, 同济大学附属第十人民医院影像临床医学中心 上海市 200072

王小会, 在读硕士, 主要从事MRI分子影像在胰腺癌早期诊断中的应用研究。

上海市科学技术委员会基金资助项目, No. 10JC1412900

作者贡献分布: 本文综述由王小会完成; 程英升审校。

通讯作者: 程英升, 教授, 200072, 上海市延长中路301号, 同济大学附属第十人民医院影像临床医学中心。

cjr.chengyshi@vip.163.com

电话: 021-66520224

收稿日期: 2012-04-19 修回日期: 2012-06-08

接受日期: 2012-06-29 在线出版日期: 2012-08-08

Advances in magnetic resonance molecular and functional imaging to diagnose pancreatic cancer

Xiao-Hui Wang, Ying-Sheng Cheng

Xiao-Hui Wang, the Affiliated People's First Hospital of Soochow University, Suzhou 215006, Jiangsu Province, China

Ying-Sheng Cheng, Clinical Imaging Center, Shanghai Tenth People's Hospital, Tongji University, Shanghai 200072, China

Supported by: the Foundation of the Shanghai Municipal Scientific and Technological Commission, No. 10JC1412900

Correspondence to: Ying-Sheng Cheng, Professor, Clinical Imaging Center, Shanghai Tenth People's Hospital, Tongji University, Shanghai 200072, China. cjr.chengysli@vip.163.com

Received: 2012-04-19 Revised: 2012-06-08

Accepted: 2012-06-29 Published online: 2012-08-08

Abstract

Pancreatic cancer has a high mortality rate, which is generally related to the initial diagnosis coming at late stage disease combined with a lack of effective diagnostic techniques. Over the past few years, molecular-functional imaging, which can be defined as the *in vivo* characterization and measurement of biologic processes at the molecular and gene levels, has developed rapidly and allows diagnosing pancreatic cancer more early and specifically. Magnetic resonance (MR) imaging is widely used for molecular imaging because of the high spatial resolution. This paper reviews recent advances in MR molecular and functional imaging to diagnose pancreatic cancer.

Key Words: Pancreatic cancer; Diffusion-weighted

imaging; Magnetic resonance perfusion imaging; Magnetic resonance spectrum imaging; MR molecular imaging

Wang XH, Cheng YS. Advances in magnetic resonance molecular and functional imaging to diagnose pancreatic cancer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2012; 20(22): 2063-2069

摘要

胰腺癌早期症状不显著, 早期诊断缺乏特异性, 因此死亡率高。近年来, 分子及功能成像发展迅速, 其以分子生物学为基础, 在活体状态下从分子、基因水平对胰腺癌进行更早期、更特异性的诊断。磁共振成像(magnetic resonance imaging, MRI)设备具有空间分辨率高、组织对比度好等优点, 因此在分子及功能成像方面应用较为广泛。本文就MR分子及功能成像在胰腺癌诊断中的应用现状及发展趋势进行综述。

关键词: 胰腺癌; 磁共振弥散成像; 磁共振灌注成像; 磁共振波谱成像; 分子影像

王小会, 程英升. MRI分子与功能成像诊断胰腺癌的研究新进展. *世界华人消化杂志* 2012; 20(22): 2063-2069

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/2063.asp>

0 引言

胰腺癌是一个致死率很高的恶性肿瘤, 死亡率接近100%。在美国, 胰腺癌居于癌症死亡率的第4位^[1]。究其原因, 胰腺癌发病隐匿, 早期症状缺乏特异性, 肿瘤生长进展快, 恶性程度高, 鉴别诊断也较困难, 所以提高诊断率是解决胰腺癌高死亡率的主要手段。近年来, 诊断胰腺癌的影像方法有了长足的进展, 特别是分子和功能成像(molecular and functional imaging)已经在肿瘤的临床研究和临床前研究方面得到广泛应用, 诊断准确度及灵敏度有很大的提高^[2]。而磁共振成像(magnetic resonance imaging, MRI)技术凭借其较高的空间分辨率、良好的组织对比度, 以及无放射线损坏等优点一直备受专家的青睐, 在胰腺癌的早期变化如分子、基因及代谢等方面取得了瞩目

■背景资料

胰腺癌发病率逐年提高, 早期诊断困难, 因此死亡率高。如何提高胰腺癌的早期诊断率是亟待解决的难题, 因此影像诊断在胰腺癌诊断中很重要。

■同行评议者

李健丁, 教授, 山西医科大学第一医院放射科CT室

■ 研发前沿

目前磁共振成像(MRI)分子及功能成像在胰腺癌诊断中的研究越来越多,特别是MRI分子影像成像探针的制备已经成为热点,但是其中还有很多问题需要解决。

的成就。目前,MR功能成像研究热点主要包括磁共振弥散加权成像(diffusion-weighted imaging, DWI)、灌注成像(magnetic resonance perfusion imaging)及波谱成像(magnetic resonance spectrum imaging, MRS);而MR分子成像主要集中于适于MR成像设备的特异性分子探针的制备。本文拟就以上各方面在胰腺癌诊断方面的应用现状及发展趋势展开论述。

1 磁共振弥散加权成像

1.1 磁共振弥散加权成像概述 DWI是基于水分子布朗运动的不同对组织病理特征进行评价,是在活体上观察水分子弥散运动的唯一方法,他可以反映人体组织的空间组成信息及病理生理状态下各组织成分之间水分子交换的功能状态^[3]。活体组织中,水分子的弥散运动包括细胞外、细胞内和跨细胞运动以及微循环(灌注),细胞外运动和灌注是组织DWI信号衰减的主要原因。固定水分子不受梯度的影响,因而能保持信号;自由水分子在弥散梯度的作用下信号丢失,在DWI图上表现为信号降低。表观弥散系数(apparent diffusion coefficient, ADC)是反应水分子弥散和毛细血管微循环的人工参数。ADC是水分子移动的自由度。加入的强磁场梯度即弥散梯度,常用b值来表示(单位为 s/mm^2),他代表施加梯度的持续时间和幅度以及两对梯度间的时间间隔。通过改变弥散梯度的幅度、长度、间隔,弥散运动的敏感性产生变化,并得到提供实际弥散距离的资料。随着高磁场磁体和高性能梯度线圈的开发, DWI在腹部及盆腔肿瘤的定性诊断、治疗评价和临床随访中应用越来越多。DWI在胰腺的应用包括胰腺肿瘤和肿瘤样病变的鉴别^[4]、肿瘤的分级^[5]及监测治疗效果^[6]等方面。

1.2 磁共振弥散加权成像在胰腺癌诊断及鉴别诊断中的应用 依据DWI的成像原理,理论上可以通过测量感兴趣区的ADC值从而定量的反映其内水分子的含量及运动情况,从而可能成为无创性鉴别胰腺肿块性质的新技术。目前,胰腺癌诊断的一个瓶颈问题是与肿块性胰腺炎的鉴别诊断。为了研究ADC值是否可以作为胰腺癌诊断的一项指标,研究者进行了大量工作。Huang等^[4]将37例胰腺癌与14例慢性肿块型胰腺炎(mass type chronic pancreatitis, MFCP)及20名正常志愿者对照,分别测量 $b = 0 \text{ s/mm}^2$ 及 $b = 1\,000 \text{ s/mm}^2$ 时各组的ADC值,结果:胰腺癌、

MFCP及正常组的ADC值($\times 10^{-3} \text{ mm}^2/\text{s}$)分别为 1.06 ± 0.15 、 1.35 ± 0.14 、 1.47 ± 0.18 ,胰腺癌的ADC值与MFCP及正常组相比均存在统计学差异(均 $P < 0.01$)。当ADC值临界值为1.195时,其区别胰腺癌及MFCP的敏感性为85.7%,特异性为86.5%。陈士跃等^[7]的研究也得出了同样的结论, $b = 1\,000 \text{ s/mm}^2$ 时胰腺癌ADC值显著低于肿块型胰腺炎,ADC值分别为 $1.087 \text{ mm}^2/\text{s} \pm 0.175 \text{ mm}^2/\text{s}$ 、 $1.279 \text{ mm}^2/\text{s} \pm 0.2133 \text{ mm}^2/\text{s}$, $P < 0.01$ 。Ichikawa等^[8]的研究认为高b值($1\,000 \text{ s/mm}^2$)DWI图像检测胰腺癌的敏感度和特异度分别达到了96.2%和98.6%。

然而,有些学者则认为DWI不能有效区分低分化胰腺癌和肿块型胰腺炎,因为二者的ADC值存在部分重叠^[9]。之所以会出现ADC值不尽相同,原因有很多,扫描技术、序列及城乡参数都可能影响到ADC值,但主要还与研究时所用病例标本有关。胰腺癌的ADC值与癌组织内细胞丰富程度、肿瘤间质内纤维含量及血流灌注情况相关^[10,11]。而慢性肿块型胰腺炎ADC值报道不一致的原因可能与胰腺炎形成过程有关,在慢性胰腺炎急性复发形成的肿块型胰腺炎时ADC值因为渗出较多而增高,在纤维成分聚集较多的肿块型胰腺炎时,ADC值较低^[12]。总的来说,ADC值对胰腺癌的诊断与鉴别诊断有帮助是肯定的。

当然,b值的选择也是影响诊断的重要因素,但目前业界关于此还没有统一的标准。有学者^[5]认为高b值可以去除灌注对DWI的影响,使得T2穿透效应影响较小。高b值时,胰腺癌病灶信号衰减较胰腺组织程度小,因而病灶和胰腺实质组织对比增加,病灶显示更加明显,有助于病灶的定性诊断。陈士跃等^[8]的研究表明胰腺癌与MFCP的ADC₅₀₀值无统计学差异,但ADC₁₀₀₀值的差异具有统计学意义,提示高b值可能更有助于胰腺癌和MFCP的鉴别诊断。然而Klauss等^[13]则发现b值在50-300 s/mm^2 时胰腺癌和慢性肿块型胰腺炎的ADC值有显著统计学差异。郭立等^[14]则认为b值的最佳取值为400 s/mm^2 ,因为随着b值增大,DWI图像信噪比增加。而b取400 s/mm^2 既避免了小b值时DWI受血流因素及T2穿透效应的影响,又避免了大b值时图像信噪比较低的影响,利于胰腺癌更好显示。关于b值的选择问题,还有待进一步探讨,还需要大量的临床研究作支持。

1.3 DWI在评估胰腺癌恶性程度中的作用 DWI可以用于评估胰腺癌的恶性程度。Hayano等^[15]回顾了21例胰腺癌患者的ADC值和临床病

例特征的关系, 结果发现ADC值和肿瘤大小及转移淋巴结数呈负相关, 有统计学意义($P = 0.004, 0.007$). 并且, 肿瘤组织ADC值低的患者出现门静脉系统和胰周神经丛侵犯的可能增大, 提示恶性程度越高的胰腺癌ADC值越低. Wang等^[5]发现低分化胰腺癌的ADC值显著低于高分化/中等分化胰腺癌, 差异具有统计学意义. 同时, 高分化/中等分化胰腺癌中富含纤维成分者的ADC值也显著低于纤维成分较少者. 由于低分化胰腺癌的病理特征为腺体成分少, 而纤维成分很多, 所以胰腺癌不同分化程度之间ADC值的差异可能与纤维成分含量不同有关. 总之, ADC值的不同和胰腺癌的恶性程度有密切关系, 相信随着技术的进步和更大量临床病例的探索, ADC值将会在胰腺癌的术前评估中发挥重要作用.

1.4 磁共振弥散加权成像在监测肿瘤治疗效果中的新进展 胰腺癌治疗后疗效的监测是指导后续治疗、提高患者生存质量及延长生存期的关键. 而传统影像学手段存在极大的盲目性和滞后性, DWI可以通过检测活体组织内部水分子的运动, 反映机体组织微观空间的组成变化和病理生理状态下各组织成分之间水分子交换的功能状况, 从而为疗效的判定提供更多的信息. 目前, 在其他实体瘤或小动物模型上已经证实了DWI在监测肿瘤治疗效果中有一定的作用^[6]. 有学者^[16]发现胃肠道间质瘤治疗后1 wk即可检测到ADC值的显著变化. 另外, DWI在直肠癌^[17]、宫颈癌^[18]治疗效果监测方面的应用也有报道. 目前, 尚未有DWI监测胰腺癌治疗效果的相关文献. 但是DWI作为监测胰腺癌治疗效果的新方法肯定会引起越来越多的关注.

2 磁共振灌注成像

MR灌注成像是在常规动态增强检查的基础上结合快速扫描技术建立起来的, 属于动态增强MR的范畴. 灌注成像技术的出现和发展标志着现代影像学从解剖形态学向着既能反映宏观大体形态、又能揭示微观代谢和功能的方向发展. 现在通用的成像方法是外源性对比剂法, 指在静脉注射对比剂的同时对选定的层面进行连续不断的扫描以获得该层面内每一像素的信号随强化时间而演变的曲线, 即时间-信号强度曲线(time-signal intensity curve, TIC), 其所反映的是对比剂在该器官中所产生的信号变化, 进而间接反映组织器官内灌注量的变化. 目前MR灌注在胰腺癌中的应用多是利用TIC计算组织强化峰值时间、增强前后信号增加百分率等参数来

无创地评价胰腺癌组织的血流灌注状态. 张晶等^[19]对胰腺癌和正常志愿者进行全胰腺灌注成像, 通过TIC计算感兴趣区的峰值时间(TTP)、最大斜率(SS). 结果相对于正常胰腺, 胰腺癌的TTP显著延长, SS明显降低. 由于SS值取决于组织的微血管数量和毛细血管通透性, SS值越小, 血容量相对减少, 所以胰腺癌相对于正常胰腺组织呈低灌注, 说明癌组织微血管数量较少. 然而Ueno等^[20]研究发现MR灌注和微血管密度(micro vascular density, MVD)之间并无显著联系, 但其发现MR灌注和胰腺癌组织血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)的表达有一定关系, 发现肿瘤信号比(SR)越高, 其VEGF表达水平越高, 并具有统计学意义($P = 0.002$). 有研究指出^[21,22]随着胰腺癌血流量升高, 整体生存率会下降, 所以MR灌注在评估胰腺癌的预后方面也有一定的作用. 总的来说, 关于胰腺的MR灌注成像的研究比较少, 结果亦不一致. 但由于MR具有良好的组织对比, 其发展前景将会越来越广阔.

3 磁共振波谱成像

MRS通过射频脉冲激励受检物质的原子核, 然后测量原子核弛豫过程中释放出来的自由衰减信号, 再经过傅里叶转换, 在化合物固有的化学位移上显示其波峰, 并以波谱曲线的形式表现出感兴趣区内物质的生化代谢变化, 是目前唯一能够定性和定量地提供或体内生化信息的方法. 常用的波谱包括¹H、³¹P和²³Na(²³Na)波谱分析, 但在胰腺癌方面的研究主要集中于¹H-MRS, 并且胰腺癌的特征性代谢物尚处于探索阶段. 早期, 有研究者^[23]提出胰腺癌的相对脂质含量(rLip)明显低于MFCP, 具有统计学意义. 近期, 黄文才^[24]证实了胰腺癌rLip值低于正常胰腺和MFCP($P < 0.001$), 并且rLip以0.647作为截点值来鉴别胰腺癌与肿块型胰腺炎, ROC分析中获得的敏感性和特异性分别为90.9%和92.6%. 其他学者^[25]也发现Lip可能是胰腺癌的潜在敏感标记物, 所以rLip值有可能是胰腺癌和肿块型胰腺炎鉴别诊断的标志性物质. 黄文才^[24]同时发现胆碱类代谢物(choline metabolites, CCM)与谷氨酸盐复合物(glutamic acid salt complexes, Glx)比值(CCM/Glx)比较, 正常胰腺组显著高于胰腺癌组和肿块型胰腺炎组, 并且胰腺癌CCM/Glx比MFCP更低($P = 0.011$), 因此CCM/Glx可能对胰腺癌的鉴别诊断有一定帮助. 苏天昊等^[26]研究50例非癌受试者及20例胰

■ 相关报道
最新研究表明, MRI分子影像可以用于早期诊断胰腺癌, 已经成功用于小动物胰腺癌的早期诊断.

■创新盘点

本文全面阐述了MRI分子及功能成像在胰腺癌诊断中的应用现状及前景,为胰腺癌的靶向分子成像提供了新的思路。

腺癌患者的 $^1\text{H-MRS}$ 中胆固醇和不饱和脂肪酸的混合峰(Chol+Unsat)与脂肪酸(Lip)峰高的比值(Chol+Unsat/Lip),发现胰腺癌组与非癌组的 Chol+Unsat/Lip 的差异具有统计学意义,其临界点取0.295时, $^1\text{H-MRS}$ 诊断胰腺癌与非癌胰腺的敏感性为55%,特异性为86%,提示 $^1\text{H-MRS}$ 中 Chol+Unsat/Lip 比值升高对诊断胰腺癌有一定参考价值。Tesiram等^[27]应用MRS还发现了一种尚未命名的复合物UCM,胰腺癌组的UCM峰值是非癌对照组的2倍,提示胰腺癌中可能还存在其他未知的特征性代谢物。总之, $^1\text{H-MRS}$ 对胰腺癌的诊断与鉴别诊断有一定作用,但其诊断胰腺癌的敏感性和特异性还有待进一步研究。

目前,运用MRS分析胰腺癌患者胆汁、尿液等的特征性代谢物也引起了研究者的关注。Bezabeh等^[28]研究发现胰腺癌组织大量释放 β -葡萄糖苷酸酶,后者可水解胆汁中的胆红素二葡萄糖苷酸产生D-葡萄糖醛酸(GlcUA)。应用 $^1\text{H-MRS}$ 及二维 $^1\text{H-HCOSY}$ 及 TOCSY 技术分析 GlcUA ,结果发现胰腺癌患者胆汁中 GlcUA 水平增高,而正常对照组及慢性胰腺炎组无或仅有少量 GlcUA 存在。所以,运用 $^1\text{H-MRS}$ 测量胰腺癌患者胆汁中 GlcUA 含量,有可能成为无创性诊断胰腺癌的新技术。但由于此研究病例少,其可靠性还需要大量的研究验证。Napoli等^[29]运用MRS研究了33例胰腺导管腺癌患者和54例正常对照组的尿液代谢物波谱,统计学分析显示胰腺导管腺癌和对照组的尿液代谢物特征存在显著差异($P<10^{-5}$),提示胰腺癌患者尿液中可能存在特异性代谢物。尿液MRS分析诊断胰腺癌的特异性和敏感性分别为90.7%和75.8%,同时由于其无创性和高重现性,可能在胰腺癌大规模筛查中发挥作用。

4 磁共振成像

分子影像学的开展使针对胰腺癌的特异性靶向成像成为可能,目前,MRI分子影像主要集中于特异性分子探针的制备及与其他成像设备结合的双模/多模态成像。

4.1 磁共振特异性分子探针 特异性分子探针通常由转运体、MR显像剂及靶向性配体组成。转运体常用的有纳米微粒、病毒载体及多聚体等,其可携带MR显像剂,如顺磁性复合物 Gd-DTPA 和超顺磁性氧化铁颗粒($\text{superparamagnetic iron oxide, SPIO}$)等。靶向配体是胰腺癌靶向成像的主要研究方向,由于胰腺癌组织表达多种标志物,选择敏感度及特异度较高的标记物及其相

应配体关系到靶向成像的成败。

4.1.1 胰腺癌相关标志物的研究:随着胰腺癌基础研究的深入,发现胰腺癌细胞及其周围间质内存在多种蛋白质或受体的高表达。除了报道较多的 CA19-9 ^[30]、黏蛋白1(mucin 1, MUC1)^[31]、Survivin蛋白^[32]等,新近发现了几种新的标志物。网蛋白-1(plectin-1, Plect1)是与丝状肌动蛋白、微管及中间丝有密切联系的蛋白质,分子量大小为500 kDa,可能是线粒体和中间纤维系统作用的重要环节。Bausch等^[33]研究表明其在原发性和转移性胰腺导管腺癌明显升高,在60%的III期癌前病变内表达,但在正常胰腺组织中不表达,所以 Plect1 有可能成为胰腺癌分子成像的特异性靶点。转铁蛋白受体($\text{transferrin receptor, TFRC}$)是一种膜结合蛋白,在恶性增生的细胞中大量表达。有学者^[34]研究了51例胰腺癌患者TFRC的表达情况,结果93%的胰腺癌表达TFRC,原发性和转移性胰腺癌表达特点相似,而正常上皮细胞不表达,提示TFRC可以用作胰腺癌诊断和靶向治疗的标志物。胰腺导管腺癌高度特异性表达组织蛋白酶E($\text{cathepsin E, Cath E}$),有学者^[35]用定量PCR和免疫组织化学的方法测定正常胰腺、慢性胰腺炎及胰腺导管腺癌中组织Cath E的表达情况,同时在小鼠模型体内注入Cath E特异性探针,并用光学成像系统成像,结果Cath E在胰腺导管腺癌中特异性表达,光学成像系统也可探测到Cath E。所以Cath E理论上也可以用作胰腺导管腺癌早期成像的特异性分子靶点。

叶酸受体 α ($\text{folate receptor alpha, FOLR1}$)是一种膜蛋白受体,在多种上皮组织来源的肿瘤组织中高表达,而在正常组织中不表达。有学者^[36]检测了FOLR1在胰腺癌、正常胰腺、癌旁和慢性胰腺炎组织的表达,发现其在94.7%(72/76)的胰腺癌中阳性表达,且表达水平与肿瘤转移相关,而在正常胰腺中无表达,所以FOLR1作为靶点进行分子成像在胰腺癌的诊断中可能具有良好的应用价值。临床已有将分子影像探针与叶酸偶联,靶向至肿瘤组织,并成功的对小鼠的肿瘤组织进行了磁共振分子显像^[37]。近来研究^[38,39]发现胰腺癌及其间质细胞内高表达尿激酶纤维蛋白溶酶原激活剂受体($\text{urokinase plasminogen activator receptor, uPAR}$),而在正常胰腺组织及慢性胰腺炎患者的胰腺组织中未见表达,可能是胰腺癌受体靶向成像的重要表面标志物。并且,胰腺癌内间质成分比例较高,所以uPAR的表达部位决定了其在胰腺癌的分子影像研究中将具

有非常广阔的前景.

肿瘤组织生长快慢与血供是否丰富密切相关, 因此, 寻找促血管生成因子等方面的特异性标志物也成为研究的热点. 目前, 研究较多的是VEGF, 是一组硫化物二聚体蛋白, 大小约34-45 kDa, 在胰腺癌中VEGF165和VEGF121占优势^[40]. VEGF对内皮细胞有趋化和促进有丝分裂的作用, 能增加血管内皮的通透性, 肿瘤内的VEGF受体多表达于新生血管的内皮细胞表面. 胰腺癌虽为乏血供肿瘤, 但其细胞内也有VEGF受体的表达^[41]. 因此, 理论上VEGF及其受体可作为胰腺癌的理想标志物. 凝血酶敏感蛋白(thrombospondin, TSP)是另一种可能的肿瘤血管标志物, 其能抑制血管生成, 在凝血酶存在时由血小板释放. TSP-1是其中的一个亚型, 是分子量为450 kDa的糖蛋白, 研究^[42,43]发现其在胰腺癌间质细胞高表达, 并且与微血管的密度呈负相关. 鉴于胰腺癌特殊的组成成分, TSP-1有望成为胰腺癌血管成像的理想靶点. 然而, 虽然发现了以上很多种胰腺癌相关的肿瘤标志物, 但由于敏感度、特异度、表达部位及表达量的差异, 这些标志物并不能完全满足胰腺癌靶向成像靶点的要求, 对胰腺癌分子影像靶点的选择需要更深入的研究.

4.1.2 胰腺癌特异性分子探针及MR靶向成像的进展: MR特异性分子探针的制备是进行靶向成像的重点和难点, 其必须满足多种条件, 如高敏感性、高特异性、无毒性、生物学兼容性 & 合适的分子量以克服体内生理屏障等. 国内外很多学者进行了大量的实验研究, 取得了可喜成绩, 在动物验中也有了成功的应用. 有学者^[44]成功地将SPIO螯合胰腺癌CA19-9单克隆抗体(Anti-CA19-9), 制备出了免疫靶向对比剂SPIO-Anti-CA19-9, 并成功进行了裸鼠模型的MRI成像, 也证实了单克隆抗体联合的Fe₂O₃纳米粒子可以特异性靶向肿瘤区域; 但存在的问题是单克隆抗体的分子量较大, 在穿越肿瘤内的血管屏障时有一定的限制, 因此有必要制备分子量较小、穿透力强的抗体片段. Girgis等^[45]成功制备了一种抗CA19-9的双特异性抗体55 kDa, 不仅具备分子量较小的优点, 而且保留了完整抗体的二价性. 他们首先通过隔离完整抗体的可变性基因区而获得双链DNA结构, 然后从NS0细胞提取并纯化出特异性抗体, 两者结合后用流式细胞仪和免疫荧光法证实, 注入胰腺癌小鼠模型并进行显微PET成像, 获得了信噪比很高的图像. 证明此种双特异性抗体完全可以取代传

统单克隆抗体, 并用于靶向分子成像.

有学者^[34,46]成功制备了靶向网蛋白-1的特异性分子探针, 他们将网蛋白-1靶向肽(net protein-1 targeting peptides, PTP)与磁性免疫荧光纳米粒子耦合制备出复合物(PTP-NP), 注入转基因小鼠模型后经体外MRI成像可以发现病灶的胰腺导管腺癌及癌前病变, 认为PTP-NP可以用于胰腺癌的早期诊断. 陈邓林^[47]构建了一种真核基因表达载体MUC1-ETR/pDC316用于胰腺癌特异性MR分子显像, 他们将*muc1*基因启动子中与组织特异表达有关的调控序列进行扩增, 并将不含有启动子及3'端不稳定序列的转铁蛋白受体编码序列(ETR)置于该启动子的控制下, 以pDC316穿梭质粒为载体构建MUC1-ETR/pDC316, 并通过体外MR成像探讨以转铁蛋白为报告分子反映细胞内*muc1*基因异常表达的可行性, 结果发现转染MUC1-ETR/pDC316质粒的MUC1阳性细胞在MR影像上具有比未处理细胞更低的T2弛豫率趋势, 但尚未实现肉眼可见的成像. 前面已经提到*muc1*基因及蛋白在胰腺癌中异常表达, 所以此表达载体具有对胰腺癌早期特异性显像的潜力, 但有关其安全性及实验优化等方面还需要进一步探讨. 虽然胰腺癌的MR分子靶向成像取得了阶段性成果, 但不否认仍处于起步阶段, 特异性及敏感性更高的分子探针依旧是未来研究的重点.

4.2 磁共振参与的多模成像 虽然MR分子成像取得了阶段性进步, 其中存在的诸多问题也是不可否认的, 特别是磁共振成像本身存在的不足如检查灵敏度低等严重的阻碍了其发展. 如何充分发挥各种成像设备的优点, 将各成像设备的不足降到最低, 就产生了多模成像的概念. 其利用2种或2种以上医学影像学模式对同一物体进行成像以获得补充信息, 或比较、验证不同成像方法得到的结果, 已经在临床广泛应用. 近来, 各种用于胰腺癌靶向光学/MR成像的双模分子探针陆续制成, 为胰腺癌早期诊断提供了新的方法. Medarova等^[48]制备了靶向糖基化粘蛋白-1(uMUC-1)的双模态分子探针, 包括Cy5.5染料修饰的交联超顺磁性氧化铁颗粒(CLIO)及吸附在葡聚糖表面的uMUC-1特异性肽(EPPT); 其结果表明CLIO-EPPT不仅可以用于胰腺癌组织的靶向光学/MR成像, 还可以跟踪胰腺癌对化疗的反应. 有学者^[49]设计了一种靶向uPAR的双模态分子靶向探针, 使Fe₂O₃纳米粒子同时联合近红外染料和尿激酶纤维蛋白溶酶原激活剂; 这种纳米靶向探针在胰腺癌细胞表面及间质细胞

■应用要点

早期诊断胰腺癌能显著降低其死亡率, MRI成像技术的不断改进将提高胰腺癌早期诊断率, 会有很广的临床应用.

■同行评价

本文从MRI分子与功能成像研究的热点方面对胰腺癌诊断的现状和发展趋势进行较具体的阐述, 内容全面, 观点新颖, 逻辑性强, 文字表达流畅, 通过该文章的全面讲解, 提高了对胰腺癌MRI诊断的认识。

内广泛分布, 使肿瘤信号的变化显著, 为双模态光学/MR成像奠定了基础。刘峰君等^[50]以钆离子(Gd^{3+})、量子点及精氨酸(R)-甘氨酸(G)-天冬氨酸(D)多肽(RGD)等为功能单元, 采用纳米载体组装技术构建了靶向性强的双模态纳米探针($QDs@Gd^{3+}$ -RGD), 证实 $QDs@Gd^{3+}$ -RGD具有较高的弛豫率, 并成功用于胰腺癌细胞的荧光/MR双模态成像。还有研究者^[51]构建了一种双融合基因表达载体, 包括增强型绿色荧光蛋白(enhanced green fluorescent protein, EGFP)和人转铁蛋白受体(TfR), 并验证其能否为体内双模态光学/MR成像奠定基础。结果表明EGFP-TfR融合蛋白主要表达在293T细胞的细胞膜上, 并能介导Tf内化, 说明该表达载体能有效表达功能蛋白, 理论上可以用于双模态光学/MR成像。虽然目前尚无该融合表达载体在胰腺癌细胞中的研究, 鉴于前面提到的胰腺癌细胞高表达转铁蛋白, 相信其在胰腺癌早期诊断中会有一定的价值。以上几种胰腺癌的双模态分子探针为靶向分子成像提供了新的思路, 相信随着技术的进步, 优势互补的多模成像会有更广阔的应用前景。

5 结论

随着MRI技术的飞速发展, MR分子和功能成像已经深入到分子、基因水平的成像, 使胰腺癌的诊断更准确、更具特异性, 特别是MRI分子影像已经在胰腺癌的早期诊断方面也取得了很大的进步。不可否认的是, MR分子和功能成像在胰腺癌诊断中的应用仍处于探索阶段, 研究结果也不尽相同。MR功能成像能否应用于胰腺癌早期诊断、制备特异性更高的靶向分子探针等问题还需要更大量深入的研究。相信在不久的将来, MR分子和功能成像在胰腺癌诊断中将发挥更大的作用。

6 参考文献

- Chakraborty S, Baine MJ, Sasson AR, Batra SK. Current status of molecular markers for early detection of sporadic pancreatic cancer. *Biochim Biophys Acta* 2011; 1815: 44-64
- Glunde K, Pathak AP, Bhujwalla ZM. Molecular-functional imaging of cancer: to image and imagine. *Trends Mol Med* 2007; 13: 287-297
- 杨新焕, 闫东, 袁曙光. 磁共振功能成像对胰腺癌的诊断研究现状. *医学综述* 2010; 16: 1556-1559
- Huang WC, Sheng J, Chen SY, Lu JP. Differentiation between pancreatic carcinoma and mass-forming chronic pancreatitis: usefulness of high b value diffusion-weighted imaging. *J Dig Dis* 2011; 12: 401-408
- Wang Y, Chen ZE, Nikolaidis P, McCarthy RJ, Merrick L, Sternick LA, Horowitz JM, Yaghamai V, Miller FH. Diffusion-weighted magnetic resonance

imaging of pancreatic adenocarcinomas: association with histopathology and tumor grade. *J Magn Reson Imaging* 2011; 33: 136-142

- Grünberg K, Grenacher L, Klauss M. [Diffusion-weighted imaging of the pancreas]. *Radiologe* 2011; 51: 186-194
- 陈士跃, 黄文才, 陆建平, 金爱国, 黄俊, 田冰. 胰腺3T磁共振弥散加权成像的临床应用研究. *中华胰腺病杂志* 2011; 11: 243-246
- Ichikawa T, Erturk SM, Motosugi U, Sou H, Iino H, Araki T, Fujii H. High-b value diffusion-weighted MRI for detecting pancreatic adenocarcinoma: preliminary results. *AJR Am J Roentgenol* 2007; 188: 409-414
- Wang Y, Miller FH, Chen ZE, Merrick L, Morteale KJ, Hoff FL, Hammond NA, Yaghamai V, Nikolaidis P. Diffusion-weighted MR imaging of solid and cystic lesions of the pancreas. *Radiographics* 2011; 31: E47-E64
- Charles-Edwards EM, deSouza NM. Diffusion-weighted magnetic resonance imaging and its application to cancer. *Cancer Imaging* 2006; 6: 135-143
- Schmidt GP, Kramer H, Reiser MF, Glaser C. Whole-body magnetic resonance imaging and positron emission tomography-computed tomography in oncology. *Top Magn Reson Imaging* 2007; 18: 193-202
- Fattahi R, Balci NC, Perman WH, Hsueh EC, Alkaade S, Havlioglu N, Burton FR. Pancreatic diffusion-weighted imaging (DWI): comparison between mass-forming focal pancreatitis (FP), pancreatic cancer (PC), and normal pancreas. *J Magn Reson Imaging* 2009; 29: 350-356
- Klauss M, Lemke A, Grünberg K, Simon D, Re TJ, Wente MN, Laun FB, Kauczor HU, Delorme S, Grenacher L, Stieltjes B. Intravoxel incoherent motion MRI for the differentiation between mass forming chronic pancreatitis and pancreatic carcinoma. *Invest Radiol* 2011; 46: 57-63
- 郭立, 杨达宽, 袁曙光, 闫东, 王家平. 胰腺癌磁共振弥散成像中b值的选择. *中国临床医学影像杂志* 2010; 21: 87-89
- Hayano K, Miura F, Amano H, Toyota N, Wada K, Kato K, Sano K, Takeshita K, Aoyagi T, Shuto K, Matsubara H, Asano T, Takada T. Correlation of apparent diffusion coefficient measured by diffusion-weighted MRI and clinicopathologic features in pancreatic cancer patients. *J Hepatobiliary Pancreat Sci* 2012 Feb 7. [Epub ahead of print]
- Zhang XP, Tang L. [Imaging evaluation of targeted therapy for gastrointestinal stromal tumor]. *Zhonghua Weichang Waikie Zazhi* 2012; 15: 208-212
- Jang KM, Kim SH, Choi D, Lee SJ, Park MJ, Min K. Pathological correlation with diffusion restriction on diffusion-weighted imaging in patients with pathological complete response after neoadjuvant chemoradiation therapy for locally advanced rectal cancer: preliminary results. *Br J Radiol* 2012 Mar 14. [Epub ahead of print]
- 刘颖. 磁共振扩散加权成像在宫颈癌诊疗中应用价值的研究. 天津: 天津医科大学, 2010: 1-129
- 张晶, 田建明, 郝强, 王莉. 磁共振灌注成像在胰腺癌中的应用初探. *中国医学计算机成像杂志* 2008; 14: 569-572
- Ueno M, Ohkawa S, Niwa T, Yoshida T, Morinaga S, Sugimasa Y. The correlation of perfusion-weighted MRI with VEGF in resected pancreatic cancer. *Journal of Clinical Oncology* 2007; 25: 15092
- Ueno M, Niwa T, Ohkawa S, Amano A, Masaki T, Miyakawa K, Yoshida T. The usefulness of perfusion-weighted magnetic resonance imaging in ad-

