

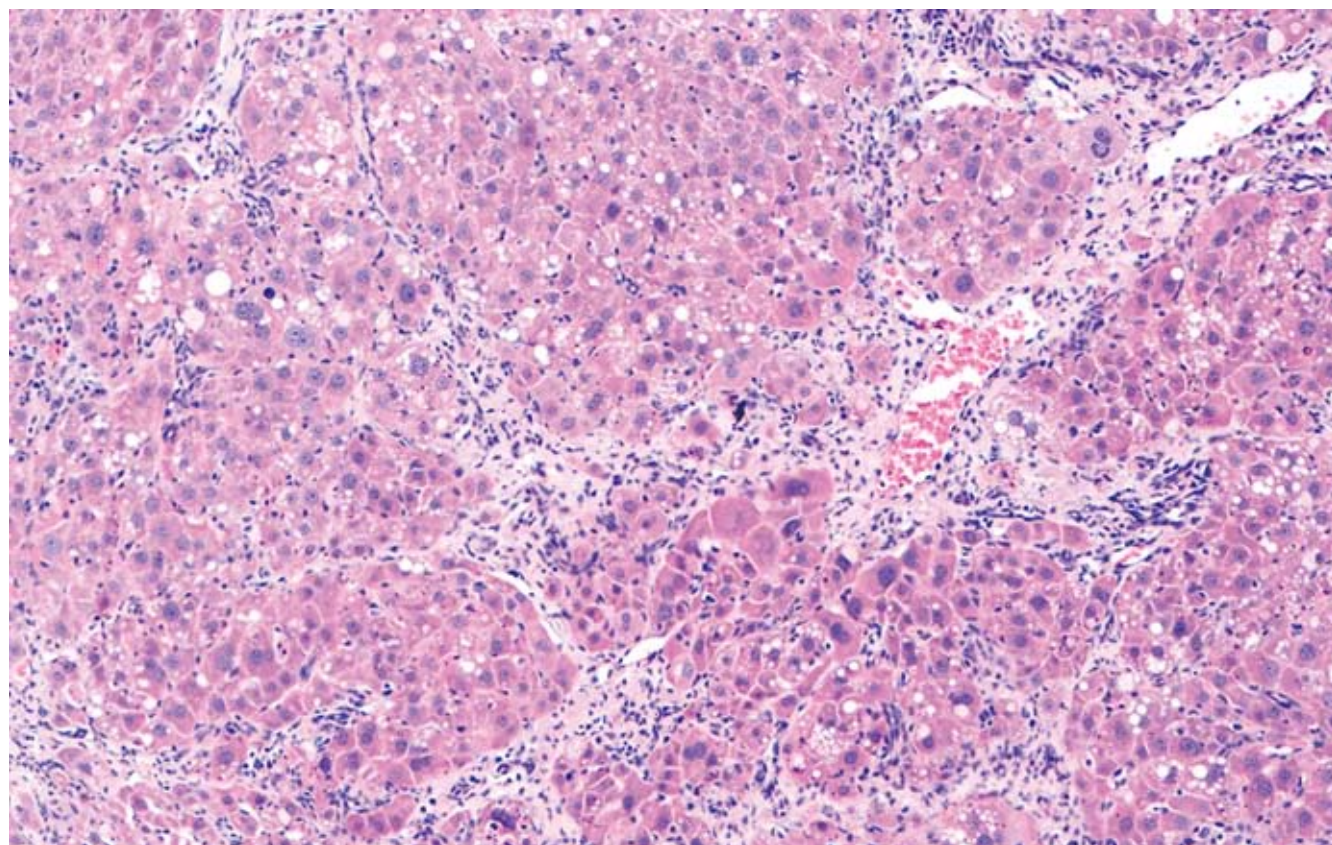
ISSN 1009-3079 (print)  
ISSN 2219-2859 (online)  
CN 14-1260/R

# 世界华人消化杂志®

**WORLD CHINESE  
JOURNAL OF DIGESTOLOGY**

**Shijie Huaren Xiaohua Zazhi**

**2011 年 7 月 8 日 第 19 卷 第 19 期 (Volume 19 Number 19)**



**19/2011**

ISSN 1009-3079



名誉总编辑

潘伯荣

总编辑

马连生

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

# 世界华人消化杂志®

## 编辑委员会

2009-01-01/2011-12-31

wcjd@wjgnet.com www.wjgnet.com

### 总顾问

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

### 名誉总编辑

潘伯荣教授

### 社长/总编辑

马连生教授

### 副总编辑

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

### 常务编委

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

### 编委

#### 消化内科学

白爱平副教授  
苒新明教授  
陈国忠副主任医师  
陈洪刚教授  
陈其奎教授  
陈卫昌教授  
陈贻胜教授  
程斌教授  
迟宝荣教授  
崔立红教授

邓长生教授  
丁士刚教授  
董蕾教授  
杜雅菊主任医师  
杜奕奇副教授  
樊晓明主任医师  
房静远教授  
冯志杰主任医师  
傅春彬主任医师  
高峰副教授  
戈之铮教授  
关玉盘教授  
关晓辉主任医师  
郭晓钟教授  
郝建宇教授  
何松教授  
洪天配教授  
侯晓华教授  
胡伏莲教授  
胡和平主任医师  
黄培林教授  
黄晓东主任医师  
黄颖秋教授  
黄缘教授  
霍丽娟教授  
季国忠教授  
江米足主任医师  
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  
李定国教授  
李淑德教授  
李瑜元教授  
李玉民教授  
李玉明教授  
廖家智副主任医师  
林志辉教授  
刘冰熔教授  
刘凤斌教授  
刘改芳主任医师  
刘海峰主任医师  
刘海林主任医师  
刘铁夫教授  
刘莹副主任医师  
刘占举教授  
陆伦根教授  
吕志武教授  
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  
任粉玉副教授  
任建林教授  
邵先玉教授  
沈琳主任医师  
沈守荣教授  
沈薇教授  
施瑞华教授  
宋军副教授  
宋于刚教授  
唐世刚教授  
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  
王晓艳副教授  
闻勤生教授  
夏冰教授  
夏时海副教授  
徐可树教授  
许乐主任医师  
杨建民教授  
姚树坤教授  
叶红军主任医师  
张春清教授  
张国梁主任医师  
张军教授  
张小晋主任医师  
张晓岚教授  
张筱茵副教授  
张志坚教授  
郑培永副教授  
郑鹏远教授  
郑素军副主任医师  
周国雄主任医师  
周晓东副教授  
周宇教授  
朱春兰主任医师  
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  
陈力教授  
陈立波教授  
陈凇教授  
陈强谱教授  
陈汝福教授  
陈亚军主任医师  
陈钟教授  
程爱国教授  
程爱群主任医师  
程树群副教授  
崔云甫教授  
戴朝六教授  
戴冬秋教授  
丁义涛教授  
董明教授  
杜成友教授  
杜顺达副主任医师  
房林副教授  
傅红副教授  
傅华群教授  
傅志仁主任医师  
高成新教授  
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  
姜卫东教授  
姜波健教授  
蒋龙元副教授  
金山副教授  
黎乐群教授  
李革副教授  
李国威教授  
李华副教授  
李华山主任医师

李杰教授  
李奇林教授  
李胜研究员  
李涛副主任医师  
李文岗教授  
李小荣教授  
李旭副教授  
李永翔主任医师  
李志霞教授  
李宗芳教授  
梁力建教授  
刘宝林教授  
刘超副教授  
刘建教授  
刘颖斌主任医师  
卢实春教授  
陆才德教授  
陆云飞教授  
禄韶英副主任医师  
吕明德教授  
吕云福教授  
彭吉润主任医师  
彭心宇教授  
齐清会教授  
秦春宏副主任医师  
秦华东教授  
秦环龙教授  
秦建民副主任医师  
邱宝安主任医师  
邱双健副教授  
邱伟华副主任医师  
仇毓东副教授  
裘正军教授  
单云峰副主任医师  
沈柏用副教授  
沈世强教授  
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  
孙学英教授  
孙延平副主任医师  
邵升副教授  
谭晓冬教授  
汤朝晖副主任医师  
汤恢焕教授  
汤绍涛教授  
唐南洪教授  
田晓峰教授  
汪波副主任医师



汪根树副教授  
王春友教授  
王德盛副主任医师  
王凤山教授  
王广义教授  
王健生教授  
王鲁副教授  
王蒙副教授  
王石林主任医师  
王文跃主任医师  
王悦华副主任医师  
王振宁教授  
王正康教授  
王志刚副主任医师  
王忠裕教授  
吴河水教授  
吴健雄教授  
吴金术教授  
吴泰璜教授  
吴志勇教授  
伍晓汀教授  
谢敏主任医师  
谢晓华副教授  
邢光明教授  
徐大华主任医师  
徐迅迪教授  
徐洪副教授  
徐戈良教授  
许剑民教授  
薛东波教授  
严律南教授  
杨柏霖副主任医师  
杨桦教授  
杨家和主任医师  
杨维良教授  
杨银学教授  
杨尹默教授  
伊力亚尔·夏合丁教授  
殷正丰教授  
于聪慧教授  
于则利教授  
禹正杨副教授  
郁宝铭教授  
元云飞教授  
张必翔主任医师  
张宏伟教授  
张佳林教授  
张进祥副教授  
张俊副研究员  
张力为副教授  
张群华教授  
张水军教授  
张宗明教授  
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  
陈仕珠主任医师  
陈志辉副主任医师  
党双锁教授  
丁惠国教授  
范建高教授  
范小玲主任医师  
高润平教授  
高泽立副教授  
高志良主任医师  
龚国忠教授  
管世鹤副教授  
郝春秋副教授  
何生松教授  
胡国信副主任医师  
靳雪源副主任医师  
林菊生教授  
刘正稳教授  
宁琴教授  
牛俊奇教授  
钱林学主任医师  
孙殿兴主任医师  
谭德明教授  
汤华研究员  
唐霓副研究员  
唐晓鹏教授  
王凯教授  
王怡主任医师  
魏来教授  
吴建国教授  
吴君主任医师  
宣世英教授  
杨江华副教授  
杨林副研究员  
姚鹏副教授  
张继明教授  
张明辉副主任医师  
张占卿主任医师  
赵桂鸣主任医师  
赵连三教授  
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

蔡淦教授

陈治水主任医师  
杜群副研究员  
黄恒青主任医师  
李军祥教授  
李康副教授  
李晓波教授  
李勇副教授  
李振华教授  
刘成海研究员  
刘平教授  
刘绍能主任医师  
龙致贤教授  
南极星教授  
牛英才研究员  
沈洪教授  
司富春教授  
唐志鹏研究员  
王富春教授  
王新月教授  
邢建峰副教授  
徐列明教授  
许玲副教授  
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  
陈公琰主任医师  
陈克能教授  
代智副研究员  
华海清教授  
李瑗教授  
刘宝瑞教授  
刘彬彬副研究员  
刘云鹏教授  
秦叔逵教授  
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  
熊斌教授  
张凤春教授

### 消化影像学

白彬主任医师  
陈克敏教授  
官泳松教授  
韩新巍教授  
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  
施海彬教授  
魏经国教授  
肖恩华教授  
徐爱民副教授  
徐辉雄教授  
徐克教授  
严惟力副教授  
杨业发教授  
杨建勇教授  
赵卫主任医师

### 消化内镜及介入治疗学

丁佑铭教授  
郝俊鸣副主任医师  
茅爱武教授  
潘林娜教授  
孙明军教授  
万军教授  
吴硕东教授  
袁友红副教授

### 消化中西医结合学

唐文富副教授  
王学美研究员  
魏睦新教授  
杨钦河教授  
张春虎副教授

### 消化基础研究

曹洁副教授  
曹鹏副研究员  
曹师承教授  
陈敬贤教授  
陈秋生教授  
陈志龙教授  
崔莲花副教授  
樊红教授  
高春芳研究员  
高国全教授  
高英堂研究员  
管冬元副教授  
何敏教授  
黄昆教授  
黄文林教授  
黄园教授  
李东辉教授  
李刚教授  
李杰副教授  
李君文研究员  
李永哲副研究员  
李增山副教授  
刘克辛教授  
刘森副教授

梅林教授  
钱其军研究员  
钱睿哲教授  
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  
田颖刚副研究员  
汪思应教授  
王钦红教授  
魏继福副研究员  
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  
姚登福教授  
阴赅宏研究员  
郁卫东副研究员  
喻荣彬教授  
张青云研究员  
张学教授  
赵平副教授  
周南进研究员  
周士胜教授  
周素芳教授  
周晓东研究员  
周晓武副主任医师  
朱进霞教授

### 消化病理学

杜祥教授  
李菊玲副教授  
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  
吕宁主任医师  
马大烈教授  
门秀丽教授  
潘兴华副主任医师  
孙伟副研究员  
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  
赵景民教授  
朱亮副教授

# 世界华人消化杂志

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

● 目 次 ● 2011 年 7 月 8 日 第 19 卷 第 19 期 (总第351期)

## 述 评

- 1981 胃黏膜肠上皮化生、胃上皮内瘤变与胃癌的组织发生  
高泽立, 张成, 盛飞英, 金丽雯

## 基 础 研 究

- 1985 siRNA沉默USP22基因对胃癌细胞增殖的抑制作用  
邓美洲, 陶凯雄, 王国斌, 刘兴华
- 1990 P21对胃癌细胞MGC-803的增殖抑制及对POLD1基因表达的调控  
阮细玲, 李永继, 吴琼, 廖柳凤, 徐恒
- 1996 软脂酸对酒精体外诱导的脂肪变性肝细胞的作用及机制  
王春晖, 卿笃信
- 2002 选择性环氧合酶-2抑制剂塞来希布对大鼠肝纤维化的作用  
田丰, 王琳, 张亚杰
- 2011 洋葱提取物对结肠癌细胞增殖的抑制作用  
周阿成, 金黑鹰, 谈瑄忠, 钱晓磊, 张春霞, 何勇山, 王水明

## 临 床 研 究

- 2016 成人原代肝细胞的分离、培养及冻存  
杭化莲, 张磊, 施晓雷, 卞建民, 丁义涛
- 2022 HIF-1 $\alpha$ 和EMT相关蛋白在胰腺癌组织中的表达及临床意义  
朱光辉, 岑刚, 黄陈, 张志华, 冯正中, 吕秀红, 袁正军

## 文 献 综 述

- 2031 内镜黏膜下剥离术在早期胃癌治疗中的应用进展  
冯倩, 戈之铮
- 2036 脂联素在非酒精性脂肪肝中的作用及机制  
张征波, 孙晓琦, 钱斐, 薛博瑜
- 2043 慢性胰腺炎的病因学研究进展  
耿琼梅, 张海蓉, 段丽平
- 2048 快速康复在结直肠手术中的应用  
赵银泉, 佟伟华, 王权
- 2053 乳糜泻临床研究进展  
李慕然, 刘艳迪, 李文

## 研 究 快 报

- 2058 麦冬多糖MDG-1对糖尿病小鼠糖耐量及肠道菌群的影响  
王令仪, 王硕, 王源, 阮克锋, 冯怡

## 临 床 经 验

- 2063 TRAIL在重型肝炎患者PBMC和血清中的表达及血浆置换治疗前后的变化  
魏屏, 张景辉, 刘薇, 朱祥珍
- 2068 重型肝炎预后因素分析与护理对策  
罗玲, 袁春兰, 赖宁, 蒋祖利, 林年芬, 汪景香
- 2072 原发性肝癌肝移植135例  
肖朝辉, 张培瑞, 余灵祥, 常伟华, 胡雄伟, 孙颖哲, 李志伟
- 2076 IL-23R基因多态性与炎症性肠病的相关性  
陆忠凯, 陈志荣, 朱俊义, 徐亚, 华炯

病例报告	2081 蓝色橡皮疱痣综合征1例 赵晶, 高善玲, 刘冰熔, 刘中宏, 范玉晶
附录	2084 《世界华人消化杂志》投稿须知 2089 2011年国内国际会议预告
志 谢	2090 志谢世界华人消化杂志编委
消 息	1995 《世界华人消化杂志》参考文献要求 2001 《世界华人消化杂志》外文字符标准 2010 招聘生物医学编辑部主任 2047 《世界华人消化杂志》入选北京大学图书馆2008年版《中文核心期刊要目总览》 2062 百世登出版集团推出12种开放获取生物医学期刊全部被PubMed和PMC收录 2067 《世界华人消化杂志》出版流程 2080 WJG总被引频次排名位于第174名 2083 中国科技信息研究所发布《世界华人消化杂志》影响因子0.625
封面故事	田丰, 王琳, 张亚杰. 选择性环氧合酶-2抑制剂塞来希布对大鼠肝纤维化的作用. 世界华人消化杂志 2011; 19(19): 2002-2010 <a href="http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/2002.asp">http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/2002.asp</a>
本期责任人	编务 刘晓芳; 送审编辑 李军亮; 组版编辑 何基才; 英文编辑 王天奇; 责任编辑 李薇; 审核编辑 李军亮; 形式规范 马连生

<p><b>世界华人消化杂志</b></p> <p><b>Shijie Huaren Xiaohua Zazhi</b></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 2011-07-08 原刊名 新消化病学杂志</p> <p>名誉总编辑 潘伯荣 总 编 辑 马连生 编辑部主任 李军亮 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 太原消化病防治中心</p>	<p><b>编辑</b> 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 <a href="http://www.wjgnet.com">http://www.wjgnet.com</a></p> <p><b>出版</b> 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 <a href="http://www.wjgnet.com">http://www.wjgnet.com</a></p> <p><b>印刷</b> 北京科信印刷厂</p> <p><b>发行</b> 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)</p> <p><b>订购</b> 全国各地邮电局</p> <p><b>邮购</b> 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 <a href="http://www.wjgnet.com">http://www.wjgnet.com</a></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(<a href="http://www.baishideng.com/wcjd/ch/index.aspx">http://www.baishideng.com/wcjd/ch/index.aspx</a>), 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><b>特别声明</b> 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>2011年版权归世界华人消化杂志所有</p>
---	---	---