- vanced pancreatic cancer. *Pancreas* 2009; 38: 644-648
- 22 Ueno M, Niwa T, Ohkawa S, Masaki T, Amano A, Miyakawa K, Yoshida T, Tarao K. The prognostic value of perfusion-weighted magnetic resonance imaging in advanced pancreas carcinoma. *Journal of Clinical Oncology* 2005; 23: 4109
- 23 Cho SG, Lee DH, Lee KY, Ji H, Lee KH, Ros PR, Suh CH. Differentiation of chronic focal pancreatitis from pancreatic carcinoma by in vivo proton magnetic resonance spectroscopy. *J Comput Assist Tomogr* 2005; 29: 163-169
- 24 黄文才. 在体胰腺癌在体3T磁共振质子波谱与扩散加权成像研究. 上海: 第二军医大学, 2011: 64-81
- 25 Ma X, Zhao X, Ouyang H, Sun F, Zhang H, Zhou C, Shen H. The metabolic features of normal pancreas and pancreatic adenocarcinoma: preliminary result of in vivo proton magnetic resonance spectroscopy at 3.0 T. *J Comput Assist Tomogr* 2011; 35: 539-543
- 26 苏天昊, 申皓, 靳二虎, 闫媛媛, 梁宇霆, 贺文. 3.0T质子磁共振波谱在评价胰腺疾病中的临床应用. *临床放射学杂志* 2012; 31: 52-55
- 27 Tesiram YA, Lerner M, Stewart C, Njoku C, Brackett DJ. Utility of nuclear magnetic resonance spectroscopy for pancreatic cancer studies. *Pancreas* 2012; 41: 474-480
- 28 Bezabeh T, Ijare OB, Albiin N, Arnelo U, Lindberg B, Smith IC. Detection and quantification of D-glucuronic acid in human bile using ¹H NMR spectroscopy: relevance to the diagnosis of pancreatic cancer. *MAGMA* 2009; 22: 267-275
- 29 Napoli C, Sperandio N, Lawlor RT, Scarpa A, Molinari H, Assfalg M. Urine metabolic signature of pancreatic ductal adenocarcinoma by (1)h nuclear magnetic resonance: identification, mapping, and evolution. *J Proteome Res* 2012; 11: 1274-1283
- 30 Molina V, Visa L, Conill C, Navarro S, Escudero JM, Auge JM, Filella X, Lopez-Boado MA, Ferrer J, Fernandez-Cruz L, Molina R. CA 19-9 in pancreatic cancer: retrospective evaluation of patients with suspicion of pancreatic cancer. *Tumour Biol* 2012; 33: 799-807
- 31 Gold DV, Karanjawala Z, Modrak DE, Goldenberg DM, Hruban RH. PAM4-reactive MUC1 is a biomarker for early pancreatic adenocarcinoma. *Clin Cancer Res* 2007; 13: 7380-7387
- 32 Bhanot U, Heydrich R, Möller P, Hasel C. Survivin expression in pancreatic intraepithelial neoplasia (PanIN): steady increase along the developmental stages of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Am J Surg Pathol* 2006; 30: 754-759
- 33 Bausch D, Thomas S, Milino-Kenudson M, Fernández-del CC, Bauer TW, Williams M, Warshaw AL, Thayer SP, Kelly KA. Plectin-1 as a novel biomarker for pancreatic cancer. *Clin Cancer Res* 2011; 17: 302-309
- 34 Ryschich E, Huszty G, Knaebel HP, Hartel M, Büchler MW, Schmidt J. Transferrin receptor is a marker of malignant phenotype in human pancreatic cancer and in neuroendocrine carcinoma of the pancreas. *Eur J Cancer* 2004; 40: 1418-1422
- 35 Cruz-Monserrate Z, Abd-Elgaliel WR, Grote T, Deng D, Ji B, Arumugam T, Wang H, Tung CH, Logsdon CD. Detection of pancreatic cancer tumours and precursor lesions by cathepsin E activity in mouse models. *Gut* 2011 Nov 22. [Epub ahead of print]
- 36 郑洪民. 分子影像标记物叶酸受体 α 在胰腺癌中的表达及意义. *山东大学学报(医学版)* 2010; 48: 83-85
- 37 Konda SD, Wang S, Brechbiel M, Wiener EC. Biodistribution of a 153 Gd-folate dendrimer, generation = 4, in mice with folate-receptor positive and negative ovarian tumor xenografts. *Invest Radiol* 2002; 37: 199-204
- 38 Harvey SR, Hurd TC, Markus G, Martinick MI, Penetrante RM, Tan D, Venkataraman P, DeSouza N, Sait SN, Driscoll DL, Gibbs JF. Evaluation of urinary plasminogen activator, its receptor, matrix metalloproteinase-9, and von Willebrand factor in pancreatic cancer. *Clin Cancer Res* 2003; 9: 4935-4943
- 39 Tan X, Egami H, Nozawa F, Abe M, Baba H. Analysis of the invasion-metastasis mechanism in pancreatic cancer: involvement of plasmin(ogen) cascade proteins in the invasion of pancreatic cancer cells. *Int J Oncol* 2006; 28: 369-374
- 40 Calin GA, Ferracin M, Cimmino A, Di Leva G, Shimizu M, Wojcik SE, Iorio MV, Visone R, Sever NI, Fabbri M, Iuliano R, Palumbo T, Pichiorri F, Roldo C, Garzon R, Sevignani C, Rassenti L, Alder H, Volinia S, Liu CG, Kipps TJ, Negrini M, Croce CM. A MicroRNA signature associated with prognosis and progression in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 2005; 353: 1793-1801
- 41 Karayiannakis AJ, Bolanaki H, Syrigos KN, Asimakopoulos B, Polychronidis A, Anagnostoulis S, Simopoulos C. Serum vascular endothelial growth factor levels in pancreatic cancer patients correlate with advanced and metastatic disease and poor prognosis. *Cancer Lett* 2003; 194: 119-124
- 42 Kasper HU, Ebert M, Malfertheiner P, Roessner A, Kirkpatrick CJ, Wolf HK. Expression of thrombospondin-1 in pancreatic carcinoma: correlation with microvessel density. *Virchows Arch* 2001; 438: 116-120
- 43 Qian X, Rothman VL, Nicosia RF, Tuszynski GP. Expression of thrombospondin-1 in human pancreatic adenocarcinomas: role in matrix metalloproteinase-9 production. *Pathol Oncol Res* 2001; 7: 251-259
- 44 乔中伟, 缪飞, 夏春梅, 黄明铭, 吴志远, 沈鹤柏, 袁耀宗. 靶向磁性纳米粒子诊断胰腺癌活体MRI研究. *中国医学计算机成像杂志* 2009; 15: 144-148
- 45 Girgis MD, Kenanova V, Olafsen T, McCabe KE, Wu AM, Tomlinson JS. Anti-CA19-9 diabody as a PET imaging probe for pancreas cancer. *J Surg Res* 2011; 170: 169-178
- 46 Kelly KA, Bardeesy N, Anbazhagan R, Gurumurthy S, Berger J, Alencar H, Depinho RA, Mahmood U, Weissleder R. Targeted nanoparticles for imaging incipient pancreatic ductal adenocarcinoma. *PLoS Med* 2008; 5: e85
- 47 陈邓林. MUC1-ETRpDC316载体介导的胰腺癌特异性MR分子显像初步研究. 广州: 中山大学, 2010
- 48 Medarova Z, Pham W, Kim Y, Dai G, Moore A. In vivo imaging of tumor response to therapy using a dual-modality imaging strategy. *Int J Cancer* 2006; 118: 2796-2802
- 49 Yang L, Mao H, Cao Z, Wang YA, Peng X, Wang X, Sajja HK, Wang L, Duan H, Ni C, Staley CA, Wood WC, Gao X, Nie S. Molecular imaging of pancreatic cancer in an animal model using targeted multifunctional nanoparticles. *Gastroenterology* 2009; 136: 1514-1525. e2
- 50 刘峰君, 张兵波, 宋歌, 程英升. Gd3+与RGD共修饰量子点用于胰腺癌细胞的荧光剂及MR双模态成像. *高等学校化学学报* 2012; 33: 378-382
- 51 Li D, Zhou B, Zhang B, Qin J, Zhu KS, Huang MS, Meng XC, Shan H. [Construction and validation of dual fusion reporter gene expression vector for molecular imaging study]. *Zhonghua Yixue Zazhi* 2011; 91: 3363-3366

人巨细胞病毒感染与炎症性肠病的相关研究进展

吉阳, 黎锐平, 王明丽

■背景资料

近些年炎症性肠病(IBD)的发病率 and 患病率呈不断增长的趋势, 越来越多的研究认为人巨细胞病毒(HCMV)与IBD的发生发展有一定的相关性, 了解HCMV在IBD患者中的感染率、诊断方法和可能的机制, 可为临床更好地预防IBD提供新思路。

吉阳, 王明丽, 安徽医科大学基础医学院微生物学教研室 安徽省合肥市 230032

黎锐平, 安徽中医学院附属医院内镜中心 安徽省合肥市 230032

吉阳, 硕士, 主要从事临床病毒学研究。

安徽省科技厅科技攻关基金资助项目, No. 08010302179

作者贡献分布: 本文综述由吉阳完成; 王明丽与黎锐平审核。

通讯作者: 王明丽, 教授, 230032, 安徽省合肥市梅山路81号, 安徽医科大学微生物学教研室, wangminglihf@yahoo.com.cn

收稿日期: 2012-04-18 修回日期: 2012-05-25

接受日期: 2012-06-28 在线出版日期: 2012-08-08

Progress in understanding the relationship between inflammatory bowel disease and human cytomegalovirus infection

Yang Ji, Rui-Ping Li, Ming-Li Wang

Yang Ji, Ming-Li Wang, Department of Microbiology, Anhui Medical University, Hefei 230032, Anhui Province, China
Rui-Ping Li, Center for Endoscopy, Anhui University of Traditional Chinese Medicine, Hefei 230032, Anhui Province, China

Supported by: the Program of Science and Technology Department of Anhui Province, No. 08010302179

Correspondence to: Ming-Li Wang, Professor, Department of Microbiology, Anhui Medical University, 81 Meishan Road, Hefei 230032, Anhui Province, China. wangminglihf@yahoo.com.cn

Received: 2012-04-18 Revised: 2012-05-25

Accepted: 2012-06-28 Published online: 2012-08-08

Abstract

Human cytomegalovirus (HCMV) is a ubiquitous DNA virus that can cause severe disease in immunosuppressive or immunocompromised patients. Recent studies have found that CMV might play a role in the pathogenesis and progression of inflammatory bowel disease (IBD). This paper gives a review of the epidemiology, clinical diagnosis, and pathogenesis of HCMV infection in patients with IBD.

Key Words: Inflammatory bowel disease; Human cytomegalovirus; Immunosuppression

Ji Y, Li RP, Wang ML. Progress in understanding the relationship between inflammatory bowel disease and human cytomegalovirus infection. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2012; 20(22): 2070-2074

摘要

人巨细胞病毒(human cytomegalovirus, HCMV)是普遍存在的DNA病毒, 在免疫损伤或免疫抑制的患者中常导致严重疾病。已有研究发现, HCMV在炎症性肠病(inflammatory bowel disease, IBD)的发生和发展中起一定作用。本文综述了近年来有关IBD患者中HCMV感染的临床调查和临床诊断方法, 并初步探讨了HCMV感染与IBD发生的相关机制。

关键词: 炎症性肠病; 人巨细胞病毒; 免疫抑制

吉阳, 黎锐平, 王明丽. 人巨细胞病毒感染与炎症性肠病的相关研究进展. *世界华人消化杂志* 2012; 20(22): 2070-2074

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/2070.asp>

0 引言

人巨细胞病毒(human cytomegalovirus, HCMV)属人类疱疹病毒 β 亚科, 基因组为线性双链DNA, 全长约240 kb, 编码约208个开放阅读框(open reading frame, ORF)。病毒复制增殖时编码3种时相基因: 立即早期基因(IE)、早期基因(E)和晚期基因(L)。HCMV在人群中感染非常普遍, 普通人群的血清阳性率达40%-100%^[1]。病毒感染免疫功能正常的个体常表现为隐性感染, 多数感染者无临床症状, 但在一定条件下可以发展为肠炎、脑炎、心肌炎和其他特定的器官疾病。免疫功能低下的人群如新生儿、实体器官移植、人类艾滋病病毒(human AIDS virus, HIV)感染者和免疫抑制剂治疗的患者感染会引起严重终末器官疾病甚至导致感染者死亡。HCMV主要通过密切接触传播, 包括唾液、尿液、血液、乳汁、精液以及移植的器官和组织^[2]。

炎症性肠病(inflammatory bowel disease, IBD)是一组原因未明的慢性肠道炎症性疾病, 主要包括两种类型的慢性肠紊乱, 溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)和克罗恩病(Crohn's disease, CD)^[3]。研究表明抗生素类、非类固醇类抗炎药物的使用, 细菌和病毒的感染均能加重IBD的恶化^[4,5]。在病毒病因学中, 研究认为

■同行评议者

李君文, 研究员, 中国人民解放军军事医学科学院卫生学环境医学研究所

HCMV感染的IBD患者, 疾病的风险会增加^[6-8]. 现在, 越来越多的研究表明HCMV与IBD有一定相关性, 且HCMV参与了IBD的发生发展过程, 能导致IBD患者发展为中毒性巨结肠^[9,10]. 临床常见的HCMV胃肠炎常常发生在免疫抑制的患者中, HCMV并发的IBD会有较高的发病率和死亡率^[11]. 虽然近40年研究报道HCMV与IBD相关的文献很多, 但是HCMV感染在IBD中的致病机制仍不明确, 本文就IBD患者中HCMV的感染与发病率, 临床诊断方法以及致病机制的研究现状作一综述.

1 炎症性肠病患者中人巨细胞病毒感染的临床调查

据世界胃肠组织2009年的报告称, 在亚洲(特别是在东亚), IBD的发病率和患病率呈持续增长的趋势. 由于不同研究者对患者进行研究时选择分组方法不同以及诊断方法不同, 现有报道IBD患者中HCMV的感染率也有所不同^[12,13].

(1)活动性IBD患者: Rahbar等^[14]用免疫组织化学染色(immunohistochemical staining, IHC)和原位杂交检测了13例UC患者和10例CD患者活检组织中HCMV发病率, 结果发现UC患者HCMV阳性率高于90%(12/13), CD患者的阳性率为100%(10/10). 而用IHC检测病毒的早期抗原得出相似的结果, 病毒活动性感染阳性率为UC85%(11/13), CD100%(10/10); (2)严重结肠炎患者: Criscuoli等^[15]进行的调查性研究发现, 在没有接受常规治疗的连续发作的严重结肠炎患者中直肠活检组织中HCMV感染率为21%. Criscuoli等^[16]检测85例症状减轻的严重结肠炎患者, 其中28例患者的活检组织病毒DNA阳性, 感染率为33%; (3)类固醇拮抗的结肠炎患者: Domènech等^[17]发现类固醇拮抗的UC患者中HCMV的感染率为32%. Kambham等^[18]检测15例类固醇拮抗患者的活检组织, 其中4例HCMV阳性, 阳性率为26%. Maher等^[19]检测发现, 在23例类固醇拮抗的活动性IBD患者中, 8例患者结肠活检组织中检测到HCMV的DNA, HCMV的感染率为34.8%; (4)结肠炎急性结肠切除术患者: Maconi等^[20]报道, 在结肠炎结肠切除术的临床标本中, 类固醇拮抗的UC患者HCMV感染率为27.3%, 其他UC患者中HCMV感染率为9.1%. Kambham等^[18]报道结肠炎急性结肠切除术且类固醇拮抗的患者中感染率为25%-27%. 其他的研究发现类固醇拮抗且采用结肠切除术的IBD

患者中HCMV的感染率为30%-60%^[21].

我国近年来IBD的报道逐年增加, 病例和人数也不断攀升, 但关于我国结肠炎患者的HCMV阳性率还没有确切报道.

2 结肠组织中人巨细胞病毒的诊断方法

目前, 临床上对结肠组织中检测HCMV感染的方法有内镜检查、病毒分离培养、组织病理检测(H&E染色, IHC)和组织PCR. 但主要使用的是组织病理和PCR检测.

2.1 内镜检查 在临床上, 疑似HCMV感染的结肠炎在内镜观察时会发现组织表面有不规则的红斑, 组织浅表糜烂并伴随分泌物, 黏膜层弥漫性水肿或多重的黏膜糜烂以及深度溃疡和假性肿瘤^[22]. Suzuki等^[23]研究发现用结肠镜能检测并发现疑似为HCMV感染UC患者的一些特异性肠黏膜表现, 如有黏液性分泌物, 黏膜易出血; 溃疡性表现如弥散性黏膜缺损、不规则和纵向溃疡以及溃疡表面鹅卵石样改变. 但是, 内镜检测难以区分严重的IBD患者是否合并HCMV感染, 所以只能做出初步疑似的HCMV感染诊断.

2.2 结肠组织标本的病毒分离培养 能确诊HCMV感染的传统金标准方法是病毒分离. 结肠组织标本进行处理后接种人胚成纤维细胞, 观察特征性细胞病变效应以及用间接免疫荧光检测, 从而确定病毒感染^[24,25]. Hashiro等^[26]从16例结肠腺癌患者的结肠标本中分离出了3株HCMV病毒, 说明结肠癌组织中存在活动性的HCMV感染. 而传统病毒分离的缺点是需要一个较长时间的孵育期(1-3 wk), 技术要求高, 不能定量检测病毒, 与新技术相比缺乏敏感性, 所以临床上很少使用. 近期使用了一种快速的HCMV培养技术, 通过将标本处理后离心, 上清接种人胚成纤维细胞, 短暂孵育后用免疫荧光等方法检测HCMV的早期抗原, 24-72 h能报告结果, 敏感性高达68%-100%^[27].

2.3 组织学病理检测 组织病理学诊断被认为是诊断终末器官病变的金标准. 主要检测方法有HE染色和IHC. 在HCMV感染的患者结肠组织, HE染色可以发现感染细胞变大, 出现嗜酸性核内包涵体和较小的细胞质包涵体. 但HE染色敏感性较差, 仅为10%-87%^[28]. 而IHC常采用相应单克隆抗体检测结肠组织感染细胞中病毒的早晚期抗原, 提高了组织病理学检测的特异性和敏感性. IHC检测HCMV感染的敏感性能达到93%^[8].

■研发前沿

研究表明HCMV与IBD有一定相关性, 但具体机制还不十分清楚, 可能与HCMV的感染再激活产生多种细胞因子有关, 有待于进一步研究.

■相关报道

研究显示, 炎症结肠组织中多种细胞因子有利于激活潜伏的HCMV, 而活动性的HCMV能增加多种细胞因子, 加重炎症反应, 进一步加重IBD患者病情.

■应用要点

本文总结了多种检测IBD患者中HCMV的方法,以及不同分组IBD患者的HCMV感染率,为我国IBD患者中HCMV感染情况的研究和HCMV感染的IBD的治疗和预防提供新思路。

2.4 结肠组织病毒DNA检测 检测结肠组织中病毒DNA的方法主要有原位杂交和PCR. 原位杂交除可以检测组织中病毒DNA外,还可对病毒感染的结肠组织细胞进行定位与分布检测. PCR可快速检测组织病毒DNA,敏感性高;常规PCR可进行定性检测,虽然能检测结肠组织中病毒DNA,但不能明确诊断为HCMV疾病. 因此,近年来敏感性更高的荧光定量PCR逐渐取代了常规的PCR,因为荧光定量PCR不仅可以准确定量病毒基因在结肠组织中的拷贝数,而且可以研究病毒在结肠组织中的复制动态. Yoshino等^[29]已采用荧光定量PCR对UC患者炎症黏膜组织中HCMV感染进行了早期检测,检出率比其他传统方法高,而且在诊断活动性HCMV感染方面也比传统检测方法更有优势. 荧光定量PCR可以设定病毒感染载量的“阈值”,比其他检测具有更高的特异性和准确性.

此外,还可以用多种方法检测体内的HCMV存在情况:(1)血清学方法检测患者HCMV IgM和IgG抗体;(2)免疫荧光法检测HCMV pp65,抗原血症也可以用来检测UC患者外周血白细胞中HCMV pp65抗原;(3)血浆及粪便PCR检测HCMV核酸等. 美国胃肠病学会2004年建议用乙状结肠镜和病毒培养来检测难治性UC患者HCMV感染^[30]. 最近欧洲克罗恩病和UC组织公布了关于IBD中HCMV诊断的国际标准,建议对免疫调节剂拮抗的IBD患者HCMV感染的诊断可采用组织标本PCR或IHC方法^[31]. 所以对于目前多种检测HCMV的方法,应结合患者的临床特征并联合多种检测方法才能增加HCMV感染的检出率,以便为进一步的确诊及治疗提供指导.

3 人巨细胞病毒感染在炎症性肠病发生发展中的致病作用

虽然已有很多证据表明HCMV与IBD有一定相关性,但目前HCMV在IBD中发生发展的作用还不明确,无法提高临床的诊疗水平. 因此,亟需对HCMV感染在IBD中的作用进行研究.

研究表明,COX-2与UC的发病密切相关. COX-2的表达与病情严重程度呈正相关, HCMV感染导致COX-2表达量增加,会生成多种前列腺素类物质,导致如炎症细胞浸润等严重的炎症反应,加重感染状态和疾病恶化程度^[32,33]. 检测发现,在结肠直肠息肉和腺癌标本中,至少80%的HCMV阳性标本中也能检测到COX-2. 最近

发现, HCMV感染平滑肌细胞能产生5-脂氧合酶(5-LO), 5-LO是花生四烯酸(AA)代谢途径的关键酶,可以催化AA生成白三烯B₄(leukotriene B₄, LTB₄),而LTB₄被认为是UC中起主要作用的炎性介质^[34,35],并能加重HCMV在感染组织中的炎症反应. 在HCMV感染的IBD患者中,平滑肌细胞5-LO阳性的结肠组织样本中存在大量的单个核细胞浸润^[36]. 这些都说明, HCMV感染细胞产生的多种炎性介质在人结肠直肠炎发生中有重要作用.

越来越多的研究表明,在炎症环境中多种细胞因子如TNF- α 和IFN- γ 能激活潜伏的HCMV从而恶化IBD^[37-41]. 目前研究发现, TNF- α 能激活潜伏在单核细胞和树突状细胞中的HCMV复制增殖^[42],且TNF- α 与HCMV复制增殖相关, TNF- α 可以结合潜伏感染细胞上的TNF- α 受体,产生信号激活NF- κ B,最终活化NF- κ B p65/p50二聚化并移位入核,结合HCMV的IE增强子(MIEP),激活潜伏的病毒复制增殖^[43]. 病毒感染再激活,可以进一步促进炎症反应,从而加重感染症状.

最新研究发现, HCMV潜伏感染的M1型单核细胞能产生多种细胞因子如IL-6、TNF- α 和IL-1 β ,这些细胞因子能活化巨噬细胞,促进HCMV再激活^[37]. 在活动性的IBD中,病变局部会大量产生促炎细胞因子,如TNF- α 和IFN- γ ,从而激活转录因子,诱导炎症趋化因子和黏附分子表达,有利于炎症部位募集更多的HCMV潜伏感染的单核细胞和树突状细胞来激活HCMV复制增殖^[44-49]. HCMV感染再激活能刺激巨噬细胞和T淋巴细胞产生TNF- γ 、IFN- α 等细胞因子,进一步加剧炎症反应,从而恶化肠炎^[21,44].

4 结论

随着我国IBD患者的不断增多,加强对IBD病因学的研究,能更好地对IBD的治疗和预防提供指导. 虽然有大量的研究报道HCMV和IBD有相关性,但是由于IBD的发病机制比较复杂,因而HCMV在IBD发病中的作用尚不明确. 因此,有必要加大对HCMV感染在IBD发病机制的研究,为临床更好地治疗和预防IBD提供新思路和新方法.

5 参考文献

- 1 Herfarth HH, Long MD, Rubinas TC, Sandridge M, Miller MB. Evaluation of a non-invasive method to detect cytomegalovirus (CMV)-DNA in stool samples of patients with inflammatory bowel disease (IBD): a pilot study. *Dig Dis Sci* 2010; 55: 1053-1058
- 2 Taylor GH. Cytomegalovirus. *Am Fam Physician*

- 2003; 67: 519-524
- 3 Abraham C, Cho JH. Inflammatory bowel disease. *N Engl J Med* 2009; 361: 2066-2078
- 4 Lakatos PL. Environmental factors affecting inflammatory bowel disease: have we made progress? *Dig Dis* 2009; 27: 215-225
- 5 Lidar M, Langevitz P, Shoenfeld Y. The role of infection in inflammatory bowel disease: initiation, exacerbation and protection. *Isr Med Assoc J* 2009; 11: 558-563
- 6 Rowshani AT, Bemelman FJ, van Leeuwen EM, van Lier RA, ten Berge IJ. Clinical and immunologic aspects of cytomegalovirus infection in solid organ transplant recipients. *Transplantation* 2005; 79: 381-386
- 7 Criscuoli V, Rizzuto MR, Cottone M. Cytomegalovirus and inflammatory bowel disease: is there a link? *World J Gastroenterol* 2006; 12: 4813-4818
- 8 Kandiel A, Lashner B. Cytomegalovirus colitis complicating inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol* 2006; 101: 2857-2865
- 9 Hamlin PJ, Shah MN, Scott N, Wyatt JL, Howdle PD. Systemic cytomegalovirus infection complicating ulcerative colitis: a case report and review of the literature. *Postgrad Med J* 2004; 80: 233-235
- 10 Shimada Y, Iiai T, Okamoto H, Suda T, Hatakeyama K, Honma T, Ajioka Y. Toxic megacolon associated with cytomegalovirus infection in ulcerative colitis. *J Gastroenterol* 2003; 38: 1107-1108
- 11 Papadakis KA, Tung JK, Binder SW, Kam LY, Abreu MT, Targan SR, Vasilias EA. Outcome of cytomegalovirus infections in patients with inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol* 2001; 96: 2137-2142
- 12 Wada Y, Matsui T, Mataka H, Sakurai T, Yamamoto J, Kikuchi Y, Yorioka M, Tsuda S, Yao T, Yao S, Haraoka S, Iwashita A. Intractable ulcerative colitis caused by cytomegalovirus infection: a prospective study on prevalence, diagnosis, and treatment. *Dis Colon Rectum* 2003; 46: S59-S65
- 13 Kishore J, Ghoshal U, Ghoshal UC, Krishnani N, Kumar S, Singh M, Ayyagari A. Infection with cytomegalovirus in patients with inflammatory bowel disease: prevalence, clinical significance and outcome. *J Med Microbiol* 2004; 53: 1155-1160
- 14 Rahbar A, Boström L, Lagerstedt U, Magnusson I, Söderberg-Naucler C, Sundqvist VA. Evidence of active cytomegalovirus infection and increased production of IL-6 in tissue specimens obtained from patients with inflammatory bowel diseases. *Inflamm Bowel Dis* 2003; 9: 154-161
- 15 Criscuoli V, Casà A, Orlando A, Pecoraro G, Oliva L, Traina M, Rizzo A, Cottone M. Severe acute colitis associated with CMV: a prevalence study. *Dig Liver Dis* 2004; 36: 818-820
- 16 Criscuoli V, Rizzuto MR, Montalbano L, Gallo E, Cottone M. Natural history of cytomegalovirus infection in a series of patients diagnosed with moderate-severe ulcerative colitis. *World J Gastroenterol* 2011; 17: 633-638
- 17 Domènech E, Vega R, Ojanguren I, Hernández A, Garcia-Planella E, Bernal I, Rosinach M, Boix J, Cabré E, Gassull MA. Cytomegalovirus infection in ulcerative colitis: a prospective, comparative study on prevalence and diagnostic strategy. *Inflamm Bowel Dis* 2008; 14: 1373-1379
- 18 Kambham N, Vij R, Cartwright CA, Longacre T. Cytomegalovirus infection in steroid-refractory ulcerative colitis: a case-control study. *Am J Surg Pathol* 2004; 28: 365-373
- 19 Maher MM, Nassar MI. Acute cytomegalovirus infection is a risk factor in refractory and complicated inflammatory bowel disease. *Dig Dis Sci* 2009; 54: 2456-2462
- 20 Maconi G, Colombo E, Zerbi P, Sampietro GM, Fociani P, Bosani M, Cassinotti A, Casini V, Russo A, Ardizzone S, Porta M, Bianchi Porro G. Prevalence, detection rate and outcome of cytomegalovirus infection in ulcerative colitis patients requiring colonic resection. *Dig Liver Dis* 2005; 37: 418-423
- 21 Moss AC. CMV in moderately active colitis: much ado about nothing? *Dig Dis Sci* 2010; 55: 880-882
- 22 Nishimoto Y, Matsumoto T, Suekane H, Shimizu M, Mikami Y, Iida M. Cytomegalovirus infection in a patient with ulcerative colitis: colonoscopic findings. *Gastrointest Endosc* 2001; 53: 816-818
- 23 Suzuki H, Kato J, Kuriyama M, Hiraoka S, Kuwaki K, Yamamoto K. Specific endoscopic features of ulcerative colitis complicated by cytomegalovirus infection. *World J Gastroenterol* 2010; 16: 1245-1251
- 24 Pereyra F, Rubin RH. Prevention and treatment of cytomegalovirus infection in solid organ transplant recipients. *Curr Opin Infect Dis* 2004; 17: 357-361
- 25 de la Hoz RE, Stephens G, Sherlock C. Diagnosis and treatment approaches of CMV infections in adult patients. *J Clin Virol* 2002; 25 Suppl 2: S1-12
- 26 Hashiro GM, Horikami S, Loh PC. Cytomegalovirus isolations from cell cultures of human adenocarcinomas of the colon. *Intervirology* 1979; 12: 84-88
- 27 Lawlor G, Moss AC. Cytomegalovirus in inflammatory bowel disease: pathogen or innocent bystander? *Inflamm Bowel Dis* 2010; 16: 1620-1627
- 28 Beaugerie L, Cywiner-Golenz C, Monfort L, Girard PM, Carbonnel F, Ngô Y, Cosnes J, Rozenbaum W, Nicolas JC, Châtelet FP, Gendre JP. Definition and diagnosis of cytomegalovirus colitis in patients infected by human immunodeficiency virus. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 1997; 14: 423-429
- 29 Yoshino T, Nakase H, Ueno S, Uza N, Inoue S, Mikami S, Matsuura M, Ohmori K, Sakurai T, Nagayama S, Hasegawa S, Sakai Y, Chiba T. Usefulness of quantitative real-time PCR assay for early detection of cytomegalovirus infection in patients with ulcerative colitis refractory to immunosuppressive therapies. *Inflamm Bowel Dis* 2007; 13: 1516-1521
- 30 Kornbluth A, Sachar DB. Ulcerative colitis practice guidelines in adults (update): American College of Gastroenterology, Practice Parameters Committee. *Am J Gastroenterol* 2004; 99: 1371-1385
- 31 European evidence-based Consensus on the prevention, diagnosis and management of opportunistic infections in inflammatory bowel disease. *J Crohns Colitis* 2009; 3: 47-91
- 32 Paiotti AP, Artigiani Neto R, Forones NM, Oshima CT, Miszputen SJ, Franco M. Immunoeexpression of cyclooxygenase-1 and -2 in ulcerative colitis. *Braz J Med Biol Res* 2007; 40: 911-918
- 33 Mariani F, Sena P, Marzona L, Riccio M, Fano R, Manni P, Gregorio CD, Pezzi A, Leon MP, Monni S, Pol AD, Roncucci L. Cyclooxygenase-2 and Hypoxia-Inducible Factor-1alpha protein expression is related to inflammation, and up-regulated since the early steps of colorectal carcinogenesis. *Cancer Lett* 2009; 279: 221-229
- 34 Dzabic M, Rahbar A. [Active HCMV infection be-

■名词解释

潜伏感染：病毒的一种持续性感染状态，原发感染后，病毒基因整合到一定的组织或细胞中，在某些条件下病毒被激活增殖，呈活动性感染状态而出现临床症状。

■同行评价

本文综述了HCMV在IBD患者中的感染情况以及检测方法,初步探讨了可能的作用机制,对临床HCMV感染IBD的预防和治疗提供了指导意义。

- hind acute inflammatory bowel disease. Causal role or epiphenomenon still to be proved]. *Lakartidningen* 2008; 105: 1378-1381
- 35 Qiu H, Strååt K, Rahbar A, Wan M, Söderberg-Nauclér C, Haeggström JZ. Human CMV infection induces 5-lipoxygenase expression and leukotriene B4 production in vascular smooth muscle cells. *J Exp Med* 2008; 205: 19-24
- 36 Söderberg-Nauclér C. HCMV microinfections in inflammatory diseases and cancer. *J Clin Virol* 2008; 41: 218-223
- 37 Nakase H, Yoshino T, Honzawa Y, Chiba T. Low prevalence of CMV infection in patients with Crohn's disease in comparison with ulcerative colitis: effect of different immune response on prevalence of CMV infection. *Dig Dis Sci* 2010; 55: 1498-1499
- 38 Dzabic M, Boström L, Rahbar A. High prevalence of an active cytomegalovirus infection in the appendix of immunocompetent patients with acute appendicitis. *Inflamm Bowel Dis* 2008; 14: 236-241
- 39 Söderberg-Nauclér C. Does cytomegalovirus play a causative role in the development of various inflammatory diseases and cancer? *J Intern Med* 2006; 259: 219-246
- 40 Soderberg-Naucler C. Human cytomegalovirus persists in its host and attacks and avoids elimination by the immune system. *Crit Rev Immunol* 2006; 26: 231-264
- 41 Hollink N, Dzabic M, Wolmer N, Boström L, Rahbar A. High prevalence of an active human cytomegalovirus infection in patients with colonic diverticulitis. *J Clin Virol* 2007; 40: 116-119
- 42 Nakase H, Matsumura K, Yoshino T, Chiba T. Systematic review: cytomegalovirus infection in inflammatory bowel disease. *J Gastroenterol* 2008; 43: 735-740
- 43 Varani S, Landini MP. Cytomegalovirus-induced immunopathology and its clinical consequences. *Herpesviridae* 2011; 2: 6
- 44 Hommes DW, Sterringa G, van Deventer SJ, Tytgat GN, Weel J. The pathogenicity of cytomegalovirus in inflammatory bowel disease: a systematic review and evidence-based recommendations for future research. *Inflamm Bowel Dis* 2004; 10: 245-250
- 45 Söderberg-Nauclér C, Fish KN, Nelson JA. Reactivation of latent human cytomegalovirus by allogeneic stimulation of blood cells from healthy donors. *Cell* 1997; 91: 119-126
- 46 Hahn G, Jores R, Mocarski ES. Cytomegalovirus remains latent in a common precursor of dendritic and myeloid cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95: 3937-3942
- 47 Koffron A, Varghese T, Hummel M, Yan S, Kaufman D, Fryer J, Leventhal J, Stuart F, Abecassis M. Immunosuppression is not required for reactivation of latent murine cytomegalovirus. *Transplant Proc* 1999; 31: 1395-1396
- 48 Kondo K, Kaneshima H, Mocarski ES. Human cytomegalovirus latent infection of granulocyte-macrophage progenitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; 91: 11879-11883
- 49 Söderberg-Nauclér C, Nelson JY. Human cytomegalovirus latency and reactivation - a delicate balance between the virus and its host's immune system. *Intervirology* 1999; 42: 314-321

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》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)

高温对SGC7901/ADM细胞多药耐药蛋白表达的影响和意义

彭楠, 焦伟国, 黎春华, 陈蔚, 王秋华, 李晓瑛

彭楠, 焦伟国, 黎春华, 陈蔚, 王秋华, 李晓瑛, 中国人民解放军总医院南楼康复医学科 北京市 100853

彭楠, 博士, 副教授, 副主任医师, 主要从事肿瘤热化疗的基础研究和临床应用研究。

作者贡献分布: 此课题由彭楠设计; 研究过程由彭楠、焦伟国及黎春华操作完成; 研究所用试剂、分析工具由陈蔚、王秋华及李晓瑛完成; 数据分析、论文写作由彭楠完成。

通讯作者: 彭楠, 副教授, 副主任医师, 100853, 北京市复兴路28号, 中国人民解放军总医院南楼康复科, pengnan301@163.com
电话: 010-66876336

收稿日期: 2012-05-11 修回日期: 2012-07-04

接受日期: 2012-07-20 在线出版日期: 2012-08-08

Effect of hyperthermia on the expression of multidrug resistance markers in adriamycin-resistant human gastric cancer cell line SGC-7901/ADM

Nan Peng, Wei-Guo Jiao, Chun-Hua Li, Wei Chen, Qiu-Hua Wang, Xiao-Ying Li

Nan Peng, Wei-Guo Jiao, Chun-Hua Li, Wei Chen, Qiu-Hua Wang, Xiao-Ying Li, Department of Rehabilitation (South Building), Chinese PLA General Hospital, Beijing 100853, China

Correspondence to: Nan Peng, Associate Professor, Associate Chief Physician, Department of Rehabilitation (South Building), Chinese PLA General Hospital, 28 Fuxing Road, Beijing 100853, China. pengnan301@163.com

Received: 2012-05-11 Revised: 2012-07-04

Accepted: 2012-07-20 Published online: 2012-08-08

Abstract

AIM: To observe the effect of hyperthermia at 43 °C on the expression of multidrug resistance-related markers, MDR1, MRP, and LRP in adriamycin (ADM)-resistant human gastric cancer cell line SGC-7901/ADM, and to determine the possible mechanisms underlying the reversal effect of hyperthermia on multidrug resistance.

METHODS: The expression of multidrug resistance molecules MDR1, P-gp, MRP, and LRP in SGC7901/ADM cells treated by hyperthermia at 43°C was assayed by immunocytochemistry, Western blot, and RT-PCR.

RESULTS: The expression of P-gp and MRP was reduced by 31.78% ($P = 0.016$) and 20.22% ($P = 0.037$), respectively, in SGC7901/ADM cells exposed to high temperature at 43 °C for 60 min, but LRP expression cannot be measured by immunocytochemistry. P-gp expression could not be detected in ADM-sensitive human gastric cancer cell line SGC7901 by Western blot; however, high expression of P-gp was detected in SGC7901/ADM cells. The expression of P-gp could be decreased by high temperature at 43 °C in all drug groups, and the expression of P-gp was reduced by 5.65% ($P = 0.007$), 17.95% ($P = 0.021$), 11.90% ($P = 0.065$) in ADM, CDDP and TAX groups, respectively.

CONCLUSION: High temperature at 43 °C could partially inhibit the expression of multidrug resistance-related molecules P-gp and MRP in ADM-resistant human gastric cancer cell line SGC7901/ADM.

Key Words: Multidrug resistance; Gastric cancer; Hyperthermia; P-glycoprotein

Peng N, Jiao WG, Li CH, Chen W, Wang QH, Li XY. Effect of hyperthermia on the expression of multidrug resistance markers in adriamycin-resistant human gastric cancer cell line SGC-7901/ADM. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2012; 20(22): 2075-2080

摘要

目的: 研究高温43 °C对多药耐药基因表达产物P-gp、MRP、LRP在蛋白水平上的影响及其生物学意义, 更深入地了解热效应逆转耐药的机制。

方法: 采用免疫细胞化学染色法、RT-PCR以及Western blot方法, 检测在不同温度 and 不同药物作用下, 人胃癌耐药细胞株SGC7901/ADM和对照的人胃癌敏感细胞SGC7901株中, 与人胃癌多药耐药相关的分子MDR1、P-gp、MRP、LRP在蛋白水平上的表达差异。

结果: 采用免疫细胞化学染色法检测人胃癌

■背景资料

临床发现热疗与放化疗有协同抗肿瘤作用, 尤其对一些中晚期放化疗耐受的患者也有效。近年研究热疗对化疗的增敏作用成为热点。

■同行评议者

朴云峰, 教授, 吉林大学第一临床医院消化科

■ 研究前沿

目前研究已证明有效的多药耐药逆转剂,多数因毒不良反应大而限制了其在临床中的应用。

耐药株SGC7901/ADM细胞,发现高温43℃ 60 min处理可使P-gp蛋白表达下调率(down-regulated rate, DRR)31.78% ($P = 0.016$),而MRP表达DRR为20.22% ($P = 0.037$),差异有统计学意义,LRP未表达。采用Western blot法在SGC7901细胞中未检测出P-gp蛋白表达,而SGC7901/ADM细胞中P-gp高表达;在ADM和CDDP处理组细胞中,高温43℃时P-gp的表达量较37℃时DRR分别为45.65% ($P = 0.007$)、17.95% ($P = 0.021$),差异有显著学意义;TAX处理组DRR为11.90%,差异无显著学意义 ($P = 0.065$)。

结论: 高温43℃的短期处理对人胃癌SGC7901/ADM细胞中P-gp和MRP多药耐药蛋白的表达有一定的抑制作用,可能是逆转耐药的机制之一。

关键词: 多药耐药; 胃癌; 高温; P-glycoprotein

彭楠, 焦伟国, 黎春华, 陈蔚, 王秋华, 李晓琰. 高温对SGC7901/ADM细胞多药耐药蛋白表达的影响和意义. 世界华人消化杂志 2012; 20(22): 2075-2080
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/2075.asp>

0 引言

肿瘤热疗是继手术、化疗、放疗、免疫治疗后的又一种肿瘤治疗手段,基础研究和临床治疗中发现,热疗与放疗或/和化疗有协同抗肿瘤的作用^[1,2],即使对一些晚期肿瘤,放化疗无效时,联合热疗辅助治疗,也能取得较好的疗效^[3,4]。因此,我们设想高温可能具有逆转肿瘤多药耐药性的机制。在我们前期的体外实验研究已经发现,高温43℃可降低人胃癌耐药细胞株SGC7901/ADM的生存率,不同程度逆转SGC7901/ADM耐药细胞对5-FU、ADM、CDDP、TAX的耐药性^[5]。为此我们进一步探究高温43℃对多药耐药基因表达产物P-gp、MRP、LRP在蛋白水平上的影响及其生物学意义,从而对高温可以部分逆转胃癌SGC-7901/ADM细胞耐药机制有更深入的了解。本实验采用的手段为免疫细胞化学染色法、RT-PCR以及Western blot方法,检测在不同温度和不同药物作用下,人胃癌耐药细胞株SGC7901/ADM和对照的人胃癌敏感细胞SGC7901株中,可能与多药耐药相关的分子MDR1、P-gp、MRP、LRP在蛋白水平上的表达。

1 材料和方法

1.1 材料 RPMI 1640(GIBCO公司产品); 新生牛

血清(杭州四季青公司); 胰蛋白酶(美国Sigma公司); HEPES(美国Sigma公司); 紫杉醇(TAX)购自美国百时美施贵宝公司; 5-氟尿嘧啶(5-FU)购自上海旭东海普药业; 顺铂(CDDP)购自齐鲁制药公司; 阿霉素(ADM)购自齐鲁制药公司。以上药物配成 $\times 100$ 保存液, -20℃分装保存。P-gp抗体、MRP抗体、LRP抗体购自美国signet公司; 各型二抗均购自北京中山公司,使用稀释度1:5 000(细胞组织化学法用)或1:10 000(Western blot法用)。RNA提取试剂盒购自鼎国生物有限公司; 组织化学试剂盒购自中山公司,该试剂盒提供封闭血清、二抗、显色底物溶液(AEC显色)及封片剂。以下试剂自备: 固定剂(10%中性福尔马林用10 mmol/L PBS配置)、过氧化物酶灭活液(30%过氧化氢: 甲醇 = 1:9)、PBST(10 mmol/L PBS pH 7.4+0.05% Tween-20)、坚固红复染液、BCIP/NBT显色液、免疫组织化学用PAP笔、封片剂及各型一抗。BCA蛋白质定量试剂盒,包含BSA标准品、 Cu^{2+} 盐溶液及BCA溶液; 4 \times 蛋白质电泳上样缓冲液(100 mmol/L Tris-HCl pH 6.8), 200 mmol/L二硫苏糖醇, 4%SDS, 0.2%溴酚蓝, 20%的甘油。低分子量蛋白质标准Pharmacia biotec公司产品。

SW-CJ-IF超净工作台(苏州净化设备厂); IMT2-21型倒置显微镜、BH-2型双目显微镜(日本OLYMPUS); BNA-311型培养箱(日本Tabai Espec产品); 电热恒温水箱(上海医疗仪器厂); 台式离心机(德国Beckman公司); 流式细胞仪(美国BD公司); HPLAS-100彩色图像分析系统(美国惠普公司); BIO-RAD转移槽、BIO-RAD PCR仪和BIO-RAD电泳槽均为美国伯乐公司; Sanyo Ultra low低温冰箱(日本三洋公司); Thermo液氮罐(美国Thermo公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞株和实验分组: 人胃癌细胞株SGC7901/S(亲代)及耐阿霉素细胞株SGC7901/ADM均由中国人民解放军第四军医大学消化病研究所樊代明院士惠赠。细胞长期培养于RPMI 1640加新生牛血清的培养液中。对照组: 37℃组、阿霉素(ADR)组、顺铂组(CDDP)、5-氟尿嘧啶(5-FU)组、紫杉醇(Tax)组。实验组: 43℃ 60 min+ADR组、CDDP组、5-FU组、Tax组。抗肿瘤药物在人体的血浆高峰浓度: ADR 0.4 mg/L, Tax 6 mg/L, CDDP 3.0 mg/L, 5-FU 10 mg/L。

1.2.2 RT-PCR检测: 按照RNA提取试剂盒提取总RNA, 经琼脂糖凝胶电泳鉴定其完整性, 通过

紫外分光光度计测定260 nm与280 nm处吸光度(A)值, 计算纯度和浓度. 使用PCR仪器扩增, 引物序列为 β -actin: 622 bp, 上游引物: 5'-caccatg-gatgatgatcgccgc-3', 下游引物: 5'-gctcggccgtggtg-gtgaag-3'; MDR: 520 bp, 上游引物: 5'-cgctattcaa attgcttga caag-3', 下游引物: 5'-cacgtgtaaa tcctcg-tata aac-3'; MRP: 276 bp, 上游引物: 5'-gggaattctg-gactggaatgtcacg-3', 下游引物: 5'-cgggatccaggaatat-gccccgacttc-3'; LRP: 342 bp, 上游引物: 5'-gag-cagttcacagtgtgtcc-3', 下游引物: 5'-aaagccaaaga-cagcagtgcg-3'. 取RT-PCR产物5 μ L, 在1.5%琼脂糖凝胶上电泳, 溴化已锭显色, 分别取目的基因与内参基因 β -actin RT-PCR产物电泳条带灰度比值, 作为目的基因mRNA相对含量.

1.2.3 免疫细胞化学染色: 每张片加50 μ L正常动物非免疫血清, 室温下孵育10 min; PBS(pH 7.4)冲洗5 min, 加50 μ L一抗孵育60 min; PBS冲洗3次, 每次5 min, 加1滴或50 μ L生物素标记的二抗, 室温下孵育10 min; PBS同法冲洗, 加1滴或50 μ L链霉菌抗生物素蛋白-AP, 室温下孵育10 min; PBS同法冲洗, 加50 μ L BCIP/NBT显色液(试剂4), 观察5-15 min, 阳性显色为蓝黑色; BCIP/NBT染色后, 自来水冲洗, 坚固红复染液复染; 复染后, 蒸馏水冲洗, 脱水, 中性树胶封片. 结果采用HPLAS-100彩色图像分析系统进行分析, 表达强度用平均光度. 下调率(down-regulated rate, DRR)的计算依据公式: $DRR(\%) = (\text{光强度}_{43^\circ\text{C}} - \text{光强度}_{37^\circ\text{C}}) / \text{光强度}_{37^\circ\text{C}} \times 100\%$.

1.2.4 Western blot法: 实验选择温度为37 $^\circ\text{C}$ 、43 $^\circ\text{C}$ 60 min; 选择药物为阿霉素组、顺铂组、紫杉醇组. 取对数生长期细胞, 细胞数以 5×10^6 为宜, 加入样品裂解液, 混匀, -80 $^\circ\text{C}$ 冰箱放置30 min. 12 000 r/min, 4 $^\circ\text{C}$ 离心30 min, 取上清液即为细胞总蛋白. 以每样品25 μ g蛋白在6%聚丙烯酰胺凝胶电泳90 min, 取下凝胶, 电转膜至PVDF膜BIO-RAD转移槽, 转移膜放置于5%脱脂奶粉, 室温封闭PVDF膜1 h; 加入20 μ L一抗(1:100)孵育过夜; 洗膜, 加入二抗<HRP山羊抗兔>(1:5 000)室温2 h; 充分洗膜3次, ECL显示试剂盒显色, 对显色条带进行A值分析, 以目的基因与内参基因 β -actin的A比值作为蛋白的相对表达量. 实验重复3次.

统计学处理 应用SPSS13.0软件进行统计学处理, 计量资料两组比较采用 t 检验.

2 结果

2.1 免疫细胞化学染色法检测不同温度组P-gp、

表1 不同温度组SGC7901/ADM细胞P-gp、MRP蛋白的表达

温度	P-gp	MRP
43 $^\circ\text{C}$ 组	13.46 \pm 1.15 ^b	9.31 \pm 0.63 ^a
37 $^\circ\text{C}$ 组	19.73 \pm 1.27	11.67 \pm 0.82
DRR	31.78%	20.22%
P值	0.016	0.037

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs 37 $^\circ\text{C}$ 组.

MRP、LRP蛋白表达水平 本实验采用BCIP/NBT染色法, 蛋白阳性颜色呈蓝紫色, 复染采用坚固红颜色呈红色. 免疫细胞化学染色法检测P-gp、MRP、LRP蛋白表达(图1). 不同温度条件下, 采用抗P-gp、MRP、LRP抗体处理, 在胃癌敏感细胞株SGC-7901中, 显微镜下仅观察到非常少量的蓝紫色细胞, 而在胃癌耐药细胞株SGC-7901/ADM中, 采用抗P-gp抗体作用后, 镜下计数所有的细胞膜处都不同程度呈蓝紫色, 而且高温43 $^\circ\text{C}$ 对于P-gp阳性细胞率基本无影响. 但采用图像分析系统测定发光强度后发现, 高温43 $^\circ\text{C}$ 60 min处理可使P-gp蛋白表达下调31.78%, 较37 $^\circ\text{C}$ 组相比, P-gp表达水平的下调差异有统计学意义($P = 0.016$); 采用抗MRP抗体作用后, 镜下计数发现63%的细胞都呈蓝紫色, 高温43 $^\circ\text{C}$ 对于MRP阳性细胞率无明显影响, 但图像分析系统检测P-gp蛋白表达水平较37 $^\circ\text{C}$ 时下调20.22%, 差异有显著性意义($P = 0.037$). 采用抗LRP抗体检测仅观察到极少量的蓝紫色阳性细胞, 图像分析系统检测LRP蛋白表达微弱(表1).

2.2 不同温度下SGC7901/ADM细胞MDR1和MRP mRNA表达 43 $^\circ\text{C}$ 处理后, MDR1 mRNA表达水平下降, DRR为12.19%, 与37 $^\circ\text{C}$ 组相比差异有显著性意义($P = 0.031$); 而经43 $^\circ\text{C}$ 处理后MRP mRNA表达水平亦下降, 但DRR仅为7.89%, 与37 $^\circ\text{C}$ 组相比差异有统计学意义($P = 0.045$, 表2).

2.3 Western blot检测P-gp蛋白的表达水平 P-gp是分子量为170 kDa的一个糖蛋白, 细胞经过不同药物和温度处理后裂解并进行SDS-PAGE电泳后, 利用抗P-gp的抗体检测P-gp蛋白的表达水平, 选用 β -actin作为等量上样的对照(图2). 结果显示, 在37 $^\circ\text{C}$ 没有任何化疗药物处理组, SGC7901细胞中检测不到P-gp蛋白的表达, 而SGC7901/ADM细胞中P-gp蛋白可以高水平的表达. 其中ADM药物添加组, 在43 $^\circ\text{C}$ 条件下, P-gp蛋白的表达水平较37 $^\circ\text{C}$ P-gp蛋白的表达水平

■相关报道

研究表明, 高温43 $^\circ\text{C}$ 可降低人胃癌耐药细胞株SGC7901/ADM的生存率, 不同程度逆转SGC7901/ADM耐药细胞对5-FU、ADM、CDDP、TAX的耐药性.

■创新盘点

本文通过研究高温对多药耐药蛋白表达的影响,进而为热效应逆转肿瘤耐药机制提供新思路。

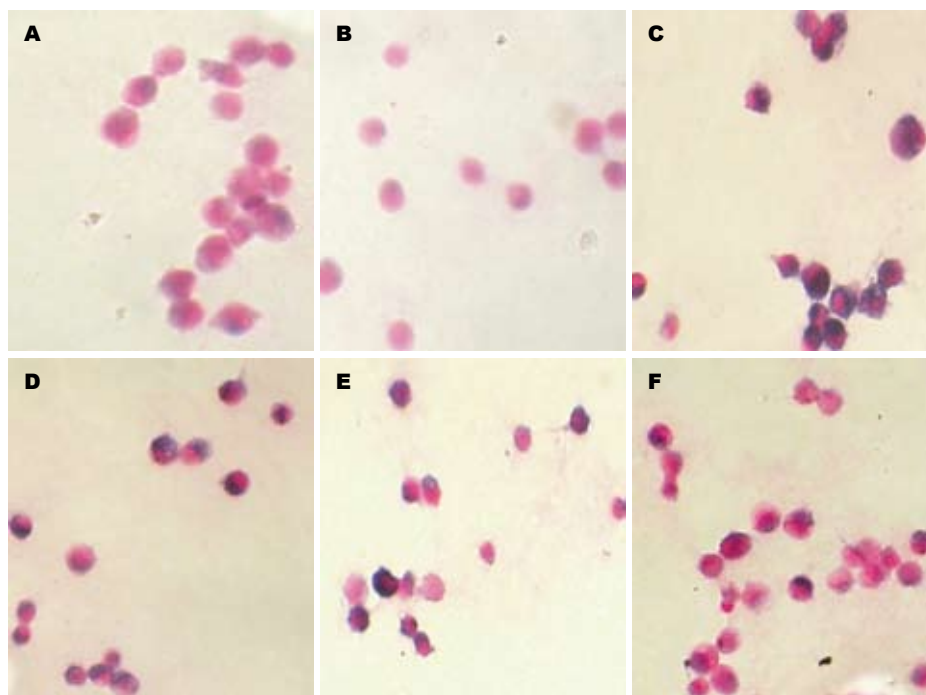


图1 免疫细胞化学染色法检测不同温度组P-gp、MRP、LRP蛋白的表达. A: SGC7901细胞株37 °C抗P-gp抗体; B: SGC7901/ADM细胞株37 °C抗LRP抗体; C: SGC7901/ADM细胞株37 °C抗P-gp抗体; D: SGC7901/ADM细胞株43 °C抗P-gp抗体; E: SGC7901细胞株/ADM 37 °C抗MRP抗体; F: SGC7901细胞株/ADM 43 °C抗MRP抗体。

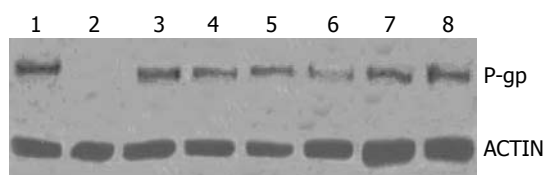


图2 Western blot法检测P-gp蛋白的表达水平. 1: SGC-7901/ADM; 2: SGC-7901; 3: SGC-7901/ADM 37 °C阿霉素; 4: SGC-7901/ADM 37 °C顺铂; 5: SGC-7901/ADM 37 °C紫杉醇; 6: SGC-7901/ADM 43 °C阿霉素; 7: SGC-7901/ADM 43 °C顺铂; 8: SGC-7901/ADM 43 °C紫杉醇。

下调45.65%, 差异有统计学意义($P = 0.007$); 而经43 °C作用后, CDDP组和TAX组P-gp蛋白的表达水平较37 °C时分别下调17.95%($P = 0.021$)、11.90%($P = 0.065$, 表3)。

3 讨论

肿瘤多药耐药的产生不是单一因素, 而是多种机制共同作用的结果。出现耐药与多种耐药基因的过度表达, 使其编码的相关蛋白表达上调, 比较肯定的有P-gp、MRP、LRP蛋白等^[6,7]。对多药耐药机制的研究, 检测耐药基因和蛋白的表达, 选择性药物或降低耐药基因的表达, 均有助于增加化疗药物的敏感性, 对提高临床治疗效果具有重要的意义^[8-11]。

P-gp被认为是肿瘤产生多药耐药的经典途径, P-gp本身可形成单一药物通道, 并具有药泵

表2 高温43 °C对SGC7901/ADM细胞MDR1、MRP mRNA表达的影响

温度	MDR1 mRNA	MRP mRNA
37°C组	0.82 ± 0.030	0.38 ± 0.040
43°C组	0.72 ± 0.013 ^a	0.35 ± 0.021 ^a
DRR	12.19%	7.89%
P值	0.031	0.045

^a $P < 0.05$ vs 37 °C组。

功能, 能结合进入细胞内的药物分子, 通过能量依赖的方式将药物转移到细胞外, 也能直接从细胞膜排除药物, 由此P-gp和MDR是导致肿瘤细胞对天然来源的抗癌药物如长春碱类、鬼臼类、紫杉醇类和蒽环类药物的主要机制^[12]。临床上也发现MDR-1基因高表达与多烯紫三醇疗效差相关^[13,14]。本实验用免疫细胞化学染色法检测P-gp、MRP、LRP在人胃癌敏感株SGC7901和人胃癌耐药株SGC7901/ADM细胞中的表达, 结果发现在人胃癌敏感株SGC7901中未检出P-gp、MRP、LRP, 在人胃癌耐药株SGC7901/ADM细胞中P-gp高表达阳性率为100%, 显微镜下可见蓝紫色环绕在胃癌耐药株SGC7901/ADM细胞周围, 也证明P-gp为一种跨膜蛋白。高温43 °C 60 min处理可使P-gp

表 3 高温43 °C对不同药物组P-gp表达的影响

温度	空白	ADM组	CDDP组	TAX组
37 °C组	0	0.46 ± 0.014	0.39 ± 0.023	0.42 ± 0.009
43 °C组	0.69 ± 0.034	0.25 ± 0.031 ^b	0.32 ± 0.015 ^a	0.37 ± 0.021
DRR	—	45.65%	17.95%	11.90%
P值		0.007	0.021	0.065

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs 37 °C组.

蛋白表达DRR 31.78% ($P < 0.01$), MRP表达DRR为20.22% ($P < 0.05$). 而用RT-PCR法检测发现43 °C使MDR和MRP mRNA表达的DRR分别为12.19%、7.89%. 由此可见, 43 °C热效应对蛋白表达降低明显, 目前还不清楚原因. 采用Western blot法在SGC7901细胞中未检测出P-gp蛋白表达, 而SGC7901/ADM细胞中P-gp高表达; 在ADM、CDDP处理组细胞中, 43 °C时P-gp的表达量较37 °C时DRR分别为45.65% ($P < 0.01$)、17.95% ($P < 0.05$), 差异有显著性意义; 而TAX处理组DRR为11.90%, 差异无显著性意义 ($P > 0.05$).

多药耐药相关蛋白(multidrug resistance associated protein, MRP)的表达增加也是多药耐药重要机制之一. MRPs主要在上皮细胞的基侧膜上表达, 是ATP能量依赖性跨膜蛋白, 具有选择性和特异性的药物外排泵. 在多种正常组织中表现为低水平表达, 但在一些肿瘤组织呈高水平表达. MRPs在肿瘤组织中的高度表达与肿瘤恶化、化疗疗效及患者的整体生存率密切相关, 如发现在胃癌中69%^[15-17].

LRP为人的穹隆体主蛋白(major vault protein, MVP), 通过调节囊泡和核质的药物转运. LRP主要是使以细胞核为靶点的药物不能通过核膜孔进入细胞核, 同时也可以使细胞质中的药物进入囊泡, 最终通过胞吐机制排到细胞外. 肿瘤细胞中LRP表达增高的意义在于他能够导致一些对CDDP、CBP、烷化剂等P-gp和MRP不能介导的药物产生耐受, 使肿瘤细胞的耐药谱更为广泛.

本实验结果显示胃癌耐药细胞株SGC7901/ADM中MRP高表达, 高温43 °C可下调MRP表达20.22% ($P < 0.05$). 在人胃癌耐药株SGC7901/ADM细胞中LRP未表达, 这与RT-PCR法检测LRP mRNA的结果一致. 但研究认为在胃癌的多药耐药中, MRP较MDR1占有更为重要的作用^[18]. 有学者对47份胃癌标本进行分析, 发现MDR1基因的定量表达与组织学类型、浸润深

度、淋巴结转移与否均无明显相关性. MRP基因在早期胃癌中显著高于进展期胃癌 ($P < 0.05$), 高、中分化腺癌显著高于低、未分化腺癌 ($P < 0.05$); 而LRP基因在无淋巴结转移组胃癌组中显著高于淋巴结转移组 ($P < 0.05$). 此结果显示MRP基因表达量与胃癌的发生发展以及预后状况具有相关性, 而MDR1则无差异, LRP在淋巴结转移胃癌组中表达明显上调^[19].

依据耐药基因的检测结果针对不同患者实施科学的、药物适配的个体化化疗方案对胃癌治疗具有重要的指导意义. 此外, 研究多药耐药逆转剂也是当前的研究热点, 已经发现多种逆转剂和新的逆转通道, 如非甾体类抗炎药物、环孢素类、维拉帕米、中药等^[20-22], 都有一定的不良反应, 限制了其临床应用. 而高温43 °C短时间处理可降低P-gp和MRP的表达, 不良反应少, 可作为逆转多药耐药的手段, 这可能也是热化疗协同抗癌作用的机制之一.

总之, 高温43 °C的短期处理对人胃癌SGC-7901/ADM细胞中P-gp和MRP多药耐药蛋白的表达有一定的抑制作用, 可能是逆转耐药的机制之一. 高温可能在临床上作为逆转多药耐药的手段.

志谢 感谢中国人民解放军军事医学科学院钟晖研究员和中国人民解放军总医院康复医学中心索伟副主任!

4 参考文献

- 1 林世寅, 李瑞英, 毛慧生, 万柏坤. 现代肿瘤热疗学-原理、方法与临床. 第1版. 北京: 学苑出版社, 1997: 4, 32
- 2 吴学勇, 李进. 热疗联合放疗和化疗治疗恶性肿瘤研究进展. 中国肿瘤临床与康复 2011; 18: 362-364
- 3 彭楠, 赵彼得, 郭新娜, 高继婷. 射频透热治疗恶性肿瘤56例疗效分析. 中华放射肿瘤学杂志 1999; 13: 38-39
- 4 袁友好, 马胜林, 方美玉. 热疗联合化疗治疗晚期恶性肿瘤158例. 中国肿瘤 2004; 13: 534-536
- 5 彭楠, 李桂荣, 黎春华, 刘庆森. 高温逆转人胃癌细胞SGC7901多药耐药性的初步研究. 现代生物医学进展 2009; 9: 2073-2075
- 6 张秀亚, 王珊, 李圆, 孔祥如, 王江波. 多药耐药基因转

■同行评价

本文有前期工作基础, 实验设计合理, 结果可靠, 具有一定的学术价值.

- 染对荷瘤小鼠骨髓造血细胞的保护作用. 第三军医大学学报 2008; 30: 2164-2167
- 7 Scheffer GL, Schroeijers AB, Izquierdo MA, Wiemer EA, Scheper RJ. Lung resistance-related protein/major vault protein and vaults in multidrug-resistant cancer. *Curr Opin Oncol* 2000; 12: 550-556
 - 8 Yan F, Wang XM, Liu ZC, Pan C, Yuan SB, Ma QM. JNK1, JNK2, and JNK3 are involved in P-glycoprotein-mediated multidrug resistance of hepatocellular carcinoma cells. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2010; 9: 287-295
 - 9 Kawasaki K, Watanabe M, Sakaguchi M, Ogasawara Y, Ochiai K, Nasu Y, Doihara H, Kashiwakura Y, Huh NH, Kumon H, Date H. REIC/Dkk-3 overexpression downregulates P-glycoprotein in multidrug-resistant MCF7/ADR cells and induces apoptosis in breast cancer. *Cancer Gene Ther* 2009; 16: 65-72
 - 10 Ferguson LA, Rhoads J. Multidrug-resistant and extensively drug-resistant tuberculosis: The new face of an old disease. *J Am Acad Nurse Pract* 2009; 21: 603-609
 - 11 魏学明, 顾国利, 任力, 熊梅, 王石林, 李德昌, 宁守斌, 熊梅. 胃癌组织中多药耐药基因的表达特点及其对化疗的指导意义. 胃肠病学和肝病杂志 2009; 18: 988-992
 - 12 Gottesman MM. Mechanisms of cancer drug resistance. *Annu Rev Med* 2002; 53: 615-627
 - 13 Kamazawa S, Kigawa J, Kanamori Y, Itamochi H, Sato S, Iba T, Terakawa N. Multidrug resistance gene-1 is a useful predictor of Paclitaxel-based chemotherapy for patients with ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 2002; 86: 171-176
 - 14 Penson RT, Oliva E, Skates SJ, Glyptis T, Fuller AF, Goodman A, Seiden MV. Expression of multidrug resistance-1 protein inversely correlates with paclitaxel response and survival in ovarian cancer patients: a study in serial samples. *Gynecol Oncol* 2004; 93: 98-106
 - 15 Triller N, Korosec P, Kern I, Kosnik M, Debeljak A. Multidrug resistance in small cell lung cancer: expression of P-glycoprotein, multidrug resistance protein 1 and lung resistance protein in chemo-naive patients and in relapsed disease. *Lung Cancer* 2006; 54: 235-240
 - 16 Ge J, Chen Z, Wu S, Chen J, Li X, Li J, Yin J, Chen Z. Expression levels of insulin-like growth factor-1 and multidrug resistance-associated protein-1 indicate poor prognosis in patients with gastric cancer. *Digestion* 2009; 80: 148-158
 - 17 Huang WT, Huang CC, Weng SW, Eng HL. Expression of the multidrug resistance protein MRP and the lung-resistance protein LRP in nasal NK/T cell lymphoma: further exploring the role of P53 and WT1 gene. *Pathology* 2009; 41: 127-132
 - 18 Zhou Y, Xu Y, Tan Y, Qi J, Xiao Y, Yang C, Zhu Z, Xiong D. Sorcin, an important gene associated with multidrug-resistance in human leukemia cells. *Leuk Res* 2006; 30: 469-476
 - 19 靳胜. MRP、LRP和MDR1基因在胃癌中的表达及其意义. 世界华人消化杂志 2012; 20: 160-163
 - 20 乔俏, 周泓旭, 李光. HIF-1 α 对非霍奇金淋巴瘤细胞凋亡作用机制的探讨. 中华肿瘤防治杂志 2011; 18: 509-512
 - 21 喻喆, 张阳, 吴涛, 李曼. 索拉非尼体外逆转人肝癌耐药细胞BEL-7402/5-FU多药耐药性机制的研究. 中华肿瘤防治杂志 2010; 17: 1743-1747
 - 22 隋华, 周利红, 殷佩浩, 王炎, 范忠泽, 周树峰, 李琦. JNK信号通路介导MDR1/P-gp调控人结肠癌多药耐药. 世界华人消化杂志 2012; 20: 892-898

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》参考文献要求

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

NF- κ B在鼠肝纤维化组织中的表达及其与 α -SMA、Ⅲ型胶原的相关性

朱净, 范建荣, 潘亮, 黄华, 肖明兵, 江枫, 陆翠华

朱净, 范建荣, 潘亮, 肖明兵, 江枫, 陆翠华, 南通大学附属医院消化内科 江苏省南通市 226001

黄华, 南通大学附属医院病理科 江苏省南通市 226001

作者贡献分布: 此课题由朱净与陆翠华设计; 动物模型制作和RT-PCR检测由范建荣、潘亮及江枫操作完成; 病理分析及免疫组织化学检测由黄华完成; 数据分析由肖明兵完成; 论文写作由朱净与肖明兵完成。

通讯作者: 陆翠华, 主任医师, 226001, 江苏省南通市, 南通大学附属医院消化科。lch670608@sina.com

电话: 0513-85051821

收稿日期: 2012-05-15 修回日期: 2012-07-10

接受日期: 2012-07-20 在线出版日期: 2012-08-08

Correlation of nuclear factor κ B expression with α -SMA and collagen III expression in hepatic fibrosis in rats

Jing Zhu, Jian-Rong Fan, Liang Pan, Hua Huang, Ming-Bing Xiao, Feng Jiang, Cui-Hua Lu

Jing Zhu, Jian-Rong Fan, Liang Pan, Ming-Bing Xiao, Feng Jiang, Cui-Hua Lu, Department of Gastroenterology, the Affiliated Hospital of Nantong University, Nantong 226001, Jiangsu Province, China

Hua Huang, Department of Pathology, the Affiliated Hospital of Nantong University, Nantong 226001, Jiangsu Province, China

Correspondence to: Cui-Hua Lu, Department of Gastroenterology, the Affiliated Hospital of Nantong University, Nantong 226001, Jiangsu Province, China. lch670608@sina.com

Received: 2012-05-15 Revised: 2012-07-10

Accepted: 2012-07-20 Published online: 2012-08-08

Abstract

AIM: To investigate the correlation of expression of nuclear factor κ B with that of α -smooth muscle actin (α -SMA) and collagen III in hepatic fibrosis in rats.

METHODS: Thirty-two male SD rats of SPF grade were divided randomly into control group and model group. Hepatic fibrosis was induced in rats by injecting carbon tetrachloride. The mRNA and protein expression of NF- κ B, α -SMA, and collagen III was examined using reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and immunohistochemistry, respectively. The correlation of NF- κ B expression with α -SMA and

collagen III expression was then analyzed.

RESULTS: NF- κ B, α -SMA and collagen III were lowly expressed in normal liver tissue. After injection of carbon tetrachloride, the expression of NF- κ B, α -SMA and collagen III mRNAs and proteins began to increase at week 2 and was significantly higher at weeks 4 and 6 (both $P < 0.05$), showing a gradually rising trend. There was a positive correlation between the expression of NF- κ B and that of α -SMA and collagen III (both $P < 0.05$).

CONCLUSION: NF- κ B plays an important role in the pathogenesis of hepatic fibrosis.

Key Words: Hepatic fibrosis; Nuclear factor κ B; α -smooth muscle actin; Collagen III

Zhu J, Fan JR, Pan L, Huang H, Xiao MB, Jiang F, Lu CH. Correlation of nuclear factor κ B expression with α -SMA and collagen III expression in hepatic fibrosis in rats. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2012; 20(22): 2081-2085

摘要

目的: 研究核转录因子 κ B(Nuclear factor kappa B, NF- κ B)在鼠肝纤维化组织中的表达及其与 α -平滑肌肌动蛋白(α -smooth muscle actin, α -SMA)、Ⅲ型胶原相关性。

方法: 32只♂清洁级SD大鼠随机分为正常对照组8只和模型组24只, 用CCl₄皮下注射法制备肝纤维化模型组, 免疫组化和RT-PCR方法联合检测NF- κ B、 α -SMA、Ⅲ型胶原蛋白及基因在肝纤维化组织中的动态表达, 并对3者表达作相关性分析。

结果: 正常对照组肝组织中NF- κ B、 α -SMA及Ⅲ型胶原的蛋白及基因均有微量表达; CCl₄注射后2、4和6 wk肝组织NF- κ B、 α -SMA及Ⅲ型胶原的蛋白及基因表达呈明显递增趋势($P < 0.05$), 2 wk后3者表达呈显著正相关($P < 0.05$)。

结论: NF- κ B表达随着肝纤维化程度的加重

■背景资料

肝纤维化是肝脏对慢性损伤的一种修复反应, NF- κ B可通过调控TNF- α 、IL-1等细胞因子的转录参与调控肝细胞的凋亡和增殖, 同时还促进肝星状细胞(HSC)的活化, 从而参与肝脏的急慢性炎症或纤维化过程, 使其与肝病的关系日益受到关注。

■同行评议者

吴君, 主任医师, 贵阳医学院附属医院感染科

■研发前沿

HSC增殖活化是肝纤维化发生发展的中心环节,通过抑制HSC活化从而减少肝内细胞外基质(ECM)的合成与分泌是肝纤维化治疗研究的主要方向,阻断NF- κ B的活性及过度产生可能是肝纤维化治疗的一种很有希望的策略。

而增强,在肝纤维化的发生和发展中起重要作用。

关键词: 肝纤维化;核转录因子 κ B; α -平滑肌肌动蛋白; III型胶原蛋白

朱净, 范建荣, 潘亮, 黄华, 肖明兵, 江枫, 陆翠华. NF- κ B在鼠肝纤维化组织中的表达及其与 α -SMA、III型胶原的相关性. 世界华人消化杂志 2012; 20(22): 2081-2085

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/2081.asp>

0 引言

肝纤维化是慢性肝损伤所共有的病理改变,肝星状细胞(hepatic stellate cell, HSC)的活化在肝纤维化发生发展中起主导作用,是肝纤维化产生与发展的中心环节^[1].核转录因子 κ B(Nuclear factor kappa B, NF- κ B)是1986年由Sen和Bltimore在成熟B淋巴细胞中发现的一种重要转录因子,因其能够与B细胞免疫球蛋白的 κ 链基因的增强子B序列(GGGACTTTCC)特异结合而得名. NF- κ B激活后可刺激多种因子的产生,促进HSC的活化,从而参与肝脏的急慢性炎症或纤维化过程^[2,3].为了进一步研究NF- κ B在肝纤维化组织中的动态表达及其与 α -平滑肌肌动蛋白(α -smooth muscle actin, α -SMA)、III型胶原表达的相关性,我们用CCl₄皮下注射法制备肝纤维化模型,RT-PCR、免疫组织化学联合检测NF- κ B、 α -SMA及III型胶原在肝纤维化组织中的动态表达。

1 材料和方法

1.1 材料 δ 清洁级SD大鼠32只,体质量150-250 g,南通大学动物实验中心提供,合格证号: 2022666,在标准饲养条件下进行饲养;兔抗大鼠NF- κ B、 α -SMA与III型胶原多克隆抗体均购自武汉博士得生物工程公司;两步法RT-PCR试剂盒为上海杰美生物工程有限公司产品。

1.2 方法

1.2.1 分组及取材: 32只大鼠随机分成正常对照组(8只)和模型组(24只).模型组按3 mL/kg给予600 mL/L CCl₄溶液(橄榄油配制)皮下注射,每周2次,共6 wk制备肝纤维模型^[4,5].正常对照组同法皮下注射橄榄油.模型组分批(8只/次)于2、4和6 wk末处死,处死时距最后一次CCl₄注射时间为72 h,正常对照组第6 wk末处死,取肝组织,部分置-80 °C冰箱保存待作RT-PCR检测;另一部分以10%甲醛固定,用于组化及病理学观察.4 wk末模型组大鼠死亡1只。

1.2.2 免疫组织化学检测: Envision二步法免疫组化检测NF- κ B、 α -SMA和III型胶原蛋白的表达,综合考虑染色强度和阳性细胞数.染色强度分数标准: 0分(无着色); 1分(淡黄色); 2分(棕黄色); 3分(棕褐色).同样物镜倍数下计数阳性细胞数: 一个视野内着色细胞0分(0%); 1分(1-25%); 2分(26-50%); 3分(51-75%); 4分(76-100%).两项得分相加: 0-2分为阴性表达“-”; 3-4分为“+”; 5-6分为“++”; 7分为“+++”^[6].