中国标准连续出版物号 **ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online)** 邮发代号 国外代号 国内定价 广告经营许可证  
CN 14-1260/R 82-262 M 4481 每期56.00元 全年1616.00元 1401004000050

# World Chinese Journal of Digestology

## July 2011 Contents in Brief Volume 19 Number 19

<b>EDITORIAL</b>	1981 Intestinal metaplasia, intraepithelial neoplasia and gastric carcinogenesis <i>Gao ZL, Zhang C, Sheng FY, Jin LW</i>
<b>BASIC RESEARCH</b>	1985 SiRNA-mediated silencing of the USP22 gene inhibits cell proliferation in human gastric cancer cell line AGS <i>Deng MZ, Tao KX, Wang GB, Liu XH</i> 1990 P21 suppresses cell proliferation and down-regulates POLD1 expression in human gastric cancer cell line MGC-803 <i>Ruan XL, Li YJ, Wu Q, Liao LF, Xu H</i> 1996 Effect of palmitic acid on ethanol-induced fatty degeneration in hepatic cells <i>in vitro</i> <i>Wang CH, Qing DX</i> 2002 Selective COX-2 inhibitor celecoxib inhibits liver fibrogenesis in rats <i>Tian F, Wang L, Zhang YJ</i> 2011 Allium cepa extracts inhibit the proliferation of colorectal cancer <i>in vitro</i> <i>Zhou AC, Jin HY, Tan XZ, Qian XL, Zhang CX, He YS, Wang SM</i>
<b>CLINICAL RESEARCH</b>	2016 Isolation, culture and cryopreservation of adult human hepatocytes <i>Hang HL, Zhang L, Shi XL, Bian JM, Ding YT</i> 2022 Clinical significance of expression of HIF-1 $\alpha$ and EMT-related factors in pancreatic ductal adenocarcinoma <i>Zhu GH, Cen G, Huang C, Zhang ZH, Feng ZZ, Lv XH, Qiu ZJ</i>
<b>REVIEW</b>	2031 Advances in treatment of early gastric cancer by endoscopic submucosal dissection <i>Feng Q, Ge ZZ</i> 2036 Role of adiponectin in the pathogenesis and treatment of nonalcoholic fatty liver disease <i>Zhang ZB, Sun XQ, Qian F, Xue BY</i> 2043 Progress in understanding the etiology of chronic pancreatitis <i>Geng QM, Zhang HR, Duan LP</i> 2048 Fast-track colorectal surgery <i>Zhao YQ, Tong WH, Wang Q</i> 2053 Advances in clinical research of celiac disease <i>Li MR, Liu YD, Li W</i>
<b>RAPID COMMUNICATION</b>	2058 Effect of MDG-1 on oral glucose tolerance and intestinal microecological balance in diabetic mice <i>Wang LY, Wang S, Wang Y, Ruan KF, Feng Y</i>
<b>CLINICAL PRACTICE</b>	2063 Changes in levels of TRAIL mRNA in PBMCs and sTRAIL in serum in patients with severe hepatitis between before and after plasma exchange therapy <i>Wei P, Zhang JH, Liu W, Zhu XZ</i> 2068 Severe hepatitis: prognostic factors and nursing interventions <i>Luo L, Yuan CL, Lai N, Jiang ZL, Lin NF, Wang JX</i> 2072 Liver transplantation for hepatocellular carcinoma: an analysis of 135 cases

	<p><i>Xiao CH, Zhang PR, Yu LX, Chang WH, Hu XW, Sun YZ, Li ZW</i></p> <p>2076 Association between IL-23R single nucleotide polymorphisms and inflammatory bowel disease</p> <p><i>Lu ZK, Chen ZR, Zhu JY, Xu Y, Hua X</i></p>
<b>CASE REPORT</b>	<p>2081 One case report of blue rubber bleb nevus syndrome</p> <p><i>Zhao J, Gao SL, Liu BR, Liu ZH, Fan YJ</i></p>
<b>APPENDIX</b>	<p>2084 Instructions to authors of World Chinese Journal of Digestology</p> <p>2089 Meeting events calendar in 2011</p>
<b>ACKNOWLEDGMENT</b>	<p>2090 Acknowledgments to reviewers of World Chinese Journal of Digestology</p>
<b>COVER</b>	<p><i>Tian F, Wang L, Zhang YJ.</i> Selective COX-2 inhibitor celecoxib inhibits liver fibrogenesis in rats.</p> <p>Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2011; 19(19): 2002-2010</p> <p><a href="http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/2002.asp">http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/2002.asp</a></p>
<b>RESPONSIBLE EDITORS FOR THIS ISSUE</b>	<p>Assistant Editor: <i>Xiao-Fang Liu</i> Review Editor: <i>Jun-Liang Li</i> Electronic Page Editor: <i>Ji-Cai He</i></p> <p>English Language Editor: <i>Tian-Qi Wang</i> Editor-in-Charge: <i>Wei Li</i> Proof Editor: <i>Jun-Liang Li</i></p> <p>Layout Editor: <i>Lian-Sheng Ma</i></p>

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

## Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

**Founded** on January 15, 1993  
**Renamed** on January 25, 1998  
**Publication date** July 8, 2011

### NAME OF JOURNAL

*World Chinese Journal of Digestology*

### RESPONSIBLE INSTITUTION

Department of Science and Technology  
of Shanxi Province

### SPONSOR

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

### EDITING

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

### PRINTING

Beijing Kexin Printing House

### PUBLISHING

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

### OVERSEAS DISTRIBUTOR

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

### HONORARY EDITOR-IN-CHIEF

Bo-Rong Pan

### EDITOR-IN-CHIEF

Lian-Sheng Ma

### SCIENCE EDITORS

Director: Jun-Liang Li

### SUBSCRIPTION

RMB 56 Yuan for each issue  
RMB 2016 Yuan for one year

### CSSN

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

### COPYRIGHT

© 2011 Published by *WCJD*. All rights reserved; no part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise without the prior permission of *WCJD*. Authors are required to grant *WCJD* an exclusive licence to publish.

### SPECIAL STATEMENT

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

### INSTRUCTIONS TO AUTHORS

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

**Copyright** © 2011 by Editorial Department of *World Chinese Journal of Digestology*

# 胃黏膜肠上皮化生、胃上皮内瘤变与胃癌的组织发生

高泽立, 张成, 盛飞英, 金丽雯

高泽立, 张成, 盛飞英, 金丽雯, 上海市浦东新区周浦医院消化科 上海市 201318

作者贡献分布: 课题选题设计、撰写由高泽立完成; 张成与金丽雯参与文献检索、资料整理; 本综述写作文字校对由盛飞英完成。

通讯作者: 高泽立, 主任医师, 硕士生导师, 201318, 上海市, 上海市浦东新区周浦医院消化科, 上海交通大学医学院附属第九人民医院周浦分院消化科。gzeli@163.com

收稿日期: 2011-03-05 修回日期: 2011-05-18

接受日期: 2011-06-21 在线出版日期: 2011-07-08

## Intestinal metaplasia, intraepithelial neoplasia and gastric carcinogenesis

Ze-Li Gao, Cheng Zhang, Fei-Ying Sheng, Li-Wen Jin

Ze-Li Gao, Cheng Zhang, Fei-Ying Sheng, Li-Wen Jin, Department of Gastroenterology, Zhoupu Hospital, Pudong New District, Shanghai 201318, China

Correspondence to: Ze-Li Gao, Department of Gastroenterology, Zhoupu Hospital, Pudong New District; Department of Gastroenterology, Zhoupu Hospital, the Ninth People's Hospital Affiliated to Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 201318, China. gzeli@163.com

Received: 2011-03-05 Revised: 2011-05-18

Accepted: 2011-06-21 Published online: 2011-07-08

### Abstract

Gastric cancer is a common disease that greatly endangers people's health. The mechanism of gastric carcinogenesis is still unknown. Gastric carcinogenesis is a long-term multistep process, during which a series of precancerous lesions develop sequentially. Intraepithelial dysplasia and intestinal metaplasia are two types of gastric precancerous lesions. Because of high malignancy and unclear etiology of gastric cancer, there are some difficulties in carrying out successful primary prevention. Here, we give an overview of the definitions and classification of gastric intraepithelial neoplasia and intestinal metaplasia, and elaborate the relationship among *Helicobacter pylori* infection, atrophic gastritis, intestinal metaplasia and gastric carcinoma.

**Key Words:** Gastric precancerous lesions; Intestinal metaplasia; Intraepithelial neoplasia; *Helicobacter pylori*; Stem cells

Gao ZL, Zhang C, Sheng FY, Jin LW. Intestinal metaplasia, intraepithelial neoplasia and gastric carcinogenesis.

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2011; 19(19): 1981-1984

### 摘要

胃癌是严重危害人民健康的疾病之一, 其发病机制尚不明确。胃癌的发生常在癌变之前经历相当漫长的演变过程, 即由正常胃黏膜转变成胃癌前病变, 部分再发展成胃癌。目前公认, 胃黏膜异型增生和肠上皮化生是胃癌前病变。鉴于胃癌的高度恶性, 且其病因发病机制尚未完全阐明, 实施针对病因的一级预防比较困难。本文就胃上皮内瘤变、异型增生和肠化生的定义和分类, 幽门螺杆菌感染、萎缩性胃炎、肠化生与胃癌发生的相关性等问题进行综述, 旨在提高对胃癌前病变的认识水平, 以便于临床医师对胃癌前病变、特别是萎缩性胃炎进行密切的监测及予以及时有效的干预。

**关键词:** 胃癌前病变; 肠上皮化生; 胃上皮内瘤变; 幽门螺杆菌; 干细胞

高泽立, 张成, 盛飞英, 金丽雯. 胃黏膜肠上皮化生、胃上皮内瘤变与胃癌的组织发生. 世界华人消化杂志 2011; 19(19): 1981-1984

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/1981.asp>

### 0 引言

胃癌是严重危害人们健康的疾病之一, 位居恶性肿瘤死亡原因的第2位, 约2/3的病例发生在发展中国家<sup>[1]</sup>。我国胃癌死亡率为25.16/10万, 占恶性肿瘤死亡率的23.35%, 每年世界范围内约1百万人被诊断为胃癌, 每年有70万人死于胃癌。在西方国家进展期胃癌5年生存率<20%, 而早期胃癌及时手术后5年生存率可达90%<sup>[2]</sup>。胃癌的发生机制不明, 肠型胃癌来源于幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *H.pylori*)感染的癌前病变, Correa<sup>[3]</sup>提出了慢性非萎缩性胃炎-慢性萎缩性胃炎-胃黏膜肠上皮化生-异型增生-黏膜内癌-浸润性癌的模式。胃癌前期变化包括癌前状态和癌前病变两个方面。癌前状态为临床概念, 指胃癌前期疾病, 如慢性萎缩性胃炎、胃溃疡、胃息肉、残胃炎及肥厚性胃炎等。癌前病变(precancerous

### ■背景资料

胃癌的发生机制不明, 肠型胃癌来源于幽门螺杆菌(*H.pylori*)感染的癌前病变, 胃癌前期变化包括癌前状态和癌前病变两个方面。癌前病变是病理概念, 包括肠上皮化生、不典型增生或称异型增生。

### ■同行评议者

陈国忠, 副主任医师, 广西中医学院第一附属医院消化内科



## ■相关报道

Kudo等探讨黏膜高度, 腺体数目, 肠化生程度与胃癌的发生及胃癌的组织病理类型, 发现胃型胃癌肠化发生少于肠型胃癌, 黏膜萎缩也轻于肠型胃癌。

lesions)是病理概念, 包括肠上皮化生、不典型增生或称异型增生。感染诱发胃黏膜慢性炎症(非萎缩性胃炎), 进而引起萎缩性胃炎及肠上皮化生, 经非典型增生而发生胃癌<sup>[4]</sup>。

## 1 胃黏膜异型增生和上皮内瘤变

不典型增生(atypia)和异型增生(dysplasia): 不典型增生多用于与良性反应性增生相关的形态学改变; 异型增生多被认为是一种良性的、具有恶性潜能的肿瘤性上皮内病变, 组织学有别于浸润癌及良性增生病变。胃上皮内瘤变(gastric epithelial neoplasia, GIN)或称胃上皮异型增生(gastric intraepithelial dysplasia, GED), Orlowska和Kolodziejczyk等<sup>[5,6]</sup>认为GIN是胃癌的前期病变, 并提示胃黏膜其他部位发生胃癌的风险增加。西方Grundmann 1975年首次使用异型增生表示与胃癌前状态相关的组织学改变, 异型增生多被认为是一种良性的、具有恶性潜能的肿瘤性上皮内病变。2000年, WHO推荐使用非浸润性低级别/高级别上皮内瘤变(non-invasive low-grade and high-grade intraepithelial neoplasia); 而癌(carcinoma)定义为肿瘤细胞浸润至固有层及更深<sup>[7]</sup>。

低级别上皮内瘤变(low-grade intraepithelial neoplasia, LGIN)指上皮结构和细胞学异常局限于上皮的下半部, 相当于胃黏膜轻度和中度异型增生, 经治疗可部分消退; 高级别上皮内瘤变(high-grade intraepithelial neoplasia, HGIN)指上皮结构和细胞学异常扩展至上皮的上半部乃至全层, 相当于胃黏膜重度异型增生和原位癌。轻度的异型增生及完全性小肠型化生属于胃黏膜的炎症反应, 多被认为是一种良性的病变; 而不完全性肠化生、重度异型增生具有明显的癌变倾向。

## 2 胃黏膜上皮内瘤变的转归

阮洪军等<sup>[8]</sup>回顾分析46例经胃镜钳取活组织病理诊断为胃黏膜HGIN患者胃镜下表现, 并对照分析28例接受外科手术切除标本的病理学检查, 研究分析显示28例术前病理诊断HGIN的患者中术后仅4例维持HGIN的诊断, 其余24例均报道为胃癌, 提示胃镜活检胃黏膜病理诊断为HGIN在大部分情况下同时已经存在癌变。国外文献显示, LGIN患者38%-75%可以消退, 19%-50%持续存在; 而HGIN患者不到16%可消退, 持续存在者占14%-58%<sup>[9,10]</sup>。LGIN进展为癌时间10 mo到4年, HGIN 60%-85%的患者4-48

mo, 而3 mo内诊断者很可能是事先的癌未能诊断<sup>[11,12]</sup>。

## 3 胃黏膜的肠化生及胃萎缩

3.1 胃黏膜的肠化生 应用过碘酸(periodic acid-schiff, PAS)和高铁二胺氧化酶(high-iron diamine, HID)技术, 将胃黏膜的肠化生分成3种亚型: I型为完全性肠化生: 带有刷状缘的吸收上皮、杯状细胞及潘氏细胞; 不完全性肠化生类似结肠柱状上皮, 根据柱状细胞分泌黏液的不同, 不完全性肠化生又可分为II型和III型, II型分泌唾液黏蛋白, III型分泌硫黏蛋白; 仅III型肠化生发生胃癌的风险较高<sup>[13]</sup>。

3.2 胃萎缩 胃黏膜腺体由化生的腺体(化生性萎缩)或纤维组织取代(非化生性萎缩)。组织学上有2种类型: (1)化生性萎缩: 胃黏膜固有腺体被肠化或假幽门腺化生腺体替代; (2)非化生性萎缩: 胃黏膜固有腺体被纤维组织或纤维肌性组织替代, 或炎症细胞浸润引起固有腺体数量减少<sup>[14]</sup>。Karaman等<sup>[15]</sup>对240例带有活检的自身免疫性萎缩性胃炎(autoimmune metaplastic atrophic gastritis, AMAG)进行临床病理分析, 结果显示息肉179例; 46例分化良好的神经内分泌肿瘤(类癌); 11例腺癌; 3例淋巴瘤, 1例胃肠间质瘤。

## 4 *H.pylori*与肠化生

*H.pylori*慢性感染在萎缩性胃炎和肠化生中起重要作用。*H.pylori*感染被认为是I类致癌因素, 人群中*H.pylori*感染率约50%<sup>[16]</sup>。*H.pylori*感染者胃癌的发生几率比非感染者高10.9倍。并非所有*H.pylori*感染者都产生胃的病变, 他可因*H.pylori*菌株不同或宿主的免疫状态不同而异<sup>[17]</sup>。Rokkas等<sup>[18]</sup>在研究*H.pylori*根除与胃癌发生关系发现*H.pylori*根除仅有益于萎缩性胃炎而非肠化生患者, 表明预防性*H.pylori*根除应在化生发生之前进行。在一些个体, 肠化生可能是进展到胃癌的“非可逆点”。在中国45岁以上胃癌高危人群肠化进展为肿瘤大约在45%, 而西方国家报道肠化进展为肿瘤仅为少数病例<sup>[19,20]</sup>。