1.2.3 RT-PR检测: 以Primer5软件设计NF- κ B、 α -SMA、III型胶原及内参GAPDH引物各一对,其序列分别为: NF- κ B: 5'GCCCTCGTG-GACAGCACCAC3', 5'GGTTTCCGGGGTGCG-GAAGG3'; α -SMA: 5'CATTCTGCTCGTGGC-GGGG3', 5'CGGGGCAGCCTTGTCCCTTG3'; III型胶原: 5'CCACCCTGAACTCAAGAGC3', 5'TGAACTGAAAGCCACCATT3'; GAPDH: 5'AACGACCCCTTCATTGAC3', 5'TCCACGA-CATACTCAGCAC3'.产物大小分别为564、339、212及191 bp,由上海生工生物有限公司设计与合成. TRizol法提取肝组织总RNA,逆转录cDNA后行PCR扩增. PCR产物经2%琼脂糖凝胶电泳,观察扩增条带.将产物条带的电泳图谱用摄影仪扫入电脑,使用“凝胶分析软件”对条带进行分析,读取积分吸光度值(I_A值),以NF- κ B、 α -SMA及III型胶原I_A值/GAPDH平均I_A值表示NF- κ B、 α -SMA及III型胶原的相对表达量。

统计学处理 所有数据由Stata7.0统计软件进行分析.组化结果中各组间NF- κ B、 α -SMA与III型胶原蛋白表达强度的比较采用秩和检验,模型组3者表达强度间的相关分析采用Spearman等级相关分析;半定量RT-PCR结果数据以mean \pm SD表示,多组间的比较采用方差分析,组间两两比较采用 q 检验,模型组NF- κ B、 α -SMA与III型胶原半定量RT-PCR结果间的相关分析采用Person相关分析.以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 肝组织病理学变化 正常对照组SD大鼠肝脏无异常.模型组2 wk,小片肝细胞坏死、炎症细胞浸润和轻度纤维组织增生; 4 wk时肝小叶大片肝细胞坏死、明显脂肪变性并有较多纤维间隔形成; 6 wk时小叶结构紊乱、胶原纤维增生(图1D箭头所示)明显、有大量纤维间隔形成并且假小叶明显(图1)。

2.2 各组NF- κ B、 α -SMA及III型胶原组化检测结

■相关报道

近来已证实, NF- κ B可通过增强转化生长因子 β 1(TGF- β 1)的表达、调节巨噬细胞功能及促进炎症发展等多途径参与肝纤维化的发生发展过程。

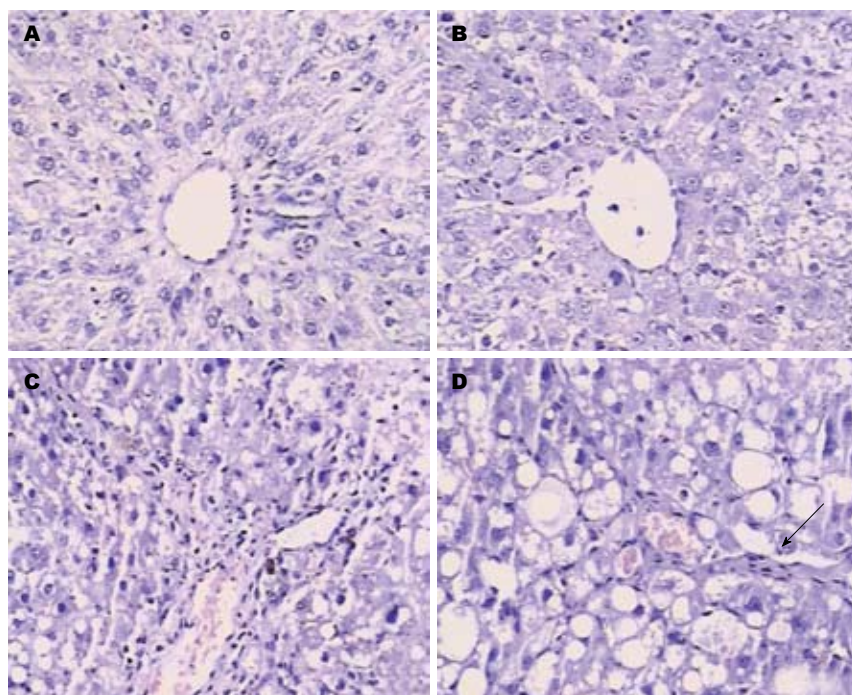


图1 正常对照组及模型组各周病理学变化(HE \times 100). A: 正常对照组; B、C、D: 模型2、4和6 wk组.

■创新盘点
NF- κ B基因及蛋白水平随着随着CCl₄注射时间的延长及肝纤维化程度的加重表达逐渐增加, 且其表达水平与 α -SMA及Ⅲ型胶原基因及蛋白表达水平均呈显著正相关, 提示在纤维化发生过程中, NF- κ B的高表达可加速纤维化的进程.

表1 各组间NF- κ B、 α -SMA及Ⅲ型胶原组化检测结果比较

分组	n	NF- κ B					α -SMA					Ⅲ型胶原				
		-	+	++	+++	秩均值	-	+	++	+++	秩均值	-	+	++	+++	秩均值
正常对照组	8	7	1	0	0	4.88 ^a	7	1	0	0	4.88 ^c	6	2	0	0	5.25 ^e
模型组2 wk	8	0	6	2	0	12.75	0	6	2	0	12.88	0	6	2	0	12.50
模型组4 wk	7	0	0	5	2	20.43	0	0	6	1	19.71	0	0	6	1	19.71
模型组6 wk	8	0	0	0	8	26.50	0	0	0	8	27.00	0	0	0	8	27.00

^a $P < 0.05$ vs NF- κ B其他各组; ^c $P < 0.05$ vs α -SMA其他各组; ^e $P < 0.05$ vs Ⅲ型胶原其他各组.

果及相关性 正常对照组肝组织NF- κ B、 α -SMA及Ⅲ型胶原微量表达. 造模2 wk后3者表达开始增强, NF- κ B主要分布在肝细胞核内, α -SMA表达的部位主要于肝细胞的胞浆内, 而Ⅲ型胶原主要表达在汇管区和中央静脉管壁周围, 至6 wk 8例大鼠中3者均为强阳性表达(表1和图2). Spearman等级相关分析显示模型组NF- κ B表达与 α -SMA($r = 0.7950$, $P = 0.000$)及Ⅲ型胶原($r = 0.7214$, $P = 0.000$)表达呈明显正相关性.

2.3 各组NF- κ B、 α -SMA及Ⅲ型胶原mRNA半定量RT-PCR检测结果及相关性分析 在正常对照组和各肝纤维化模型组, 均扩增出564、339、212及191 bp的NF- κ B、 α -SMA、Ⅲ型胶原及内参GAPDH基因片段, 经灰度扫描后半定量分析结果显示, NF- κ B、 α -SMA及Ⅲ型胶原mRNA在模型组2、4和6 wk表达逐渐增强, 与正常对照组比较差异均具有统计学意义($P < 0.05$), 且模型各组间的两两比较差异亦均有统计学意义. Person

相关分析显示模型组NF- κ B半定量RT-PCR结果与 α -SMA($r = 0.492$, $P = 0.000$)及Ⅲ型胶原($r = 0.835$, $P = 0.000$)结果有相关性, 亦呈明显正相关(表2).

3 讨论

肝纤维化的本质是肝内细胞外基质(extracellular matrix, ECM)的沉积增加和成分的改变, ECM不仅数量增多, 组成成分也发生改变, 低密度的基底膜变成间质性疤痕状膜, 且含有大量胶原纤维^[7]. 其中Ⅲ型胶原可达到正常时的3-4倍. 该过程与大量细胞因子释放激活HSC, 使其转化为肌成纤维细胞密切相关, 而肌成纤维细胞作为一种特殊的成纤维细胞, 在其转化并导致纤维化形成过程中 α -SMA表达常随着增强^[8,9], 检测 α -SMA常可作为其产生的标志^[10]. 本研究结合以往研究^[4,5], 采用经典的CCl₄复制肝纤维化模型, 其在病理生理方面与人体肝纤维化的过程

■应用要点

NF- κ B基因及蛋白水平的检测,有助于判断纤维化进程;NF- κ B为肝纤维化的治疗提供了新的靶点.

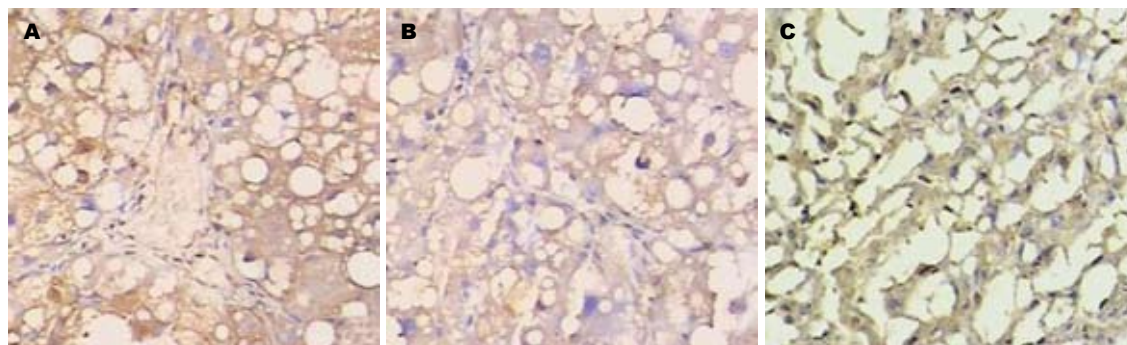


图2 模型组第6周NF- κ B、 α -SMA及Ⅲ型胶原组化检测图(Envision $\times 100$). A: NF- κ B; B: α -SMA; C: Ⅲ型胶原.

表2 各组NF- κ B、 α -SMA及Ⅲ型胶原mRNA半定量RT-PCR检测结果比较 (mean \pm SD)

组别	<i>n</i>	NF- κ B	α -SMA	Ⅲ型胶原
正常对照组	8	0.091 \pm 0.023	0.069 \pm 0.018	0.231 \pm 0.110
模型组2周	8	0.290 \pm 0.100 ^a	0.201 \pm 0.102 ^a	0.463 \pm 0.121 ^a
模型组4周	7	0.790 \pm 0.450 ^a	0.482 \pm 0.103 ^a	0.674 \pm 0.251 ^a
模型组6周	8	1.270 \pm 0.850 ^a	1.004 \pm 0.460 ^a	1.021 \pm 0.630 ^a

^a $P < 0.05$ vs 对照组.

比较相似,同时具有制模方便、时间短和成模率高的特点.结果显示:模型组SD大鼠2 wk时肝小叶小片肝细胞坏死,炎症细胞浸润,肝细胞浆疏松样变,散在点灶状坏死,轻度纤维组织增生,少数见纤细的纤维间隔.模型组SD大鼠第4周时肝小叶大片肝细胞坏死,可见嗜酸性坏死及桥接坏死,肝细胞呈明显的脂肪变性,有较多纤维间隔形成,胶原纤维由汇管区深入小叶内,但没包裹.模型组SD大鼠第6周时小叶结构紊乱,胶原纤维增生明显,有大量纤维间隔形成,假小叶明显,可见许多脂肪变性.随着造模时间的延长, α -SMA及Ⅲ型胶原基因及蛋白表达亦逐渐增强,至6 wk达最高峰.造模过程中仅第4周出现1例大鼠死亡,表明肝纤维化模型制备有效,成功模拟了肝纤维化发生发展过程.

NF- κ B是一种具有多向性调节作用的蛋白质因子,在受到氧自由基、TNF- α 、IL-1、LPS及紫外线等刺激下NF- κ B可被激活,能够调控包括细胞因子、趋化因子、生长因子和炎症介质等多种基因的表达,引发炎症反应,其中也包括了与肝纤维化密切相关的转化生长因子 β 1(transforming growth factor- β 1, TGF- β 1)的表达增强^[2,3]. TGF- β 1除能调节其他促纤维化因子表达增强外,尚能直接活化胶原启动子,并增加ECM蛋白如胶原和纤维结合素的信号等来促进肝纤维化的发生^[11]. Friedman^[12]研究显示NF- κ B

还是巨噬细胞潜在的调节因子,巨噬细胞对HSC的作用具有两面性,在纤维化进程中促进其活化,在恢复期可使活化的星状细胞凋亡,NF- κ B对肝细胞灵敏短暂的信号调节可引起凋亡和生长两种相反的作用. Farrell等^[13]在研究非酒精性脂肪变性致肝纤维化过程中发现,NF- κ B是关键性的促炎因子,其表达的增强可促进多种炎症因子的活化.表明NF- κ B与肝纤维化的发生发展密切相关.本研究中正常大鼠肝组织中NF- κ B仅少量表达,CCl₄注射2 wk后,NF- κ B基因及蛋白水平随着CCl₄注射时间的延长及肝纤维化程度的加重表达逐渐增加,至6 wk时达到最高峰,且在大鼠纤维化发展过程中NF- κ B基因及蛋白表达水平与 α -SMA及Ⅲ型胶原基因及蛋白表达水平均呈显著正相关,进一步提示其在肝纤维化过程中的重要作用.

有研究表明,白桦脂酸(betulinic acid, BA)可明显抑制Toll样受体4(Toll-like receptor 4, TLR4)、髓样分化因子88(myeloid differentiation factor 88, MyD88)及NF- κ B活性,通过调节TLR4/MyD88/NF- κ B信号通路达到预防及治疗肝纤维化的作用^[14]. β 激酶抑制剂(IKK2 inhibitor, IMD)^[15]、NF- κ B的抑制剂如粉防己碱(Tetrandine)^[16]均可降低肝纤维化的程度.进一步证明NF- κ B与肝纤维化发病机制密切相关,NF- κ B可能成为肝纤维化新的治疗靶点.

4 参考文献

- 1 Tacke F, Weiskirchen R. Update on hepatic stellate cells: pathogenic role in liver fibrosis and novel isolation techniques. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol* 2012; 6: 67-80
- 2 Li J, Hu W, Baldassare JJ, Bora PS, Chen S, Poulos JE, O'Neill R, Britton RS, Bacon BR. The ethanol metabolite, linolenic acid ethyl ester, stimulates mitogen-activated protein kinase and cyclin signaling in hepatic stellate cells. *Life Sci* 2003; 73: 1083-1096
- 3 Yang H, Zhao LF, Zhao ZF, Wang Y, Zhao JJ, Zhang L. Heme oxygenase-1 prevents liver fibrosis in rats by regulating the expression of PPAR γ and NF- κ B. *World J Gastroenterol* 2012; 18: 1680-1688
- 4 陆翠华, 陆静贤, 华国平, 朱净, 王华, 黄介飞, 顾美珍, 周倩, 倪润洲. 反义抑制结缔组织生长因子对实验性肝纤维化的影响. *中华肝脏病杂志* 2007; 15: 118-121
- 5 许晶, 朱净, 潘亮, 陆静贤, 肖明兵, 黄华, 倪润洲, 陆翠华. 瘦素在肝纤维化组织中的表达及其与肝星状细胞活化的关系. *世界华人消化杂志* 2009; 17: 2127-2130
- 6 Xie L, Ni WK, Chen XD, Xiao MB, Chen BY, He S, Lu CH, Li XY, Jiang F, Ni RZ. The expressions and clinical significances of tissue and serum galectin-3 in pancreatic carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol* 2012; 138: 1035-1043
- 7 Manning DS, Afdhal NH. Diagnosis and quantitation of fibrosis. *Gastroenterology* 2008; 134: 1670-1681
- 8 Tutau F, Rodríguez-Ortigosa C, Puche JE, Juanarena N, Monreal I, García Fernández M, Clavijo E, Castilla A, Castilla-Cortázar I. Enhanced actions of insulin-like growth factor-I and interferon-alpha co-administration in experimental cirrhosis. *Liver Int* 2009; 29: 37-46
- 9 Hegazy SK, El-Bedewy M, Yagi A. Antifibrotic effect of aloe vera in viral infection-induced hepatic periportal fibrosis. *World J Gastroenterol* 2012; 18: 2026-2034
- 10 Sousa AM, Liu T, Guevara O, Stevens J, Fanburg BL, Gaestel M, Toksoz D, Kayyali US. Smooth muscle alpha-actin expression and myofibroblast differentiation by TGF β are dependent upon MK2. *J Cell Biochem* 2007; 100: 1581-1592
- 11 Tang M, Potter JJ, Mezey E. Activation of the human α 1(I) collagen promoter by leptin is not mediated by transforming growth factor beta responsive elements. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 312: 629-633
- 12 Friedman SL. Mac the knife? Macrophages- the double-edged sword of hepatic fibrosis. *J Clin Invest* 2005; 115: 29-32
- 13 Farrell GC, van Rooyen D, Gan L, Chitturi S. NASH is an Inflammatory Disorder: Pathogenic, Prognostic and Therapeutic Implications. *Gut Liver* 2012; 6: 149-171
- 14 Wan Y, Wu YL, Lian LH, Xie WX, Li X, Ouyang BQ, Bai T, Li Q, Yang N, Nan JX. The anti-fibrotic effect of betulinic acid is mediated through the inhibition of NF- κ B nuclear protein translocation. *Chem Biol Interact* 2012; 195: 215-223
- 15 Wei J, Shi M, Wu WQ, Xu H, Wang T, Wang N, Ma JL, Wang YG. I κ B kinase-beta inhibitor attenuates hepatic fibrosis in mice. *World J Gastroenterol* 2011; 17: 5203-5213
- 16 Hsu YC, Chiu YT, Cheng CC, Wu CF, Lin YL, Huang YT. Antifibrotic effects of tetrandrine on hepatic stellate cells and rats with liver fibrosis. *J Gastroenterol Hepatol* 2007; 22: 99-111

■同行评价

本文探讨了NF- κ B在鼠肝纤维化组织中的表达及其与 α -SMA和Ⅲ型胶原相关性, 实验结果客观, 有一定的学术价值。

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, 文字精练, 数据可靠, 写作规范, 表达准确。

siRNA沉默Cyclin E基因对肝癌HepG2、SMMC-7721和BEL-7402细胞增殖和侵袭能力的影响

刘慧涛, 王娜, 李敏, 臧文巧, 吴睿, 赵国强

■背景资料

Cyclin E蛋白是一种重要的周期蛋白, 是促进细胞周期G₁/S转换的重要调节因子。Cyclin E在多种恶性肿瘤中存在过表达, 阻断其表达可抑制肿瘤细胞的生长, 有望成为肿瘤治疗的候选靶点。

刘慧涛, 河南省南阳油田总医院消化科 河南省南阳市 473132

王娜, 李敏, 臧文巧, 赵国强. 郑州大学基础医学院 河南省郑州市 450001

吴睿, 郑州大学第二附属医院神经康复科 河南省郑州市 450014

刘慧涛, 主治医师, 主要从事消化系统肿瘤的治疗和研究。

作者贡献分布: 此课题由赵国强设计; 刘慧涛、王娜、李敏、臧文巧及吴睿操作完成; 数据分析由刘慧涛与王娜完成; 论文写作由刘慧涛、王娜及赵国强完成。

通讯作者: 赵国强, 教授, 450001, 河南省郑州市, 郑州大学基础医学院. zhaogq@zzu.edu.cn

收稿日期: 2012-05-10 修回日期: 2012-06-30

接受日期: 2012-07-20 在线出版日期: 2012-08-08

RNAi-mediated silencing of the Cyclin E gene inhibits the proliferation and invasion of HepG2, SMMC-7721 and BEL-7402 cells

Hui-Tao Liu, Na Wang, Min Li, Wen-Qiao Zang, Rui Wu, Guo-Qiang Zhao

Hui-Tao Liu, Department of Gastroenterology, Nanyang Oilfield General Hospital, Nanyang 473132, Henan Province, China

Na Wang, Min Li, Wen-Qiao Zang, Guo-Qiang Zhao, Basic Medical College, Zhengzhou University, Zhengzhou 450001, Henan Province, China

Rui Wu, Department of Neurological Rehabilitation, the Second Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450014, Henan Province, China

Correspondence to: Guo-Qiang Zhao, Professor, Basic Medical College, Zhengzhou University, Zhengzhou 450001, Henan Province, China. zhaogq@zzu.edu.cn

Received: 2012-05-10 Revised: 2012-06-30

Accepted: 2012-07-20 Published online: 2012-08-08

Abstract

AIM: To observe the effect of RNAi-mediated silencing of the Cyclin E gene on the proliferation and invasion of HepG2, SMMC-7721 and BEL-7402 cells.

METHODS: Two vectors carrying siRNA targeting the Cyclin E gene were constructed and transfected into HepG2, SMMC-7721 and BEL-7402 cells. The mRNA and protein expression of Cyclin E were measured by RT-PCR

and Western blot, respectively. CCK-8 assay and colony formation assay were employed to assess the proliferation and colony-forming ability of transfected HepG2, SMMC-7721 and BEL-7402. Flow cytometry (FCM) and transwell migration assay were used to evaluate cell cycle progression and migration of transfected cells.

RESULTS: Compared to the blank control group and negative control group, the expression of Cyclin E mRNA and protein was significantly decreased, the proliferation, colony-forming ability, and migration were suppressed significantly, and cell cycle was arrested in G₀/G₁ phase in two experimental groups.

CONCLUSION: Down-regulation of Cyclin E expression significantly inhibits the proliferation and migration of HepG2, SMMC-7721 and BEL-7402 cells.

Key Words: Cyclin E; siRNA; Liver cancer cell lines; Cell proliferation; Cell invasion

Liu HT, Wang N, Li M, Zang WQ, Wu R, Zhao GQ. RNAi-mediated silencing of the Cyclin E gene inhibits the proliferation and invasion of HepG2, SMMC-7721 and BEL-7402 cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2012; 20(22): 2086-2091

摘要

目的: 观察siRNA沉默Cyclin E基因表达对肝癌HepG2、SMMC-7721和BEL-7402细胞增殖和侵袭能力的影响。

方法: 构建2个靶向Cyclin E基因siRNA载体, 转染人肝癌HepG2、SMMC-7721和BEL-7402细胞。RT-PCR、Western blot检测转染后HepG2、SMMC-7721和BEL-7402细胞Cyclin E基因mRNA和蛋白表达水平。CCK-8试验、软琼脂克隆形成实验检测HepG2、SMMC-7721和BEL-7402细胞增殖、克隆形成能力。流式细胞术、transwell试验分别检测HepG2、SMMC-7721和BEL-7402细胞周期和

■同行评议者

代智, 副研究员, 复旦大学附属中山医院肝癌研究所

侵袭能力。

结果: 构建的2个Cyclin E基因siRNA载体插入序列与所设计序列均一致; 转染HepG2、SMMC-7721和BEL-7402细胞后, 干扰1组、干扰2组与空白对照组和阴性对照组比较, Cyclin E mRNA和蛋白表达量均显著降低($P<0.05$), 细胞生长速度延缓, 软琼脂细胞集落形成数、穿透细胞数均显著降低($P<0.05$), S和G₂/M期细胞比例减少, G₀/G₁期细胞比例增加。

结论: 沉默肝癌细胞Cyclin E表达水平, 可有效抑制细胞生长、增殖和侵袭能力。

关键词: Cyclin E; siRNA; 肝癌细胞株; 细胞增殖; 细胞侵袭

刘慧涛, 王娜, 李敏, 臧文巧, 吴睿, 赵国强. siRNA沉默Cyclin E基因对肝癌HepG2、SMMC-7721和BEL-7402细胞增殖和侵袭能力的影响. 世界华人消化杂志 2012; 20(22): 2086-2091
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/2086.asp>

0 引言

细胞周期调控机制紊乱导致的细胞生长失控是肿瘤发生的重要机制之一。Cyclin E是周期蛋白的一种, 在细胞的增殖分化及肿瘤发生中起重要作用^[1]。他能够与CDK2一起促进细胞周期的G₁/S转换, 进而促进细胞分裂^[2]。研究发现, 异常情况下由于Cyclin E无顺序无规律的过度表达, 不断激活其下游蛋白, 驱使细胞异常增殖, 引起肿瘤^[3]。有研究表明Cyclin E过表达与肝癌的发生密切相关^[4]。因此, 本文构建靶向Cyclin E的siRNA载体, 转染肝癌HepG2、SMMC-7721和BEL-7402细胞, 观察沉默Cyclin E基因表达对细胞增殖、分裂和侵袭能力的影响。

1 材料和方法

1.1 材料 人肝癌细胞株HepG2、SMMC-7721和BEL-7402(中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心); pGFP-V-RS载体(美国OriGene Technologies公司); 质粒DNA提取纯化试剂盒(北京天恩泽基因科技有限公司); 小量总RNA提取试剂盒(德国Qiagen公司); RPMI 1640培养基、小牛血清(美国GIBCO公司); 荧光定量PCR试剂盒(One Step SYBR[®] PrimeScript[®] RT-PCR Kit, 大连宝生物公司); 鼠抗Cyclin E单克隆抗体、辣根过氧化物酶标记的山羊抗鼠IgG抗体、鼠抗GAPDH抗体(美国Santa Cruz公司); LipofectAmine[™] 2000(美国Invitrogen公司)。

1.2 方法

1.2.1 靶向Cyclin E基因siRNA载体的构建: 依据Cyclin E mRNA序列(NM_057182.1), 利用Dharmacon公司提供的在线软件siDESIGN筛选确定靶向Cyclin E基因的两个siRNA序列, 即951-969位(GCAAAAGGTTTCAGGGTAT)、1122-1140位(GGACAAAGCCCGAGCAAAG), 分别合成发卡样单链DNA, 退火后分别与siRNA载体pGFP-V-RS重组。随机选取两个转化菌隔夜培养, 抽提质粒, 对插入序列进行测序。得到重组载体pGFP-V-RS-siCE951和pGFP-V-RS-siCE1122。

1.2.2 肝癌细胞株的转染: 提取纯化GFP-V-RS-siCE951、pGFP-V-RS-siCE1122和pGFP-V-Con(无关序列siRNA阴性对照载体)质粒。复苏HepG2、SMMC-7721和BEL-7402细胞, 按Invitrogen公司转染试剂LipofectAmine[™] 2000操作说明分别转染HepG2、SMMC-7721和BEL-7402细胞。转染分4组: 干扰1组(转染pGFP-V-RS-siCE951)、干扰2组(转染pGFP-V-RS-siCE1122)、阴性对照组(转染pGFP-V-Con)和空白对照组(不转染任何质粒, 仅用脂质体处理)。转染12 h后换液, 加入含有抗生素的完全培养基37℃、50 mL/L CO₂培养24 h进行以下实验。

1.2.3 RT-PCR检测Cyclin E mRNA表达: 使用Qiagen公司小量总RNA提取试剂盒提取各组转染细胞总RNA, AMV逆转录成cDNA。使用宝生物公司的荧光定量PCR试剂盒扩增, Cyclin E扩增引物5'CGGGTCCACAGGGATGCGAAGGA3'和5'CAGGTGTGGGGATCAGGGAGCA3'。内参GAPDH扩增引物5'GCCTTCCGTGTCCCCACTGC3'和5'CAATGCCAGCCCCAGCGTCA3'。扩增反应条件: 94℃预变性20 s, 60℃ 60 s, 共40个循环。每个标本均扩增5管, 以Cyclin E的表达量与内参GAPDH表达量的比值为Cyclin E的相对表达量。

1.2.4 Western blot检测Cyclin E蛋白表达: 裂解各组细胞, 用Bradford法测定上清中蛋白浓度以调整上样体积和上样量。SDS-PAGE凝胶100 V, 电泳1 h, 转膜, 置膜于25 mL封闭缓冲液中1 h。1:800鼠抗Cyclin E单克隆抗体及鼠抗GAPDH, 室温孵育1-2 h。1:2 000辣根过氧化物酶标记的山羊抗鼠IgG抗体, 室温孵育1 h, 显色, 成像扫描分析系统保存图像。

1.2.5 细胞增殖检测: 取各组细胞, 以1×10⁴个细胞/孔细胞浓度接种各组细胞于96孔细胞培养板, 各组细胞均设置5个复孔, 接种后的1-5 d内,

■研究前沿

研究发现, 异常情况下由于Cyclin E无顺序无规律的过度表达, 不断激活其下游蛋白, 驱使细胞异常增殖, 引起肿瘤。RNA干扰技术可以特异阻断或降低其靶向基因的表达, 在抑制肿瘤生长的基础研究方面取得了一定的进展。

■ 相关报道

Liang等报道, siRNA靶向沉默Cyclin E基因,可以有效阻止乳腺癌细胞在裸鼠中的生长. Li等报道, siRNA靶向Cyclin E可以抑制肝癌细胞Cyclin E的表达,且可以加速体外培养的肝癌细胞凋亡,阻止细胞的分裂.

表 1 各组细胞Cyclin E mRNA相对表达量 (mean \pm SD)

分组	转染载体	HepG2	SMMC-7721	BEL-7402
干扰1组	pGFP-V-RS-siCE951	0.215 \pm 0.021 ^b	0.235 \pm 0.027 ^b	0.196 \pm 0.024 ^b
干扰2组	pGFP-V-RS-siCE1122	0.178 \pm 0.019 ^b	0.189 \pm 0.020 ^b	0.143 \pm 0.021 ^b
阴性对照组	pGFP-V-Con	0.406 \pm 0.037	0.426 \pm 0.033	0.329 \pm 0.037
空白对照组	-	0.372 \pm 0.042	0.432 \pm 0.039	0.344 \pm 0.036

^b $P < 0.01$ vs 阴性对照组和空白对照组.

采用CCK-8细胞增殖检测试剂盒,测定各组细胞孔内的吸光度值(A),记录数据,计算平均值,绘制各组细胞生长曲线.

1.2.6 流式细胞术分析细胞周期: 取各组对数生长期细胞,胰酶消化,用注射器将细胞用力打入5 mL 70%(预冷)乙醇中,封口膜封口. 4 °C固定过夜. 800 r/min 15 min收集细胞, PBS洗2次. 用0.4 mL PBS重悬细胞并转至Tube中轻轻吹打. 加RNase-A至终浓度50 μ g/mL, 37 °C水浴消化30 min. 加PI至终浓度65 μ g/mL,在冰浴中避光染色30 min. 300目尼龙网过滤,上机检测. 每组细胞重复3次.

1.2.7 软琼脂克隆形成实验: 1:1混合1.2%的琼脂糖和2 \times RPMI 1640培养基,加入2 \times 抗生素和20%的小牛血清,平皿中冷却凝固. 1:1混合0.7%的琼脂糖和2 \times DMEM培养基,加入0.2 mL浓度为5 $\times 10^3$ 个细胞/mL的细胞悬液,注入上述平皿,培养10-14 d取出培养板,每组细胞随机选取10个低倍视野,镜下计数形成的细胞克隆数(细胞数>50计为一个克隆)^[5].

1.2.8 Transwell试验: 转染后48 h,取各组细胞调整为2 $\times 10^5$ /mL,在上室中加入200 μ L细胞悬液,下室加入500 μ L含趋化因子的培养基,每组设5个复孔. 37 °C、50 mL/L CO₂培养48 h后取出,小心用棉签擦去基质胶和上室内的细胞,结晶紫染色,显微镜观察、取10个视野,计数取平均值.

统计学处理 所有实验数据均使用SPSS16.0统计软件进行分析处理,所有数据用mean \pm SD表示,结果采用单因素方差(One-way ANOVA)分析,以 $P < 0.05$ 为有显著性差异.

2 结果

2.1 靶向Cyclin E基因siRNA载体的构建结果 两种退火产物与载体重组转化后均得到大量转化菌,对重组质粒中目的基因进行测序,结果与所设计的发卡样单链DNA序列一致(图1). 说明构

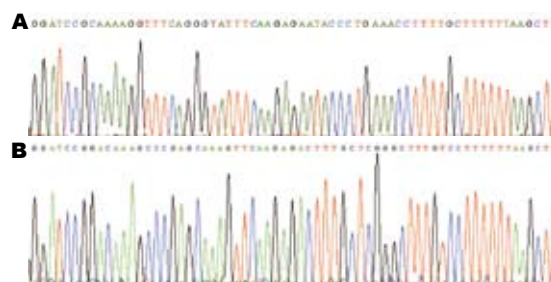


图 1 重组载体发卡样单链DNA测序图. A: pGFP-V-RS-siCE951中插入序列; B: pGFP-V-RS-siCE1122中插入序列.

建得重组载体pGFP-V-RS-siCE951和pGFP-V-RS-siCE1122.

2.2 RT-PCR检测各组转染细胞Cyclin E mRNA表达结果 3种肝癌细胞的干扰1组、干扰2组、阴性对照组和空白对照组细胞Cyclin E mRNA的相对表达量见表1. 比较3种肝癌细胞的干扰1组、干扰2组与对照组, Cyclin E mRNA的相对表达量都显著降低,差异均有非常显著性(HepG2: $P < 0.01$, $F = 27.39$; SMMC-7721: $P < 0.01$, $F = 21.04$; BEL-7402: $P < 0.01$, $F = 18.62$). 说明干扰1组、2组肝癌HepG2、SMMC-7721和BEL-7402细胞中Cyclin E mRNA表达均受到显著抑制.

2.3 Western blot检测Cyclin E蛋白表达结果 干扰1组、干扰2组、空白对照组和阴性对照组细胞在大约54 kDa处均有免疫印迹出现,其中空白对照组和阴性对照组的免疫印迹显著强于干扰1组和干扰2组(图2). 说明设计靶向Cyclin E基因siRNA载体能够有效干扰肝癌HepG2、SMMC-7721和BEL-7402细胞Cyclin E蛋白的表达.

2.4 细胞增殖检测结果 各组细胞的生长曲线见图3, 统计学分析显示,比较空白对照组与阴性对照组细胞A值得出差异无显著性($P > 0.05$); 干扰1组、干扰2组与2个对照组比较,在3、4、5 d细胞孔内的A值显著减少,差异有显著性($P < 0.05$). 说明抑制肝癌HepG2、SMMC-7721和BEL-7402细胞Cyclin E基因表达,可以降低这些

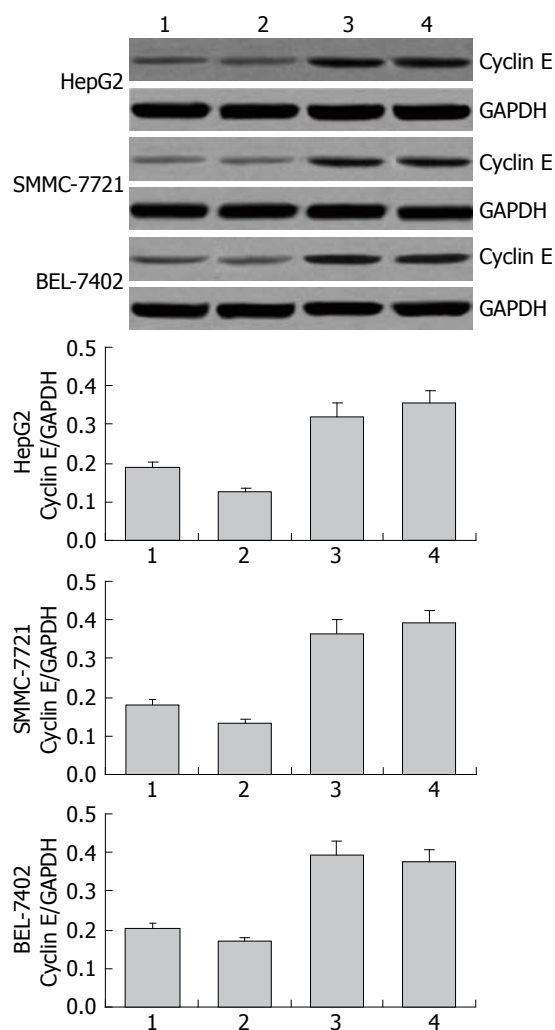


图 2 各组转染细胞Cyclin E蛋白Western blot图. 1: 干扰1组; 2: 干扰2组; 3: 阴性对照组; 4: 空白对照组.

细胞的生长速度.