## 5 肠化的分子生物学改变

有关肠化的基因改变知之甚少, 如基因不稳定性, 端粒酶活性改变, *p53*基因突变已有相关报道, 然而这些变化与肠化进展到肿瘤的关系还远远未被揭示, 微卫星不稳定性(microsatellite instability, MSI)及杂合性丧失(loss of heterozy-

gosity, LOH)2种主要的基因不稳定与胃癌有关。微卫星是正常短的, 重复系列DNA, 重复系列的长度因人而异。在肿瘤时, MSI可以出现。当一个基因的等位基因丢失时, LOH发生, 余下的等位基因突变或缺失<sup>[14]</sup>。Hamamoto等<sup>[21]</sup>研究表明47%的胃癌患者及27%的不完全肠化患者至少1/9的位点出现MSI, LOH仅发生2/15。Sugai等<sup>[22]</sup>对148例早期胃癌的黏膜内癌和黏膜下癌检测LOH, MSI和甲基化状况。与黏膜内癌相比较, 黏膜下癌显示高的LOH和低的甲基化, 提示胃黏膜下癌是基因改变的积累。

端粒是染色体末端DNA重复区, 其生理功能是维持染色体结构的完整性, 防止染色体结构在复制时丢失及防止其被核酸酶降解, 端粒缩短到一定程度, 细胞不可避免的出现衰老, 反之, 肿瘤细胞端粒酶活性明显升高。从正常黏膜慢性胃炎, 肠化生到胃癌, 端粒酶活性逐渐升高, 在一项研究<sup>[23]</sup>中, 肠化、腺瘤、胃癌端粒酶阳性分别是15%、45%和89%。Kameshima等<sup>[24]</sup>研究表明不完全肠化端粒活性高于完全肠化。*p53*基因是肿瘤抑制基因, 与细胞周期调控, DNA修复, 细胞凋亡有关, 在胃癌常伴有P53突变, 肠型胃癌常发生在A:T位点<sup>[25]</sup>。

## 6 肠上皮化生、萎缩性胃炎与胃癌的组织发生

郭鹏等<sup>[26]</sup>对12例早期胃癌癌灶及周围1 cm范围胃壁作连续切片, 以探讨胃癌的组织发生, 结果显示10例表面上皮杵指状增生, 部分癌旁表面上皮细胞部分缺失, 由肉芽组织取代, 说明有急慢性胃炎反复发作的过程; 胃小凹阻塞7例, 小凹由炎性肉芽组织充塞, 所属腺体部分萎缩, 部分代偿扩张; 12例癌旁都有不同程度的不典型增生, 伴萎缩性胃炎, 肠上皮化生有4例。不完全肠化、不典型增生、胃癌之间的关系已有较多报道, 王益民等<sup>[27]</sup>对68例胃癌和同期胃镜检查的67例非溃疡性消化不良病例行病理学和组织化学评估, 研究胃黏膜肠化生与胃癌组织发生关系, 结果显示在胃癌组肠化检出率是86.8%(59/68), 对照组检出率是38.8%(26/67), 不完全肠化主要位于胃窦部及小弯区胃体。Kudo等<sup>[28]</sup>探讨黏膜高度, 腺体数目, 肠化生程度与胃癌的发生及胃癌的组织病理类型, 发现胃型胃癌肠化发生少于肠型胃癌, 黏膜萎缩也轻于肠型胃癌。显示胃型胃癌及中至低度分化腺癌常伴有黏膜萎缩及较少化生。较少发生肠化生的萎缩型胃炎是胃型胃癌发生的主要基础。

## 7 干细胞、胃癌干细胞与肠上皮化生及胃癌发生

正常干细胞(normal stem cells, NSCs)保留着一部分未分化的细胞, NSCs存在于某些正常组织, 如脑组织, 骨髓和胃肠道。这些NSCs具有自我复制和多向分化的能力外, 其中胃肠道NSCs存在于颈/颊增生区, 从上部颈和下颊部经历了复杂的迁移, 成为分化的上皮细胞<sup>[29]</sup>。由于缺乏特有标识, 人胃肠NSCs很难鉴定。

胃成体干细胞能分化形成完整的小肠隐窝和胃腺体。当受到持续的炎性刺激、自身抗体或其他理化因素作用时增殖为肠上皮细胞, 如吸收细胞、杯状细胞和潘氏细胞, 即肠上皮化生。肠上皮化生的过程是组织细胞分化异常所致, 这种细胞分化异常发生在干细胞水平<sup>[30]</sup>。

胃癌的发生发展经历长期的多步骤演变, 正常胃黏膜-慢性非萎缩性胃炎-慢性萎缩性胃炎-胃黏膜肠上皮化生-上皮内瘤变-浸润性胃癌。Tatematsu等<sup>[31]</sup>研究发现, 胃干细胞在肠上皮化生中表现出异常的细胞分化, 即同一干细胞可产生胃、肠表型细胞, 早期胃癌主要包括胃型细胞, 进展期胃癌则有肠型代替胃型细胞, 认为肠上皮化生并不是癌前病变, 肠型细胞可独立地出现在胃上皮肠化生和胃癌中, 胃黏膜细胞和胃癌细胞的肠上皮化生是一种同源转化。说明胃癌本身是一种干细胞疾病, 是干细胞发生了癌变。

## 8 结论

目前多数学者认为胃黏膜癌变和生理性再生、病理性修复、化生和不典型增生始发于具有多向分化的干细胞, 胃腺干细胞位于胃小凹底部和腺颈部。在*H.pylori*感染基础上, 多次急慢性胃炎反复发作引发萎缩性胃炎, 萎缩性胃炎没有得到积极有效治疗, 胃黏膜在多次重创及修复过程中, 可造成胃黏膜的糜烂、坏死及溃疡形成并产生多种致癌物质。这种损伤与修复伴炎性坏死产生的致癌物质, 导致细胞出现异型增生, 由炎性增生-异型型增生-致癌变这个过程大约需10-20年。可见对胃的癌前病变, 特别是萎缩性胃炎进行早期干预治疗, 防止肠化生的发生, 是预防胃癌的关键。

## 9 参考文献

- 1 Khorana HG. Polynucleotide synthesis and the genetic code. *Fed Proc* 1965; 24: 1473-1487
- 2 Yamamoto H, Kita H. Endoscopic therapy of early gastric cancer. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2005; 19: 909-926

## ■同行评价

本文层次清晰, 可读性较强, 有一定的科学价值。

- 3 Correa P. A human model of gastric carcinogenesis. *Cancer Res* 1988; 48: 3554-3560
- 4 Filipe MI, Muñoz N, Matko I, Kato I, Pompe-Kirn V, Jutersek A, Teuchmann S, Benz M, Prijon T. Intestinal metaplasia types and the risk of gastric cancer: a cohort study in Slovenia. *Int J Cancer* 1994; 57: 324-329
- 5 Orlowska J, Jarosz D, Pachlewski J, Butruk E. Malignant transformation of benign epithelial gastric polyps. *Am J Gastroenterol* 1995; 90: 2152-2159
- 6 Kolodziejczyk P, Yao T, Oya M, Nakamura S, Utsunomiya T, Ishikawa T, Tsuneyoshi M. Long-term follow-up study of patients with gastric adenomas with malignant transformation. An immunohistochemical and histochemical analysis. *Cancer* 1994; 74: 2896-2907
- 7 施尧. 胃上皮异型增生的国际分类及其临床应用. 外科理论与实践 2000; 5: 202-203
- 8 阮洪军. 胃黏膜高级别上皮内瘤变46例分析. 全科医学临床与教育 2009; 7: 430-431
- 9 Bearzi I, Brancorsini D, Santinelli A, Rezai B, Mannello B, Ranaldi R. Gastric dysplasia: a ten-year follow-up study. *Pathol Res Pract* 1994; 190: 61-68
- 10 Lansdown M, Quirke P, Dixon MF, Axon AT, Johnston D. High grade dysplasia of the gastric mucosa: a marker for gastric carcinoma. *Gut* 1990; 31: 977-983
- 11 Kokkola A, Haapiainen R, Laxén F, Puolakkainen P, Kivilaakso E, Virtamo J, Sipponen P. Risk of gastric carcinoma in patients with mucosal dysplasia associated with atrophic gastritis: a follow up study. *J Clin Pathol* 1996; 49: 979-984
- 12 Yamada H, Ikegami M, Shimoda T, Takagi N, Maruyama M. Long-term follow-up study of gastric adenoma/ dysplasia. *Endoscopy* 2004; 36: 390-396
- 13 Correa P, Piazuelo MB, Wilson KT. Pathology of gastric intestinal metaplasia: clinical implications. *Am J Gastroenterol* 2010; 105: 493-498
- 14 Busuttill RA, Boussioutas A. Intestinal metaplasia: a premalignant lesion involved in gastric carcinogenesis. *J Gastroenterol Hepatol* 2009; 24: 193-201
- 15 Karaman A, Kabalar ME, Binici DN, Oztürk C, Pirim I. Genetic alterations in gastric precancerous lesions. *Genet Couns* 2010; 21: 439-450
- 16 De Luca A, Iaquinto G. Helicobacter pylori and gastric diseases: a dangerous association. *Cancer Lett* 2004; 213: 1-10
- 17 Peek RM, Blaser MJ. Helicobacter pylori and gastrointestinal tract adenocarcinomas. *Nat Rev Cancer* 2002; 2: 28-37
- 18 Rokkas T, Pistiolas D, Sechopoulos P, Robotis I, Margantinis G. The long-term impact of Helicobacter pylori eradication on gastric histology: a systematic review and meta-analysis. *Helicobacter* 2007; 12 Suppl 2: 32-38
- 19 Leung WK, Lin SR, Ching JY, To KF, Ng EK, Chan FK, Lau JY, Sung JJ. Factors predicting progression of gastric intestinal metaplasia: results of a randomised trial on Helicobacter pylori eradication. *Gut* 2004; 53: 1244-1249
- 20 El-Zimaity HM, Ramchatesingh J, Saeed MA, Graham DY. Gastric intestinal metaplasia: subtypes and natural history. *J Clin Pathol* 2001; 54: 679-683
- 21 Hamamoto T, Yokozaki H, Semba S, Yasui W, Yunosaki S, Miyazaki K, Tahara E. Altered microsatellites in incomplete-type intestinal metaplasia adjacent to primary gastric cancers. *J Clin Pathol* 1997; 50: 841-846
- 22 Sugai T, Habano W, Endoh M, Konishi Y, Akasaka R, Toyota M, Yamano H, Koeda K, Wakabayashi G, Suzuki K. Molecular analysis of gastric differentiated-type intramucosal and submucosal cancers. *Int J Cancer* 2010; 127: 2500-2509
- 23 Maruyama Y, Hanai H, Fujita M, Kaneko E. Telomere length and telomerase activity in carcinogenesis of the stomach. *Jpn J Clin Oncol* 1997; 27: 216-220
- 24 Kameshima H, Yagihashi A, Yajima T, Kobayashi D, Denno R, Hirata K, Watanabe N. Helicobacter pylori infection: augmentation of telomerase activity in cancer and noncancerous tissues. *World J Surg* 2000; 24: 1243-1249
- 25 Yokozaki H, Kuniyasu H, Kitadai Y, Nishimura K, Todo H, Ayhan A, Yasui W, Ito H, Tahara E. p53 point mutations in primary human gastric carcinomas. *J Cancer Res Clin Oncol* 1992; 119: 67-70
- 26 郭鹏, 邸军. 早期胃癌的组织发生. 白求恩医科大学学报 2000; 26: 56-58
- 27 王益民, 张庆. 胃黏膜肠化与胃癌组织发生的关系. 蚌埠医学院学报 2004; 29: 123-125
- 28 Kudo Y, Morohashi S, Takasugi K, Tsutsumi S, Ogasawara H, Hanabata N, Yoshimura T, Sato F, Fukuda S, Kijima H. Histopathological phenotypes of early gastric cancer and its background mucosa. *Biomed Res* 2011; 32: 127-134
- 29 Saikawa Y, Fukuda K, Takahashi T, Nakamura R, Takeuchi H, Kitagawa Y. Gastric carcinogenesis and the cancer stem cell hypothesis. *Gastric Cancer* 2010; 13: 11-24
- 30 黄文生, 陈柳静. 肿瘤干细胞与结直肠癌肿瘤干细胞. 医学综述 2007; 13: 691
- 31 Tatematsu M, Tsukamoto T, Inada K. Stem cells and gastric cancer: role of gastric and intestinal mixed intestinal metaplasia. *Cancer Sci* 2003; 94: 135-141

编辑 李军亮 电编 何基才

# siRNA沉默USP22基因对胃癌细胞增殖的抑制作用

邓美洲, 陶凯雄, 王国斌, 刘兴华

邓美洲, 陶凯雄, 王国斌, 刘兴华, 华中科技大学同济医学院附属协和医院腔镜外科 湖北省武汉市 430022

邓美洲, 在读博士, 主要从事胃肠道疾病的研究.

作者贡献分布: 此课题由邓美洲与陶凯雄设计; 研究过程由邓美洲完成; 数据分析由邓美洲与刘兴华完成; 陶凯雄与王国斌提供实验材料及分析工具, 并审阅论文、指导论文修改.

通讯作者: 陶凯雄, 教授, 主任医师, 博士生导师, 430022, 湖北省武汉市解放大道1277号, 华中科技大学同济医学院附属协和医院腔镜外科. tao\_kaixiongwhuh@163.com

收稿日期: 2011-03-17 修回日期: 2011-06-04

接受日期: 2011-06-15 在线出版日期: 2011-07-08

## SiRNA-mediated silencing of the USP22 gene inhibits cell proliferation in human gastric cancer cell line AGS

Mei-Zhou Deng, Kai-Xiong Tao, Guo-Bin Wang, Xing-Hua Liu

Mei-Zhou Deng, Kai-Xiong Tao, Guo-Bin Wang, Xing-Hua Liu, Department of Laparoscopic Surgery, Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, Hubei Province, China

Correspondence to: Professor Kai-Xiong Tao, Department of Laparoscopic Surgery, Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, 1277 Jiefang Avenue, Wuhan 430022, Hubei Province, China. tao\_kaixiongwhuh@163.com

Received: 2011-03-17 Revised: 2011-06-04

Accepted: 2011-06-15 Published online: 2011-07-08

## Abstract

**AIM:** To evaluate the impact of silencing of the USP22 gene by small interfering RNA (siRNA) on the proliferation of human gastric cancer AGS cells.

**METHODS:** Three USP22-specific siRNAs and a negative siRNA were designed and transfected into AGS cells using Lipofectamine 2000. Quantitative real-time PCR (qRT-PCR) and Western blot were utilized to detect the expression levels of USP22 mRNA and protein, respectively. Cell proliferation was measured using Cell Counting Kit-8 (CCK-8). The distribution of cell cycle was determined by flow cytometry.

**RESULTS:** All three USP22-specific siRNAs could silence the expression of the USP22 gene.

Forty-eight hours after transfection, the expression levels of USP22 mRNA and protein were reduced by  $80.47\% \pm 2.99\%$  and  $79.40\% \pm 3.58\%$ , respectively; the reduced rate of cell proliferation was  $27.33\% \pm 3.49\%$ ; and the proportion of gastric cancer cells arrested in G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> phase increased significantly, while those arrested in S phase decreased significantly.

**CONCLUSION:** Transfection of USP22-specific siRNAs could effectively inhibit the expression of the USP22 gene and significantly suppress cell growth in human gastric cancer cell line AGS.

**Key Words:** Ubiquitin-specific peptidase 22; Small interfering RNA; Gastric cancer; AGS cells; Cell proliferation

Deng MZ, Tao KX, Wang GB, Liu XH. SiRNA-mediated silencing of the USP22 gene inhibits cell proliferation in human gastric cancer cell line AGS. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(19): 1985-1989

## 摘要

**目的:** 探讨小干扰RNA(siRNA)沉默泛素特异性肽酶22(ubiquitin specific peptidase 22, USP22)对胃癌细胞增殖的影响.

**方法:** 针对USP22基因设计3条siRNA及阴性siRNA, 用脂质体Lipofectamine 2000转染胃癌AGS细胞, 通过实时定量PCR和Western blot检测转染后AGS细胞USP22基因中mRNA和蛋白表达水平的变化情况, 流式细胞术检测细胞周期分布变化情况, CCK8法检测细胞增殖率及抑制率.

**结果:** 转染48 h后, 3条siRNA均能显著抑制USP22 mRNA和蛋白的表达. 其中, 以转染USP22 siRNA3后效果最明显, mRNA和蛋白表达分别下降 $80.47\% \pm 2.99\%$ 和 $79.40\% \pm 3.58\%$ . 细胞增殖明显受到抑制, USP22 siRNA3组细胞增殖抑制率为 $27.33\% \pm 3.49\%$ . 细胞周期中G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>期细胞增多, S期细胞减少.

**结论:** 采用RNA干扰技术能够有效地沉默USP22基因的表达, 并显著抑制胃癌细胞的

## ■背景资料

胃癌是最常见的消化系统肿瘤, 虽然手术联合化疗不断取得改进, 但是预后仍不理想, 探索新的治疗方式有一定的意义. 泛素特异性肽酶22(USP22)参与肿瘤细胞周期相关基因的调控, 并与细胞增殖密切相关.