2.5 细胞周期测定结果 细胞周期检测数据见表2. 3种肝癌细胞干扰1组和干扰2组各期细胞比例与2个对照组比较, S和G₂/M期细胞比例均减少, G₀/G₁期细胞比例均增加, 差异有显著性 ($P < 0.05$). 说明在肝癌HepG2、SMMC-7721和BEL-7402细胞中抑制Cyclin E基因表达可以改变细胞周期, 使其S和G₂/M期细胞比例减少, G₀/G₁期细胞比例增加.

2.6 软琼脂克隆形成实验结果 3种肝癌细胞干扰1组、干扰2组、阴性对照组和空白对照组平均细胞集落形成数见表3. 空白对照组与阴性对照组平均集落形成数比较, 差异均无显著性 ($P > 0.05$); 干扰1组和干扰2组与2个对照组比较, 平均集落形成数均显著减少, 差异有显著性 ($P < 0.05$). 说明抑制肝癌HepG2、SMMC-7721和BEL-7402细胞Cyclin E基因表达, 可以降低细胞软琼脂集落形成能力.

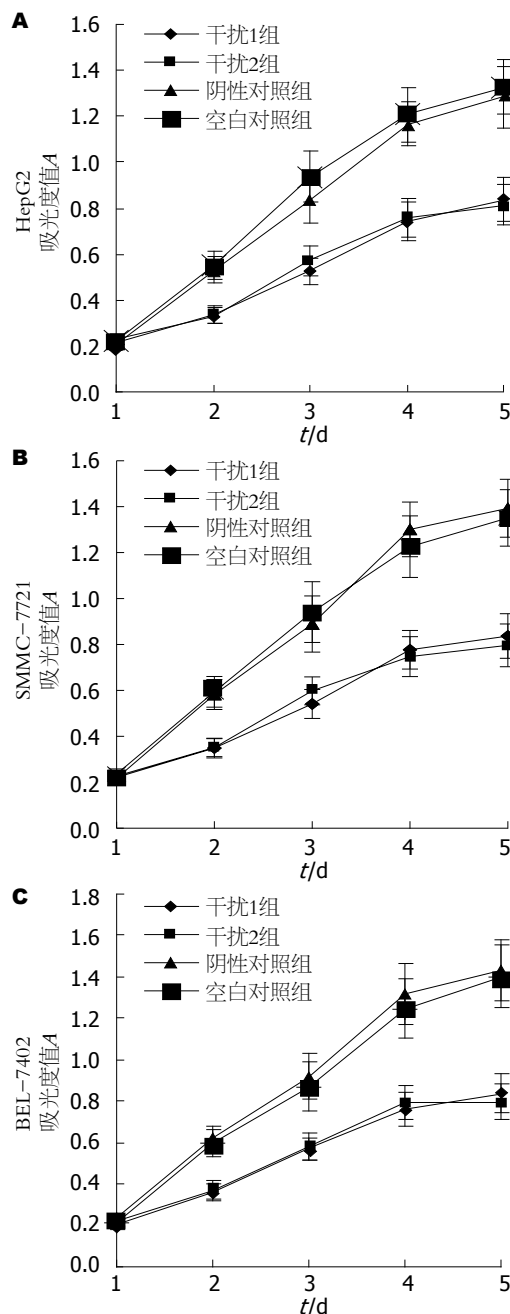


图 3 各组转染细胞生长曲线. A: HepG2; B: SMMC-7721; C: BEL-7402.

2.7 Transwell实验结果 干扰1组、干扰2组、阴性对照组和空白对照组平均穿透细胞数见表4. 空白对照组与阴性对照组平均穿透细胞数比较, 差异无显著性 ($P > 0.05$); 干扰1组和干扰2组与2个对照组比较, 平均穿透细胞数显著减少, 差异有显著性 ($P < 0.01$). 说明抑制肝癌HepG2、SMMC-7721和BEL-7402细胞Cyclin E基因表达, 可以降低细胞侵袭转移能力.

3 讨论

肿瘤的发生发展是一个多因素参与、多阶段发生

■ 创新盘点

Cyclin E蛋白的RNAi在肝癌SMMC-7721、BEL-7402中未有文献报道. 本研究采用Cyclin E基因siRNA载体转染人肝癌HepG2、SMMC-7721和BEL-7402细胞, RT-PCR、Western blot、CCK-8试验、软琼脂克隆形成实验、流式细胞术、transwell试验等来检测Cyclin E基因沉默后, 对目的细胞生长、增殖和侵袭能力的影响, 具有一定的创新性.

■应用要点

siRNA可以有效抑制肝癌细胞株HepG2、SMMC-7721和BEL-7402中Cyclin E的表达,有效抑制细胞生长、增殖和侵袭能力。

表 2 各组转染细胞细胞周期分布比例 (%)

分组	HepG2			SMMC-7721			BEL-7402		
	G ₀ -G ₁	S	G ₂ -M	G ₀ -G ₁	S	G ₂ -M	G ₀ -G ₁	S	G ₂ -M
干扰1组	74.37 ± 2.51 ^b	20.62 ± 0.41 ^b	5.01 ± 0.17 ^b	68.27 ± 2.36 ^b	24.48 ± 0.38 ^b	7.25 ± 0.14 ^b	70.26 ± 2.66 ^b	22.05 ± 0.56 ^b	7.69 ± 0.21 ^b
干扰2组	70.49 ± 2.31 ^b	22.42 ± 0.54 ^b	7.09 ± 0.35 ^b	69.28 ± 2.31 ^b	23.71 ± 0.54 ^b	7.01 ± 0.21 ^b	71.39 ± 2.92 ^b	21.12 ± 0.64 ^b	7.49 ± 0.27 ^b
阴性对照组	61.22 ± 1.99	28.15 ± 0.53	10.63 ± 0.21	58.19 ± 2.07	30.29 ± 0.51	11.52 ± 0.22	62.09 ± 3.15	27.15 ± 0.42	10.76 ± 0.32
空白对照组	62.69 ± 3.67	27.43 ± 0.57	9.88 ± 0.44	57.35 ± 2.28	29.81 ± 0.62	12.84 ± 0.33	60.15 ± 2.33	28.43 ± 0.64	11.42 ± 0.39

^bP<0.01 vs 阴性对照组和空白对照组。

表 3 各组细胞平均细胞集落形成数 (n = 6, mean ± SD)

分组	HepG2	SMMC-7721	BEL-7402
干扰1组	124.6 ± 16.3 ^b	86.2 ± 15.2 ^b	95.50 ± 11.5 ^b
干扰2组	141.2 ± 15.2 ^b	95.8 ± 13.5 ^b	102.83 ± 16.9 ^b
阴性对照组	209.2 ± 25.8	150.5 ± 17.6	162.50 ± 21.79
空白对照组	226.7 ± 34.2	164.8 ± 20.1	175.33 ± 17.4

^bP<0.01 vs 阴性对照组和空白对照组。

表 4 各组细胞平均穿透细胞数 (n = 6, mean ± SD)

组别	HepG2	SMMC-7721	BEL-7402
干扰1组	42.2 ± 5.4 ^b	64.2 ± 7.4 ^b	45.5 ± 6.3 ^b
干扰2组	51.0 ± 8.1 ^b	72.8 ± 11.7 ^b	49.7 ± 7.2 ^b
阴性对照组	115.0 ± 12.2	139.5 ± 18.2	122.3 ± 15.6
空白对照组	116.2 ± 8.9	147.8 ± 16.6	115.9 ± 16.7

^bP<0.01 vs 阴性对照组和空白对照组。

和多基因改变的过程。研究表明,细胞周期调控机制紊乱导致的细胞增殖失控被认为是肿瘤发生发展的重要机制之一。细胞周期是一个高度有序的进程,受到各种蛋白质的严格调控,周期蛋白(cyclin)保证细胞周期的正常进行具有重要作用^[6,7]。

Cyclin E是一种G₁期周期蛋白,1991年由美国学者Koff首先发现^[8]。Cyclin E促进肿瘤的发生与其在细胞周期中的调控作用有关。Cyclin E是促进细胞周期G₁/S转换的重要调节因子,Cyclin E的过度表达,导致细胞异常增殖,引起肿瘤^[9-11]。RNA干扰技术可以特异阻断或降低其靶向基因的表达,在抑制肿瘤生长的基础研究方面取得了一定的进展^[12-14]。Liang等^[15]报道,siRNA靶向沉默Cyclin E基因,可以有效阻止乳腺癌细胞在裸鼠中的生长。Li等^[16]报道,siRNA

靶向Cyclin E可以抑制肝癌细胞Cyclin E的表达,且可以加速体外培养的肝癌细胞系凋亡,阻止细胞的分裂。

本研究采用RNA干扰技术观察了Cyclin E沉默对肝癌细胞株HepG2、SMMC-7721和BEL-7402增殖的影响。实验结果显示,构建的Cyclin E基因siRNA载体转染HepG2、SMMC-7721和BEL-7402细胞后,干扰1组、干扰2组与空白对照组和阴性对照组比较,Cyclin E mRNA的相对表达量显著降低,Cyclin E蛋白表达量明显下降,细胞生长速度延缓,S、G₂、M期细胞比例减少,G₀、G₁期细胞比例增加,软琼脂细胞集落形成数、穿透细胞数显著减少。

分析试验结果,我们认为沉默Cyclin E可使肝癌细胞Cyclin E mRNA和蛋白表达均显著下降,周期阻滞于G₀/G₁期,阻止了肝癌细胞的分裂速度,进而延缓肝癌细胞生长。Transwell试验还表明,沉默Cyclin E还降低了细胞的侵袭能力,Cyclin E和细胞侵袭能力的关系还有待进一步的研究。本研究为深入探索肝癌的发病机制和靶向治疗积累实验资料。

4 参考文献

- 1 Stamatakis M, Palla V, Karaiskos I, Xiromeritis K,

- Alexiou I, Pateras I, Kontzoglou K. Cell cyclins: triggering elements of cancer or not? *World J Surg Oncol* 2010; 8: 111
- 2 Freemantle SJ, Dmitrovsky E. Cyclin E transgenic mice: discovery tools for lung cancer biology, therapy, and prevention. *Cancer Prev Res (Phila)* 2010; 3: 1513-1518
- 3 Santamaria D, Ortega S. Cyclins and CDKS in development and cancer: lessons from genetically modified mice. *Front Biosci* 2006; 11: 1164-1188
- 4 Tsuji T, Miyazaki M, Fushimi K, Mihara K, Inoue Y, Ohashi R, Ohtsubo M, Hamazaki K, Furusako S, Namba M. Cyclin E overexpression responsible for growth of human hepatic tumors with p21WAF1/CIP1/SDI1. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 242: 317-321
- 5 胡志亮, 谭德明, 侯周华, 谢萍, 刘国珍, 欧阳奕, 刘菲, 刘洪波. HBx基因缺失突变体HBx-d382对L02细胞增殖及非锚定依赖生长能力的影响. *世界华人消化杂志* 2010; 18: 1109-1114
- 6 Mazumder S, Plesca D, Almasan A. A jekyll and hyde role of cyclin E in the genotoxic stress response: switching from cell cycle control to apoptosis regulation. *Cell Cycle* 2007; 6: 1437-1442
- 7 Lopez-Beltran A, MacLennan GT, Montironi R. Cyclin E as molecular marker in the management of breast cancer: a review. *Anal Quant Cytol Histol* 2006; 28: 111-114
- 8 Koff A, Cross F, Fisher A, Schumacher J, Leguellec K, Philippe M, Roberts JM. Human cyclin E, a new cyclin that interacts with two members of the CDC2 gene family. *Cell* 1991; 66: 1217-1228
- 9 Bahnassy AA, Zekri AR, Loutfy SA, Mohamed WS, Moneim AA, Salem SE, Sheta MM, Omar A, Al-Zawahry H. The role of cyclins and cyclin dependent kinases in development and progression of hepatitis C virus-genotype 4-associated hepatitis and hepatocellular carcinoma. *Exp Mol Pathol* 2011; 91: 643-652
- 10 Schildkraut JM, Moorman PG, Bland AE, Halabi S, Calingaert B, Whitaker R, Lee PS, Elkins-Williams T, Bentley RC, Marks JR, Berchuck A. Cyclin E overexpression in epithelial ovarian cancer characterizes an etiologic subgroup. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2008; 17: 585-593
- 11 Zhou YJ, Xie YT, Gu J, Yan L, Guan GX, Liu X. Overexpression of cyclin E isoforms correlates with poor prognosis in rectal cancer. *Eur J Surg Oncol* 2011; 37: 1078-1084
- 12 Kim DH, Rossi JJ. Strategies for silencing human disease using RNA interference. *Nat Rev Genet* 2007; 8: 173-184
- 13 Jankovic R, Radulovic S, Brankovic-Magic M. siRNA and miRNA for the treatment of cancer. *J BUON* 2009; 14 Suppl 1: S43-S49
- 14 Gondi CS, Rao JS. Concepts in in vivo siRNA delivery for cancer therapy. *J Cell Physiol* 2009; 220: 285-291
- 15 Liang Y, Gao H, Lin SY, Goss JA, Brunicardi FC, Li K. siRNA-based targeting of cyclin E overexpression inhibits breast cancer cell growth and suppresses tumor development in breast cancer mouse model. *PLoS One* 2010; 5: e12860
- 16 Li K, Lin SY, Brunicardi FC, Seu P. Use of RNA interference to target cyclin E-overexpressing hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* 2003; 63: 3593-3597

■同行评价

本文选题尚可, 具有一定的学术价值。

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》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)

不同原发部位胃转移癌12例

刘艳萍, 金博, 王琦三

■背景资料

胃转移癌是一种极其罕见的继发性肿瘤, 其原发部位以食管癌多见。患者多有原发肿瘤史, 临床表现不易与原发胃癌鉴别, 其诊断主要依赖于原发肿瘤病史及病理组织学检查, 预后较差。

刘艳萍, 新疆医科大学附属肿瘤医院重症监护病房 新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市 830011

金博, 王琦三, 新疆医科大学附属肿瘤医院胃肠外科 新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市 830011

刘艳萍, 主治医师, 主要从事重症监护及肿瘤患者围手术期治疗的研究。

作者贡献分布: 刘艳萍负责研究设计、资料收集、数据分析及论文撰写; 金博与王琦三提供部分资料; 金博参与论文撰写。

通讯作者: 刘艳萍, 主治医师, 830011, 新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市新市区苏州东街789号, 新疆医科大学附属肿瘤医院重症监护病房。2012liuyanping@sina.com
电话: 0991-7819141

收稿日期: 2012-03-03 修回日期: 2012-05-07

接受日期: 2012-07-01 在线出版日期: 2012-08-08

Metastatic carcinoma to the stomach from different primary sites: An analysis of 12 cases

Yan-Ping Liu, Bo Jin, Qi-San Wang

Yan-Ping Liu, Intensive Care Unit, the Affiliated Xinjiang Tumor Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China

Bo Jin, Qi-San Wang, Department of Gastrointestinal Surgery, the Affiliated Xinjiang Tumor Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China

Correspondence to: Yan-Ping Liu, Attending Physician, Intensive Care Unit, the Affiliated Xinjiang Tumor Hospital of Xinjiang Medical University, 789 Suzhou East Road, New-city District, Urumqi 830011, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China. 2012liuyanping@sina.com
Received: 2012-03-03 Revised: 2012-05-07

Accepted: 2012-07-01 Published online: 2012-08-08

Abstract

AIM: To discuss the clinical characteristics, diagnosis and treatment of metastatic carcinoma to the stomach from different primary sites.

METHODS: Ten patients diagnosed with metastatic carcinoma to the stomach at our hospital from January 1990 to January 2010 were included in the study. The clinical characteristics, diagnosis, treatment, and prognosis of metastatic carcinoma to stomach from different primary sites were analyzed.

RESULTS: Esophageal cancer was the most common primary tumor. The patients usually had a tumor history, and it was difficult to dis-

tinguish between secondary and primary gastric cancer because of their similar clinical manifestations. The diagnosis depended mainly on a tumor history and histopathological examination. The prognosis was poor, and their median survival time was 9.5 months. Early diagnosis and timely operation might improve prognosis.

CONCLUSION: Metastatic carcinoma to the stomach is a kind of extremely rare secondary carcinoma and is difficult to differentiate from primary gastric cancer. The diagnosis is dependent on a tumor history and histopathological examination, and operation should be made a priority for treatment.

Key Words: Gastric metastatic carcinoma; Esophageal cancer; Melanoma; Liver cancer; Lung cancer; Kidney carcinoma; Breast carcinoma

Liu YP, Jin B, Wang QS. Metastatic carcinoma to the stomach from different primary sites: An analysis of 12 cases. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2012; 20(22): 2092-2096

摘要

目的: 探讨不同原发部位胃转移癌的临床特点及诊治。

方法: 对我院1990-01/2010-01诊断胃癌的病例资料进行检索, 其中符合胃转移癌诊断者12例, 计算其在胃癌中的构成比, 结合国内外相关文献, 分析不同原发部位胃转移癌的临床特点、诊治手段及其效果与预后。

结果: 胃转移癌原发部位以食管癌居多, 占胃转移癌的50%(6/12)。患者多有原发肿瘤病史, 临床表现与原发性胃癌相似, 诊断主要依赖于原发癌病史及病理组织学检查, 预后较差(生存期9.5 mo), 尽早诊断并手术可改善预后。

结论: 胃转移癌发病率极低, 不易与原发性胃癌鉴别, 诊断依据是原发癌病史及病理组织学检查, 预后差, 手术是主要的治疗手段。

关键词: 胃转移癌; 食管癌; 黑色素瘤; 肝癌; 肺癌;

■同行评议者

邹小明, 教授, 哈尔滨医科大学附属第二医院普外科

肾癌; 乳腺癌

刘艳萍, 金博, 王琦三. 不同原发部位胃转移癌12例. 世界华人消化杂志 2012; 20(22): 2092-2096
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/2092.asp>

0 引言

胃转移癌是指癌细胞从原发部位经血管、淋巴管或其他途径侵袭至胃部继续生长, 形成与原发肿瘤相同类型的肿瘤^[1]. 广义上泛指胃的转移性肿瘤. 其在概念上应注意与转移性胃癌如Krukenberger瘤(有作者称之为“卵巢的胃转移癌”^[2])等概念相区别, 后者为原发灶为胃癌的转移性肿瘤. 此外, 胃内的异位组织如异位胰腺等癌变应属原发癌, 亦不属胃转移癌之范畴. 临床上, 胃转移癌极其罕见, 国内外文献罕有报道. 本文对我院收治的12例胃转移癌病例资料进行分析, 探讨不同原发部位胃转移癌的临床特点及诊治.

1 材料和方法

1.1 材料 对我院1990-01/2010-01诊断胃癌的病例资料6 940例(同一患者多次入院计1例)进行检索, 其中符合胃转移癌诊断者12例, 包括: 食管下段腺癌胃转移6例、足部黑色素瘤胃转移2例、肝细胞癌胃转移1例、肺小细胞未分化癌胃转移1例、肾透明细胞癌胃转移1例、乳腺非典型髓样癌胃转移1例, 均经胃镜病理学或术后病理学检查确诊.

1.2 方法 根据我院病例资料, 计算胃转移癌在胃癌中的构成比, 分析不同原发部位胃转移癌的临床特点、诊治手段及其效果与预后.

2 结果

病例基本资料见表1. 2. 基于我院数据, 胃转移癌占胃癌的1.73%(12/6 940), 发病率极低. 其原发部位以食管癌多见, 占胃转移癌的50%(6/12). 男女比例2:1(8:4). 年龄38-74岁, 中位年龄58.5岁. 临床表现以进食哽噎感、上腹疼痛、呕血、黑便等消化系症状为主, 与原发胃癌相似, 不易鉴别. 诊断依赖于原发癌病史及胃镜或术后病理学检查. 本组6例食管癌胃转移患者, 术前均诊断食管下段癌, 其中1例较典型者胃镜病理示食管中分化腺癌(图1A), 术后病理示食管下段中分化腺癌(图1B), 同时发现胃底部黏膜下有转移灶, 且与食管下段癌原发灶不连续, 病变符合中分化腺癌, 考虑与食管癌同源(图

1C). 原发部位为食管癌者, 转移部位以胃上段为主, 而原发部位为其他肿瘤者, 转移部位以胃中、下段多见. 食管癌胃转移者, 血清癌胚抗原(carcino-embryonic antigen, CEA)可升高, 而其他原发肿瘤胃转移者, 血清CEA无升高. 原发部位为食管癌、黑色素瘤、肝癌、肺癌者, 胃转移为同时性(simultaneity), 首诊发现; 原发灶为肾脏、乳腺者, 胃转移为异时性(heterochromia), 分别于术后6年、2年时诊断. 2例异时性胃转移者, 均为老年患者, 原发癌手术后均接受了辅助治疗, 原发癌均未于原位复发而直接出现了远隔胃转移. 本组患者生存期2 mo-9年, 中位生存期9.5 mo. 虽然发现胃转移癌提示原发肿瘤已属晚期, 但对可切除性胃转移癌行根治性手术联合术后辅助治疗者, 术后生存期3 mo-9年, 中位生存期20 mo, 预后明显改善. 异时性胃转移者, 手术效果佳, 术后生存期为2年(乳腺癌胃转移)、9年(肾癌胃转移), 预后明显优于同时性胃转移者.

3 讨论

临床上, 胃周围毗邻器官癌肿如食管癌、肝癌、胰腺癌、结肠癌等在进展过程中直接侵犯胃者并不罕见, 而胃的远隔转移癌更具研究价值. 据国外大宗尸检报告, 肿瘤死亡患者中存在胃转移癌(瘤)者占1.28%-1.70%^[3], 该数字明显高于国内外文献报道的数据, 分析其中纳入了较多胃被临近癌肿直接侵犯的病例. 国内外对胃转移癌的研究报道主要集中于非直接侵犯性转移. 胃是血供丰富的器官, 血行转移在理论上可以成为远隔转移的主要途径. 欧洲的数据显示胃转移癌的原发灶以黑色素瘤、乳腺癌、肺癌居多^[4], 美国以肺癌、肠癌居多^[5], 日本以肺癌、乳腺癌、食管癌居多^[6].

胃转移癌缺乏特异性临床表现, 难以与原发胃癌相鉴别. 其常见临床表现包括: 出血、腹痛、食欲减退、呕吐^[5]、贫血^[7]等消化系症状. 其临床诊断有赖于病理组织学检查及原发肿瘤病史^[5-7]. 据Oda等^[6]报道, 胃转移癌内镜活检确诊率仅为15.6%, 术前误诊率高. 故对临床诊断为胃癌且既往有其他原发性肿瘤病史的患者, 应警惕胃转移癌的可能. Jung等^[8]的研究结果提示, 对无其他部位远隔转移等绝对手术禁忌者, 胃转移癌行根治性手术治疗后, 预后较好.

关于食管癌胃转移, 国内外报道的数据差异较大. 国内数据提示食管癌胃转移占胃转移癌的首位^[9], 而国外罕见食管癌胃转移之临床

■**研发前沿**
胃虽为血供丰富器官, 但在临床上胃转移癌极其罕见, 国内外文献罕有报道, 其发病原因、转移途径不明.

■相关报道

欧洲的数据显示胃转移癌的原发灶以黑色素瘤、乳腺癌、肺癌居多,美国以肺癌、肠癌居多,日本以肺癌、乳腺癌、食管癌居多。

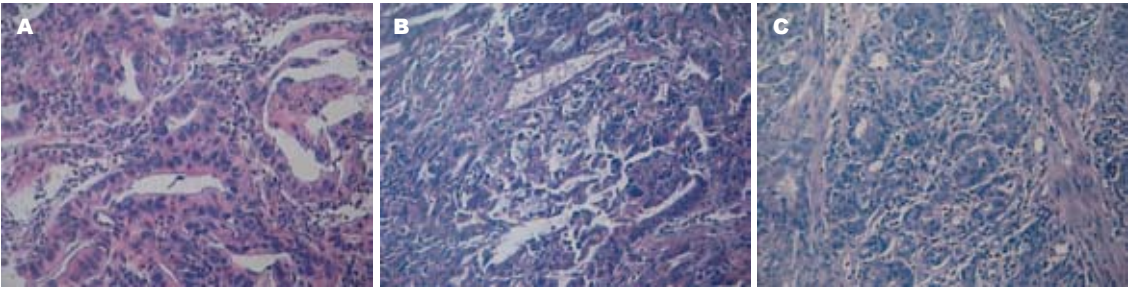


图 1 食管下段癌胃转移病理学特点. A: 食管下段中分化腺癌的胃镜病理; B: 食管下段中分化腺癌的术后病理; C: 胃底部黏膜下转移灶, 与食管下段癌原发灶不连续, 病变符合中分化腺癌, 考虑与食管癌同源(术后病理).

表 1 食管癌胃转移病例基本资料

	食管癌胃转移					
	病例1	病例2	病例3	病例4	病例5	病例6
性别	男	女	男	男	男	女
年龄(岁)	70	60	38	46	56	63
民族	汉	维吾尔	哈萨克	汉	汉	汉
原发癌手术史	-	-	-	-	-	-
原发灶病理	中分化腺癌	高分化腺癌	印戒细胞癌	低分化腺癌	中分化腺癌	低分化腺癌
原发癌辅助治疗	-	-	-	-	新辅助化疗	-
胃转移癌临床表现	进食哽噎感	进食哽噎感	呕血	黑便	进食哽噎感	上腹疼痛
胃转移癌部位	贲门	胃底	胃底	胃底	贲门	胃底
CEA(ug/L)	7.416	3.204	130.579	9.418	2.907	1.669
胃镜病理	中分化腺癌	高分化腺癌	黏液腺癌	低分化腺癌	高分化腺癌	低分化腺癌
胃转移癌手术	食管下段癌根治术	食管下段癌根治术	食管下段癌根治术	食管下段癌根治术	食管下段癌根治术	食管下段癌根治术
胃转移癌术后病理	中分化腺癌	高分化腺癌	-	-	中分化腺癌	低分化腺癌
术后辅助治疗	辅助化疗	辅助化疗			辅助化疗	辅助化疗
随访	术后3年心衰死亡	术后7 mo失访	术后3 mo死亡	术后4 mo死亡	术后至今6年健在	术后16 mo复发死亡

表 2 其他癌胃转移病例基本资料

	黑色素瘤胃转移		肝癌胃转移	肺癌胃转移	肾癌胃转移	乳腺癌胃转移
	病例1(足部)	病例2(足部)				
性别	男	女	男	男	男	女
年龄(岁)	47	58	43	74	66	59
民族	汉	汉	汉	汉	维吾尔	汉
原发癌手术史	-	-	-	-	6年前	2年前
原发灶病理	恶性黑色素瘤	恶性黑色素瘤	-	小细胞未分化癌	左肾癌根治术	左乳癌改良根治术
原发癌辅助治疗	-	-	-	化疗	术后干扰素治疗	术后辅助化疗
胃转移癌临床表现	黑便	上腹疼痛	上腹不适	黑便	呕血黑便	上腹疼痛
胃转移癌部位	胃体胃窦	胃窦	胃体	胃体	胃窦	胃角
CEA(ug/L)	3.974	2.668	3.871	4.183	1.902	2.08
胃镜病理	恶性黑色素瘤	恶性黑色素瘤	肝细胞癌	小细胞未分化癌	透明细胞癌	低分化腺癌
胃转移癌手术	-	-	-	-	胃远端癌根治术	胃远端癌根治术
胃转移癌术后病理	-	-	-	-	透明细胞癌	非典型髓样癌
术后辅助治疗					干扰素治疗	辅助化疗
随访	2 mo死亡	3 mo死亡	5 mo死亡	1年死亡	术后至今9年健在	术后至今2年健在

报道. WHO自2000年提出胃食管结合部(gastroesophageal junction, GEJ)的概念, 将胃—食管分界线上各5 cm之间的区域视为一个独立的解剖学区域, 发生于此区域的腺癌被视为一种疾病—胃食管结合部腺癌(adenocarcinoma of gastroesophageal junction, AGE)或称食管胃结合部腺癌(adenocarcinoma of esophagogastric junction, AEG)^[10]. Saito等^[11]在1985年提出食管癌胃转移的组织学诊断标准: (1)两处病变不管细胞分化程度如何, 组织学类型相同; (2)不考虑血管或淋巴管的侵犯, 两处病灶间不连续; (3)胃内病变不暴露于胃腔内, 若暴露于胃腔内, 肿瘤中心位于胃黏膜下; (4)胃内病变与胃周围性转移性病变不连续; (5)胃内病变与鳞状上皮或胃内鳞状上皮化生不连续. 解剖学上, 胃黏膜下淋巴管丛与食管黏膜下淋巴管网吻合非常丰富^[12], 因此食管癌的黏膜下浸润可蔓延至贲门及胃上段, 而转移灶可自胃黏膜下向胃腔内及胃腔外生长.

黑色素瘤起病隐匿, 发展迅速, 极易转移至肝、脑、肺及淋巴结, 但胃转移者临床尚罕见^[13]. 黑色素瘤根据发生部位不同可分为皮肤及黏膜黑色素瘤两大类^[14]. 黑色素瘤主要通过淋巴道播散, 也可经血行转移, 较为特殊的是黑色素瘤周围卫星结节的形成可能是通过血行或淋巴道转移所致, 后者即称为中途转移^[15]. 临床上黑色素瘤转移至胃肠道的确诊率仅为2%, 而在因黑色素瘤广泛转移而死亡的患者尸检中, 检出率却达到60%^[16], 分析可能与患者非胃肠道临床表现更为明显有关.

肝癌胃转移临床上亦罕见. 肝左外叶癌可通过直接侵犯转移至胃小弯侧. 影像学上同时发现肝脏及胃占位者, 应注意鉴别胃癌肝转移、胃与肝双原发癌及肝癌胃转移. 肝炎病史、血清AFP明显升高及肝内病灶数量有助于鉴别. 肝癌胃转移在病理学上还需与胃肝样腺癌相鉴别, 胃肝样腺癌多见于中老年人, 好发于胃窦, 血清AFP多升高, 癌组织有明显肝样分化, 常伴有肝转移, 预后差^[17,18]. 胃肝样腺癌具有较特殊的病理特征, 组织学上主要由不同而又密切相关的腺癌区和肝样分化区两部分组成^[19]. 免疫组织化学染色CEA及上皮膜抗原CK20呈阳性, 可作为胃肝样腺癌肝转移与肝癌胃转移鉴别的重要标记^[20].

支气管肺癌胃转移在欧美国家及日本报道较多, 而我国报道罕见. 胃作为肺癌的罕见转移部位, 其转移途径可能为血行转移, 亦或含癌细

胞的痰液经吞咽种植于胃内生长, 原发肿瘤多为小细胞未分化癌^[21]. 肺癌胃转移可能与原发肿瘤恶性程度、年龄等因素相关^[22].

肾癌胃转移在临床上极为罕见. 国内仅我院于2003年报道1例^[23], 为肾透明细胞癌胃转移. 肾癌胃转移应为血行转移, 本病患者以60岁以上男性居多. 胃转移的发生距原发肾癌初治时间间隔较长, 其原因不明. 据国外报道, 肾癌发生转移后多预后不良, 中位生存期为12 mo^[24]. 但随着免疫治疗在临床的应用, 预后有所提高. 我们的资料显示, 通过对胃转移癌的根治性切除, 辅以术后免疫治疗, 患者预后良好, 获得了5年以上的无瘤生存, 分析患者得益于以根治性手术为主的综合治疗.

关于乳腺癌胃转移, 国内罕见报道, 而国外报道较多. 原发性乳腺癌胃转移常为小叶癌而非导管癌^[7]. 我院收治乳腺非典型髓样癌胃转移1例. 患者行乳腺癌根治术后进行了系统的全身辅助化疗(6周期), 其间乳腺肿瘤原发部位及淋巴结无复发, 但术后2年出现了远隔胃转移, 故不排除辅助化疗在发挥对乳腺原发癌治疗效果的同时, 促进了癌细胞的迁移. 病理学上, 髓样癌(Medullary carcinoma, MC)是一种界限清楚的肿瘤, 细胞分化差, 排列成大的片状, 无腺样结构, 间质少, 淋巴浆细胞浸润明显. 由于严格的诊断标准的使用, 据报道其约占所有乳腺癌的5%-7%^[25,26]. 2003年WHO发布了乳腺癌肿瘤学分型标准^[27], 其中包括典型髓样癌(typical medullary carcinoma, TMC)与非典型髓样癌(atypical medullary carcinoma, AMC)的诊断标准. 预后方面, 乳腺典型髓样癌要优于非典型髓样癌^[28].

总之, 我们的资料提示, 胃转移癌是一种极其罕见的继发性肿瘤, 其原发部位以食管癌多见. 患者多有原发肿瘤史, 临床表现不易与原发性胃癌鉴别, 其诊断主要依赖于原发肿瘤病史及病理组织学检查, 预后较差, 尽早诊断并手术可改善预后. 对有根治性切除机会的患者, 应积极手术治疗.

4 参考文献

- 1 金博, 王海江, 赵泽亮, 王琦三, 帕尔哈提·沙依木. 胃转移癌二例. 中华胃肠外科杂志 2012; 15: 184
- 2 余奇侠, 杜云华. 卵巢的胃转移癌20例临床分析. 中华医学杂志 2001; 25: 248
- 3 夏庆安, 张志勇, 胡月明. 乳腺癌胃转移1例. 第三军医大学学报 2009; 31: 2298-2305
- 4 Majerus B, Timmermans M. [Gastric metastases of ovarian adenocarcinoma. Apropos of a case]. Acta Chir Belg 1990; 90: 166-171

■名词解释

胃转移癌: 癌细胞从原发部位经血管、淋巴管或其他途径侵袭至胃部继续生长, 形成与原发肿瘤相同类型的肿瘤, 其在概念上应注意与转移性胃癌如Krukenberger瘤等概念相区别, 后者为原发灶为胃癌的转移性肿瘤.