## ■同行评议者

肖文华, 主任医师, 中国人民解放军总医院第一附属医院肿瘤科



## ■研发前沿

分子靶向治疗是最近肿瘤分子生物学研究中的热点,其中,针对致癌基因的RNA干扰是近年肿瘤研究的热点领域,寻找到合适的RNA干扰的靶点是目前亟待解决的问题。

增殖。

**关键词:** 泛素特异性肽酶22; 小干扰RNA; 胃癌; AGS细胞; 细胞增殖

邓美洲, 陶凯雄, 王国斌, 刘兴华. siRNA沉默USP22基因对胃癌细胞增殖的抑制作用. 世界华人消化杂志 2011; 19(19): 1985-1989

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/1985.asp>

## 0 引言

胃癌是消化系最常见的恶性肿瘤之一。尽管手术联合辅助化疗不断取得改进,胃癌患者预后仍不理想<sup>[1]</sup>。胃癌细胞增殖过快是导致胃癌患者生存率减低的重要原因,因此抑制胃癌细胞增殖可作为抑制胃癌进展、改善胃癌患者预后的重要手段。目前,随着胃癌研究的进展,针对肿瘤细胞生长、凋亡、细胞周期等分子靶向治疗在胃癌的诊治中逐渐受到重视,寻找到合适的治疗靶点便成为影响治疗效果的关键因素<sup>[2-4]</sup>。泛素特异性肽酶22(ubiquitin specific peptidase 22, USP22)参与肿瘤细胞周期相关基因的调控,并与细胞增殖密切相关<sup>[5,6]</sup>。本实验组在前期的实验中已证实胃癌组织中USP22蛋白高表达。在此基础上,本实验采用小干扰RNA(small interference RNA, siRNA)下调胃癌AGS细胞USP22基因的表达,以观察其对胃癌增殖的影响。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 胃癌AGS细胞(武汉协和医院腔镜实验室保存),细胞培养基DMEM(HyClone),胎牛血清(杭州四季青),Lipofectamine 2000(Invitrogen),Opti-MEMI培养基、青霉素、链霉素双抗(Gibco),TRIzol、逆转录试剂盒(TaKaRa),Fast SYBR Green Mast Mix(Applied Biosystems),USP22多克隆抗体(Abcam),二抗(武汉博士德)、CKK8试剂、细胞周期检测试剂盒、ECL试剂盒、蛋白裂解液(碧云天),SDS-PAGE凝胶制备试剂盒(武汉谷歌生物),阴性对照siRNA和USP22 siRNA(广州锐博生物公司)。

### 1.2 方法

**1.2.1 细胞培养:** 细胞培养使用含100 mL/L胎牛血清的DMEM培养基,于37℃、50 mL/L CO<sub>2</sub>培养箱中。48-72 h传代或换液。

**1.2.2 USP22干扰片段的设计及合成:** 通过Ambion网站设计针对USP22基因的特异性siRNA序列,并由广州锐博公司合成。序列为: siRNA-1,

5'-GGAGAAAGAUCACCUCGAATT-3'和3'-TTCCUCUUUCUAGUGGAGCUU-5'; siRNA-2, 5'-CUGCAAAGGUGAUGACAAUTT-3'和3'-TTGACGUUUCACUACUGUUA-5'; siRNA-3, 5'-GAAGCAUAUUCACGAGCAUTT-3'和3'-TTCUUCGUAUAAGUGCUCGUA-5'。同时设计阴性对照RNA,序列为: 5'-GAGA-AGACUACUCAAGCATT-3'和3'-TTCU-CUUCUGAUGAGUUCGUA-5'。

**1.2.3 细胞转染:** 转染前1 d以2×10<sup>5</sup>/孔接种6孔板,待细胞铺满孔底约50%时,参考广州锐博siRNA使用说明书转染,转染时使用不含抗生素的Opti-MEMI培养基孵育siRNA片段和Lipofectamine 2000转染试剂,每孔最终体积2 mL,每孔siRNA浓度50 nmol/L,转染6 h后换液。实验分组: 空白对照组(control): 仅含有转染试剂; 阴性对照组(negative siRNA): 含转染试剂和不影响目的基因表达的干扰片段; 干预组(USP22 siRNAs): 含转染试剂和干扰片段。

**1.2.4 实时定量PCR:** 收集转染48 h后的细胞,TRIzol法提取细胞总RNA,逆转录合成cDNA。通过实时定量PCR扩增目的基因。反应体系为20 μL,其中Fast sybr green mix I 10 μL, cDNA 2 μL, 上、下游引物各0.8 μL, ddH<sub>2</sub>O 6.4 μL。反应条件为: 94℃预变性20 s, 94℃变性5 s, 60℃退火、延伸30 s, 反应40个循环。采用2<sup>-ΔΔC<sub>t</sub></sup>法分析目的基因mRNA的相对表达水平。扩增基因的特异性引物由Invitrogen公司合成,序列为: USP22(115 bp) 5'-CTACCAG-GAGTCCACAAAGCAG-3'和5'-CACATAC-GTGGTGATCTTCCGC-3'; GAPDH(131 bp), 5'-GTCTCCTCTGACTTCAACAGCG-3'和5'-ACCACCCTGTTGCTGTAGCCAA-3'。

**1.2.5 Western blot:** 转染细胞48 h后采用RIPA裂解液提取蛋白,用BCA法进行蛋白定量。配置10% SDS-PAGE分离胶10 mL: H<sub>2</sub>O 4 mL, 30%丙烯酰胺3.3 mL, 1.5 mol/L Tris-HCl(pH8.8)2.5 mL, 10% SDS 0.1 mL, AP 0.1 mL, TEMED 5 μL。5% SDS-PAGE浓缩胶4.5 mL: H<sub>2</sub>O 3 mL, 30%丙烯酰胺0.75 mL, 1 mol/L Tris-HCl(pH6.8) 0.75 mL, 10% SDS 60 μL, AP 45 μL, TEMED 6 μL。取等量蛋白30 μg上样于浓缩胶,80 V电泳至样品基本进入分离胶后,再改电压为100 V,恒压电泳至电泳指示剂迁移至分离胶下游边缘时停止电泳。200 mA电流转膜1 h后用含5%脱脂奶粉的TBST封闭2 h,4℃孵育USP22、GAPDH抗体过夜,用

## ■相关报道

Zhang等在肺癌的一项研究中证实,通过RNA干扰沉默USP22基因的表达后,肺癌细胞增殖明显受到抑制,由此证实USP22基因表达确实在肿瘤的增殖中起到一定的作用。Liu等在结肠癌的研究中证实USP22高表达与预后较差,与肝转移相关。

表 1 干预组3对AGS细胞周期分布的影响 (%)

分组	G <sub>0</sub> /G <sub>1</sub> 期	S期	G <sub>2</sub> /M期
空白对照组	42.65 ± 2.46	40.32 ± 1.27	17.03 ± 1.19
阴性对照组	43.93 ± 2.63	39.36 ± 4.50	16.72 ± 1.87
干预组3	58.67 ± 3.75 <sup>a</sup>	27.44 ± 3.96 <sup>a</sup>	13.89 ± 0.25

<sup>a</sup>*P* < 0.05 vs 空白对照组。

二抗IgG室温振荡孵育2 h后, TBST洗膜, ECL发光, AlphaEaseFC软件进行灰度扫描以分析相对蛋白表达值, 以GAPDH为内参对照。

1.2.6 流式细胞仪检测细胞周期: 转染48 h后, 用胰酶消化细胞, 培养基中和后离心细胞, 用PBS洗涤细胞1次, 加入700 mL/L乙醇1 mL固定过夜, 第2天离心除去酒精, 用含2 g/L PI的PBS 500 μL重悬, 避光孵育30 min后, 用流式细胞仪检测各细胞周期的分布情况。

1.2.7 CCK8检测细胞增殖: 将细胞以 $3 \times 10^3$ /孔接种于96孔板, 每组设6个副孔, 待细胞铺满孔底50%时转染细胞, 每孔100 μL, siRNA浓度50 nmol/L, 转染48 h后每孔加入CCK8试剂10 μL, 于37 °C培养箱中孵育2 h, 使用酶标仪选择450 nm波长测定吸光值, 计算细胞增殖率及增殖抑制率。

**统计学处理** 应用SPSS18.0进行统计学分析, 每组实验重复3次, 数据以mean ± SD表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 然后用SNK进行两两比较, *P* < 0.05为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 USP22 siRNA对USP22基因表达的影响 转染3组USP22 siRNA片段后在mRNA水平和蛋白水平上能使USP22基因表达明显下调(*P* < 0.05)。其中, 以转染USP22 siRNA3后效果最明显, mRNA和蛋白表达分别下降80.47% ± 2.99%和79.40% ± 3.58%。而转染阴性对照组siRNA后mRNA和蛋白水平均无明显改变(*P* > 0.05)。因此, 选择对USP22基因沉默效率最高的USP22 siRNA3组片段进行后续实验(图1, 2)。

2.2 USP22 siRNA3对胃癌AGS细胞细胞周期的影响 转染USP22 siRNA3之后, AGS细胞中G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>期细胞多于空白对照组(*P* < 0.05), S期细胞少于空白对照组(*P* < 0.05)。转染阴性对照siRNA组AGS细胞中G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>期及S期细胞与空白对照组相比无明显变化(*P* > 0.05, 图3, 4, 表1)。

2.3 USP22 siRNA3对胃癌AGS细胞增殖的抑制

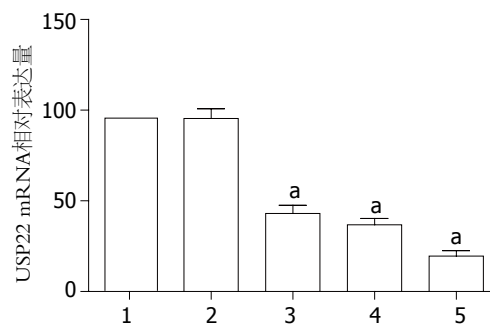


图 1 实时定量PCR检测转染48 h后USP22基因mRNA的表达水平。1: 空白对照组; 2: 阴性对照组; 3: 干预组1; 4: 干预组2; 5: 干预组3。\**P* < 0.05 vs 空白对照组。

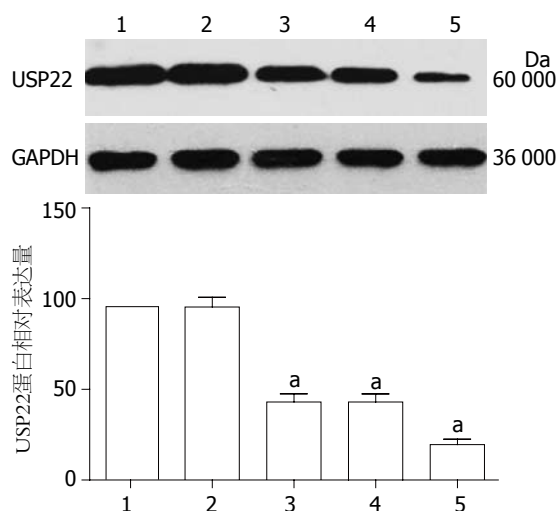


图 2 Western blot检测转染48 h后USP22蛋白的表达水平。1: 空白对照组; 2: 阴性对照组; 3: 干预组1; 4: 干预组2; 5: 干预组3。\**P* < 0.05 vs 空白对照组。

作用 转染48 h后, USP22 siRNA3组细胞增殖抑制率为27.33% ± 3.49%, 与空白组差别有显著性意义(*P* < 0.05)。阴性对照siRNA组细胞增殖抑制率为3.84% ± 6.64%, 与空白对照组差别无显著性意义(*P* > 0.05, 图5)。

## 3 讨论

去泛素化酶主要有两大类, 包括泛素羧基端水解酶(ubiquitin C-terminal hydrolases, UCH)和泛素特异性加工酶(ubiquitin-specific processing proteases, UBP或USP)。去泛素化酶调节细胞内的一系列生化反应, 包括细胞的生长分化, 肿瘤形成, 调控细胞周期, 转录激活和信号转导等<sup>[7-19]</sup>。USP22属于泛素特异性加工酶家族, 位于人类17号染色体, 编码蛋白产物60 000 Da, 通过去泛素化修饰达到调节细胞周期和促进肿瘤增殖的作用, 正常心脏和骨骼肌中USP22高表达, 肺和肝脏中低表达<sup>[20]</sup>。USP22在膀胱癌和结肠癌组织中表达

### ■ 创新盘点

本文首次探索了抑制USP22基因表达对胃癌细胞增殖的抑制作用, 通过干预胃癌细胞增殖周期的进展, 抑制了胃癌细胞的增殖。

## ■应用要点

USP22基因促进胃癌细胞的增殖, 为胃癌分子靶向治疗提供了一个新的靶点. 针对USP22基因设计RNA干扰, 抑制肿瘤增殖, 为改善胃癌患者预后提供了一定的理论基础.

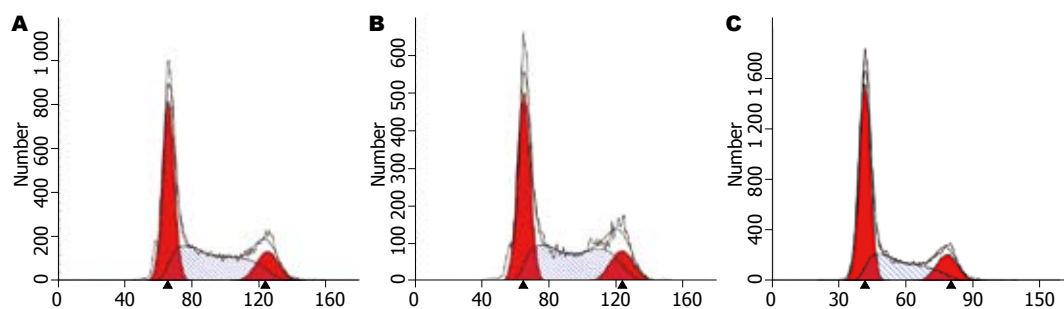


图3 流式细胞仪检测转染干预组3对AGS细胞周期分布的影响. A: 空白对照组; B: 阴性对照组; C: 干预组3.

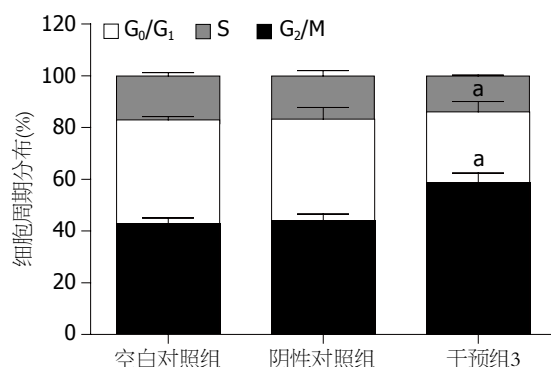


图4 干预组3对AGS细胞周期分布的影响. <sup>a</sup> $P < 0.05$  vs 空白对照组.

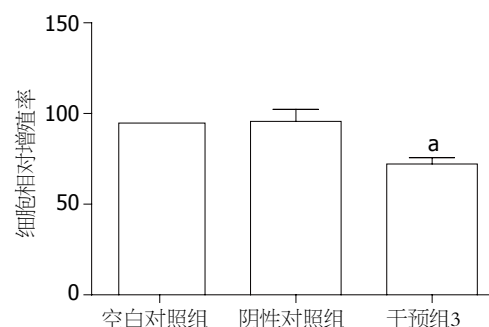


图5 干预组3对AGS细胞增殖的影响. <sup>a</sup> $P < 0.05$  vs 空白对照组.

高于癌旁正常组织, 而且随着肿瘤恶性程度的增加USP22表达增强, 此外, USP22与结肠癌肝转移和预后差相关<sup>[21,22]</sup>. 一项对P53表达缺失的肺癌H1299细胞的研究表明, 通过RNA干扰沉默USP22基因的表达后, 肺癌细胞增殖明显受到抑制<sup>[5]</sup>. 国内也有针对膀胱癌EJ细胞的相关研究, 得出了类似的结论<sup>[23]</sup>. 目前关于USP22基因在胃癌中的作用, 国内外尚未见报道. 由此我们通过针对USP22基因设计干扰片段, 以观察其表达下调对胃癌AGS细胞增殖的影响.

本组实验针对USP22基因设计合成小分子干扰片段, 3组干扰片段均能于作用48 h后在mRNA和蛋白水平下调USP22基因的表达. 其中, USP22 siRNA3组片段沉默效率最高, mRNA和蛋白水平USP22表达分别降低80.47%±2.99%和79.40%±3.58%. 沉默USP22基因后胃癌AGS细胞增殖明显受到抑制. 细胞周期分布中, G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>期细胞明显增多, S期细胞明显减少. 与空白对照组相比, USP22 siRNA3组细胞抑制率为27.33%±3.49%. 目前研究表明, SAGA(Spt-Ada-Gcn5 acetyltransferase)复合体通过参与翻译后水平组蛋白的修饰以调节一系列的细胞内进程, 其修饰方式包括: 乙酰化、甲基化、泛素化和磷酸化等<sup>[24-26]</sup>. 而USP22是SAGA复合体的一

个亚基, 通过与SAGA其他亚基共同作用参与泛素化过程, 进而介导核受体的转录激活<sup>[6,27,28]</sup>. USP22通过介导组蛋白H2A和H2B去泛素化, 以调节组蛋白表达水平, 而组蛋白与转录激活, 遗传调节, 肿瘤进展相关<sup>[6,29-31]</sup>. 此外, USP22也是c-Myc介导的转录所必需的, 抑制其表达导致c-Myc激活转录效应降低, 进而抑制了肿瘤增长和细胞周期进行<sup>[5]</sup>. 因此, USP22可能通过调节组蛋白表达水平及促进c-Myc转录激活达到促进肿瘤增殖的作用, 其精确机制尚有待进一步研究.

总之, 本次实验针对USP22设计干扰片段, 降低了USP22基因的表达水平, 并通过进一步研究抑制了胃癌AGS细胞增殖, 阻滞了细胞周期, 为将USP22作为抑制胃癌增殖新的靶点, RNA干扰技术应用于胃癌研究提供了新的思路.