■同行评价

胃转移癌的临床发病率底, 本文有很好的临床价值和指导意义。

- 5 Green LK. Hematogenous metastases to the stomach. A review of 67 cases. *Cancer* 1990; 65: 1596-1600
- 6 Oda H, Yamao T, Saito D, Ono H, Gotoda T, Yamaguchi H, Yoshida S, Shimoda T. Metastatic tumors to the stomach: analysis of 54 patients diagnosed at endoscopy and 347 autopsy cases. *Endoscopy* 2001; 33: 507-510
- 7 Hsu CC, Chen JJ, Changchien CS. Endoscopic features of metastatic tumors in the upper gastrointestinal tract. *Endoscopy* 1996; 28: 249-253
- 8 Jung HJ, Lee HY, Kim BW, Jung SM, Kim HG, Ji JS, Choi H, Lee BI. Gastric Metastasis from Ovarian Adenocarcinoma Presenting as a Submucosal Tumor without Ulceration. *Gut Liver* 2009; 3: 211-214
- 9 郝安林. 食管癌胃转移14例. 中国肿瘤临床与康复 2004; 11: 364
- 10 Hamilton SR, Aaltonen LA. World Health Organization Classification of Tumors. Pathology & Genetics. Tumors of the Digestive System. Lyon: IARC Press, 2000: 11-36
- 11 Saito T, Iizuka T, Kato H, Watanabe H. Esophageal carcinoma metastatic to the stomach. A clinicopathologic study of 35 cases. *Cancer* 1985; 56: 2235-2241
- 12 夏穗生. 实用腹部外科手术技巧. 天津: 天津科学技术出版社, 2006: 423
- 13 王国华. 恶性黑色素瘤胃转移5例X线分析. 中国误诊学杂志 2006; 6: 2212-2213
- 14 刘南, 张栋. 口腔黏膜恶性黑色素瘤胃十二指肠转移一例. 中华消化内镜杂志 2009; 26: 38
- 15 孙静阳, 胡波, 于晶功, 裴笑月. 胃转移性恶性黑色素瘤1例. 世界华人消化杂志 2010; 18: 1928-1931
- 16 Stukavec J, Horák L. [The malignant melanoma metastasis into the stomach corpus]. *Rozhl Chir* 2005; 84: 148-150
- 17 Roberts CC, Colby TV, Batts KP. Carcinoma of the stomach with hepatocyte differentiation (hepatoid adenocarcinoma). *Mayo Clin Proc* 1997; 72: 1154-1160
- 18 Chang YC, Nagasue N, Kohno H, Taniura H, Uchida M, Yamanoi A, Kimoto T, Nakamura T. Clinicopathologic features and long-term results of alpha-fetoprotein-producing gastric cancer. *Am J Gastroenterol* 1990; 85: 1480-1485
- 19 卢震海, 万德森, 潘志忠, 张惠忠. 胃肝样腺癌1例报告附文献复习. 癌症 2004; 23: 110-112
- 20 占春玲, 吴保平, 张亚历. 原发性肝癌胃转移1例分析. 中国误诊学杂志 2007; 7: 1333-1334
- 21 陈晖, 林瑶光, 刘荧. 老年肺癌并胃转移1例报告. 广西医科大学学报 2004; 21: 766
- 22 张文, 陈玮, 成媛. 支气管未分化小细胞癌胃转移1例. 实用医技杂志 2005; 12: 3196
- 23 陈鹏, 王琦三, 章佳新. 肾癌胃转移1例. 临床肿瘤学杂志 2003; 8: 398
- 24 Rubins J. Metastatic renal cell carcinoma: response to treatment with human recombinant erythropoietin. *Ann Intern Med* 1995; 122: 676-677
- 25 顾雅佳, 周康荣, 陈丹箴, 王玖华, 张廷璆. 乳腺癌的X线表现及病理基础. 中华放射学杂志 2003; 37: 439-444
- 26 Guo X, Fan Y, Lang R, Gu F, Chen L, Cui L, Pringle GA, Zhang X, Fu L. Tumor infiltrating lymphocytes differ in invasive micropapillary carcinoma and medullary carcinoma of breast. *Mod Pathol* 2008; 21: 1101-1107
- 27 Böcker W. [WHO classification of breast tumors and tumors of the female genital organs: pathology and genetics]. *Verh Dtsch Ges Pathol* 2002; 86: 116-119
- 28 邹佳霖, 于诗香, 马琳琳. 乳腺髓样癌的超声表现及临床意义. 医学影像学杂志 2006; 16: 721-724

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 •

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)

非淤胆型婴儿巨细胞病毒性肝炎治疗68例

辜芳, 罗晓明

辜芳, 温州医学院 浙江省温州市 325035

罗晓明, 浙江省人民医院儿科 浙江省杭州市 310014

作者贡献分布: 辜芳与罗晓明对此文所作贡献均等; 此课题由辜芳与罗晓明设计; 研究过程由辜芳与罗晓明操作完成; 数据分析由辜芳完成; 论文写作由辜芳与罗晓明完成。

通讯作者: 罗晓明, 教授, 310014, 浙江省杭州市, 浙江省人民医院儿科。xml_lm@yahoo.com.cn

电话: 0571-85893626

收稿日期: 2012-05-18 修回日期: 2012-07-08

接受日期: 2012-07-20 在线出版日期: 2012-08-08

Treatment of non-cholestatic cytomegalovirus hepatitis in infants: An analysis of 68 cases

Fang Gu, Xiao-Ming Luo

Fang Gu, Wenzhou Medical College, Wenzhou 325035, Zhejiang Province, China

Fang Gu, Xiao-Ming Luo, Department of Pediatrics, Zhejiang Province Hospital, Hangzhou 310014, Zhejiang Province, China

Correspondence to: Xiao-Ming Luo, Professor, Department of Pediatrics, Zhejiang Province Hospital, Hangzhou 310014, Zhejiang Province, China. xml_lm@yahoo.com.cn

Received: 2012-05-18 Revised: 2012-07-08

Accepted: 2012-07-20 Published online: 2012-08-08

Abstract

AIM: To investigate treatment options for infants with non-cholestatic cytomegalovirus (CMV) hepatitis.

METHODS: Sixty-eight infants with non-cholestatic CMV hepatitis who were treated at our hospital between December 2008 and July 2010 were divided into two groups: treatment group ($n = 34$) and control group ($n = 34$). All infants were given compound glycyrrhizin at a dose of 2 mg/(kg·d) for 3 weeks. The therapy group was additionally treated with ganciclovir at a dose of 10 mg/(kg·d) for 2 weeks and 5 mg/(kg·d) for one more week.

RESULTS: The response rate was 94.1% in the treatment group and 91.1% in the control group. Serum levels of aminotransferases (ALT, AST), total bilirubin (TBIL), gamma-glutamyl transpeptidase (GGT), and alkaline phosphatase (ALP) had a significant decrease after treatment

in the two groups (all $P < 0.05$), while direct bilirubin (DBIL) and total bile acid (TBA) showed no significant changes (both $P > 0.05$). All these parameters had no significant differences between the two groups either before or after therapy (all $P > 0.05$). During one-year follow-up period, 5 infants were lost to follow-up, and hepatic function parameters were normal in the remaining infants. The positive rate of urine CMV-DNA was 54.5% in the treatment group and 50% in the control group ($P > 0.05$).

CONCLUSION: Routine antiviral therapy with ganciclovir is not recommended in infants with non-cholestatic CMV hepatitis.

Key Words: Ganciclovir; Compound glycyrrhizin; Infants; Non-cholestatic; Cytomegalovirus hepatitis

Gu F, Luo XM. Treatment of non-cholestatic cytomegalovirus hepatitis in infants: An analysis of 68 cases. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2012; 20(22): 2097-2100

摘要

目的: 探讨非淤胆型婴儿巨细胞病毒性肝炎的治疗方法。

方法: 选择2008-01/2010-07本院儿科住院的68例非淤胆型婴儿巨细胞病毒性肝炎患儿, 随机分为治疗组34例和对照组34例, 均予复方甘草酸苷2 mL/(kg·次), 1次/d, 共3 wk。治疗组加用更昔洛韦5 mg/(kg·次), 2次/d, 2 wk; 1次/d, 1 wk。

结果: 治疗组和对照组总有效率分别为94.1%和91.1%, 治疗3 wk复查肝功能指标结果提示丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天门冬氨酸氨基转移酶(AST)、总胆红素(total bilirubin, TBIL)、谷氨酰转肽酶(gamma glutamyl transpeptidase, GGT)和碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)指标较治疗前均明显下降, 差异有显著意义($P < 0.05$); 直接胆红素(direct bilirubin, DBIL)、总胆汁酸(total bile acid, TBA)指标较治疗前均无明显变化, 差异无显著意义($P > 0.05$)。治疗前或治疗后2组间比较上述指标差异无显著意义($P > 0.05$)。随访1年, 失访5人, 余患儿肝功能均正常; 尿CMV-DNA,

■背景资料

更昔洛韦是治疗淤胆型婴儿巨细胞病毒性肝炎的有效药物, 而非淤胆型婴儿巨细胞病毒性肝炎是否需要更昔洛韦治疗尚存在争议。

■同行评议者

施诚仁, 教授, 上海交通大学医学院附属新华医院小儿外科

■应用要点

本研究旨在探讨非淤胆型婴儿巨细胞病毒性肝炎的治疗方法,为临床医师选择合理的治疗方案提供理论基础。

治疗组18人(54.5%)阳性,对照组15人(50.0%)阳性,差异无显著意义($P>0.05$)。

结论: 非淤胆型婴儿巨细胞病毒性肝炎不建议常规予更昔洛韦抗病毒治疗。

关键词: 更昔洛韦; 复方甘草酸苷; 婴儿; 非淤胆型; 巨细胞病毒性肝炎

辜芳, 罗晓明. 非淤胆型婴儿巨细胞病毒性肝炎治疗68例. 世界华人消化杂志 2012; 20(22): 2097-2100
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/2097.asp>

0 引言

巨细胞病毒(cytomegalovirus, CMV)在自然界中广泛存在, 胎儿及免疫力低下的婴儿易受其损害. 肝脏是CMV感染的重要靶器官, CMV侵犯肝脏后可引起黄疸、肝脏肿大和肝功能损害(婴儿CMV肝炎)^[1]. 淤胆型婴儿CMV肝炎可能引起胆汁性肝硬化, 甚至胆道闭锁, 预后不良. Ozkan等^[2]用更昔洛韦治疗淤胆型CMV肝炎有较好的疗效. 非淤胆型婴儿CMV肝炎常预后良好, 对这类病人是否需要抗病毒治疗目前存在争议. 本研究比较护肝治疗加更昔洛韦抗病毒治疗和单纯护肝治疗非淤胆型婴儿CMV肝炎, 观察治疗效果, 总结如下。

1 材料和方法

1.1 材料 选择2008-01/2010-07浙江省人民医院儿科收治的68例非淤胆型婴儿CMV肝炎患儿. CMV感染诊断符合中华医学会儿科分会消化组巨细胞病毒感染诊断方案^[3]. 非淤胆型肝炎诊断符合: 肝功能损害伴或不伴肝脏肿大, 同时排除甲、乙、丙、丁和戊型肝炎病毒、TORCH中其他病毒引起的肝炎, 药物性肝炎和缺氧、中毒引起的肝损害. 无皮肤瘙痒及大便颜色变浅或呈白陶土色. 直接胆红素(direct bilirubin, DBIL)<20%的总胆红素(total bilirubin, TBIL), 谷氨酰转肽酶(gamma glutamyl transpeptidase, GGT)不超过正常上限的2倍, 总胆汁酸(total bile acid, TBA)在正常范围. 其中男41例, 女27例, 年龄0-1岁, <3 mo 47例, <6 mo 18例, <1岁3例. 将所有患儿随机分为治疗组和对照组, 2组患儿的年龄、性别、胎龄和出生体重无统计学意义($P>0.05$), 具有可比性。

1.2 方法

1.2.1 治疗: 治疗组采用更昔洛韦(丽科伟, 湖北科益药业股份有限公司生产)抗病毒治疗. (1)诱

导期: 更昔洛韦5 mg/(kg·次), 2次/d, 持续2 wk; (2)维持期: 更昔洛韦5 mg/(kg·次), 1次/d, 持续1 wk. 诱导期和维持期均予复方甘草酸苷注射液(美能, 日本米罗株式会社生产)2 mL/(kg·次), 1次/d, 持续3 wk. 对照组患者予复方甘草酸苷注射液(美能)2 mL/(kg·次), 1次/d, 持续3 wk.

1.2.2 观察项目: 血丙氨酸氨基转移酶(alanine aminotransferase, ALT)、天门冬氨酸氨基转移酶(aspartate aminotransferase, AST)、TBIL、DBIL、GGT、碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)、TBA以及尿CMV-DNA.

1.2.3 测定: (1)肝功能. 空腹静脉血2 mL静置后留取血清备用. ALT、AST、GGT和ALP均采用速率法, TBIL、DBIL采用终点重氮法, TBA采用循环酶法. 采用奥林巴斯公司提供的试剂. 采用美国Beckman公司Synchron[△]CX7全自动生化分析仪; (2)尿CMV-DNA. 连续3次留清洁中段尿5 mL送检. 采用尿CMV荧光定量聚合酶链反应(FQ-PCR)法, 采用广州达安公司生产的人巨细胞病毒(HCMV)核酸扩增荧光定量检测试剂盒, 按说明书进行操作。

1.2.4 疗效判断标准: (1)治愈: ALT和AST降至正常; (2)好转: 以上值均明显下降但仍高于正常; (3)无效: 治疗前后肝功能指标无明显变化, 或治疗过程中出现肝功能指标升高。

1.2.5 随访: 随访1年, 复查肝功能和CMV-DNA(尿液)。

统计学处理 采用国际通用的SPSS10.0进行分析, 计量资料以mean±SD表示, 采用 t 检验, 计数资料采用 χ^2 检验, 以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 治疗结果 治疗组: 治愈29例, 好转3例, 无效2例, 总有效率94.1%; 对照组: 治愈30例, 好转1例, 无效3例, 总有效率91.1%, 经统计学处理, 两组治疗效果无显著差异($P>0.05$)。

2.2 肝功能指标 比较治疗前后两组患儿ALT、AST、TBIL、GGT和ALP, 差异有显著意义($P<0.05$), 比较治疗前后DBIL和TBA, 差异无显著意义($P>0.05$). 治疗前两组患儿ALT、AST、TBIL、DBIL、GGT、ALP和TBA比较, 差异无显著意义($P>0.05$), 治疗后两组患儿ALT、AST、TBIL、DBIL、GGT、ALP、TBA比较, 差异无显著意义($P>0.05$, 表1)。

2.3 不良反应 治疗组和对照组患儿在治疗过程

表 1 两组患儿肝功能指标比较 (mean ± SD)

检测指标	治疗组						对照组					
	治疗前	治疗后	<i>t</i>	^a <i>P</i>	<i>t</i>	^b <i>P</i>	治疗前	治疗后	<i>t</i>	^c <i>P</i>	<i>t</i>	^d <i>P</i>
ALT(U/L)	73.23 ± 25.63	44.21 ± 5.32	3.475	<0.01	2.131	>0.05	70.37 ± 31.21	41.38 ± 4.76	3.431	<0.01	1.76	>0.05
AST(U/L)	132.56 ± 45.83	55.11 ± 17.32	3.941	<0.01	1.682	>0.05	151.00 ± 56.78	53.87 ± 18.27	4.842	<0.01	1.324	>0.05
TBIL(μmol/L)	161.32 ± 17.71	37.56 ± 8.28	2.069	<0.05	0.678	>0.05	162.79 ± 15.79	35.89 ± 9.91	4.842	<0.01	0.856	>0.05
DBIL(μmol/L)	24.31 ± 0.72	16.75 ± 0.31	1.797	>0.05	1.273	>0.05	22.23 ± 0.79	15.67 ± 0.43	1.453	>0.05	1.541	>0.05
GGT(U/L)	58.65 ± 45.83	45.29 ± 36.39	2.152	<0.05	1.782	>0.05	60.11 ± 39.87	44.09 ± 33.59	1.874	<0.05	1.664	>0.05
ALP(U/L)	240.47 ± 61.92	224.88 ± 48.14	3.176	<0.05	1.992	>0.05	220.97 ± 51.54	217.98 ± 51.14	3.003	<0.05	1.493	>0.05
TBA(μmol/L)	12.78 ± 7.14	14.04 ± 10.67	0.590	>0.05	1.291	>0.05	11.89 ± 5.43	9.81 ± 8.64	0.553	>0.05	0.951	>0.05

^a: 治疗组治疗前后比较; ^b: 治疗前两组比较; ^c: 对照组治疗前后比较; ^d: 治疗后两组比较。

中分别有8例患儿和1例患儿出现中性粒细胞减少, 差异有显著意义($\chi^2 = 4.996, P < 0.05$); 分别有7例患儿和1例患儿出现血小板减少, 差异有显著意义($\chi^2 = 3.861, P < 0.05$)。

2.4 随访1年 随访1年时复查, 治疗组失访1人, 对照组失访4人, 其余随访患儿ALT和AST均在正常范围, 尿CMV-DNA, 治疗组18人(54.5%)阳性, 对照组15人(50.0%)阳性, 差异无显著意义($\chi^2 = 0.012, P > 0.05$)。

3 讨论

CMV在人群中感染率很高, 特别是婴儿, 感染率高达42%。CMV感染常引起各系统的损害, 以CMV肝炎和CMV肺炎最常见^[4,5]。CMV肝炎是一种最常见的严重危害婴儿健康的肝脏疾病。婴儿CMV肝炎发病机制有2种, 其一为CMV大量复制造成直接损伤; 其二为CMV引起的异常免疫反应引起肝细胞损害, 包括了细胞免疫和体液免疫。清除CMV和抑制自身免疫损伤是治疗CMV肝炎的关键。婴儿CMV肝炎的临床表现同其他病毒性肝炎一样, 主要表现为乏力、食欲减退、恶心、呕吐、肝肿大及肝功能损害, 部分病人可有黄疸和发热。其中淤胆型婴儿CMV肝炎是其重型, 主要表现为黄疸进行性加重, 胆管直接闭塞, 胆汁淤积性肝硬化, 严重者甚至危及生命^[6]。目前多数研究结果支持淤胆型婴儿CMV肝炎早期使用更昔洛韦抗病毒治疗可取得较好的疗效^[7-9]。非淤胆型婴儿CMV肝炎临床

症状轻, 一般不会引起肝脏的严重后果, 是否需要抗病毒治疗, 目前存在争论。部分学者认为, 对于有明确的CMV感染的证据, 就可以抗病毒治疗^[10]。也有学者认为不需要抗病毒治疗, 常规护肝治疗即可取得好的疗效^[11]。而常规的抗病毒治疗过程及药物不良反应会增加社会的经济负担和患儿的痛苦。为了观察更昔洛韦在非淤胆型婴儿CMV肝炎治疗中的作用, 本研究把诊断为非淤胆型婴儿CMV肝炎的患儿分为2组, 均予复方甘草酸苷护肝治疗, 治疗组加用更昔洛韦, 观察治疗效果, 以探讨更昔洛韦治疗非淤胆型婴儿CMV肝炎的利弊。结果表明两种治疗方案的治疗总有效率分别为94.1%和91.1%, 差异无显著意义。治疗3 wk后两组患儿ALT、AST、TBIL、GGT和ALP较治疗前均显著下降, 差异有显著意义。以上各指标治疗后2组间比较差异无显著意义。说明从近期疗效来看, 是否加用更昔洛韦治疗非淤胆型婴儿CMV肝炎, 疗效并无差别。那么更昔洛韦治疗非淤胆型婴儿CMV肝炎的远期疗效呢? 更昔洛韦是一种广谱的抗DNA病毒药物, 主要是通过竞争性抑制病毒DNA聚合酶, 及渗入病毒DNA终止病毒DNA链的延长, 从而抑制病毒DNA在体内的复制。由于他在感染细胞内的浓度是非感染细胞的100倍, 且不易产生耐药性, 而成为治疗CMV肝炎的关键药^[12,13]。但他终究只是一种病毒抑制剂, 只能抑制产毒性感染, 在治疗过程中, 使CMV的分泌量减少, 停药后仍会复原到原水平。疱疹病毒

■名词解释

婴儿巨细胞病毒性肝炎: 是指在婴儿期(包括新生儿期)发生, 由人巨细胞病毒引起的肝脏疾病, 是目前我国儿科和婴儿期最常见的一种肝脏疾病。

■同行评价

本文报道非淤胆型婴儿巨细胞病毒肝炎治疗方法共68例, 适合普通基层学习, 也对综合医院专科医师有一定帮助。

独有的能逃避免疫机制以免被凋亡和杀灭的特性, 作为其中之一的CMV具有同样的特点, 因此很难被彻底清除。目前研究认为更昔洛韦治疗CMV肝炎的远期疗效尚不确定。Vancikova等^[11]研究发现更昔洛韦对于CMV急性期感染效果显著, 但是长期的有效性差, 对CMV引起的胆汁排泄异常, 肝纤维化无明显的治疗作用。本研究病例1年随访中, 尚未观察到肝功能异常, 同时尿CMV-DNA阳性率分别恢复到54.5%和50%, 无明显差异。表明更昔洛韦治疗非淤胆型CMV肝炎并无确切的远期疗效, 有必要进行更长时间的随访研究。

本研究还发现更昔洛韦抗病毒治疗过程中常有不良反应: 骨髓抑制。更昔洛韦抑制病毒复制, 与此同时体内增生活跃的骨髓也可能被抑制, 临床上主要表现为粒细胞和血小板减少^[14,15]。在治疗过程中观察到治疗组有8例患儿出现粒细胞减少, 1例患儿出现血小板减少, 而对照组只有1名患儿同时出现粒细胞与血小板的下降, 差异有显著意义。

总之, 更昔洛韦治疗非淤胆型婴儿CMV肝炎, 与单纯护肝治疗相比并无明显优点, 且有一定的副作用, 不建议纳入常规的治疗方案, 有必要增加病例量及进行更长时间的随访进一步研究。

4 参考文献

- 1 董永绥. 婴儿巨细胞病毒性肝炎(上). 临床儿科杂志 2006; 24: 74-77
- 2 Ozkan TB, Mistik R, Dikici B, Nazlioglu HO. Anti-

- viral therapy in neonatal cholestatic cytomegalovirus hepatitis. *BMC Gastroenterol* 2007; 7: 9
- 3 中华医学会儿科学分会感染消化学组. 巨细胞病毒感染诊断方案. 中华儿科杂志 1999; 37: 441
- 4 王静, 陶枫. 婴幼儿巨细胞病毒肺炎42例临床分析. 天津医药 2012; 40: 294-295
- 5 王宝香, 朱润庆. 婴儿肝炎综合症、胆道闭锁、胆总管囊肿与巨细胞病毒感染的关系. 世界华人消化杂志 2006; 14: 1745-1747
- 6 Goedhals D, Kriel J, Hertzog ML, Janse van Rensburg MN. Human cytomegalovirus infection in infants with prolonged neonatal jaundice. *J Clin Virol* 2008; 43: 216-218
- 7 刘汉嘉, 覃肇源, 李剑波, 黎银焕. 更昔洛韦治疗婴儿淤胆型巨细胞病毒性肝炎的疗效研究. 实用医学杂志 2010; 26: 660-662
- 8 Tezer H, Seçmeer G, Kara A, Ceyhan M, Cengiz AB, Devrim I, Us D, Yüce A, Gürakan F, Yildirim I, Ozen H, Saltik-Temizel IN. Cytomegalovirus hepatitis and ganciclovir treatment in immunocompetent children. *Turk J Pediatr* 2008; 50: 228-234
- 9 刘葵. 更昔洛韦治疗新生儿淤胆型巨细胞病毒性肝炎的疗效观察. 中国新生儿科杂志 2009; 24: 307-308
- 10 熊亮. 更昔洛韦治疗婴儿巨细胞病毒肝炎的临床疗效评价及对细胞因子的影响. 细胞与分子免疫学杂志 2010; 26: 1130-1132
- 11 Vanckov Z, Kucerov T, Pelikn L, Zikmundov L, Priglov M. Perinatal cytomegalovirus hepatitis: To treat or not to treat with ganciclovir. *Paediatr Child Health* 2004; 40: 444-448
- 12 Okulu E, Akin IM, Atasay B, Ciftçi E, Arsan S, Türmen T. Severe postnatal cytomegalovirus infection with multisystem involvement in an extremely low birth weight infant. *J Perinatol* 2012; 32: 72-74
- 13 吴俊峰, 方维民. 更昔洛韦治疗婴儿巨细胞病毒肝炎疗效观察. 医学理论与实践 2011; 21: 85-86
- 14 刘文君, 刘斌, 郭渠莲, 张迎春, 袁亚杰, 付晓冬, 邓正华, 林江. 更昔洛韦和黄芪对巨细胞病毒感染所致造血祖细胞增殖抑制的影响. 中华儿科杂志 2004; 42: 490-494
- 15 贺晓日, 陈平洋, 王涛, 谢宗德, 胡劲涛, 薄涛, 盖建芳. 不同剂量更昔洛韦治疗新生儿先天性巨细胞病毒感染的临床观察. 中国当代儿科杂志 2009; 11: 641-644

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 总被引频次排名位于第 174 名

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

腹腔镜联合胆道镜在重症急性胰腺炎继发胰腺脓肿中的应用

赵林, 秦鸣放, 李宁, 勾承月, 郑明伟, 戴其利

赵林, 天津医科大学研究生院 天津市 300070
秦鸣放, 李宁, 勾承月, 郑明伟, 戴其利, 天津市南开医院微创外科中心 天津市 300100
赵林, 硕士, 主要从事微创外科方面的研究。
作者贡献分布: 赵林与秦鸣放对此文所作贡献均等; 此研究由赵林与秦鸣放设计; 研究过程由秦鸣放、李宁、勾承月、郑明伟、戴其利及赵林操作完成; 数据分析由赵林完成; 本论文写作由赵林与秦鸣放完成。
通讯作者: 秦鸣放, 教授, 300100, 天津市南开三纬路, 天津市南开医院微创外科中心. zhaolinyuanfen@yahoo.com.cn
电话: 022-27435267
收稿日期: 2012-03-30 修回日期: 2012-06-06
接受日期: 2012-06-30 在线出版日期: 2012-08-08

Laparoscopy combined with cholangioscopy for the treatment of pancreatic abscess after severe acute pancreatitis

Lin Zhao, Ming-Fang Qin, Ning Li, Cheng-Yue Gou, Ming-Wei Zheng, Qi-Li Dai

Lin Zhao, Graduate School of Tianjin Medical University, Tianjin 300100, China
Ming-Fang Qin, Ning Li, Cheng-Yue Gou, Ming-Wei Zheng, Qi-Li Dai, Center for Minimally Invasive Surgery, Nankai Hospital, Tianjin 300100, China
Correspondence to: Ming-Fang Qin, Professor, Center for Minimally Invasive Surgery, Nankai Hospital, Tianjin 300100, China. zhaolinyuanfen@yahoo.com.cn
Received: 2012-03-30 Revised: 2012-06-06
Accepted: 2012-06-30 Published online: 2012-08-08

Abstract

AIM: To evaluate the value of laparoscopy combined with cholangioscopy in the treatment of pancreatic abscess after severe acute pancreatitis.

METHODS: The clinical data for 38 patients with pancreatic abscess after severe acute pancreatitis who underwent laparoscopy and cholangioscopy co-therapy or open surgery in Nankai Hospital from June 2000 to June 2011 were retrospectively analyzed, including general information, operative time, intraoperative blood loss, postoperative intestinal recovery time, WBC and liver function changes, postoperative complications, mortality, hospital stay, and hospitalization costs.

RESULTS: The laparoscopy and cholangioscopy co-therapy group had no significant differences with the open group in general information, patient composition, operative time, hospital stay, and mortality. However, significant differences were noted in intraoperative blood loss ($108 \text{ mL} \pm 18 \text{ mL}$ vs $137 \text{ mL} \pm 25 \text{ mL}$), postoperative intestinal recovery time ($26.8 \text{ h} \pm 9.7 \text{ h}$ vs $31 \text{ h} \pm 10.1 \text{ h}$), liver function changes at 2 weeks postoperatively (ALP: $76.7 \text{ U/L} \pm 12.6 \text{ U/L}$ vs $83.2 \text{ U/L} \pm 13.6 \text{ U/L}$; GGT: $60.3 \text{ U/L} \pm 14.1 \text{ U/L}$ vs $67.1 \text{ U/L} \pm 13.8 \text{ U/L}$), incidence of postoperative complications (19.0% vs 41.2%), hospitalization costs (49.3 ± 0.9 thousand Yuan vs 43.2 ± 0.6 thousand Yuan) between the two groups (all $P < 0.05$).

CONCLUSION: Laparoscopy and cholangioscopy co-therapy is a safe, effective, and minimally invasive treatment for pancreatic abscess after severe acute pancreatitis but is associated with higher cost and longer operation time and hospital stay.

Key Words: Severe acute pancreatitis; Laparoscopy; Cholangioscopy; Pancreatic abscess

Zhao L, Qin MF, Li N, Gou CY, Zheng MW, Dai QL. Laparoscopy combined with cholangioscopy for the treatment of pancreatic abscess after severe acute pancreatitis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2012; 20(22): 2101-2105

摘要

目的: 探讨腹腔镜、胆道镜联合应用在重症急性胰腺炎继发胰腺脓肿中的临床应用价值。

方法: 回顾性分析我院2000-06/2011-06随机使用腹腔镜、胆道镜联合及开腹手术治疗重症急性胰腺炎继发胰腺脓肿的38例患者, 包括一般资料、手术时间、术中出血量、术后肠道功能恢复时间、术后白细胞、肝功能变化、术后并发症、死亡率、住院时间、住院费用等。

结果: 腹腔镜、胆道镜联合治疗组和开腹组在患者组成、手术时间、住院时间、死亡率

■背景资料

胰腺脓肿(PA)是重症急性胰腺炎(SAP)的严重并发症, 死亡率极高, 传统治疗以开腹为主, 腹腔镜、胆道镜等微创技术的应用, 为PA治疗提供了新的思路。

■同行评议者

谷俊朝, 主任医师, 首都医科大学附属北京友谊医院普外科; 刘颖斌, 主任医师, 上海交通大学医学院附属新华医院

■研发前沿

近年关于PA的研究指向主要是手术入路的选择, 保证引流充分, 并发症的减少等方面。

等方面无统计学差异, 治疗组在术中失血量($108.2\text{ mL} \pm 18.1\text{ mL}$ vs $137.4\text{ mL} \pm 25.2\text{ mL}$)、术后肠道恢复时间($26.8\text{ h} \pm 9.7\text{ h}$ vs $31\text{ h} \pm 10.1\text{ h}$)、术后肝功能变化(碱性磷酸酶: $76.7\text{ U/L} \pm 12.6\text{ U/L}$ vs $83.2\text{ U/L} \pm 13.6\text{ U/L}$; 谷氨酰转氨酶计数: $60.3\text{ U/L} \pm 14.1\text{ U/L}$ vs $67.1\text{ U/L} \pm 13.8\text{ U/L}$)、术后并发症(19.0% vs 41.2%)、住院费用($49.3\text{ 千元} \pm 0.9\text{ 千元}$ vs $43.2\text{ 千元} \pm 0.6\text{ 千元}$)上与对照组差异显著($P < 0.05$)。

结论: 腹腔镜、胆道镜联合治疗重症急性胰腺炎继发胰腺脓肿安全可靠、更加合理, 有一定临床意义, 但其费用较高, 手术时间及住院时间稍长, 需加以改进。

关键词: 重症急性胰腺炎; 腹腔镜; 胆道镜; 胰腺脓肿

赵林, 秦鸣放, 李宁, 勾承月, 郑明伟, 戴其利. 腹腔镜联合胆道镜在重症急性胰腺炎继发胰腺脓肿中的应用. 世界华人消化杂志 2012; 20(22): 2101-2105

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/2101.asp>

0 引言

胰腺脓肿(pancreatic abscess, PA)是重症急性胰腺炎(severe acute pancreatitis, SAP)的严重并发症之一, 应及早确诊并治疗. 开腹行胰腺脓肿及坏死组织清除、胰周引流及腹腔灌洗是传统最主要的治疗方法. 近年来随着微创技术的发展, 外科医生逐渐将腹腔镜技术用于治疗PA. 我院2000-06/2011-06使用腹腔镜、胆道镜联合治疗SAP继发PA患者, 效果良好, 现总结报道如下。

1 材料和方法

1.1 材料 本组38例均以SAP入院, 最终经手术确诊为PA. 其中男16例, 女22例, 年龄25-61岁(平均 $40.7\text{ 岁} \pm 20.7\text{ 岁}$). 术前伴胆囊结石者11例, 伴胆管结石者5例, 伴冠心病者7例, 高血压4例, 慢性胃炎2例, 慢性支气管炎2例, 既往行阑尾切除术者3例, 无严重影响手术之内科疾病. 38例入院后经胃肠减压、抗感染、补液、抑酸、抑酶、抗休克、维持水电解质平衡等治疗, 症状及腹部体征逐渐减轻, 但在入院后10-37 d(平均 $21.2\text{ d} \pm 19.1\text{ d}$), 病情变化临床表现为腹痛38例, 腹胀34例, 寒战发热(体温 $>38\text{ }^{\circ}\text{C}$)32例, 恶心呕吐27例, 黄疸12例, 腹部包块29例. 白细胞计数增高35例($10.5\text{--}26.5 \times 10^9/\text{L}$), 尿淀粉酶增高17例($570\text{--}4\,620\text{ U/L}$), 肝功能异常29例, 穿刺脓液淀粉酶升高18例, 细菌培养阳性者31例, 胸部X检查发现胸腔积液28例, CT或B超检查可见有胰

腺或胰周囊性包块, 壁厚不规则, 囊内容物密度均匀或不均匀. 脓肿最低可达骶前, 数目1-8个, 直径2.8-11.3 cm. 据此, 高度怀疑脓肿存在并伴有感染, 遂行手术治疗. 将PA患者随机分为腹腔镜、胆道镜联合治疗组(微创组)及开腹组, 其中微创组21例, 开腹组17例. 其操作均由我科有20年以上丰富手术经验的2位主任医师主持。

1.2 方法 微创组及开腹组在一般资料组成上均无统计学差异($P > 0.05$, 表1)。

1.2.1 手术处理: (1)微创组21例行腹腔镜胰腺脓肿及胰周坏死组织清除、胰周引流、腹腔灌洗术. 取仰卧位, 全身麻醉, 四孔法入腹(脐下约1 cm为进镜孔, 右上腹锁骨中线肋缘下4 cm为主操作孔, 左锁骨中线肋缘下4 cm及左侧腋前线肋缘下3 cm为辅助操作孔), 建立气腹后探查腹腔, 以超声刀或者Ligasure经胃结肠韧带切开小网膜囊显露胰腺前侧, 然后切开十二指肠降段外侧腹膜及远侧胰腺下缘腹膜, 经脾下缘暴露远侧胰腺下缘, 探查腹膜后、胰后、升、降结肠后部, 也可经横结肠系膜根部或肝胃韧带切开进入脓腔探查, 可见坏死组织范围可从胰周至肝肾、脾肾间隙及结肠旁沟的腹膜后间隙, 最低处可达骶骨前. 将脓腔内纤维隔打通, 机械清创, 吸引器尽量将胰腺坏死组织及脓液清除干净, 留取脓液送培养和药敏. 有7例同时行腹腔镜胆囊切除术, 3例行腹腔镜胆囊切除+胆管探查术. 处理干净腹腔渗液后, 根据脓腔情况决定引流管的大小、数量和放置部位. 停止气腹后, 可吸收线间断缝合腹直肌前鞘及皮下组织, 结束手术. 术后继续术前常规胰腺炎治疗方法, 同时用抗生素盐水腹腔冲洗, 保持引流通畅, 间断拔除引流管. 若怀疑脓肿再发, 则可行胆道镜探查并脓肿穿刺引流术, 必要时再次腹腔镜甚至开腹操作; (2)对照组17例常规行开腹胰腺坏死组织清除、脓肿引流、胰周引流术; 有4例同时行开腹胆囊切除, 2例行胆囊切除、胆管探查取石术, 1例行空肠造瘘术, 1例行胆肠吻合术. 术后可疑脓肿再发再次行剖腹探查、脓肿及坏死组织清除、引流术。

1.2.2 观察指标: 手术时间, 术中出血量, 术后排便时间, 术后2 wk白细胞计数、碱性磷酸酶、谷氨酰转氨酶计数, 住院时间, 住院费用, 术后并发症、死亡率等。

统计学处理 数据用SPSS13.0软件进行计算机处理, 计量资料采用 $\text{mean} \pm \text{SD}$ 表示, 采用 t 检验; 率的比较采用 χ^2 检验. $P < 0.05$ 为有显著性差异。

■相关报道

Alverdy和Horvathd等探索腹腔PA外引流术的优点, 但未涉及适应证及胆道镜的应用。

表 1 腹腔镜、胆道镜联合治疗组和开腹手术组患者的一般情况 (mean ± SD)

变量	微创组(n = 21)	开腹组(n = 17)
年龄(岁)	41.3 ± 14.4	43.7 ± 15.2
女性n(%)	12.0(57.1)	10.0(58.9)
白细胞计数($\times 10^9/L$)	14.2 ± 2.6	13.7 ± 3.1
ALP(U/L)	548.6 ± 86.3	551.5 ± 79.1
AMY(U/L)	1680.5 ± 520.7	1710.0 ± 545.5
脓肿范围大小(cm)	5.1 ± 2.4	5.4 ± 2.1
APACHE评分	9.9 ± 1.3	10.3 ± 1.4

ALP: 碱性磷酸酶; AMY: 尿淀粉酶。

表 2 腹腔镜、胆道镜治疗组与开腹治疗组相关项目比较 (mean ± SD)

项目	微创组(n = 21)	开腹组(n = 17)
手术时间(min)	122.1 ± 37.2	119.7 ± 35.3
术中出血量(mL)	108.2 ± 18.1	137.4 ± 25.2 ^a
术后排便时间(h)	26.8 ± 9.7	31.0 ± 10.1 ^a
术后2 wk WBC计数($\times 10^9/L$)	14.2 ± 2.6	13.9 ± 3.1
术后2 wk ALP计数(U/L)	75.7 ± 12.6	84.2 ± 13.6 ^a
术后2 wk GGT计数(U/L)	60.3 ± 14.1	69.1 ± 13.8 ^a
住院时间(d)	102.3 ± 19.4	98.6 ± 17.5
死亡率(%)	3.0(14.3)	2.0(11.8)
术后至出院并发症率(%)	4.0(19.0)	5.0(29.4) ^a
住院费用(千元)	49.3 ± 0.9	43.2 ± 0.6 ^a

ALP: 碱性磷酸酶; GGT: 谷氨酰转肽酶。°P<0.05 vs 腹腔镜、胆道镜联合治疗组。

2 结果

微创组21例中首次腹腔镜术后有7例患者怀疑脓肿再发, 遂行胆道镜经腹引管窦道探查及脓肿穿刺引流术, 其中2例因脓肿多发、壁厚, 胆道镜效果不佳再次采用腹腔镜操作, 共计行4次脓肿开窗手术, 有4例共行3次手术, 21例患者有4例因胰腺坏死范围过大、脓肿分隔较多中转开腹; 开腹组17例首次术后有6例可疑脓肿再发, 再次行剖腹探查、脓肿及坏死组织清除、引流术, 其中2例因脓肿再发、壁厚共行4次手术, 有3例共行3次手术。