**致谢:** 感谢吴轲、石亮及李伟同志在本实验中给予的大力帮助.

#### 4 参考文献

- Shah MA, Kelsen DP. Gastric cancer: a primer on the epidemiology and biology of the disease and an overview of the medical management of advanced disease. *J Natl Compr Canc Netw* 2010; 8: 437-447
- 吕伟, 陈凛. 胃癌分子靶向治疗的现状与进展. *世界华人消化杂志* 2007; 15: 2672-2678

- 3 Wu WK, Lee CW, Cho CH, Chan FK, Yu J, Sung JJ. RNA interference targeting raptor inhibits proliferation of gastric cancer cells. *Exp Cell Res* 2011; 317: 1353-1358
- 4 De Vita F, Giuliani F, Silvestris N, Catalano G, Ciardiello F, Orditura M. Human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) in gastric cancer: a new therapeutic target. *Cancer Treat Rev* 2010; 36 Suppl 3: S11-S15
- 5 Zhang XY, Varthi M, Sykes SM, Phillips C, Warzecha C, Zhu W, Wyce A, Thorne AW, Berger SL, McMahon SB. The putative cancer stem cell marker USP22 is a subunit of the human SAGA complex required for activated transcription and cell-cycle progression. *Mol Cell* 2008; 29: 102-111
- 6 Zhang XY, Pfeiffer HK, Thorne AW, McMahon SB. USP22, an hSAGA subunit and potential cancer stem cell marker, reverses the polycomb-catalyzed ubiquitylation of histone H2A. *Cell Cycle* 2008; 7: 1522-1524
- 7 Ramakrishna S, Suresh B, Baek KH. The role of deubiquitinating enzymes in apoptosis. *Cell Mol Life Sci* 2011; 68: 15-26
- 8 Grillari J, Grillari-Voglauer R, Jansen-Dürr P. Post-translational modification of cellular proteins by ubiquitin and ubiquitin-like molecules: role in cellular senescence and aging. *Adv Exp Med Biol* 2010; 694: 172-196
- 9 Kimura Y, Tanaka K. Regulatory mechanisms involved in the control of ubiquitin homeostasis. *J Biochem* 2010; 147: 793-798
- 10 Fang Y, Fu D, Shen XZ. The potential role of ubiquitin c-terminal hydrolases in oncogenesis. *Biochim Biophys Acta* 2010; 1806: 1-6
- 11 Bardag-Gorce F. Effects of ethanol on the proteasome interacting proteins. *World J Gastroenterol* 2010; 16: 1349-1357
- 12 Tsukamoto S, Yokosawa H. Inhibition of the ubiquitin-proteasome system by natural products for cancer therapy. *Planta Med* 2010; 76: 1064-1074
- 13 Shabek N, Ciechanover A. Degradation of ubiquitin: the fate of the cellular reaper. *Cell Cycle* 2010; 9: 523-530
- 14 Katz EJ, Isasa M, Crosas B. A new map to understand deubiquitination. *Biochem Soc Trans* 2010; 38: 21-28
- 15 Fujita K, Srinivasula SM. Ubiquitination and TNFR1 signaling. *Results Probl Cell Differ* 2009; 49: 87-114
- 16 Finley D. Recognition and processing of ubiquitin-protein conjugates by the proteasome. *Annu Rev Biochem* 2009; 78: 477-513
- 17 Reyes-Turcu FE, Ventii KH, Wilkinson KD. Regulation and cellular roles of ubiquitin-specific deubiquitinating enzymes. *Annu Rev Biochem* 2009; 78: 363-397
- 18 Hussain S, Zhang Y, Galardy PJ. DUBs and cancer: the role of deubiquitinating enzymes as oncogenes, non-oncogenes and tumor suppressors. *Cell Cycle* 2009; 8: 1688-1697
- 19 Nijman SM, Luna-Vargas MP, Velds A, Brummelkamp TR, Dirac AM, Sixma TK, Bernards R. A genomic and functional inventory of deubiquitinating enzymes. *Cell* 2005; 123: 773-786
- 20 Lee HJ, Kim MS, Shin JM, Park TJ, Chung HM, Baek KH. The expression patterns of deubiquitinating enzymes, USP22 and Usp22. *Gene Expr Patterns* 2006; 6: 277-284
- 21 骆杨, 曾甫清, 顾朝辉, 汪良, 王智宇, 蒋国松, 肖行远. 膀胱移行细胞癌中候选肿瘤干细胞标记物USP22 mRNA水平定量分析及其与肿瘤分级的关系. *临床泌尿外科杂志* 2009; 24: 140-144
- 22 Liu YL, Yang YM, Xu H, Dong XS. Aberrant expression of USP22 is associated with liver metastasis and poor prognosis of colorectal cancer. *J Surg Oncol* 2011; 103: 283-289
- 23 吕磊, 杨军, 王智宇, 蒋国松, 肖行远. 非对称性小RNA干扰技术介导的USP22基因沉默的研究. *中华实验外科杂志* 2010; 27: 1511-1513
- 24 Baker SP, Grant PA. The SAGA continues: expanding the cellular role of a transcriptional co-activator complex. *Oncogene* 2007; 26: 5329-5340
- 25 Rodríguez-Navarro S. Insights into SAGA function during gene expression. *EMBO Rep* 2009; 10: 843-850
- 26 Bhaumik SR. Distinct regulatory mechanisms of eukaryotic transcriptional activation by SAGA and TFIID. *Biochim Biophys Acta* 2011; 1809: 97-108
- 27 Pijnappel WW, Timmers HT. Dubbing SAGA unveils new epigenetic crosstalk. *Mol Cell* 2008; 29: 152-154
- 28 Atanassov BS, Evrard YA, Multani AS, Zhang Z, Tora L, Devys D, Chang S, Dent SY. Gcn5 and SAGA regulate shelterin protein turnover and telomere maintenance. *Mol Cell* 2009; 35: 352-364
- 29 Zhao Y, Lang G, Ito S, Bonnet J, Metzger E, Sawat-subashi S, Suzuki E, Le Guezennec X, Stunnenberg HG, Krasnov A, Georgieva SG, Schüle R, Takeyama K, Kato S, Tora L, Devys D. A TFIC/STAGA module mediates histone H2A and H2B deubiquitination, coactivates nuclear receptors, and counteracts heterochromatin silencing. *Mol Cell* 2008; 29: 92-101
- 30 Frappier L, Verrijzer CP. Gene expression control by protein deubiquitinases. *Curr Opin Genet Dev* 2011; 21: 207-213
- 31 Avvakumov N, Nourani A, Côté J. Histone chaperones: modulators of chromatin marks. *Mol Cell* 2011; 41: 502-514

## ■同行评价

本文设计合理, 结果可信, 有一定的临床参考价值.

编辑 曹丽鸥 电编 何基才



# P21对胃癌细胞MGC-803的增殖抑制及对POLD1基因表达的调控

阮细玲, 李永继, 吴琼, 廖柳凤, 徐恒

## ■背景资料

P21是目前已知具有最广泛激酶抑制活性的细胞周期抑制蛋白, 他可以阻滞细胞周期进程, 抑制DNA的复制. 而DNA聚合酶 $\delta$ 是唯一与细胞周期相关、在DNA复制中起主导作用的DNA复制酶. 认识两者的关系有助于更深入理解DNA复制.

阮细玲, 李永继, 吴琼, 广西医科大学病理学 广西壮族自治区南宁市 530021

廖柳凤, 广西医科大学药理学 广西壮族自治区南宁市 530021  
徐恒, 广西医科大学医学实验中心 广西壮族自治区南宁市 530021

阮细玲, 在读硕士, 主要从事胃癌、乳腺癌功能基因组学和蛋白质组学研究.

国家自然科学基金资助项目, No. 30950028

广西自然科学基金资助项目, No. 2010jjC40020

广西医科大学实验中心开放课题基金资助项目, No. KFJJ2010-66

作者贡献分布: 荧光定量PCR和Western blot等主要实验、数据分析和文章撰写由阮细玲完成; 细胞培养、质粒转染等由吴琼、李永继及廖柳凤协助完成; 课题指导、文章修改和审阅由徐恒完成.

通讯作者: 徐恒, 教授, 530021, 广西壮族自治区南宁市双拥路22号, 广西医科大学医学实验中心. heng6888@yahoo.com  
电话: 0771-5313093

收稿日期: 2011-05-06 修回日期: 2011-06-22

接受日期: 2011-06-28 在线出版日期: 2011-07-08

## P21 suppresses cell proliferation and down-regulates POLD1 expression in human gastric cancer cell line MGC-803

Xi-Ling Ruan, Yong-Ji Li, Qiong Wu, Liu-Feng Liao, Heng Xu

Xi-Ling Ruan, Yong-Ji Li, Qiong Wu, Department of Pathology, Guangxi Medical University, Nanning 530021, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China

Liu-Feng Liao, Department of Pharmacology, Guangxi Medical University, Nanning 530021, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China

Heng Xu, Medical Experimental Research Center, Guangxi Medical University, Nanning 530021, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30950028; the Natural Science Foundation of Guangxi Zhuang Autonomous Region, No. 2010jjC40020; and the Foundation of the Medical Experimental Research Center of Guangxi Medical University, No. KFJJ2010-66

Correspondence to: Professor Heng Xu, Medical Experimental Research Center, Guangxi Medical University, 22 Shuangyong Road, Nanning 530021, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China. heng6888@yahoo.com

Received: 2011-05-06 Revised: 2011-06-22

Accepted: 2011-06-28 Published online: 2011-07-08

## Abstract

**AIM:** To investigate whether and how P21 regu-

lates POLD1 expression in human gastric cancer cell line MGC-803 and to find new clues to blocking the malignant proliferation of cancer cells.

**METHODS:** MGC-803 cells were divided into three groups: blank control group (untransfected cells), negative control group (cells transfected with an empty vector pXJ41-neo), and experimental group (cells transfected with a eukaryotic expression plasmid pXJ41-p21). After transfection, cell proliferation was detected by MTT assay; cell apoptosis was detected by flow cytometry; and the mRNA and protein expression was detected by quantitative real-time PCR and Western blot, respectively.

**RESULTS:** Compared to the two control groups, cell proliferation was significantly inhibited, cell apoptosis was increased ( $11.36 \pm 0.51$  vs  $7.39 \pm 0.17$ ,  $7.69 \pm 0.47$ ,  $F = 85.338$ ,  $P < 0.05$ ), and the mRNA and protein expression of POLD1 was inhibited in the experimental group. In addition, the relative expression levels of cyclin E and Rb1 increased, that of CDK2 decreased, and that of *c-myc* showed little change in the experimental group when compared to the two control groups.

**CONCLUSION:** P21 can suppress cell proliferation and promote apoptosis in human gastric cancer cell line MGC-803. P21 can also suppress POLD1 expression possibly by regulating the expression of CDK2, cyclin E, Rb1 or other cell cycle factors in MGC-803 cells.

**Key Words:** Gastric cancer; P21; POLD1; Expression regulation

Ruan XL, Li YJ, Wu Q, Liao LF, Xu H. P21 suppresses cell proliferation and down-regulates POLD1 expression in human gastric cancer cell line MGC-803. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(19): 1990-1995

## 摘要

**目的:** 研究P21对POLD1基因的调控通路, 以

## ■同行评议者

陈国忠, 副主任医师, 广西中医学院第一附属医院消化内科; 杜雅菊, 主任医师, 哈尔滨医科大学附属第二医院消化内科

探索阻断癌细胞恶性增殖的机制。

**方法:** 实验主要分3组: 阴性对照组(转染空载体pXJ41-neo的803-pXJ细胞)、空白对照组(胃癌细胞MGC-803)、实验组(转染P21重组真核表达质粒pXJ41-p21的803-p21细胞)。MTT实验分析细胞增殖变化, 流式细胞仪检测细胞凋亡水平, 实时荧光定量PCR技术检测基因表达水平的变化, Western blot分析蛋白表达差异。

**结果:** MTT实验显示, 与空白对照和阴性对照组相比, 实验组细胞增殖受到明显抑制, 凋亡率(%)增高( $11.36 \pm 0.51$  vs  $7.39 \pm 0.17$ ,  $7.69 \pm 0.47$ ,  $F = 85.338$ , 均 $P < 0.05$ )。实验组P21 mRNA表达水平显著提高( $2.15 \pm 0.23$  vs  $1.05 \pm 0.11$ ,  $1.00 \pm 0.00$ ,  $F = 59.054$ , 均 $P < 0.05$ )。POLD1则显著下调( $0.45 \pm 0.07$  vs  $1.09 \pm 0.13$ ,  $1.00 \pm 0.00$ ,  $F = 49.907$ , 均 $P < 0.05$ )。P21、P125蛋白表达变化与基因变化相一致。cyclin E、Rb1基因表达均上调, CDK2基因表达下调, *c-myc*基因表达则变化不大。

**结论:** P21抑制了胃癌细胞的增殖、促进其凋亡, 同时抑制了POLD1基因的表达, 这种抑制作用可能通过CDK2、cyclin E、Rb1等细胞周期因子实现。

**关键词:** 胃癌; P21; POLD1; 表达调控

阮细玲, 李永继, 吴琼, 廖柳凤, 徐恒. P21对胃癌细胞MGC-803的增殖抑制及对POLD1基因表达的调控. 世界华人消化杂志 2011; 19(19): 1990-1995  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/1990.asp>

## 0 引言

据DePamphilis<sup>[1]</sup>报道, 使细胞周期任一时期DNA复制减少或增加都可能导致严重的后果, 产生癌症、先天性缺陷及发育异常等人类遗传性疾病。DNA聚合酶 $\delta$ (DNA polymerase  $\delta$ , pol $\delta$ )是唯一与细胞周期相关、在DNA复制中起主导作用的DNA复制酶<sup>[2]</sup>, 其催化亚基P125具有5'-3'聚合酶和3'-5'外切酶两种活性, 编码该亚基的基因称为POLD1<sup>[3]</sup>。而P21是目前已知具有最广泛激酶抑制活性的细胞周期抑制蛋白<sup>[4,5]</sup>, 他可以阻滞细胞周期进程, 抑制DNA的复制。据此我们推测他可能参与了对POLD1基因的表达调控, 并研究其可能的调控模式, 从这种新的调控网络与胃癌细胞内DNA复制的关系来寻找阻断癌细胞恶性增殖的又一途径。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** MGC-803细胞购自中国科学院上海生物细胞研究所; pXJ41-neo载体由新加坡国立大学王跃教授惠赠, pXJ41-p21是将P21的cDNA构建入pXJ41-neo载体获得的真核表达载体, 由北京师范大学桑建利教授惠赠; DMEM培养基, Hyclone公司; 胎牛血清, 杭州四季青公司; 高效真核转染试剂Vigofect, 威格拉斯生物技术有限公司; Annexin V/PI凋亡检测试剂盒, 南京凯基生物科技公司; TRIzol, Invitrogen公司; 逆转录试剂盒, Fermentas公司; 荧光定量PCR试剂盒, 天根生化科技有限公司; 兔抗人P21抗体C19、山羊抗人DNA聚合酶 $\delta$ (P125)抗体C20为Santa Cruz产品; 远红外荧光标记的山羊抗兔、兔抗山羊二抗, 美国KPL公司

### 1.2 方法

**1.2.1 细胞培养:** 人胃癌细胞系MGC-803培养于含100 mL/L胎牛血清的高糖DMEM培养基, 37 °C、50 mL/L CO<sub>2</sub>条件下培养。

**1.2.2 细胞转染:** 转染前1 d将MGC-803细胞转种于6孔板, 汇合度为70%-80%。转染前1 h给细胞换用无血清DMEM培养基。转染试剂Vigofect与质粒比例为3  $\mu$ L : 5  $\mu$ g制备转染复合物, 15 min后均匀滴入6孔板细胞, 培养箱培养6 h, 换用完全培养基。转染后48 h收获细胞。

**1.2.3 MTT法分析细胞增殖:** 对数生长期细胞接种于96孔板,  $2 \times 10^3$ /孔, 每组细胞均做5个复孔, 第2天转染pXJ41-p21、pXJ41-neo质粒到细胞, 分别于转染0、24、48、72 h加入20  $\mu$ L MTT溶液, 继续培养4 h后, 小心吸尽培养液, 每孔加入150  $\mu$ L DMSO, 酶标仪检测490 nm处吸光度值(A值), 最后绘制生长曲线。

**1.2.4 细胞凋亡检测:** 细胞经胰酶消化后, 计数板计数细胞, 每管取 $1 \times 10^6$ 细胞, 预冷的PBS洗细胞3次, 用200  $\mu$ L Buffer重悬细胞, 每管分别加入5  $\mu$ L Annexin V-FITC、5  $\mu$ L PI, 避光孵育20 min, 流式细胞仪上机检测。

**1.2.5 荧光定量PCR检测基因表达:** 应用Primer Premier 5.0软件设计引物, 各基因的引物序列见表1。提取细胞总RNA, 各取1  $\mu$ g进行逆转录得到cDNA, ABI 7500荧光定量PCR仪上进行反应, 反应体系为: 9  $\mu$ L PCR mix、9  $\mu$ L去离子水、1  $\mu$ L引物、1  $\mu$ L cDNA。以GAPDH为内参, PCR条件为: 95 °C预变性2 min, 95 °C变性20 s、60 °C退火30 s、72 °C延伸31 s, 40个循环, 采用比较Ct法, 7500 Software v2.0.5分析数据。