微创组有18例痊愈出院, 死亡3例, 其中2例死于多器官功能衰竭, 1例因急性呼吸窘迫综合征伴腹腔内出血死亡; 开腹组死亡2例, 均死于多器官功能衰竭。微创组术后有2例合并胰漏, 1例结肠漏, 1例胃漏, 开腹组术后3例胰漏, 2例胃漏。微创组在手术时间、住院时间、死亡率上均高于开腹组, 但此差异无统计学意义

($P>0.05$); 两组在术后2 wk白细胞计数上也无统计学差异($P>0.05$); 在术中出血量、术后排便时间、肝功能变化、并发症率、住院费用上则有统计学差异($P<0.05$)。出院后随访8-23 mo, PA均未复发, 微创组出现3例胰腺假性囊肿, 对照组有2例出现胰腺假性囊肿, 2例出现血糖升高, 未并发出血、肠漏、胰漏, 失访2例。两组结果比较详见表2。

3 讨论

PA是SAP坏死感染后的一个严重并发症, 在SAP中的发生率大约为5%, 病死率较高。国外报道达14%-54%, 国内资料为12.2%-25%^[1], 他是胰腺内或胰周的坏死组织液化感染, 或假性囊肿继发而致局限性的脓液聚积。实验表明^[2]胰腺坏死感染病原菌主要为肠道菌群, 最常见的是大肠杆菌, 其次为肠球菌及克雷伯氏菌。急性胰腺炎治疗2-3 wk后病情恶化, 出现腹痛、腹胀、发热和腹部包块等临床症状或体征, 应警惕胰腺脓肿可能形成。本组42例患者上述症状发生率均高于70%, 证实了体检在诊断胰腺脓肿中的重要性。为明确诊断, 应及时行B超和CT检查, 若在胰腺弥漫性肿大的背景上出现质地不均、液化和蜂窝状低密度区, 则考虑胰腺坏死脓肿存在, 本组分别有27例和14例经B超、CT检查证实脓肿存在。此外, B超或CT引导下脓肿穿刺、细菌及血培养等均可协助证实脓肿存在^[3,4]。

PA非手术治疗死亡率达95%以上^[5], 因此一经确诊应立即手术, 且手术一般在SAP发病2-4 wk后, 失活及正常组织已有分界, 较易清除。微创组有3例、对照组有2例有明显脓肿形成的征象, 因未及时手术致脓肿破裂, 发生弥漫性腹膜炎, 术后多器官功能衰竭死亡。

传统手术常采用开腹胰腺坏死组织清创^[6,7], 坏死组织清理彻底、引流通畅、住院时间短; 但创伤较大, 术后疼痛明显, 感染率、并发症率高。X线引导的经皮置管穿刺引流术是近年兴起的一项新技术^[8], 他减少了开腹大切口带来的并发症, 但引流管管理比较麻烦, 坏死碎屑引流也不充分。比较而言, 腹腔镜、胆道镜联合行脓肿、坏死组织清除及大口径引流管放置不仅可避免开腹, 还可保证术后充分引流, 其优势如下: (1)腹腔镜放大作用使解剖标志清晰, 结合脓肿位置可选择更准确的手术入路^[9,10]; (2)可进入更狭小的操作空隙, 扩大局部手术视野, 对胰周血管、神经、组织的识别和保护作用更为

■创新盘点

国内尚缺乏微创治疗PA及其适应证、技术要点、优缺点之报道, 本文在腹腔镜与胆道镜的选择、联合应用、特点、与开腹对比等方面均做了有益探索 and 说明。

■应用要点

首选腹腔镜操作, 准确定位、彻底清创、动作轻柔、充分引流; PA可疑再发时, 可优选术后胆道镜操作, 效果不佳时, 可再次联合腹腔镜甚至开腹操作、微创与安全并重。

确切; (3)超声刀和Ligasure可减少创面渗血, 并能更准确地清除脓肿及坏死组织。Horvathd和Vijan^[11,12]认为腹腔镜胰腺脓肿外引流术治疗PA患者具有并发症少、引流确切、术后恢复快的特点。

结合病例, 本联合疗法中腹腔镜可用于: (1)脓肿急性发作, 怀疑重度感染, 急诊探查、清除坏死组织时; (2)PA诊断明确、基本度过胰腺急性坏死反应期、坏死与正常组织界限明显时。胆道镜用于怀疑脓肿再发, 探查、清除腹腔镜在进展期末彻底清除的坏死组织时。

通过对21例PA患者的治疗, 我们认为腹腔镜、胆道镜联合疗法有以下技术要点: (1)寻找和确定脓肿的位置。多数脓肿位于小网膜囊内或结肠系膜基底部, 但脓肿有多发性, 蔓延时部分可被组织吸收, 也可超出正常胰腺解剖位置向左上腹小网膜囊、左右结肠旁沟及盆腔扩散^[13,14]。术前应充分进行影像学检查定位, 设计准确的手术入路; (2)尽可能彻底清除脓肿及坏死组织。术中尽可能敞开脓肿前壁, 打通脓腔内的纤维隔, 吸净稠厚脓液及坏死组织; (3)术中动作轻柔, 减少并发症。SAP及PA时局部水肿严重, 腹腔空间变小, 坏死胰腺组织中还可能有关管通过, 故宜钝性分离为主, 切忌暴力, 且要妥善处理创面、确切止血; (4)保持引流充分。胰腺脓肿有其特殊性, 脓腔内有大量坏死组织和絮状物, 细小引流管效果不佳, 可据脓腔具体特点放置腹引, 如多根带侧孔的引流管或双套管引流, 采用可冲洗的双腔引流管, 交叉放置于坏死清除区的最低点, 从双侧腹引出等。

术后应继续加强营养支持, 维持水、电解质平衡, 并选用能通过血胰屏障、有效抑菌的抗生素^[15]、长期持续腹引管冲洗引流, 必要时换管以免脓栓阻塞。至于拔管时机, 窦道形成之前切不可行, 待脓液引流量逐渐减少, 或经造影证实脓腔消失, 方可减少冲洗液及冲洗次数并逐步拔管。可隔日拔管1.0 cm, 拔管过早、过快, 可能引起脓肿复发, 我们有2例患者于术后1年方拔除腹引。术后可小剂量应用地塞米松, 减轻感染中毒症状, 还可给予清热除湿、通理攻下的中药, 以促进残余脓肿的吸收、防止复发。

值得一提的是, 微创组在手术时间、住院时间、死亡率上均稍高于开腹, 尽管其无明显统计学差异; 在住院费用上也远高后者, 且两者有统计学差异。而且, 由于PA的多发性和广泛性, 脓肿数目不等、时有分隔, 且多数患者胰腺

坏死界限不清, 一次手术很难清除所有感染坏死组织, 也不能中止坏死的发展, 术后复发率高。文献报道^[16]再手术率为11%-43%, 本组38例治疗组与对照组均因脓肿再发多次行手术治疗。考虑胆道镜较单纯腹腔镜手术费用明显较低, 可用胆道镜经腹引管窦道清创及脓肿穿刺, 但其强度不足之结构特点使其在脓肿多发、壁厚时效果不佳, 需腹腔镜再次配合, 必要时开腹, 切不可一味追求美观、微创而导致清创引流不彻底, 致脓肿反复发作, 甚至危及生命。此外, 合并基础病时其治疗上与PA同时进行, 且PA自身特点决定其出现时基础病已基本稳定, 本组均未出现影响手术操作及预后之现象。

我们认为, 腹腔镜、胆道镜联合治疗重症急性胰腺炎继发胰腺脓肿安全、微创、效佳, 完全可以达到或优于开腹的治疗效果; 然而其手术及住院时间长、费用较高等问题还需进一步改进; 且本文病例较少, 需进一步行多中心、大样本研究。

4 参考文献

- 1 朱爱军, 石景森, 孙学军. 21例胰腺脓肿的治疗. 肝胆外科杂志 2003; 11: 425-426
- 2 Baradkar VP, Mathur M, Kumar S. Pancreatic abscess secondary to gall stones caused by *Escherichia coli*. *Indian J Pathol Microbiol* 2009; 52: 573-574
- 3 Tanaka T, Matsugu Y, Fukuda Y. Use of ultrasonically activated shears improves the safety of pancreaticojejunostomy after pancreaticoduodenectomy. *Arch Surg* 2002; 137: 1258-1261
- 4 Sadik R, Kalaitzakis E, Thune A, Hansen J, Jönson C. EUS-guided drainage is more successful in pancreatic pseudocysts compared with abscesses. *World J Gastroenterol* 2011; 17: 499-505
- 5 Ramia JM, de la Plaza R, Quiñones-Sampedro JE, Ramiro C, Veguillas P, García-Parreño J. Walled-off pancreatic necrosis. *Neth J Med* 2012; 70: 168-171
- 6 Ranson JH. The role of surgery in the management of acute pancreatitis. *Ann Surg* 1990; 211: 382-393
- 7 Veltchev LM, Kalniev MA. Giant retroperitoneal abscess following necrotizing pancreatitis treated with internal drainage. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2009; 8: 551-553
- 8 vanSonnenberg E, Wittich GR, Goodacre BW, Casola G, D'Agostino HB. Percutaneous abscess drainage: update. *World J Surg* 2001; 25: 362-369; discussion 370-372
- 9 Pamoukian VN, Gagner M. Laparoscopic necrosectomy for acute necrotizing pancreatitis. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 2001; 8: 221-223
- 10 Ammori BJ. Laparoscopic transgastric pancreatic necrosectomy for infected pancreatic necrosis. *Surg Endosc* 2002; 16: 1362
- 11 Horvath KD, Kao LS, Wherry KL, Pellegrini CA, Sinanan MN. A technique for laparoscopic-assisted percutaneous drainage of infected pancreatic necrosis and pancreatic abscess. *Surg Endosc* 2001; 15:

- 1221-1225
- 12 Vijan SS, Ahmed KA, Harmsen WS, Que FG, Reid-Lombardo KM, Nagorney DM, Donohue JH, Farnell MB, Kendrick ML. Laparoscopic vs open distal pancreatectomy: a single-institution comparative study. *Arch Surg* 2010; 145: 616-621
 - 13 Lu HM, Zhang ZD, Hu WM. A long journey: report of a case with pancreatic abscess extending to the groin. *Chin Med J (Engl)* 2010; 123: 3362-3363
 - 14 Almashat S, Sepehr A. Obstructive and inflammatory gastric heterotopic pancreatic tissue. *Arch Iran Med* 2011; 14: 357-358
 - 15 Sonavane A, Baradkar V, Salunkhe P, D'Souza D, Kumar S. Acute necrotizing pancreatitis with pancreatic abscess due to *Prevotella* species in a diabetic. *Indian J Med Microbiol* 2010; 28: 64-67
 - 16 Malleshappa P, Chaudhari AP, Aghariya M, Siddiqui A, Ranganath R, Shah AB. Thrombotic microangiopathy as a complication of recurrent pancreatitis. *Indian J Nephrol* 2011; 21: 215-217

编辑 张姗姗 电编 闫晋利

■同行评价

本文客观评价腹腔镜、胆道镜联合治疗PA的优缺点,并对适应证及技术要点做了总结,构思严谨、重点突出、科学意义及临床价值较好,但还需行长期、多中心、大样本研究。

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}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。

选择性5-羟色胺再摄取抑制剂治疗肠易激综合征疗效的系统评价

赖瑞敏, 曹立颖, 乔丽娜, 胡东平, 周永宁

■背景资料

肠易激综合征(IBS)是消化系统常见疾病,在我国发病率有逐年上升的趋势,但常规治疗方法疗效不让人满意,且研究发现本病的发生和加重多与心理因素人格障碍有关,而抗抑郁药治疗IBS临床疗效不明确,要求更多随机对照临床试验进行评价。

赖瑞敏, 曹立颖, 乔丽娜, 胡东平, 周永宁, 兰州大学第一医院 甘肃省兰州市 730000

赖瑞敏, 硕士, 主要从事肠易激综合征临床治疗方面的研究。

作者贡献分布: 本课题由周永宁与赖瑞敏设计; 数据分析由赖瑞敏与曹立颖完成; 研究过程由赖瑞敏、曹立颖、乔丽娜、胡东平及周永宁共同完成; 本论文写作由赖瑞敏与曹立颖完成。

通讯作者: 周永宁, 教授, 730000, 甘肃省兰州市城关区东岗西路, 兰州大学第一医院消化内科. yongningzhou@sina.com
电话: 0931-8625200-6872

收稿日期: 2012-05-08 修回日期: 2012-07-01

接受日期: 2012-07-20 在线出版日期: 2012-08-08

Efficacy and safety of selective serotonin reuptake inhibitor antidepressants in patients with irritable bowel syndrome: A systematic review

Rui-Min Lai, Li-Ying Cao, Li-Na Qiao, Dong-Ping Hu, Yong-Ning Zhou

Rui-Min Lai, Li-Ying Cao, Li-Na Qiao, Dong-Ping Hu, Yong-Ning Zhou, the First Hospital of Lanzhou University, Lanzhou 730000, Gansu Province, China

Correspondence to: Yong-Ning Zhou, Professor, Department of Gastroenterology, the First Hospital of Lanzhou University, Donggang West Road, Chengguan District, Lanzhou 730000, Gansu Province, China. yongningzhou@sina.com
Received: 2012-05-08 Revised: 2012-07-01

Accepted: 2012-07-20 Published online: 2012-08-08

Abstract

AIM: To systematically assess the efficacy and safety of selective serotonin reuptake inhibitor (SSRI) antidepressants (SSRIs) for irritable bowel syndrome (IBS).

METHODS: PubMed, Embase, the Cochrane Central Register of Controlled Trials, Chinese Biomedical Literature Database, and China Journal Full-text Database were searched for randomized controlled trials investigating the efficacy of SSRIs in the management of IBS. The Revman 5.0 software provided by the Cochrane Collaboration was used for assessment.

RESULTS: Five placebo-controlled, double-blind, randomized trials including 300 patients were involved in this analysis. SSRIs used in

these studies included citalopram, fluoxetine and paroxetine. Compared to placebo, SSRIs were not associated with a statistically significant global symptom relief [RR = 2.09, 95%CI = (0.97, 4.47), $P < 0.05$]. There was no significant difference in the incidence of serious adverse events between the SSRIs and placebo groups [RR = 1.38, 95%CI = (0.68, 2.82), $P > 0.05$].

CONCLUSION: There are no significant differences in IBS symptom improvement and incidence of side effects between SSRI and placebo groups.

Key Words: Selective serotonin reuptake inhibitors; Irritable bowel syndrome; Systematic review; Meta-analysis

Lai RM, Cao LY, Qiao LN, Hu DP, Zhou YN. Efficacy and safety of selective serotonin reuptake inhibitor antidepressants in patients with irritable bowel syndrome: A systematic review. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2012; 20(22): 2106-2110

摘要

目的: 系统评价选择性5-羟色胺再摄取抑制剂(selective serotonin reuptake inhibitor, SSRI)治疗肠易激综合征(irritable bowel syndrome, IBS)的有效性及安全性。

方法: 计算机检索PubMed、Embase、Cochrane图书馆临床对照试验数据库、中国生物医学文献数据库(CBM)、中国期刊全文数据库(CNKI), 查找SSRI治疗肠易激综合征的所有随机对照试验(randomized controlled trials, RCTs), 应用Cochrane协作网提供的Revman5.0软件进行分析评价。

结果: 共纳入5项试验, 共300例患者。治疗使用的药物包括氟西汀、西酞普兰、帕罗西汀。RCT表明, SSRI改善IBS总体症状缓解率无统计学意义[RR = 2.09, 95%CI = (0.97, 4.47), $P < 0.05$]; 严重不良反应的发生率与安慰剂组相比无明显统计学差异[RR = 1.38, 95%CI = (0.68, 2.82), $P > 0.05$].

■同行评议者

白爱平, 副教授, 江西省南昌大学第一附属医院消化病研究所

结论: SSRI对缓解IBS患者的总体症状与安慰剂相比未见明显疗效差别, 不良事件发生率无统计学意义。

关键词: 选择性5-羟色胺再摄取抑制剂; 肠易激综合征; 系统评价; Meta分析

赖瑞敏, 曹立颖, 乔丽娜, 胡东平, 周永宁. 选择性5-羟色胺再摄取抑制剂治疗肠易激综合征疗效的系统评价. 世界华人消化杂志 2012; 20(22): 2106-2110

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/2106.asp>

0 引言

肠易激综合征(irritable bowel syndrome, IBS)是一种常见的胃肠道功能紊乱性疾病, 以腹痛或腹部不适伴排便习惯改变为特征, 排外引起这些症状的器质性疾病^[1]。IBS在美国影响着3%-20%人群^[2], 而在我国南方社区人群中的患病率约为5.7%^[3]。发病高峰年龄30-40岁, 女性占主导^[4]。许多IBS患者同时伴有焦虑抑郁症状, 目前临床上治疗IBS的方法很多, 但均不甚理想, 治疗症状消失后停药约有40%-50%复发^[5]。

近年来的临床和基础研究发现, 选择性5-羟色胺再摄取抑制剂(selective serotonin reuptake inhibitors, SSRIs)可通过改变IBS患者内脏痛觉传入神经及胃肠道转运时间等机制改善患者的肠道功能及精神心理症状, 提高患者的生存质量。其中SSRIs治疗IBS疗效存在较大争议, 现对其有效性及安全性进行系统评价。

1 材料和方法

1.1 材料 纳入所有的关于SSRIs治疗IBS的随机对照试验(randomized controlled trials, RCTs)。同时排除IBS诊断标准不明及其他非全文文献。

1.2 方法

1.2.1 研究对象: 成人IBS患者以罗马标准^[6]为诊断标准, 无腹部手术病史, 乳糖耐受试验正常。对未设对照或以健康人作为对照组及研究对象年龄<18岁或>80岁予以剔除。

1.2.2 疗效评价: 以各研究定义的疗效判断为准, 并对症状改善加以分析。

1.2.3 文献采集: 计算机检索PubMed(1966/2012-02)、Embase(1974/2012-02)、Cochrane图书馆临床对照试验数据库(The Cochrane Central Register of Controlled Trials)(2012年)、中国生物医学文献数据库(1978/2012-02)、中国期刊全文数据库(1979/2012-02); 检索文献无语种限

制。中文检索词包括肠易激综合征(IBS)、胃肠神经官能症、肠道功能紊乱性疾病、抗抑郁药、选择性5-羟色胺再摄取抑制剂(SSRIs)、随机对照试验(RCTs)。英文检索词包括Irritable Bowel Syndrome(IBS), Antidepressive Agents, Second-Generation Antidepressive Agents, Atypical Antidepressants, selective serotonin reuptake inhibitors(SSRIs)。

1.2.4 方法学质量评价与资料提取: 由2名研究者分别对检索到的文献进行筛选, 确定符合纳入标准的文献, 并对纳入研究的实验进行质量评价和资料提取, 遇到意见不一致, 则通过讨论解决或由第3位研究人员协助解决分歧。质量评价依据Cochrane Handbook 5.0推荐的“风险评估工具”进行偏倚风险评估, 其中RCT偏倚风险评估内容如下: (1)作者叙述为随机法; (2)随机方法正确或/和采用分配隐藏; (3)双盲; (4)结果数据的完整性; (5)选择性报告偏倚; (6)其他偏倚来源。

统计学处理 应用Cochrane协作网提供的Revman 5.0进行数据分析。对试验结果采用 χ^2 检验进行异质性分析, 若有异质性($P \leq 0.05$, $I^2 > 50\%$), 选用随机效应模型计算^[7]; 反之, 用固定效应模型^[8]。总体疗效以各研究定义的疗效判断为准。对于二分变量使用相对危险度(relative risk, RR), 对连续性变量使用标准化均差(standardized mean difference, SMD), 两者均采用95%的可信区间(confidence interval, CI)。若各临床试验提供的数据无法进行Meta分析, 则只进行描述性的定性系统评价。若Meta分析结果显示疗效差异有统计学意义, 则进行敏感性分析判断结果的稳定性。

2 结果

2.1 纳入研究情况 根据纳入标准共56篇文献入选。通过阅读标题、摘要、查阅全文, 并排除依据Cochrane Handbook 5.0评分的低质量RCTs, 最后5个临床试验^[9-13]纳入本次分析, 共300例患者。2篇研究^[9,10]提及非抑郁状态IBS患者, 1篇^[11]提及疼痛、便秘症状为主IBS患者, 其余2篇包含各型IBS患者。试验使用的5-羟色胺再摄取抑制剂抑郁药包括西酞普兰1篇、氟西汀2篇、帕罗西汀2篇。各临床试验特征描述见表1。

2.2 纳入试验的方法学质量评估 本系统评价依据Cochrane Handbook 5.0风险偏倚评估工具对纳入研究进行风险偏倚评估, 纳入研究存在一

■研究前沿

近年来的研究报道, 选择性5-羟色胺再摄取抑制剂(SSRIs)具有减轻疼痛和降低内脏敏感性作用, 且显示出其在IBS治疗方面的一定临床应用价值, 但其进一步的疗效还有待深入研究。

■相关报道

有报道SSRIs虽然可降低IBS患者内脏敏感性和疼痛阈值,但与常规治疗方法相比无明显优势。

表 1 纳入研究基本情况

作者	年份	国家	平均年龄(岁)	性别女/男	IBS诊断标准	SSIR类型	剂量(mg)	疗程(wk)
Ladabaum等 ^[9]	2010	美国	52	44/10	Rome II	西酞普兰	20-40	8
Kuiken等 ^[10]	3003	荷兰	40 ± 2	22/18	Rome II	氟西汀	20	6
Vahedi等 ^[11]	2005	伊朗	34.9 ± 10.0	27/17	Rome II	氟西汀	20	12
Tabas等 ^[12]	2004	美国	46 ± 11	60/21	Rome I	帕罗西汀	10-20	12
Masand等 ^[13]	2009	美国	49	63/9	Rome II	帕罗西汀	12.5-50	12

IBS: 肠易激综合征; SSRIs: 选择性5-羟色胺再摄取抑制剂。

表 2 纳入研究方法学质量评估

研究	随机方法	隐藏分组	盲法	结果数据的完整性	选择性报告结果的完整性	偏倚来源
Ladabaum等 ^[9]	是(不清楚)	是	是(双盲)	是	不清楚	不清楚
Kuiken等 ^[10]	是(计算机)	是	是(双盲)	是	不清楚	不清楚
Vahedi等 ^[11]	是(计算机)	是	是(双盲)	是	不清楚	不清楚
Tabas等 ^[12]	是(计算机)	是	是(双盲)	是	不清楚	不清楚
Masand等 ^[13]	是(不清楚)	否	是(双盲)	是	不清楚	不清楚

是: 低度偏倚风险; 否: 高度偏倚风险; 不清楚: 中度偏倚风险。

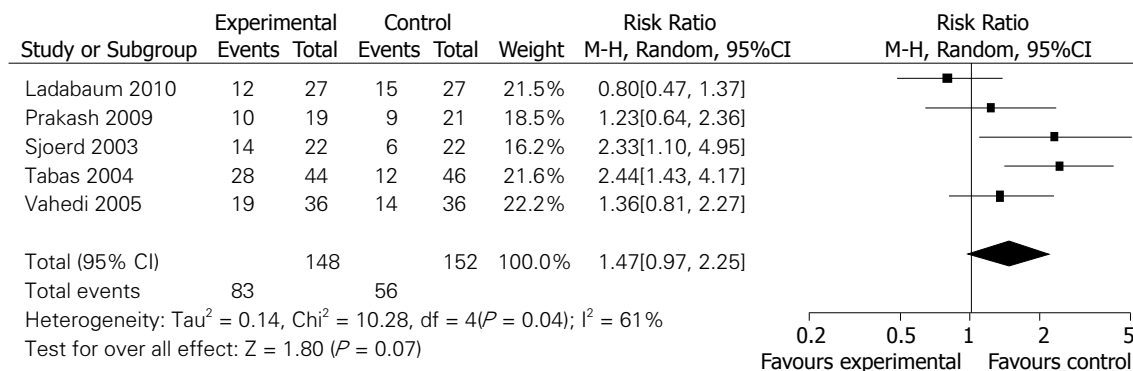


图 1 SSRIs治疗IBS总体症状缓解率的Meta分析。

定程度的偏倚风险。纳入试验中随机分组方法在5个研究中都详尽报道,并对盲法及隐藏分组方法进行了具体描述。因此纳入试验存在选择性偏倚、实施偏倚和测量偏倚的低度可能性。纳入研究风险评估结果详见表2。

2.3 疗效评价

2.3.1 总体症状缓解率: 以各研究定义的疗效判断为标准,对试验结果进行异质性分析,结果有异质性($P = 0.04$; $I^2 = 61\%$),选用随机效应模型。SSRIs总体症状缓解率与安慰剂组相比,两组间差异无统计学意义[RR = 2.09, 95%CI = (0.97, 4.47), $P = 0.04$],说明SSRIs治疗IBS疗效与安慰剂相比无明显差异(图1)。

2.3.2 严重不良反应的评价: SSRIs的不良反应主

要包括头晕、嗜睡、头痛、胃肠道反应、性功能障碍、瘙痒等。5项随机对照研究均报道不良反应,1项研究^[10]因未出现严重不良反应,无患者退出研究。提取数据进行异质性分析,结果无异质性($P = 0.39$; $I^2 = 0\%$),选用固定效应模型。Meta分析结果发现SSRIs组不良反应发生率与安慰剂组相比,两组间差异无统计学意义[RR = 1.38, 95%CI = (0.68, 2.82), $P > 0.05$],说明SSRIs治疗IBS是安全的(图2)。漏斗图分析显示对称,表示无发表偏倚。

3 讨论

IBS病因及发病机制迄今尚不清楚,目前认为与胃肠动力异常、内脏感觉过敏、脑-肠轴改变、

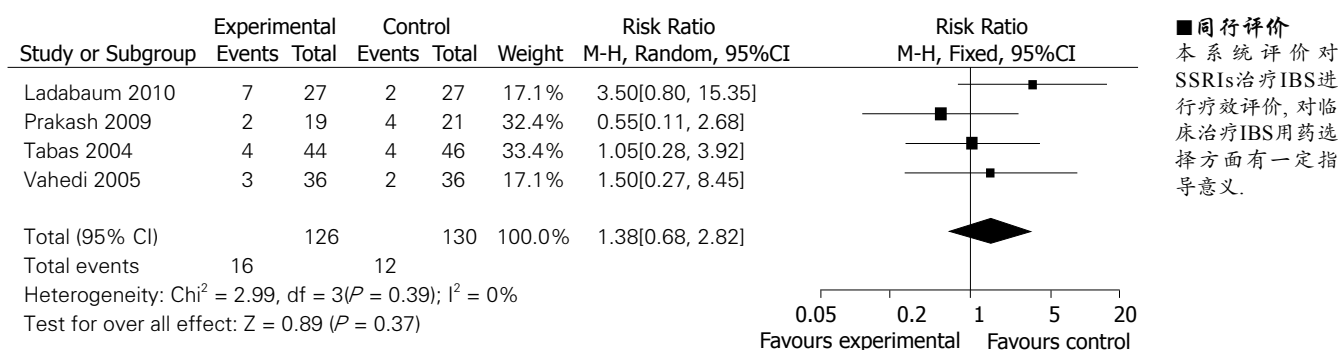


图 2 SSRIs治疗IBS安全性的Meta分析。

精神因素、感染等多种因素有关^[14], 且现在常用的治疗方法常不尽如人意^[15]。研究发现IBS是一种身心疾病, 且一大部分患者焦虑、抑郁评分高于健康患者, 故新型抗抑郁药SSRIs近年来用于IBS治疗。而抗抑郁药在治疗IBS中的有效性一直存在争议。如Ford等^[16]研究发现SSRIs抗抑郁药治疗IBS缓解症状方面是有效的, 与对照组相比不良事件的发生率上无差别。而Talley等^[17]发现三环类和SSRIs抗抑郁药在整体症状缓解率方面与对照组相比没有重要的不同。

本次纳入的试验Meta分析显示SSRIs在改善IBS总体症状方面与对照组相比无统计学意义。但Greed等^[18]研究提出SSRIs治疗IBS是有效的, 其中一个重要的机制是降低内脏敏感性。而直肠敏感性可以作为IBS的一个潜在生物学指标^[19]。研究发现IBS症状的改变与直肠敏感性指标的改变无相关性, 直肠测压发现直肠敏感性降低不能导致IBS临床症状提升^[8,9]。对于SSRIs有减轻疼痛和降低内脏敏感性方面, 最近研究发现SSRIs有止痛作用, 与提高痛觉阈值有关。在IBS患者特别是女性患者中, 伴有焦虑、抑郁等情绪改变, SSRIs能改善患者的焦虑、抑郁等情绪得分, 但是IBS伴有抑郁状态的患者症状的改善与抗抑郁药物用量是否相关进一步阐明^[20]。对于无抑郁状态的IBS患者, 多数研究发现SSRIs治疗IBS与对照组相比并无明显优势, 且抗抑郁药治疗IBS是常低于治疗抑郁的剂量。Meta分析显示试验组与安慰剂组的不良反应发生率无统计学差异, 对于提高SSRIs的治疗剂量, 以及汉密尔顿抑郁量表评分存在抑郁的IBS患者治疗是否有效有待进一步研究。由于治疗剂量及随访时间不同, 且绝大多数研究未报道其远期疗效, 尚需要大量的高质量试验来验证, 作者认为本研究结论需要结合长期的临床实践来解释。

本系统评价初步显示SSRIs可改善IBS患者

的总体症状, 与对照组相比无明显差别。由于患者对于抗抑郁药的不良反应、经济效益以及对抗抑郁药的心理接受程度等原因, 导致临床上应用SSRIs治疗IBS的RCTs开展较少, 样本量太小, 且入选标准、症状和疗效评价标准不一, 各项研究结论缺乏较强的可比性。所以期待进行更大规模的随机对照临床试验, 对SSRIs在治疗IBS的疗效及安全性进行进一步评价。

4 参考文献

- 1 Hyphantis T, Guthrie E, Tomenson B, Creed F. Psychodynamic interpersonal therapy and improvement in interpersonal difficulties in people with severe irritable bowel syndrome. *Pain* 2009; 145: 196-203
- 2 Grundmann O, Yoon SL. Irritable bowel syndrome: epidemiology, diagnosis and treatment: an update for health-care practitioners. *J Gastroenterol Hepatol* 2010; 25: 691-699
- 3 Xiong LS, Chen MH, Chen HX, Xu AG, Wang WA, Hu PJ. A population-based epidemiologic study of irritable bowel syndrome in South China: stratified randomized study by cluster sampling. *Aliment Pharmacol Ther* 2004; 19: 1217-1224
- 4 Spiller R, Aziz Q, Creed F, Emmanuel A, Houghton L, Hungin P, Jones R, Kumar D, Rubin G, Trudgill N, Whorwell P. Guidelines on the irritable bowel syndrome: mechanisms and practical management. *Gut* 2007; 56: 1770-1798
- 5 Evangelista S. Benefits from long-term treatment in irritable bowel syndrome. *Gastroenterol Res Pract* 2012; 2012: 936960
- 6 Basseri RJ, Weitsman S, Barlow GM, Pimentel M. Antibiotics for the treatment of irritable bowel syndrome. *Gastroenterol Hepatol (N Y)* 2011; 7: 455-493
- 7 Mak A, Cheung MW, Fu EH, Ho RC. Meta-analysis in medicine: an introduction. *Int J Rheum Dis* 2010; 13: 101-104
- 8 Higgins JP, Thompson SG, Deeks JJ, Altman DG. Measuring inconsistency in meta-analyses. *BMJ* 2003; 327: 557-560
- 9 Ladabaum U, Sharabidze A, Levin TR, Zhao WK, Chung E, Bacchetti P, Jin C, Grimes B, Pepin CJ. Citalopram provides little or no benefit in nondepressed patients with irritable bowel syndrome. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2010; 8: 42-48. e1
- 10 Kuiken SD, Tytgat GN, Boeckstaens GE. The selective serotonin reuptake inhibitor fluoxetine

- does not change rectal sensitivity and symptoms in patients with irritable bowel syndrome: a double blind, randomized, placebo-controlled study. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2003; 1: 219-228
- 11 Vahedi H, Merat S, Rashidioon A, Ghoddosi A, Malekzadeh R. The effect of fluoxetine in patients with pain and constipation-predominant irritable bowel syndrome: a double-blind randomized-controlled study. *Aliment Pharmacol Ther* 2005; 22: 381-385
- 12 Tabas G, Beaves M, Wang J, Friday P, Mardini H, Arnold G. Paroxetine to treat irritable bowel syndrome not responding to high-fiber diet: a double-blind, placebo-controlled trial. *Am J Gastroenterol* 2004; 99: 914-920
- 13 Masand PS, Pae CU, Krulewicz S, Peindl K, Mannelli P, Varia IM, Patkar AA. A double-blind, randomized, placebo-controlled trial of paroxetine controlled-release in irritable bowel syndrome. *Psychosomatics* 2009; 50: 78-86
- 14 Son YJ, Jun EY, Park JH. Prevalence and risk factors of irritable bowel syndrome in Korean adolescent girls: a school-based study. *Int J Nurs Stud* 2009; 46: 76-84
- 15 Talley NJ, Spiller R. Irritable bowel syndrome: a little understood organic bowel disease? *Lancet* 2002; 360: 555-564
- 16 Ford AC, Talley NJ, Schoenfeld PS, Quigley EM, Moayyedi P. Efficacy of antidepressants and psychological therapies in irritable bowel syndrome: systematic review and meta-analysis. *Gut* 2009; 58: 367-378
- 17 Talley NJ, Kellow JE, Boyce P, Tennant C, Huskic S, Jones M. Antidepressant therapy (imipramine and citalopram) for irritable bowel syndrome: a double-blind, randomized, placebo-controlled trial. *Dig Dis Sci* 2008; 53: 108-115
- 18 Creed F. How do SSRIs help patients with irritable bowel syndrome? *Gut* 2006; 55: 1065-1067
- 19 Mertz H, Naliboff B, Munakata J, Niazi N, Mayer EA. Altered rectal perception is a biological marker of patients with irritable bowel syndrome. *Gastroenterology* 1995; 109: 40-52
- 20 Friedrich M, Grady SE, Wall GC. Effects of antidepressants in patients with irritable bowel syndrome and comorbid depression. *Clin Ther* 2010; 32: 1221-1233

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出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。

TGF- β 1在腹膜转移癌与结核性腹膜炎的表达及意义

王四维, 王学梅, 张义侠, 陶春梅, 李银燕, 张震, 陈波

王四维, 王学梅, 张义侠, 陶春梅, 李银燕, 张震, 陈波, 中国医科大学附属第一医院超声科 辽宁省沈阳市 110001
王四维, 硕士, 主要从事腹部超声诊断与介入超声的研究。

作者贡献分布: 本课题由王四维、王学梅及李银燕设计; 超声引导下穿刺由王学梅、张义侠、陶春梅及陈波完成; 基础实验过程由王四维与张震完成; 写作由王四维完成, 王学梅与李银燕修改。

通讯作者: 王学梅, 教授, 主任医师, 博士生导师, 110001, 辽宁省沈阳市, 中国医科大学附属第一医院超声科。

wxmlmt@yahoo.com.cn

电话: 024-83282098

收稿日期: 2012-03-21 修回日期: 2012-05-05

接受日期: 2012-06-02 在线出版日期: 2012-08-08

Significance of expression of TGF- β 1 in peritoneal carcinomatosis and tuberculous peritonitis

Si-Wei Wang, Xue-Mei Wang, Yi-Xia Zhang, Chun-Mei Tao, Yin-Yan Li, Zhen Zhang, Bo Chen

Si-Wei Wang, Xue-Mei Wang, Yi-Xia Zhang, Chun-Mei Tao, Yin-Yan Li, Zhen Zhang, Bo Chen, Department of Ultrasound Diagnostics, the First Hospital of China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China

Correspondence to: Xue-Mei Wang, Professor, Chief Physician, Department of Ultrasound Diagnostics, the First Hospital of China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China. wxmlmt@yahoo.com.cn

Received: 2012-03-21 Revised: 2012-05-05

Accepted: 2012-06-02 Published online: 2012-08-08

Abstract

AIM: To study the expression and significance of expression of transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) in tuberculous peritonitis and peritoneal carcinomatosis.

METHODS: Immunohistochemistry and Western blot were used to detect the expression of TGF- β 1 in 20 cases of tuberculous peritonitis and 20 cases of peritoneal carcinomatosis. The difference in TGF- β 1 expression between tuberculous peritonitis and peritoneal carcinomatosis was evaluated.

RESULTS: Immunohistochemistry and Western blot analyses showed that TGF- β 1 was expressed in both tuberculous peritonitis and peritoneal carcinomatosis. The expression of TGF- β 1 in peritoneal carcinoma was significantly

higher than that in tuberculous peritonitis (85% vs 20%; 88.01 ± 14.41 vs 31.55 ± 5.61 ; both $P < 0.01$).