## ■ 相关报道

有文献报道, 肝癌组织POLD1基因及P125蛋白的表达明显高于癌旁组织, 提示P125的高表达可能与肿瘤的发生、发展有重要的关系。

## ■创新盘点

胃癌细胞内P21对POLD1基因的表达调控关系尚无报道,而且调控的具体机制仍不清楚,本文已筛选出一些相关因子,为后续的研究奠定了基础。

表 1 荧光定量PCR所用到的引物序列

基因	引物序列	产物长度(bp)
GAPDH	上游引物 5'-AACGGATTTGGTCGTATTG-3'	210
	下游引物 5'-CTGGAAGATGGTGATGGG-3'	
<i>p21</i>	上游引物 5'-ATTCAGCATTGTGGGAGGAG-3'	131
	下游引物 5'-TGGACTGTTTCTCTCGGCT-3'	
POLD1	上游引物 5'-GCTCCGCTCCTACACGCTCAA-3'	109
	下游引物 5'-GGTCTGGTCGTTCCATTCTGC-3'	
cyclin E	上游引物 5'-CAGGGTATCAGTGGTGCGACAT-3'	181
	下游引物 5'-TTCTTTGCTCGGGCTTTGTCC-3'	
Rb1	上游引物 5'-GACCCAGAGCAGGACAGCG-3'	177
	下游引物 5'-ACCTCCCAATACTCCATCCACA-3'	
CDK2	上游引物 5'-GGCCTAGCTTTCTGCCATTC-3'	188
	下游引物 5'-CCCAGGAGGATTCAGGAGC-3'	
<i>c-myc</i>	上游引物 5'-CGAGGAGAATGTCAAGAGGCG-3'	176
	下游引物 5'-CTGCTTGACGGACAGGATGT-3'	

**1.2.6 Western blot分析蛋白表达:** RIPA裂解液提取细胞总蛋白,测定浓度后,取50  $\mu$ g蛋白样品,加入上样缓冲液煮沸5 min变性后上样电泳。100 mA电流条件下转膜2 h,5%脱脂奶粉封闭2 h。4  $^{\circ}$ C摇床孵育一抗(P21、P125一抗稀释度分别为1:500、1:2 000)过夜,PBST洗膜3次,10 min每次,室温孵育二抗(二抗稀释度均为1:5 000)1 h,PBST洗膜3次,10 min每次,PBS洗1次(10 min),最后用LI-COR Odyssey红外荧光扫描成像系统扫描PVDF膜,Odyssey V3.0软件分析图像及数据。

**统计学处理** SPSS13.0统计软件进行统计学分析,采用ANOVA单因素方差分析,并用LSD法进行两两比较,结果用mean $\pm$ SD表示,检验水准 $\alpha=0.05$ ,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 MTT实验分析细胞的增殖** 与阴性对照组803-pXJ细胞、空白对照组MGC-803细胞相比,实验组803-*p21*细胞490 nm处的A值在转染后24 h差异无统计学意义( $0.51\pm0.10$  vs  $0.41\pm0.09$ ,  $0.58\pm0.14$ ,  $F=1.744$ , 均 $P>0.05$ ),但在48、72 h时差异具有统计学意义( $0.69\pm0.08$  vs  $1.01\pm0.18$ ,  $1.14\pm0.07$ ,  $F=11.333$ ;  $1.04\pm0.16$  vs  $1.43\pm0.13$ ,  $1.44\pm0.17$ ,  $F=6.706$ , 均 $P<0.05$ ),即实验组细胞生长受到明显抑制(图1)。

**2.2 流式细胞术检测细胞凋亡** 与阴性对照组803-pXJ细胞、空白对照组MGC-803细胞相比,实验组803-*p21*细胞凋亡率增高( $11.36\pm0.51$  vs  $7.39\pm0.17$ ,  $7.69\pm0.47$ ,  $F=85.338$ , 均 $P<0.05$ ,图2)。

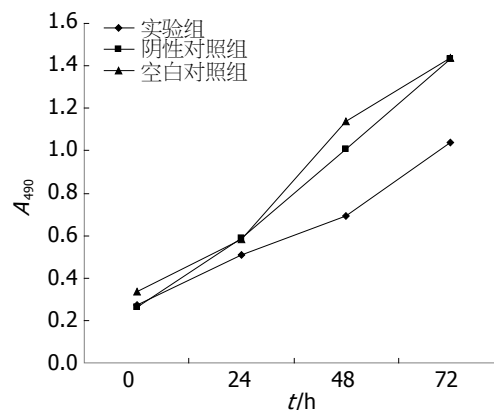


图 1 MGC-803细胞生长曲线。

## 2.3 荧光定量PCR检测mRNA表达量

**2.3.1 *p21*基因和POLD1基因:** 与对照组相比较,实验组细胞*p21*基因的相对表达量增加,说明重组质粒在细胞内成功表达*p21*基因,而POLD1基因表达受抑制。

**2.3.2 CDK2等细胞周期因子基因表达的变化:** 与对照组相比,实验组cyclin E、Rb1表达上调;CDK2基因表达受到抑制;*c-myc*基因表达在各组间差异无统计学意义(表2)。

**2.3.3 Western blot分析蛋白表达:** P21蛋白表达水平增高( $0.64\pm0.04$  vs  $0.40\pm0.07$ ,  $0.45\pm0.06$ ,  $F=13.788$ , 均 $P<0.05$ ),P125表达受抑制( $0.12\pm0.01$  vs  $0.19\pm0.15$ ,  $0.20\pm0.00$ ,  $F=14.378$ , 均 $P<0.05$ ,图3)。

## 3 讨论

DNA复制是由多种蛋白及酶(包括DNA聚合酶)严格调控的过程<sup>[6]</sup>,真核生物DNA聚合酶至少包

表 2 各组细胞周期因子mRNA相对表达水平

分组	CDK2	cyclin E	<i>c-myc</i>	Rb1
实验组	0.64 ± 0.13	1.34 ± 0.09	1.07 ± 0.03	1.90 ± 0.16
阴性对照组	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00
空白对照组	1.10 ± 0.09	1.11 ± 0.16	1.04 ± 0.16	1.05 ± 0.15
F值	21.670	18.047	0.436	50.540
P值	<0.05	<0.05	>0.05	<0.05

## ■应用要点

P21对POLDD1基因的表达调控与细胞周期、DNA复制关系密切,可能为抑制癌细胞的恶性增殖提供一种新的思路。

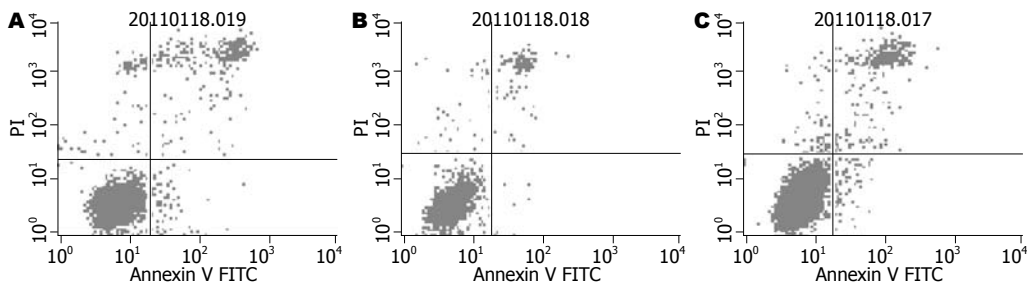


图 2 细胞凋亡实验. A: 实验组; B: 阴性对照组; C: 空白对照组。

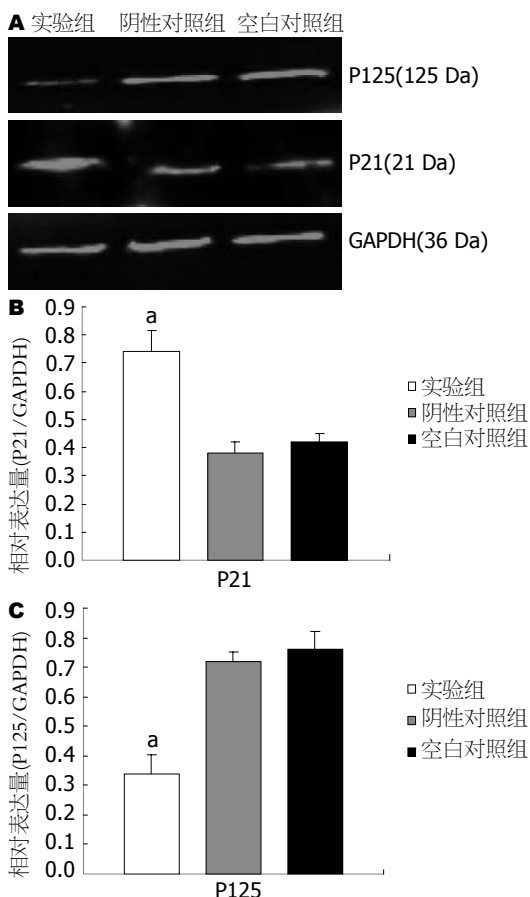


图 3 各组细胞P21、P125蛋白表达. A: Western blot检测3组细胞P21、P125的相对表达水平; B: 各组P21蛋白的相对表达量; C: 各组P125蛋白的相对表达量. <sup>a</sup> $P < 0.05$  vs 对照组。

括6种: DNA聚合酶 $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ 、 $\delta$ 、 $\epsilon$ 及 $\zeta$ <sup>[7]</sup>. pol $\delta$ 是DNA聚合酶B家族的成员,他在DNA复制、修

复、重组及跨损伤修复等均发挥重要作用<sup>[8,9]</sup>. 人类Pol $\delta$ 全酶至少由4种亚基组成: P125、P66、P50及P12<sup>[10]</sup>. 其中催化亚基P125由POLDD1基因编码<sup>[11]</sup>.

Sanefuji等<sup>[12]</sup>通过免疫组织化学的方法显示肝癌细胞核内P125的表达阳性率显著高于正常肝组织,并且P125的表达与细胞的分化及血管侵袭的程度有关. 欧贤红等<sup>[13]</sup>通过RT-PCR及Western blot的方法也发现肝癌组织POLDD1基因及P125蛋白的表达明显高于癌旁组织. 提示P125的高表达可能与肿瘤的发生、发展有重要的关系。

*p53*是一个重要的肿瘤抑制基因<sup>[14]</sup>, Li和Lee<sup>[15]</sup>通过Northern blot及EMSA等实验证实野生型*p53*通过与Sp1竞争性结合POLDD1启动子上的P4序列而抑制POLDD1基因mRNA表达水平. 作为*p53*基因的最重要的下游基因之一, *p21*基因的表达产物P21蛋白可以通过依赖或不依赖P53的途径发挥其细胞周期阻滞、DNA修复、细胞分化及凋亡等功能<sup>[16]</sup>. 一方面,他可以通过直接结合cyclin-CDK复合物而抑制其活性,使Rb蛋白不能发生磷酸化, E2F不能释放,从而使细胞周期停滞在G<sub>1</sub>期, DNA复制受抑制<sup>[5]</sup>. 另外他可以通过紧密结合增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen, PCNA), 影响PCNA与pol $\delta$ 的相互结合, 进而直接抑制DNA复制<sup>[17]</sup>. 石磊等<sup>[18]</sup>研究发现乳腺癌细胞系MCF7内P21抑制POLDD1基因的表达, 胃癌细胞内是否也存在这



## ■同行评价

本文创新性较好, 研究方法先进, 数据可靠, 具有较好的科学意义。

种抑制作用, 具体机制如何, 目前尚不清楚。

本研究通过将P21重组真核表达质粒pXJ41-*p21*转染到胃癌细胞MGC-803内, 使细胞高表达*p21*基因, 从而探讨了P21对胃癌细胞增殖和凋亡的影响, 及P21对POLDD1基因的表达调控作用。

细胞凋亡结果显示, 高表达*p21*基因的胃癌细胞凋亡水平升高, 说明*p21*基因具有有促凋亡作用。目前对于P21与细胞凋亡的关系还没有达成一致。P21的抑制凋亡作用与其胞质定位有关, 细胞质内的P21可抑制凋亡相关蛋白及减少对CDK2、PCNA的抑制作用从而起到抗细胞凋亡作用<sup>[19]</sup>。而P21的促凋亡作用可能通过依赖或者不依赖P53的途径, 但其具体机制目前仍不清楚, 可能与DNA修复体系的成员相互作用或对P21的调节作用有关<sup>[20]</sup>。最近研究表明, 对于无DNA损伤的P53激活的*p21*基因, 并不影响细胞凋亡<sup>[21]</sup>。

MTT实验表明, 高表达*p21*基因的胃癌MGC-803细胞增殖速度受到明显抑制, 且邱荣元等<sup>[22]</sup>、谭晓虹等<sup>[23]</sup>证实野生型P21抑制了肝癌细胞的增殖。Plasilova等<sup>[24]</sup>干扰间充质干细胞P21表达后, 细胞生长明显比对照组快。这些共同说明了野生型*p21*基因对细胞增殖的较广泛抑制作用。

更重要的是, *p21*基因高表达的胃癌MGC-803细胞POLDD1基因表达在mRNA和蛋白水平都下调了, 即P21抑制了POLDD1基因的表达。以上结果表明, P21抑制癌细胞生长的同时也抑制了POLDD1基因的表达。POLDD1基因表达产物P125表达下调后, polδ的5'-3'聚合酶活性将不能充分发挥, DNA复制过程将受到影响, 从而细胞生长也受影响。表明P21对POLDD1的调控作用与DNA复制、细胞增殖等关系密切。

为了更深入地探讨P21对POLDD1基因调控的可能机制, 我们通过荧光定量PCR的方法, 分析了P21高表达后其他细胞周期因子表达的变化, 以找到与P21对POLDD1的调控机制相关的因子。

已知P21的N末端具有保守的CDK2/cyclin E结合位点, 使CDK2活性被抑制<sup>[25,26]</sup>。但CDK2蛋白的缺失并不会阻滞细胞周期进程<sup>[27]</sup>, CDK2缺失的情况下, P21可以与CDK1结合<sup>[28]</sup>。据此我们推测P21对POLDD1的调控与CDK2/cyclin E有关, 但不应该是唯一的通路。已有实验表明, 非磷酸化的pRb在G<sub>1</sub>期可以与P125结合<sup>[29]</sup>, 而我们研究发现, P21可以上调Rb1基因的表达, 这为P21通

过Rb1而间接调控POLDD1的表达提供了一定的依据。

有文献<sup>[30-32]</sup>报道c-Myc可以下调*p21*基因的表达, 但反过来, P21对c-Myc的表达是否有影响未为可知。我们的研究显示, P21对*c-myc*基因表达的影响并不明显。他可能不作为P21对POLDD1基因表达调控的一个间接因子。

总之, 我们的实验结果表明, P21影响了胃癌细胞的增殖及凋亡, 同时他可能通过影响CDK2/cyclin E、Rb1的基因表达而间接抑制POLDD1基因的表达, 并且我们推测P21对癌细胞的增殖抑制作用可能与他抑制POLDD1的抑制有关, 这需要我们作进一步的实验来证实, 且更深入研究P21对POLDD1基因表达调控的具体通路显得非常重要, 可为抑制肿瘤细胞增殖提供一种新的思路。

## 4 参考文献

- 1 DePamphilis ML. DNA Replication and Human Disease. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY. 2006
- 2 林晓燕, 张叔人, 徐恒. 真核生物DNA聚合酶δ的研究现状. 自然科学进展 2005; 15: 1-7
- 3 Chang LS, Zhao L, Zhu L, Chen ML, Lee MY. Structure of the gene for the catalytic subunit of human DNA polymerase delta (POLDD1). *Genomics* 1995; 28: 411-419
- 4 张春林, 廖威明, 李佛宝. 细胞周期调控基因p21WAF1/CIP1与肿瘤. 肿瘤研究与临床 2002; 14: 141-143
- 5 杨安强, 郑兴征, 潘晓琳, 付锦艳. 细胞周期调控基因p21WAF1/CIP1与肿瘤的关系. 现代肿瘤医学 2006; 14: 243-245
- 6 Balakrishnan L, Gloor JW, Bambara RA. Reconstitution of eukaryotic lagging strand DNA replication. *Methods* 2010; 51: 347-357
- 7 Hindges R, Hübscher U. DNA polymerase delta, an essential enzyme for DNA transactions. *Biol Chem* 1997; 378: 345-362
- 8 Sweasy JB, Lauper JM, Eckert KA. DNA polymerases and human diseases. *Radiat Res* 2006; 166: 693-714
- 9 Schmitt MW, Venkatesan RN, Pillaire MJ, Hoffmann JS, Sidorova JM, Loeb LA. Active site mutations in mammalian DNA polymerase delta alter accuracy and replication fork progression. *J Biol Chem* 2010; 285: 32264-32272
- 10 Liu L, Mo J, Rodriguez-Belmonte EM, Lee MY. Identification of a fourth subunit of mammalian DNA polymerase delta. *J Biol Chem* 2000; 275: 18739-18744
- 11 Yang CL, Chang LS, Zhang P, Hao H, Zhu L, Toomey NL, Lee MY. Molecular cloning of the cDNA for the catalytic subunit of human DNA polymerase delta. *Nucleic Acids Res* 1992; 20: 735-745
- 12 Sanefuji K, Taketomi A, Iguchi T, Sugimachi K, Ikegami T, Yamashita Y, Gion T, Soejima Y, Shirabe K, Maehara Y. Significance of DNA polymerase delta catalytic subunit p125 induced by mutant p53 in the invasive potential of human hepatocellular carcinoma. *Oncology* 2010; 79: 229-237

- 13 欧贤红, 廖柳凤, 刘华钢, 徐恒. POLD1基因在原发性肝癌中的表达及其意义. *世界华人消化杂志* 2011; 19: 151-155
- 14 Jerry DJ, Tao L, Yan H. Regulation of cancer stem cells by p53. *Breast Cancer Res* 2008; 10: 304
- 15 Li B, Lee MY. Transcriptional regulation of the human DNA polymerase delta catalytic subunit gene POLD1 by p53 tumor suppressor and Sp1. *J Biol Chem* 2001; 276: 29729-29739
- 16 Gartel AL. p21(WAF1/CIP1) and cancer: a shifting paradigm? *Biofactors* 2009; 35: 161-164
- 17 Waga S, Hannon GJ, Beach D, Stillman B. The p21 inhibitor of cyclin-dependent kinases controls DNA replication by interaction with PCNA. *Nature* 1994; 369: 574-578
- 18 石磊, 徐恒, 朱晓宇, 孙建华, 宋楠萌, 李莉, 桑建利. p21对DNA聚合酶 $\delta$ 表达的抑制及其对MCF7细胞增殖和恶性表型的影响. *自然科学进展* 2006; 16: 672-678
- 19 Abbas T, Dutta A. p21 in cancer: intricate networks and multiple activities. *Nat Rev Cancer* 2009; 9: 400-414
- 20 宋其蔓, 孙洞箫. 细胞凋亡与p21关系的研究进展. *医学综述* 2008; 14: 816-818
- 21 Xia M, Knezevic D, Vassilev LT. p21 does not protect cancer cells from apoptosis induced by non-genotoxic p53 activation. *Oncogene* 2011; 30: 346-355
- 22 邱荣元, 何生松, 陈锋, 庞然, 杨凯凯. P21真核表达载体的构建及其对HepG2细胞增殖的影响. *世界华人消化杂志* 2009; 17: 2662-2666
- 23 谭晓虹, 徐恒, 韦长元, 曹骥, 崔凌飞, 刘斐. RNA干扰p21对肝癌细胞SMC-7721增殖的影响. *世界华人消化杂志* 2011; 19: 827-831
- 24 Plasilova M, Schonmeyer B, Fernandez J, Clavin N, Soares M, Mehrara BJ. Accelerating stem cell proliferation by down-regulation of cell cycle regulator p21. *Plast Reconstr Surg* 2009; 123: 149S-157S
- 25 Zhang H, Xiong Y, Beach D. Proliferating cell nuclear antigen and p21 are components of multiple cell cycle kinase complexes. *Mol Biol Cell* 1993; 4: 897-906
- 26 Fotadar R, Bendjennat M, Fotadar A. Functional analysis of CDK inhibitor p21WAF1. *Methods Mol Biol* 2004; 281: 55-71
- 27 Merrick KA, Wohlbold L, Zhang C, Allen JJ, Horiuchi D, Huskey NE, Goga A, Shokat KM, Fisher RP. Switching cdk2 on or off with small molecules to reveal requirements in human cell proliferation. *Mol Cell* 2011; 42: 624-636
- 28 Satyanarayana A, Hilton MB, Kaldis P. p21 Inhibits Cdk1 in the absence of Cdk2 to maintain the G1/S phase DNA damage checkpoint. *Mol Biol Cell* 2008; 19: 65-77
- 29 Krucher NA, Zygmunt A, Mazloun N, Tamrakar S, Ludlow JW, Lee MY. Interaction of the retinoblastoma protein (pRb) with the catalytic subunit of DNA polymerase delta (p125). *Oncogene* 2000; 19: 5464-5470
- 30 Jung P, Menssen A, Mayr D, Hermeking H. AP4 encodes a c-MYC-inducible repressor of p21. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 105: 15046-15051
- 31 Hwang-Verslues WW, Sladek FM. Nuclear receptor hepatocyte nuclear factor 4alpha1 competes with oncoprotein c-Myc for control of the p21/WAF1 promoter. *Mol Endocrinol* 2008; 22: 78-90
- 32 Wang Z, Liu M, Zhu H, Zhang W, He S, Hu C, Quan L, Bai J, Xu N. Suppression of p21 by c-Myc through members of miR-17 family at the post-transcriptional level. *Int J Oncol* 2010; 37: 1315-1321

编辑 李薇 电编 何基才

ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) CN 14-1260/R 2011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”的右上角注角码号;若正文中仅引用某文献中的论述,则在该论述的句末右上角注角码号.如马连生<sup>[1]</sup>报告……,潘伯荣等<sup>[2-5]</sup>认为……;PCR方法敏感性高<sup>[6-7]</sup>.文献序号作正文叙述时,用与正文同号的数字并排,如本实验方法见文献[8].所引参考文献必须以近2-3年SCIE, PubMed,《中国科技论文统计源期刊》和《中文核心期刊要目总览》收录的学术类期刊为准,通常应只引用与其观点或数据密切相关的国内外期刊中的最新文献,包括世界华人消化杂志(<http://www.wjgnet.com/1009-3079/index.jsp>)和World Journal of Gastroenterology(<http://www.wjgnet.com/1007-9327/index.jsp>).期刊: 序号, 作者(列出全体作者). 文题, 刊名, 年, 卷, 起页-止页, PMID编号; 书籍: 序号, 作者(列出全部), 书名, 卷次, 版次, 出版地, 出版社, 年, 起页-止页.

# 软脂酸对酒精体外诱导的脂肪变性肝细胞的作用及机制

王春晖, 卿笃信

## ■背景资料

慢性饮酒引起的肝脏脂肪的累积可以导致更为严重的肝脏损伤形式。药理学发展的目标就是在早期阶段逆转脂肪变性。

王春晖, 卿笃信, 中南大学湘雅二医院消化内科 湖南省长沙市 410011

王春晖, 硕士, 主要从事酒精性肝病防治方面的研究。

作者贡献分布: 王春晖与卿笃信对此文所作贡献均等; 此课题由卿笃信与王春晖设计; 研究过程由王春晖完成; 研究所用试剂及分析工具由卿笃信提供; 数据分析由王春晖完成; 本文写作由王春晖与卿笃信共同完成。

通讯作者: 卿笃信, 教授, 主任医师, 410011, 湖南省长沙市, 中南大学湘雅二医院消化内科。qingdx@163.com.cn

收稿日期: 2011-05-03 修回日期: 2011-06-21

接受日期: 2011-06-28 在线出版日期: 2011-07-08

## Effect of palmitic acid on ethanol-induced fatty degeneration in hepatic cells *in vitro*

Chun-Hui Wang, Du-Xin Qing

Chun-Hui Wang, Du-Xin Qing, Department of Gastroenterology, the Second Xiangya Hospital of Central South University, Changsha 410011, Hunan Province, China

Correspondence to: Professor Du-Xin Qing, Department of Gastroenterology, the Second Xiangya Hospital of Central South University, Changsha 410011, Hunan Province, China. qingdx@163.com.cn

Received: 2011-05-03 Revised: 2011-06-21

Accepted: 2011-06-28 Published online: 2011-07-08

## Abstract

**AIM:** To determine the effect of different concentrations of palmitic acid on alcohol-induced lipogenesis in L-02 liver cells and to explore mechanisms involved.

**METHODS:** Cultured L-02 liver cells were divided into three groups: blank control group, alcohol induction group, and palmitic acid intervention group, which were cultured in RPMI 1640 medium containing 10% serum, RPMI 1640 medium containing 10% serum and 6% ethanol, and RPMI 1640 medium containing 10% serum, 6% ethanol and different concentrations of palmitic acid (2.5, 5, 10, 20, 30, and 40  $\mu\text{mol/L}$ ), respectively. Cell proliferation was measured by MTT assay. The accumulation of lipid droplets was observed by light inverted microscopy after red oil-O staining. Intracellular triglyceride (TG) level was determined using commercial kits. Western blot was used to detect the levels of nuclear SREBP-1c protein in hepatocytes of each group.

**RESULTS:** A model of alcohol-induced steatosis was successfully induced in L-02 liver cells by incubation with 0.6% ethanol for 72 h. Compared to the alcohol induction group, palmitic acid at concentrations of 2.5, 5, and 10  $\mu\text{mol/L}$  could not only significantly promote cell proliferation (all  $P < 0.05$ ) but also significantly reduce the accumulation of lipid droplets and the levels of intracellular TG and nuclear SREBP-1c protein (all  $P < 0.05$ ), showing concentration-dependent protective effects. However, palmitic acid at concentrations of 20, 30 and 40  $\mu\text{mol/L}$  significantly inhibited cell proliferation (all  $P < 0.05$ ) and increased the accumulation of lipid droplets and the levels of intracellular TG and nuclear SREBP-1c protein (all  $P < 0.05$ ), showing harmful effect on alcohol-induced steatosis in L-02 liver cells.

**CONCLUSION:** Palmitic acid at concentrations  $<10 \mu\text{mol/L}$  has protective effects and palmitic acid at concentrations  $>10 \mu\text{mol/L}$  has harmful effects on alcohol-induced steatosis in L-02 liver cells. Palmitic acid exerts effects on alcohol-induced steatosis in L-02 liver cells via mechanisms associated with regulating the expression of nuclear SREBP-1c protein in hepatocytes.

**Key Words:** Ethanol; L-02 hepatocytes; Alcoholic fatty liver; Palmitic acid; Nuclear sterol regulatory element-binding protein-1c

Wang CH, Qing DX. Effect of palmitic acid on ethanol-induced fatty degeneration in hepatic cells *in vitro*. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(19): 1996-2001

## 摘要

**目的:** 探讨不同浓度的软脂酸对酒精体外诱导的脂肪变性肝细胞的作用及机制。

**方法:** 体外培养人正常肝细胞株L-02, 设立空白对照组、酒精诱导组及软脂酸干预组。软脂酸干预组设6个浓度梯度(2.5、5、10、20、30、40  $\mu\text{mol/L}$ ), 空白对照组用正常培养基培养96 h, 酒精诱导组和软脂酸干预组在细胞培养24 h后加入终浓度为60 mL/L的无水乙醇, 继续培养24 h后, 软脂酸干预组加入各浓度软脂酸。采用MTT法测细胞增殖, 油红O染色观察

## ■同行评议者

潘兴华, 副主任医师, 中国人民解放军成都军区昆明总医院病理实验科

细胞内脂滴形成情况, 试剂盒检测细胞内三酰甘油的含量, Western blot法测定细胞核内成熟的固醇调节元件结合蛋白-1c(nSREBP-1c)的含量。

**结果:** 60 mL/L的无水乙醇培养L-02细胞72 h成功建立了脂肪变性模型, 软脂酸干预后, 软脂酸浓度 $\leq 10 \mu\text{mol/L}$ 时, 软脂酸明显地促进酒精诱导的脂肪变性肝细胞的增殖( $P < 0.05$ ), 并且明显地减轻细胞内脂滴的形成, 减少细胞内三酰甘油的含量和细胞核内nSREBP-1c的含量, 并呈现出剂量效应关系; 而软脂酸浓度 $\geq 20 \mu\text{mol/L}$ 时, 明显地抑制酒精诱导的脂肪变性肝细胞的增殖( $P < 0.05$ ), 并且加重细胞内脂滴的形成, 增加细胞内三酰甘油和细胞核内nSREBP-1c的含量( $P < 0.05$ ), 呈现出对酒精诱导的脂肪变性肝细胞的损害作用。

**结论:** 在一定浓度范围内, 软脂酸对酒精诱导的脂肪变性肝细胞有防治作用, 但超过此范围时, 却反过来加重肝细胞的脂肪变性。推测软脂酸对酒精诱导的脂肪变性肝细胞的影响与调节肝细胞核内nSREBP-1c有关。

**关键词:** 乙醇; L-02细胞; 酒精性脂肪肝; 软脂酸; 细胞核内成熟的固醇调节元件结合蛋白-1c

王春晖, 卿笃信. 软脂酸对酒精体外诱导的脂肪变性肝细胞的作用及机制. 世界华人消化杂志 2011; 19(19): 1996-2001  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/1996.asp>

## 0 引言

慢性饮酒引起的肝脏脂肪的累积可以导致更为严重的肝脏损伤形式<sup>[1,2]</sup>。药理学发展的目标就是在早期阶段逆转脂肪变性。如果说戒酒是处理各种形式的酒精性肝病(alcoholic liver disease, ALD)的长期目标, 那么通过饮食调节来防治ALD将是一个更吸引人的途径。已有动物实验证实饱和脂肪酸可以防治ALD, 防治作用与调节脂质代谢<sup>[3,4]</sup>、降低氧化应激及脂质过氧化<sup>[5]</sup>、减轻肝纤维化<sup>[6]</sup>有关。软脂酸是一种饱和脂肪酸, 除了具有某些潜在的生理功能外<sup>[7]</sup>, 对血脂的影响作用也较复杂<sup>[8,9]</sup>, 其富含于各种动物油脂中, 与人们日常生活息息相关。本实验将在体外条件下研究软脂酸对酒精诱导的脂肪变性肝细胞的作用及可能机制。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 人正常肝细胞株L-02购自中南大学湘雅医院细胞实验中心, 胎牛血清购自杭州四季

青生物工程材料有限公司, RPMI 1640培养液购自美国Gibco公司, 软脂酸购自美国Sigma公司, 无水乙醇为国产分析纯, MTT购自湘雅附二医院实验中心, 三酰甘油检测试剂盒购自南京建成生物工程研究所, 细胞核内成熟的固醇调节元件结合蛋白-1c(nuclear sterol regulatory element-binding protein-1c, SREBP-1c)抗体购自北京博奥森生物技术有限公司。

### 1.2 方法

**1.2.1 软脂酸浓度的选择与溶解:** 张红锋等<sup>[10]</sup>的实验结果证实6 mL/L的乙醇与20  $\mu\text{mol/L}$ 的软脂酸联合培养肝细胞, 可以建立肝细胞脂肪变性模型, 且比乙醇单独作用引起的脂肪变性严重, 因此我们考虑如果软脂酸对酒精诱导的脂肪变性肝细胞有防治作用, 其浓度可能低于20  $\mu\text{mol/L}$ , 因此我们选用2.5、5、10、20、30、40  $\mu\text{mol/L}$ 一系列的浓度作为软脂酸的干预浓度, 以探讨软脂酸对酒精诱导的脂肪变性肝细胞的作用。软脂酸的溶解<sup>[11]</sup>: 用0.1 mol/L的NaOH溶液在70  $^{\circ}\text{C}$ 中溶解一定量的软脂酸, 震荡混匀10 min, 然后过滤, 配成100 mmol/L的软脂酸储存液。在55  $^{\circ}\text{C}$ 水浴中用去离子水配50 g/L的无脂肪酸的BSA溶液, 过滤, 然后将上述的软脂酸溶液和BSA溶液按1:19的体积比混合配成5 mmol/L软脂酸和50 g/L BSA复合液, 复合液在水浴中震荡10 s后继续水浴10 min, 取出冷却至室温。后将此复合液用不同体积的培养液配成终浓度为2.5、5、10、20、30、40  $\mu\text{mol/L}$ 的软脂酸工作液。

**1.2.2 肝细胞L-02的培养与传代:** 采用100 mL/L胎牛血清(FBS)的RPMI 1640培养液, 在37  $^{\circ}\text{C}$ 、50 mL/L  $\text{CO}_2$ 饱和湿度孵育箱内培养。2-3 d换液1次, 约3-5 d能单层长满培养瓶底, 长满瓶底后, 用2.5 g/L胰蛋白酶消化, 按1:3传代, 所有实验均取对数生长期细胞。

**1.2.3 实验分组与细胞的处理:** 培养细胞到对数生长期后将细胞分为8组: 空白对照组(NA)、酒精诱导组(A)、2.5  $\mu\text{mol/L}$ 软脂酸干预组(PA1)、5  $\mu\text{mol/L}$ 软脂酸干预组(PA2)、10  $\mu\text{mol/L}$ 软脂酸干预组(PA3)、20  $\mu\text{mol/L}$ 软脂酸干预组(PA4)、30  $\mu\text{mol/L}$ 软脂酸干预组(PA5)、40  $\mu\text{mol/L}$ 软脂酸干预组(PA6), 3组均在37  $^{\circ}\text{C}$ 、50 mL/L  $\text{CO}_2$ 饱和湿度孵育箱内培养24 h后, NA组仍换用正常培养液, A组及软脂酸干预组分别加入含终浓度为60 mL/L无水乙醇的培养液, 继续培养24 h后, 软脂酸干预组加入软脂酸母液, 使其终浓度为2.5、5、10、20、30、40  $\mu\text{mol/L}$ , NA组及A组

### ■ 相关报道

已有动物实验证实饱和脂肪酸可以防治ALD, 防治作用与调节脂质代谢、降低氧化应激及脂质过氧化、减轻肝纤维化有关。



## ■应用要点

在一定浓度范围内,软脂酸对酒精诱导的脂肪变性肝细胞有防治作用,但超过此范围时,却反过来加重肝细胞的脂肪变性。推测软脂酸对酒精诱导的脂肪变性肝细胞的影响与调节肝细胞核内nSREBP-1c有关。

加入与软脂酸母液其他成分相同但不含有软脂酸的等体积溶液,48 h后进行相关指标的检测,实验各组处理时均设4个复孔,且每个指标重复测定3次。

**1.2.4 MTT法观察软脂酸对酒精体外诱导的脂肪变性肝细胞增殖的影响:**采用96孔板,每孔植入 $1 \times 10^4$ 个细胞,按上述方法分组处理,48 h后吸出培养液,各孔中加入200  $\mu$ L浓度为0.05%的MTT,37  $^{\circ}$ C孵育4 h,去上清液,各孔各加入200  $\mu$ L二甲基亚砜(DMSO),震荡10 min,混匀以溶解被还原的MTT结晶,在酶标仪上检测波长为490 nm吸光度值( $A_{490}$ ),计算各组细胞的存活率。