CONCLUSION: TGF- β 1 may play an important role in the occurrence and development of peritoneal lesions.

Key Words: Transforming growth factor- β 1; Tuberculous peritonitis; Peritoneal carcinomatosis

Wang SW, Wang XM, Zhang YX, Tao CM, Li YY, Zhang Z, Chen B. Significance of expression of TGF- β 1 in peritoneal carcinomatosis and tuberculous peritonitis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2012; 20(22): 2111-2114

摘要

目的: 研究转化生长因子 β 1(transforming growth factor β 1, TGF- β 1)在腹膜转移癌与结核性腹膜炎的表达及意义。

方法: 使用免疫组织化学、Western blot方法, 从分子水平、蛋白水平检测并比较TGF- β 1在20例腹膜转移癌组织及20例结核性腹膜炎组织中的表达, 比较腹膜转移癌与结核性腹膜炎表达的组间差异。

结果: 通过免疫组织化学及Western blot的实验表明, TGF- β 1在腹膜转移癌与结核性腹膜炎中均有表达, 且在腹膜转移癌中的表达显著高于结核性腹膜炎(85% vs 20%; 88.01 ± 14.41 vs 31.55 ± 5.61 ; 均 $P < 0.01$)。

结论: TGF- β 1在腹膜病变的发生和发展过程中起到了重要的作用。

关键词: 转化生长因子- β 1; 腹膜转移癌; 结核性腹膜炎

王四维, 王学梅, 张义侠, 陶春梅, 李银燕, 张震, 陈波. TGF- β 1在腹膜转移癌与结核性腹膜炎的表达及意义. *世界华人消化杂志* 2012; 20(22): 2111-2114
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/2111.asp>

0 引言

腹膜是全身最大和配布最复杂、衬贴于腹、盆

■背景资料

腹膜转移癌是目前造成腹腔恶性肿瘤治疗失败的主要原因, 此阶段的患者病情发展快、预后差, 临床治疗难度大, 所以明确恶性肿瘤腹膜转移的机制从而实现早期预防刻不容缓。

■同行评议者

毛高平, 教授, 中国人民解放军空军总医院

■研发前沿

目前普遍认为肿瘤的侵袭与转移是肿瘤细胞与宿主细胞、细胞外基质之间一系列复杂的、多步骤、多因素相互作用的动态过程,但各个步骤的具体影响因素还有待进一步研究。

腔壁内面和腹、盆脏器表面的浆膜,腹膜病变中以腹膜转移癌(peritoneal metastatic carcinoma, PMC)与结核性腹膜炎(tuberculous peritonitis, TP)最常见,其中腹膜转移癌仍是目前造成腹腔恶性肿瘤治疗失败的主要原因^[1],此阶段患者病情发展快、预后差,临床治疗难度大^[2]。所以明确恶性肿瘤腹膜转移的机制从而实现早期预防刻不容缓。转化生长因子 $\beta 1$ (transforming growth factor $\beta 1$, TGF- $\beta 1$)基因定位于染色体19q13^[3],并广泛存在于正常组织细胞中,在除成人肝细胞外的全身所有细胞和一些肿瘤细胞中表达,参与许多生理和病理过程,可以促进或抑制细胞增殖、调节各种组织分化和参与纤维化,尤其是在肿瘤的发生、发展中的调节作用,对肿瘤的研究具有极其深远的意义^[4,5]。本研究使用免疫组组织化学、Western blot免疫印迹方法,分别从分子水平、蛋白水平检测并比较TGF- $\beta 1$ 在40例腹膜活检组织中的表达,探讨其表达水平与腹膜转移癌发生的相关性,以期揭示腹膜转移癌的发生机制,为进一步临床预防恶性肿瘤的腹膜转移开拓新的途径。

1 材料和方法

1.1 材料 2010-01/2010-09,在中国医科大学附属第一医院以腹水待查入院并行腹膜穿刺活检的患者,共40例。病理诊断结核性腹膜炎20例,其中男8例,女12例,年龄 39.25 ± 3.51 岁;腹膜转移癌20例,其中男14例,女6例,年龄 60.41 ± 3.96 岁。临床症状主要为腹胀、腹痛、发热及消瘦等,无明确心肝肾源性疾病。TGF- $\beta 1$ 兔抗人多克隆抗体(Santa Cruz Biotechnology);羊抗兔二抗、SP免疫组化试剂盒、DAB显色试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司);磷酸盐缓冲液, PBS(0.01 M, pH 7.2-7.4)(北京中杉金桥生物技术有限公司);蛋白裂解液、蛋白酶抑制剂、上样缓冲液、BCA定量及ECL发光试剂盒(上海碧云天生物公司); β -actin(Sigma公司);免疫印迹配胶、电泳、电转装置。

1.2 方法

1.2.1 标本采集和处理: 穿刺前应常规检查患者的血压、心电图、凝血等指标结果,并签署腹膜活检知情同意书。一般选择贴近腹壁、厚度 >1.5 cm的腹膜,首先行二维扫查排除肠管等相似结构,确定穿刺点。所有操作均由同一名经验丰富的医师完成。消毒穿刺点及周围皮肤,并以1%-2%利多卡因皮下局部麻醉。所有穿刺患者

均在HITACHI HI-VISION 900型超声诊断仪的实时引导下由14G活检针配合活检枪完成,以确保针道避开血管等结构。每位患者取腹膜组织2-4条,活检结束后,随访观察患者有无术后并发症。

1.2.2 免疫组织化学染色: 免疫组织化学采用链霉素抗生物素蛋白-过氧化物酶(S-P)法,按照试剂盒说明书进行操作:石蜡切片脱蜡至水,3% H_2O_2 室温孵育,以清除内源性过氧化物酶的活性,抗原微波热修复,5%-10%正常山羊血清封闭非特异性位点,倾去血清,滴加TGF- $\beta 1$ 一抗工作液,4℃孵育过夜,滴加生物素标记的二抗工作液和辣根过氧化物酶标记的链酶卵白素工作液,DAB染色,苏木素复染细胞核,封片。以PBS代替一抗作阴性对照。

1.2.3 Western blot免疫印迹: 将组织裂解于200 μ L含有蛋白酶抑制剂(100 μ g/mL PMSE, 2 μ g/mL Aprotinin)的RIPA裂解液中[0.1%SDS, 1%脱氧胆酸钠, 1%Triton-100, 150 mmol/L NaCl, 1 mmol/L EDTA(pH 8.0), 10 mmol/L Tris-HCl(pH 7.5)], 4℃裂解1 h, 4℃15 000 r/min,离心30 min,取上清,至新管。采用Bradford法进行蛋白定量,按照每管50 μ g/孔上样,经SDS-PAGE凝胶进行电泳分离后,转移至硝酸纤维素膜上,在含50 g/L脱脂奶粉的PBS中封闭过夜。倒掉封闭液,用洗膜液(0.1%Tween20, 1×PBS)洗5 min。加入用杂交液(1%BSA, 0.1%Tween20, 1×PBS)稀释的一抗分别为TGF- $\beta 1$ 和actin,摇床上室温杂交2 h,用洗膜液洗3次,每次10 min。然后分别加入用杂交液稀释的二抗(1:5 000、1:8 000),室温杂交1 h,用洗膜液洗3次,每次10 min。吸去PVDF膜上的多余液体,铺在LAS3000mine化学发光成像仪中,加入等体积混合ECL试剂盒中的液体Detection reagent 1和Detection reagent 2显影,采集图像。

1.2.4 免疫组织化学评分标准: 每张切片400倍显微镜下随机选取5个视野。(1)阳性细胞数:每个视野记数100个细胞,计算5个视野的阳性细胞的平均百分数,将平均百分数分为4分:阳性细胞数1%-24%记为1分;25%-49%记为2分;50%-74%记为3分; $>75\%$ 记为4分;(2)染色强度:无着色0分;浅黄色1分;黄或深黄色2分;褐或棕褐色3分,上述两项相加为(0-7)分标准: ≥ 4 分为高表达。

1.2.5 Western blot免疫印迹: 结果运用Quantity One软件,根据ECL发光成像后条带和电泳条带的面积和密度计算每个条带的灰度值或吸光度。

■相关报道

Lv等通过体外实验认为TGF- $\beta 1$ 可能在纤维化过程中可以起到重要的作用,这一研究结果从很大程度上表明了TGF- $\beta 1$ 为癌细胞的“登陆”腹膜创造极其有利的条件。

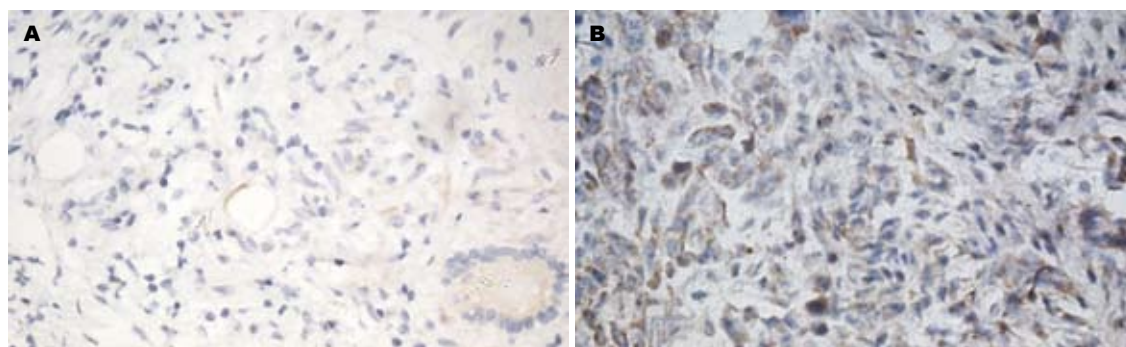


图1 结核性腹膜炎和腹膜转移癌组织TGF- β 1表达($\times 400$). A: 结核性腹膜炎; B: 腹膜转移癌.

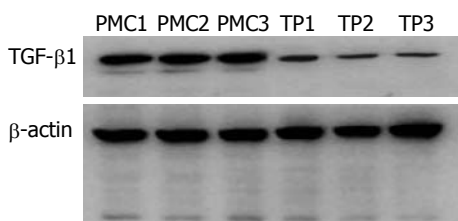


图2 结核性腹膜炎(右3条)和腹膜转移癌(左3条)TGF- β 1以及内参的免疫印迹图.

统计学处理 采用SPSS19.0统计软件, 计量资料用 $\text{mean} \pm \text{SD}$ 表示, 两样本均数比较采用 t 检验, 阳性率的比较采用 χ^2 检验, 以 $P < 0.01$ 作为显著性检验水准.

2 结果

2.1 免疫组织化学 TGF- β 1蛋白以胞浆表达为主, 在腹膜转移癌及结核性腹膜炎的胞浆均有表达, TGF- β 1在腹膜转移癌组织中高表达占85%(17/20); 在结核性腹膜炎中高表达仅占20%(4/20), 两者比较有显著统计学差异($\chi^2 = 16.942, P < 0.01$, 图1).

2.2 Western blot免疫印迹 结核性腹膜炎组织内TGF- β 1的蛋白定量为 31.55 ± 5.61 (QL/pixel²), 腹膜转移癌组织内TGF- β 1的蛋白定量为 88.01 ± 14.41 (QL/pixel²). 腹膜转移癌组织内TGF- β 1的表达显著高于结核性腹膜炎($P < 0.01$, 图2).

3 讨论

腹膜转移癌的发生多是癌细胞经血行或腹膜直接种植生长所致, 多继发于腹腔内肝、胃、结肠、胰腺和卵巢、子宫的癌肿和腹膜后的恶性肿瘤, 也可继发于肺、脑、骨骼、鼻咽部的肿瘤以及皮肤黑色素瘤等^[6]. 目前国内外普遍认为肿瘤的侵袭与转移是肿瘤细胞与宿主细胞、细胞外基质之间一系列复杂的、多步骤、多因素相互作用的动态过程, 主要包括: (1)单个肿

瘤细胞或细胞群必须要脱离始发的肿物进入腹腔; (2)肿瘤细胞将黏附到间皮; (3)肿瘤细胞穿透间皮单层细胞和基底膜, 进入间皮下结缔组织; (4)侵及下层的结缔组织为肿瘤增生提供支架; (5)诱导血管新生^[7]. 各种分子(如黏附分子、蛋白水解酶及运动因子等)的相互作用实现了癌细胞的侵袭转移^[8].

TGF- β 1是一种具有多种功能的细胞因子, 可通过TGF-Smad或其他信号通路(如Ras/MEK/ERK和蛋白激酶C信号通路)参与许多生理和病理过程, 可以促进或抑制细胞增殖、调节各种组织分化和参与纤维化^[9]. 在肿瘤转移过程中: 一方面腹膜间皮细胞将会纤维化, 从而为癌细胞的“登陆”腹膜创造有利条件. 2011年, Yoshihiro等^[10]通过体外实验认为TGF- β 1可能在这一过程中可以起到重要的作用; 另一方面, 在腹膜的深层包含着丰富的毛细血管网, 在生长因子的作用下还会产生新的血管, 在慢性炎症和恶性肿瘤存在的情况下, 相关血管生长因子水平的上调使新血管的生成与抑制失衡, 导致血管大量形成^[11], TGF- β 1和血管内皮生长因子的表达呈正相关, 表明TGF- β 1刺激肿瘤血管生成的作用可通过旁分泌途径诱导血管内皮生长因子的表达, 间接地刺激肿瘤血管的生成, 同时血管内皮生长因子对TGF- β 1也有类似作用, 二者共同促进血管的生成^[12].

本研究对TGF- β 1在腹膜转移癌及结核性腹膜炎组织中表达进行了研究, 通过免疫组化发现: TGF- β 1在结核性腹膜炎组织中仅少量表达于结核结节周围; 而在腹膜转移癌组织中, 他则呈现明显的弥漫性的高表达. 同时应用Western blot的方法进一步从基因和蛋白的水平上发现了相同的趋势. 这一结果一方面证实了腹膜转移癌血管新生的程度要显著高于结核性腹膜炎, 另一方面也表明腹膜转移癌组织呈现弥漫的纤

■创新盘点
TGF- β 1在腹膜组织中的高表达, 说明病变腹膜组织的纤维化及血管增生, 高度提示恶性转移可能.

■应用要点
TGF- β 1在腹膜转移癌组织中的表达高于结核性腹膜炎组织, 提示TGF- β 1在腹膜转移癌的发生发展中具有重要作用.

同行评价

本文选题结合临床, 结果对临床理解腹膜转移癌的分子机制具有一定意义, 有一定的新颖性, 文章写作较流畅, 具有一定的临床参考意义。

维化, 而结核性腹膜炎则仅在结核结节周围较明显, 这也与二者的病理基础相符: 结核性腹膜炎的病理基础为腹膜组织的肉芽组织形成与干酪样坏死; 腹膜转移癌则为肿瘤细胞弥漫种植于腹膜表面, 生长繁殖, 被腹膜的结缔组织所包裹形成大小不等的转移结节。因此我们可以认为TGF- β 1在恶性肿瘤腹膜转移时会对这一进程起到重要的促进作用。

TGF- β 1可依赖多条信号通路发挥作用, 主要有Smads依赖和非Smads依赖性的信号通路^[13], 有学者认为TGF- β 1在腹膜转移癌中的作用主要是通过磷酸化Smad2、3来实现的^[14], 也有大量文献报道TGF- β 1是通过非经典型信号通路诱导肿瘤转移和浸润^[15]。所以TGF- β 1在恶性肿瘤细胞的腹膜转移过程中通过什么途径来起作用, 还需要人们进一步的研究和验证。

总之, 恶性肿瘤腹膜转移的发生发展过程, 包括腹膜纤维化及肿瘤血管生成等一系列改变, 其分子机制的改变是这诸多改变的基础, 而TGF- β 1是这其中的重要调节因子, 为今后进一步完善恶性肿瘤腹膜转移的分子机制奠定了基础。

参考文献

- 1 Tamsma J. The pathogenesis of malignant ascites. *Cancer Treat Res* 2007; 134: 109-118
- 2 Yang XJ, Li Y, al-shammaa Hassan AH, Yang GL, Liu SY, Lu YL, Zhang JW, Yonemura Y. Cytoreductive surgery plus hyperthermic intraperitoneal chemotherapy improves survival in selected patients with peritoneal carcinomatosis from abdominal and pelvic malignancies: results of 21 cases. *Ann Surg Oncol* 2009; 16: 345-351
- 3 Massagué J. The transforming growth factor-beta family. *Annu Rev Cell Biol* 1990; 6: 597-641
- 4 Margetts PJ, Kolb M, Galt T, Hoff CM, Shockley TR, Gauldie J. Gene transfer of transforming growth factor-beta1 to the rat peritoneum: effects on membrane function. *J Am Soc Nephrol* 2001; 12: 2029-2039
- 5 Itoh S, Itoh F. Implication of TGF- β as a survival factor during tumor development. *J Biochem* 2012 May 2. [Epub ahead of print]
- 6 Shi M, Zhu J, Wang R, Chen X, Mi L, Walz T, Springer TA. Latent TGF- β structure and activation. *Nature* 2011; 474: 343-349
- 7 Spalding DR, Williamson RC. Peritonitis. *Br J Hosp Med (Lond)* 2008; 69: M12-M15
- 8 Jayne D. Molecular biology of peritoneal carcinomatosis. *Cancer Treat Res* 2007; 134: 21-33
- 9 Shiozaki H, Doki Y, Tamura S, Monden M. [Molecular mechanism of carcinogenesis in gastric cancer: Intercellular molecule cadherin and catenin]. *Nihon Rinsho* 2001; 59 Suppl 4: 88-93
- 10 Yashiro M, Chung YS, Nishimura S, Inoue T, Sowa M. Fibrosis in the peritoneum induced by scirrhous gastric cancer cells may act as "soil" for peritoneal dissemination. *Cancer* 1996; 77: 1668-1675
- 11 Lv ZD, Na D, Ma XY, Zhao C, Zhao WJ, Xu HM. Human peritoneal mesothelial cell transformation into myofibroblasts in response to TGF- β 1 in vitro. *Int J Mol Med* 2011; 27: 187-193
- 12 Thurston G, Kitajewski J. VEGF and Delta-Notch: interacting signalling pathways in tumour angiogenesis. *Br J Cancer* 2008; 99: 1204-1209
- 13 Araújo FA, Rocha MA, Mendes JB, Andrade SP. Atorvastatin inhibits inflammatory angiogenesis in mice through down regulation of VEGF, TNF-alpha and TGF-beta1. *Biomed Pharmacother* 2010; 64: 29-34
- 14 Yáñez-Mó M, Lara-Pezzi E, Selgas R, Ramírez-Huesca M, Domínguez-Jiménez C, Jiménez-Heffernan JA, Aguilera A, Sánchez-Tomero JA, Bajo MA, Alvarez V, Castro MA, del Peso G, Cirujeda A, Gamallo C, Sánchez-Madrid F, López-Cabrera M. Peritoneal dialysis and epithelial-to-mesenchymal transition of mesothelial cells. *N Engl J Med* 2003; 348: 403-413
- 15 Giehl K, Imamichi Y, Menke A. Smad4-independent TGF-beta signaling in tumor cell migration. *Cells Tissues Organs* 2007; 185: 123-130

编辑 曹丽鸥 电编 闫晋利

腹膜后腺泡状软组织肉瘤1例

时林森, 王峰, 汪灏, 管文贤

时林森, 王峰, 汪灏, 管文贤, 南京医科大学鼓楼临床医学院
普通外科 江苏省南京市 210008

时林森, 硕士, 主要从事胃肠外科肿瘤的基础与临床研究.

作者贡献分布: 本文的临床资料收集、撰写、文献查询由时林森完成; 王峰参与临床资料收集及文章撰写; 汪灏指导文章配图及撰写; 管文贤负责对论文进行指导与修改.

通讯作者: 管文贤, 教授, 210008, 江苏省南京市中山路321号, 南京医科大学鼓楼临床医学院普通外科. guan-wx@163.com
电话: 025-83106666-11402

收稿日期: 2012-05-13 修回日期: 2012-07-01

接受日期: 2012-07-20 在线出版日期: 2012-08-08

Retroperitoneal alveolar soft-part sarcoma: A case report

Lin-Sen Shi, Feng Wang, Hao Wang, Wen-Xian Guan

Lin-Sen Shi, Feng Wang, Hao Wang, Wen-Xian Guan,
Department of General Surgery, Affiliated Gulou Clinical
Medical School of Nanjing Medical University, Nanjing
210008, Jiangsu Province, China

Correspondence to: Wen-Xian Guan, Professor, Department of General Surgery, Affiliated Gulou Clinical Medical School of Nanjing Medical University, 321 Zhongshan Road, Nanjing 210008, Jiangsu Province, China. guan-wx@163.com

Received: 2012-05-13 Revised: 2012-07-01

Accepted: 2012-07-20 Published online: 2012-08-08

Abstract

Alveolar soft-part sarcoma is a rare type of malignant soft tissue tumor that usually presents as a painless, slow-growing mass and is easily misdiagnosed as paraganglioma, alveolar rhabdomyosarcoma, clear cell renal cell carcinoma, or granular cell tumor. Alveolar soft-part sarcoma of the retroperitoneum is extremely rare. Here we report a case of retroperitoneal alveolar soft-part sarcoma that was correctly diagnosed based on a combination of imaging, clinical and pathological features and the use of immunohistochemical and gene detection techniques. A literature review was performed to further raise the awareness of this rare disease.

Key Words: Retroperitoneal; Alveolar soft-part sarcoma; Diagnosis

Shi LS, Wang F, Wang H, Guan WX. Retroperitoneal alveolar soft-part sarcoma: A case report. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2012; 20(22): 2115-2117

摘要

腺泡状软组织肉瘤是一种少见的软组织恶性肿瘤,发生于腹膜后的腺泡状软组织肉瘤极为罕见,主要表现为无痛性生长的软组织肿块.国内外报道罕见,且易与副神经节瘤、腺泡状横纹肌肉瘤、肾透明细胞癌、颗粒细胞瘤混淆.本文报道腹膜后的腺泡状软组织肉瘤1例,结合影像学、临床病理学特征、免疫组织化学及基因检测技术,作出了正确诊断及治疗,并结合相关文献进行分析讨论,进一步提高了对腹膜后的腺泡状软组织肉瘤的认识.

关键词: 腹膜后; 腺泡状软组织肉瘤; 诊断

时林森, 王峰, 汪灏, 管文贤. 腹膜后腺泡状软组织肉瘤1例. *世界华人消化杂志* 2012; 20(22): 2115-2117

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/2115.asp>

0 引言

腹膜后腺泡状软组织肉瘤(retroperitoneal alveolar soft tissue sarcoma)在临床上非常罕见,我院2012-12收治1例,先将本例患者相关资料报道如下.

1 病例报告

女, 26岁, 因“发现右下腹包块3 mo余”入院, 伴右下腹痛, 右下肢麻木. 查体: 右下腹可及1包块, 表面无红肿, 实质性, 大小约9 cm×8 cm×7 cm, 界清, 活动度欠佳. 查CT示: 右侧腹腔占位, 考虑神经来源(图1). MRI示: L2-4椎体水平右侧腰大肌实质性占位伴坏死, 累计周围椎弓根及椎管内, 考虑间质肉瘤可能性大(图2). 手术采用右肋缘下弧形切口, 长约20 cm. 术中见肿瘤位于右侧腹膜后, 大小约9 cm×8 cm×7 cm, 质硬, 无完整包膜, 边界欠清, 活动差, 累及右侧腰大肌. 分离肿瘤与周围组织粘连, 切除包括肿瘤在内的部分右侧腰大肌. 标本剖视: 肿块大小约9 cm×8 cm×7 cm, 切面鱼肉状, 中心可见液化灶. 术后病理: 肉眼观暗红色肿块1枚, 大小9 cm×7 cm×6.5 cm, 部分区域有脂肪组织, 肿块切面灰黄色, 实性、质中、见坏死, 部分区域呈囊性变. 镜下

■背景资料

腺泡状软组织肉瘤(ASPS)是一种较为罕见的恶性肿瘤,由Christopherson及其同事于1952年首先报告,其病理组织学特点为肿瘤血管丰富,光镜下可见假腺泡形成,电镜下细胞内可见特征性的多边形结晶.

■同行评议者

季加孚, 教授, 北京大学肿瘤医院

■研发前沿

ASPS, 目前组织学起源尚不很明确, 遗传学研究发现 $t(X; 17)(p11; q25)$ 易位, 这种染色体的非均衡易位使 Xp11 上的 TFE3 转录因子与 17q25 上的 ASPL 基因形成融合基因。

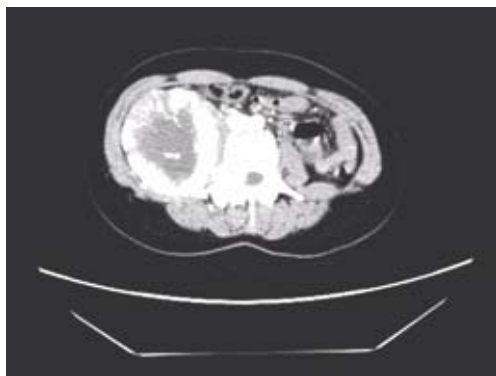


图 1 CT检查图. 右侧腹腔可见一巨大软组织团块影, 局部与L3椎管内相连, 右肾受压移位, 大小约9.3 cm × 8.1 cm, 其内可见片状低密度影, 增强后可见明显不均匀强化, 其内可见供血血管影。

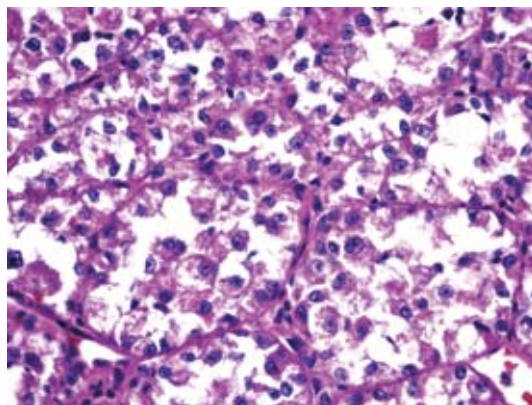


图 3 HE染色(×400). 肿瘤细胞小巢状或腺泡样排列, 细胞多角形或圆形, 细胞核具有一定异型性, 核仁明显, 间质血窦丰富。



图 2 MRI检查. L2-4椎体水平右侧腹膜后大小约9.1 cm × 7.1 cm, 增强后肿块实性部分明显强化, 中心坏死部分不强化。

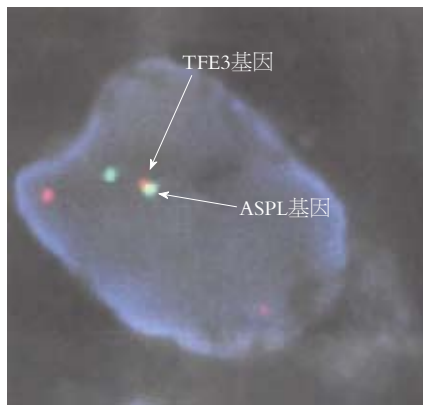


图 4 TFE3-ASPL融合基因表达. 红色信号代表X染色体TFE3基因端粒侧, 绿色信号代表17号染色体ASPL基因着丝粒侧。

见肿瘤组织边界清晰, 具纤维包膜. 肿瘤组织呈小巢状或腺泡样排列; 细胞多角形或圆形, 细胞核具有一定异型性, 间质血窦丰富(图3)。

免疫组织化学: 肿瘤细胞表达突触素(synaptophysin, Syn)(-), 嗜铬蛋白A(chromogranin A, CgA)(+), 白细胞分化抗原56(cluster of differentiation 56, CD56)(-), 细胞增殖核抗原(nuclear associated antigen, Ki-67)约3%(+), TEF-3基因(TFE-3)(+), 肌特异性肌纤维蛋白(muscle specific actin, MSA)(-), S100蛋白(S100)(-), 生肌因子(myogenin, Myo-Genin)(+), 胞质角蛋白(cyto-keratin, CK)(-), 神经丝蛋白(neurofilament protein, NF)(+), 结蛋白(desmin, Des)散在少量细胞(+), 白细胞分化抗原34(cluster of differentiation 34, CD34)血管(+), 唾液酸糖蛋白(Podoplanin D2-40)脉管(+).

特殊染色: PAS染色(Periodic acid-Schiff stain, PAS)(+). 病理诊断: (右后腹膜肿瘤): 结合免疫组织化学及HE切片考虑为腺泡状软组织肉瘤, 脉管内见瘤栓. 荧光原位杂交

(fluorescence in situ hybridization, FISH)基因检测: 本次检测FISH结果异常, 肿瘤细胞表现为 $der(17)t(x;17)(p11;q25)$ 易位, 分子病理学改变符合腺泡状软组织肉瘤(图4)。

2 讨论

腺泡状软组织肉瘤(alveolar soft part sarcoma, ASPS)由Christopherson和其同事于1952年首先报道^[1], 它是一种罕见的软组织肉瘤, 据美国、印度、中国学者报道, 其分别占全部软组织肉瘤的0.5%-1.0%、1.8%、0.5%左右^[2-4]. 本病多见于年轻患者, 发病高峰年龄15-30岁, 女性多于男性. 发病部位最常见于骨盆和下肢软组织, 发生于腹膜后的腺泡状软组织肉瘤非常罕见^[2]. 常表现为无痛性生长的软组织肿块。

病理镜检: 低倍镜下细胞呈多角形、巢状或腺泡样排列, 周围环绕类似肺泡毛细血管的血管窦. 高倍镜下肿瘤细胞胞质丰富, 多含有细胞周期性嗜酸阿少夫小体、淀粉糖酵解酶阳性

■相关报道

ASPS发病部位最常见于骨盆和下肢的软组织, 发生于腹膜后的腺泡状软组织肉瘤非常罕见, 国内外报道较少, 且临床资料多不完整。

颗粒和典型的均匀红染棒状结晶, 胞质或棒状结晶PAS染色均为(+). 细胞核为圆形或椭圆形, 染色质形态不规则, 核仁明显, 核分裂象少见. 影像学检查, CT平扫肿瘤和周围骨骼肌相比表现为等密度或稍高密度, MRI T1加权像表现为等信号或稍低信号, CT增强和MRI T2加权像肿瘤组织明显增强或表现为高信号, 75%以上患者可见瘤灶中心液化坏死^[5]. ASPS的遗传学研究发现t(X;17)(p11;q25)易位, 这种染色体的非均衡易位使Xp11上的TFE3转录因子与17q25上的ASPL基因形成融合基因. 因此, TFE3对ASPS的诊断具有重要意义^[3,6].

ASPS是一种少见的软组织恶性肿瘤, 发生于腹膜后的ASPS极为罕见, 且易与副神经节瘤、腺泡状横纹肌肉瘤、肾透明细胞癌、颗粒细胞瘤混淆. 本例患者结合影像学、临床病理学特征、免疫组织化学及基因检测技术, 作出了正确诊断. ASPS虽然生长缓慢, 但高度恶性. 治疗上以病灶根治性切除为主, 辅以术后局部放疗和化疗, 但疗效不理想^[7,8]. 多见静脉受侵和血液转移, 常见转移部位主要是肺, 其次为脑、骨、肝等. 本例患者术后随访半年, 未见明显局部复发及远处转移.

3 参考文献

- 1 Christopherson WM, Foote FW, Stewart FW. Alveolar soft-part sarcomas; structurally characteristic tumors of uncertain histogenesis. *Cancer* 1952; 5: 100-111
- 2 Portera CA, Ho V, Patel SR, Hunt KK, Feig BW, Respondek PM, Yasko AW, Benjamin RS, Pollock RE, Pisters PW. Alveolar soft part sarcoma: clinical course and patterns of metastasis in 70 patients treated at a single institution. *Cancer* 2001; 91: 585-591
- 3 Rekhi B, Ingle A, Agarwal M, Puri A, Laskar S, Jambhekar NA. Alveolar soft part sarcoma 'revisited': clinicopathological review of 47 cases from a tertiary cancer referral centre, including immunohistochemical expression of TFE3 in 22 cases and 21 other tumours. *Pathology* 2012; 44: 11-17
- 4 方志伟, 陈勇, 宋金钢, 张如明, 杨蕴, 马育林, 张瑾, 滕胜, 邢汝维, 多健. 796例软组织肉瘤分析. *中国肿瘤临床* 2006; 33: 383-386
- 5 Ladanyi M, Antonescu CR, Drobnjak M, Baren A, Lui MY, Golde DW, Cordon-Cardo C. The precystalline cytoplasmic granules of alveolar soft part sarcoma contain monocarboxylate transporter 1 and CD147. *Am J Pathol* 2002; 160: 1215-1221
- 6 Daigeler A, Kuhn C, Hauser J, Goertz O, Tilkorn D, Steinstraesser L, Steinau HU, Lehnhardt M. Alveolar soft part sarcoma: clinicopathological findings in a series of 11 cases. *World J Surg Oncol* 2008; 6: 71
- 7 Kayton ML, Meyers P, Wexler LH, Gerald WL, LaQuaglia MP. Clinical presentation, treatment, and outcome of alveolar soft part sarcoma in children, adolescents, and young adults. *J Pediatr Surg* 2006; 41: 187-193
- 8 Casanova M, Ferrari A, Bisogno G, Cecchetto G, Basso E, De Bernardi B, Indolfi P, Fossati Bellani F, Carli M. Alveolar soft part sarcoma in children and adolescents: A report from the Soft-Tissue Sarcoma Italian Cooperative Group. *Ann Oncol* 2000; 11: 1445-1449

■同行评价

本文病例罕见, 该报道紧密结合临床实践, 具有较好的临床指导价值.

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 •

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)

《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-RCES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 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 $^aP < 0.05$, $^bP < 0.01$ ($P > 0.05$ 不注). 如同一表中另有一套 P 值, 则 $^cP < 0.05$, $^dP < 0.01$; 第三套为 $^eP < 0.05$, $^fP < 0.01$ 等.

2.6 数字用法 遵照国家标准GB/T 15835-1995出版物上数字用法的规定, 作为汉语词素者采用汉字数字, 如二氧化碳、十二指肠、三倍体、四联球菌、五四运动、星期六等. 统计学数字采用阿拉伯数字, 如1000-1500 kg, 3.5 mmol/L \pm 0.5 mmol/L等. 测量的数据不能超过其测量仪器的精密度, 例如6347意指6000分之一的精密度. 任何一个数字, 只允许最后一位有误差, 前面的位数不应有误差. 在一组数字中的 $\text{mean} \pm \text{SD}$ 应考虑到个体的变差, 一般以SD的1/3来定位数, 例如 $3614.5 \text{ g} \pm 420.8 \text{ g}$, SD的1/3达一百多g, 平均数波动在百位数, 故应写成 $3.6 \text{ kg} \pm 0.4 \text{ kg}$, 过多的位数并无意义. 又如 $8.4 \text{ cm} \pm 0.27 \text{ cm}$, 其 $\text{SD}/3 = 0.09 \text{ cm}$, 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!

蔡开琳 副教授

华中科技大学同济医学院附属协和医院普通外科

南极星 教授

延边大学药学院

蔡三军 主任医师

复旦大学附属肿瘤医院大肠外科

牛英才 研究员

齐齐哈尔医学院医药科学研究所

曹秀峰 教授

南京医科大学附属南京第一医院肿瘤中心

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

陈卫昌 教授

苏州大学附属第一医院消化内科

宋振顺 教授

西京医院肝胆外科

樊红 教授

东南大学基础医学院遗传与发育生物学系

孙学英 教授

哈尔滨医科大学第一附属医院黑龙江省肝胆外科中心

范学工 教授

中南大学湘雅医院

唐南洪 教授

福建医科大学附属协和医院省肝胆外科研究所

冯志杰 主任医师

河北医科大学第二医院消化内科

王悦华 副主任医师

首都医科大学附属宣武医院外科

郝丽萍 副教授

华中科技大学同济医学院公共卫生学院营养与食品卫生学系

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

何晓顺 教授

中山大学附属第一医院

杨柏霖 副主任医师

南京中医药大学附属医院肛肠科

何裕隆 教授

中山大学附属第一医院胃肠胰腺外科

杨钦河 教授

暨南大学医学院中医系

黄晓东 主任医师

武汉市中心医院消化内科

姚树坤 教授

卫生部中日友好医院消化内科

黄颖秋 教授

本溪钢铁(集团)总医院消化内科

张凤春 教授

上海交通大学医学院附属仁济医院肿瘤中心

李华 副教授

中山大学附属第三医院肝脏外科

张国梁 主任医师

天津市第一中心医院消化内科

李勇 副教授

上海中医药大学附属市中医医院消化科

张力为 副教授

新疆医科大学第一附属医院胸外科

禄韶英 副教授

西安交通大学医学院第一附属医院普外科

周国雄 主任医师

南通大学附属医院消化内科