**1.2.5 油红O染色观察各组细胞内脂滴的形成情况:**采用24孔板,每孔植入 $4 \times 10^4$ 个细胞,按上述方法分组处理,结束后弃去上清液,用PBS洗涤3遍,加入4%多聚甲醛1 mL固定30 min, PBS洗2次,后每孔中加入3油红O稀释液1 mL,染色30 min, PBS漂洗2次,稍干后,可于倒置显微镜下观察细胞内脂滴的形成情况。

**1.2.6 各组细胞内三酰甘油检测:**采用6孔板,每孔植入 $1 \times 10^5$ 个细胞,按上述方法分组处理,结束后弃去上清液,收集各组培养板上的细胞,按三酰甘油检测试剂盒要求,提取并检测细胞内三酰甘油的含量。

**1.2.7 Western blot法检测各组细胞核内nSREBP-1c的含量:**细胞分组处理后提取核蛋白,以50  $\mu$ g孔上样,电泳(60 V, 2.5 h)结束后用半干转仪将凝胶中蛋白转移到NC膜上,后将NC膜用3% BSA封闭2 h,一抗4  $^{\circ}$ C孵育过夜,二抗常温孵育1 h,以新鲜配制NBT/BCIP显色,水洗终止反应,NC膜晾干后用扫描仪输出结果,结果用Image J软件分析处理。以PCNA作为内参照,将目的条带灰度值与PCNA灰度值相比作为目的蛋白的相对表达量。

**统计学处理** 采用SPSS17.0统计软件进行数据的处理分析,实验数据均以 $\text{mean} \pm \text{SD}$ 表示,先进行方差齐性检验,如符合方差齐性, A组与各干预组间比较采用单因素方差分析, NA组与A组两组间比较采取配对 $t$ 检验,确定 $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

## 2 结果

**2.1 软脂酸对酒精体外诱导的脂肪变性肝细胞增殖的影响** A组细胞存活率较NA组降低( $P < 0.05$ ),当软脂酸浓度 $\leq 10 \mu\text{mol/L}$ 时,软脂酸对酒精体外诱导的脂肪变性肝细胞的增殖有一

表 1 不同浓度的软脂酸对酒精诱导的脂肪变性肝细胞增殖的影响 ( $\text{mean} \pm \text{SD}$ )

分组	A值	细胞活性的变化(%)
NA组	$0.824 \pm 0.018$	100.0
A组	$0.776 \pm 0.011^a$	94.2
PA1组	$0.793 \pm 0.013^c$	96.2
PA2组	$0.795 \pm 0.015^c$	96.5
PA3组	$0.802 \pm 0.011^c$	97.3
PA4组	$0.716 \pm 0.011^c$	86.9
PA5组	$0.693 \pm 0.014^{ce}$	84.1
PA6组	$0.649 \pm 0.014^{ceg}$	78.8

<sup>a</sup> $P < 0.05$  vs NA组; <sup>c</sup> $P < 0.05$  vs A组; <sup>e</sup> $P < 0.05$  vs PA4组; <sup>g</sup> $P < 0.05$  vs PA5组。

定的促进作用,差别有统计学意义( $P < 0.05$ );当软脂酸的浓度 $\geq 20 \mu\text{mol/L}$ 时,软脂酸反过来抑制细胞的增殖,而且随着软脂酸浓度的增加抑制作用越明显,差别有统计学意义( $P < 0.05$ ,表1)。

**2.2 油红O染色观察软脂酸对各组细胞内脂滴形成情况的影响** NA组细胞形态正常,胞膜界限清楚,胞内无明显脂滴形成; A组细胞较NA组稍肿胀,胞内可见大小不等的橘红色脂滴,分布在靠近细胞膜的区域,并可见少许脱落细胞;软脂酸干预后,与酒精诱导组相比,当软脂酸浓度 $\leq 10 \mu\text{mol/L}$ 时,肝细胞内形成的脂滴大小和数量均有所减轻,脱落细胞减少,而且软脂酸浓度越高对脂滴的减轻作用越明显,当软脂酸浓度 $\geq 20 \mu\text{mol/L}$ 时,软脂酸反过来可以加重细胞内脂滴的形成,且软脂酸浓度越大加重作用越强,当软脂酸为 $40 \mu\text{mol/L}$ 时,细胞内橘红色的脂滴明显增多,并连接成片,同时脱落细胞亦明显增多(图1)。

**2.3 软脂酸对细胞内三酰甘油的影响** 经测定A组细胞内三酰甘油的量较NA组高( $P < 0.05$ ),软脂酸干预组:当软脂酸浓度 $\leq 10 \mu\text{mol/L}$ 时,软脂酸可以减少细胞内三酰甘油的量( $P < 0.05$ ),且随软脂酸浓度的增加减轻作用越明显,当软脂酸浓度 $\geq 20 \mu\text{mol/L}$ 时,软脂酸则可以增加细胞内三酰甘油的量,PA5组较PA4组增加作用明显,但PA6组较PA4、PA5组增加作用减小( $P < 0.05$ ,图2)。

**2.4 Western blot法检测细胞核内nSREBP-1c的表达量** A组核内nSREBP-1c的相对表达量较NA组增高( $P < 0.05$ ),软脂酸干预组:当软脂酸浓度 $\leq 10 \mu\text{mol/L}$ 时,软脂酸干预组核内nSREBP-1c的相对表达量较A组低( $P < 0.05$ ),且随软脂酸浓度的增加而降低,当软脂酸浓度 $\geq 20 \mu\text{mol/L}$ 时,软脂酸干预组核内nSREBP-1c的相对表达量较A

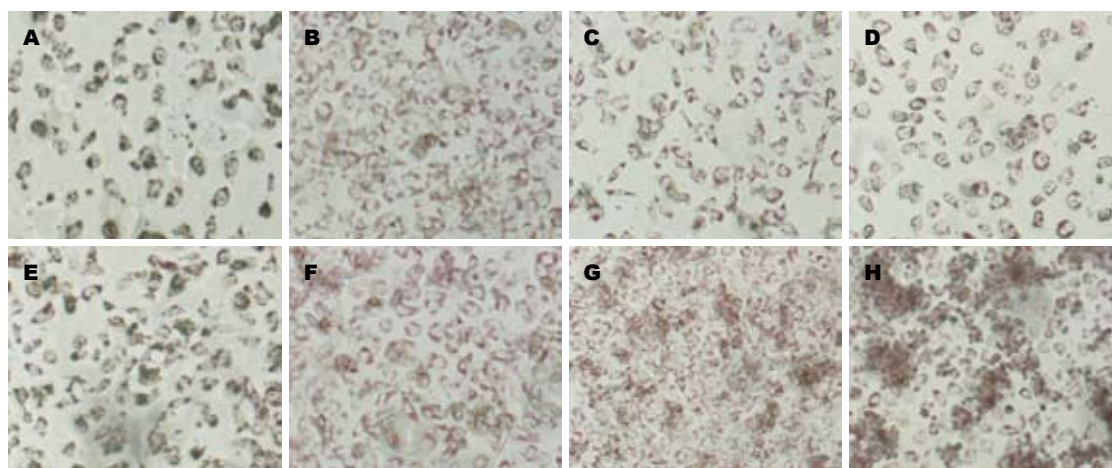


图 1 软脂酸对各组细胞内脂滴形成情况的影响(油红O染色 $\times 200$ ). A: NA组; B: A组; C: PA1组; D: PA2组; E: PA3组; F: PA4组; G: PA5组; H: PA6组.

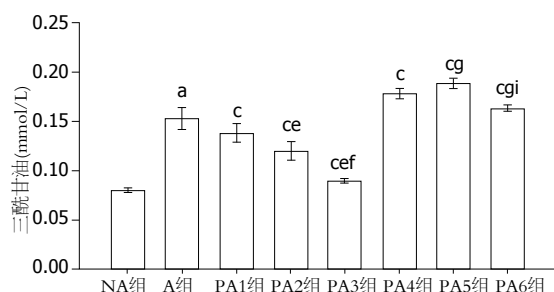


图 2 不同浓度的软脂酸对酒精诱导的脂肪变性肝细胞细胞内三酰甘油的影响. <sup>a</sup> $P<0.05$  vs NA组; <sup>a</sup> $P<0.05$  vs A组; <sup>c</sup> $P<0.05$  vs PA1组; <sup>ce</sup> $P<0.05$  vs PA4组; <sup>cef</sup> $P<0.05$  vs PA5组.

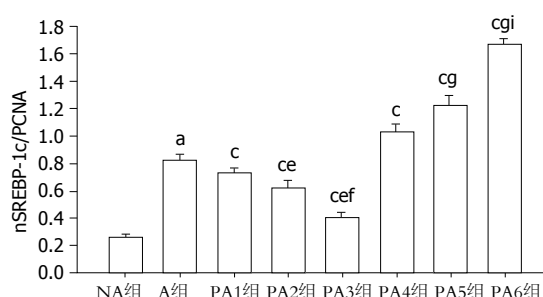


图 4 各组细胞核内nSREBP-1c的相对表达量(nSREBP-1c/PCNA). <sup>a</sup> $P<0.05$  vs NA组; <sup>a</sup> $P<0.05$  vs A组; <sup>c</sup> $P<0.05$  vs PA1组; <sup>ce</sup> $P<0.05$  vs PA4组; <sup>cef</sup> $P<0.05$  vs PA5组.

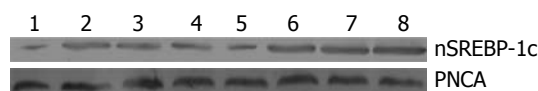


图 3 Western blot检测nSREBP-1c和PCNA的蛋白表达. 1: NA组; 2: A组; 3: PA1组; 4: PA2组; 5: PA3组; 6: PA4组; 7: PA5组; 8: PA6组.

组高( $P<0.05$ ), 且随着软脂酸浓度的增加而增高( $P<0.05$ , 图3, 4).

### 3 讨论

ALD是指长期大量摄入酒精而导致肝脏损害的一系列病变<sup>[12]</sup>, 其包括酒精性脂肪肝(alcohol fatty liver, AFL)、酒精性肝炎(alcoholic hepatitis, AH)、酒精性肝纤维化(alcoholic hepatic fibrosis, AHF)、酒精性肝硬化(alcoholic cirrhosis, AC). 随着社会经济的发展, 饮酒人数和人均饮酒量呈现逐年上升的趋势, 酒精滥用和酒精依赖已成为当今世界日益严重的公共卫生问题<sup>[13]</sup>. 国内外流行病学研究均显示ALD的患病率呈不断上升趋势<sup>[14,15]</sup>, 由此预测, 未来10年或20年以后, ALD将成为我国肝病防治的主要对象. 随着

### ■同行评价

本文提示从饮食调节和外源干预的角度可能寻找控制肝脂肪变性的简便方法, 有一定的参考和实用价值.

ALD发病机制的研究进展<sup>[16-19]</sup>, 对于寻求和研发防治ALD的药物提供了基础, 目前用于防治ALD的措施有戒酒、中药<sup>[20]</sup>、应用降脂药物<sup>[21]</sup>、抗纤维化<sup>[22]</sup>、补充B类维生素及氨基酸、平衡营养等<sup>[23,24]</sup>. 近些年来许多动物实验证实了饱和脂肪酸可以用来防治ALD<sup>[3-6]</sup>, 这就为通过饮食调节来防治ALD提供了希望, 且证实其防治作用广泛, 与调节脂质代谢、减少氧化应激、减轻炎症和纤维化有关, 但亦有实验证实饱和脂肪酸本身即可以导致脂肪肝<sup>[25]</sup>, 且其导致脂肪肝的机制部分与上调SREBP-1c有关<sup>[26]</sup>, 而且张红锋等<sup>[10]</sup>用乙醇与软脂酸共同培养肝细胞时, 也成功地建立了脂肪变性肝细胞模型, 因此饱和脂肪酸对ALD的确切作用还不清楚, 推测可能与饱和脂肪酸的量有关, 为了更好地研究饱和脂肪酸对ALD的作用, 且弥补动物实验的不足, 本实验在体外条件下观察了不同浓度的软脂酸对酒精诱导的脂肪变性肝细胞的作用及可能机制.

实验结果显示软脂酸浓度 $\leq 10 \mu\text{mol/L}$ 时, 对酒精诱导的脂肪变性肝细胞起防治作用, 即使在酒精存在的情况下依旧对其起保护作用,

其中包括可以促进酒精诱导的脂肪变性肝细胞的增殖及减轻酒精引起的脂肪变性,但当软脂酸浓度 $\geq 20 \mu\text{mol/L}$ 时,软脂酸反过来加重了酒精对肝细胞的损害,其中包括抑制细胞的增殖及加重脂肪变性.由此得出软脂酸对于酒精诱导的脂肪变性肝细胞的防治作用存在一个“界限”,即在界限范围之内可以防治酒精引起的肝细胞脂肪变性,但超过此范围却反过来加重酒精引起的脂肪变性,而且研究发现软脂酸的防治作用存在剂量效应关系,同时加重作用也呈现出随浓度增加而加重的现象.另外我们检测了与肝细胞脂肪合成密切相关的nSREBP-1c的表达量,结果显示nSREBP-1c的表达呈现出与其他指标相同的趋势,即在上述范围内nSREBP-1c表达量降低,且随软脂酸浓度的增加而降低,超过上述范围nSREBP-1c表达量升高,且随软脂酸浓度增加而升高.综合上述实验结果,我们推测软脂酸对酒精诱导的脂肪变性肝细胞的防治作用存在一个“度”的问题,超过了一定的“度”将对酒精诱导的脂肪变性肝细胞产生损害作用,而且推测软脂酸对酒精诱导的脂肪变性肝细胞的影响可能部分与调节核内的nSREBP-1c的表达有关,至于软脂酸是如何调节nSREBP-1c的更为精细的机制需要进一步研究,而且由于本实验的研究时间比较短,软脂酸对酒精诱导的脂肪变性肝细胞的长期作用如何也有待进一步的研究.

饱和脂肪酸对ALD存在防治作用为我们通过调节饮食来防治ALD带来了希望,但是饱和脂肪酸本身可以导致脂肪肝,以及对其他器官的损害作用又限制了他的应用,因此需要进行更完善的实验以便更好的利用饱和脂肪酸,另外本实验只探讨了饱和脂肪酸的其中一种,由于各种种类的饱和脂肪酸拥有各自不同的生理作用<sup>[27-30]</sup>,不同种类的饱和脂肪酸对ALD的作用如何需要我们进一步的实验证实及探讨.

#### 4 参考文献

- Diehl AM. Nonalcoholic fatty liver disease: implications for alcoholic liver disease pathogenesis. *Alcohol Clin Exp Res* 2001; 25: 8S-14S
- Yang S, Lin H, Diehl AM. Fatty liver vulnerability to endotoxin-induced damage despite NF-kappaB induction and inhibited caspase 3 activation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2001; 281: G382-G392
- You M, Cao Q, Liang X, Ajmo JM, Ness GC. Mammalian sirtuin 1 is involved in the protective action of dietary saturated fat against alcoholic fatty liver in mice. *J Nutr* 2008; 138: 497-501
- You M, Considine RV, Leone TC, Kelly DP, Crabb DW. Role of adiponectin in the protective action of dietary saturated fat against alcoholic fatty liver in mice. *Hepatology* 2005; 42: 568-577
- Ronis MJ, Korourian S, Zipperman M, Hakkak R, Badger TM. Dietary saturated fat reduces alcoholic hepatotoxicity in rats by altering fatty acid metabolism and membrane composition. *J Nutr* 2004; 134: 904-912
- Nanji AA, Jokelainen K, Tipoe GL, Rahemtulla A, Dannenberg AJ. Dietary saturated fatty acids reverse inflammatory and fibrotic changes in rat liver despite continued ethanol administration. *J Pharmacol Exp Ther* 2001; 299: 638-644
- Mitchell DA, Vasudevan A, Linder ME, Deschenes RJ. Protein palmitoylation by a family of DHHC protein S-acyltransferases. *J Lipid Res* 2006; 47: 1118-1127
- Chait A, Brunzell JD, Denke MA, Eisenberg D, Ernst ND, Franklin FA, Ginsberg H, Kotchen TA, Kuller L, Mullis RM. Rationale of the diet-heart statement of the American Heart Association. Report of the Nutrition Committee. *Circulation* 1993; 88: 3008-3029
- Sundram K, Hayes KC, Siru OH. Dietary palmitic acid results in lower serum cholesterol than does a lauric-myristic acid combination in normolipemic humans. *Am J Clin Nutr* 1994; 59: 841-846
- 张红锋, 杨慧萍, 王耀发. 乙醇和软脂酸诱导的脂肪肝离体细胞模型. 华东师范大学学报(自然科学版) 2002; (4): 88-95
- Karaskov E, Scott C, Zhang L, Teodoro T, Ravazzola M, Volchuk A. Chronic palmitate but not oleate exposure induces endoplasmic reticulum stress, which may contribute to INS-1 pancreatic beta-cell apoptosis. *Endocrinology* 2006; 147: 3398-3407
- Lieber CS. Alcoholic fatty liver: its pathogenesis and mechanism of progression to inflammation and fibrosis. *Alcohol* 2004; 34: 9-19
- 孙艳, 吴阳, 刘兵, 刘凯, 白靛, 迟宝荣. 酒精性肝病的研究进展. 吉林大学报(医学版) 2006; 32: 733-736
- Diehl AM. Liver disease in alcohol abusers: clinical perspective. *Alcohol* 2002; 27: 7-11
- 姚桢. 酒精性肝病的发病机制: 遗传学机制. 北京: 中国医药科技出版社, 2001: 20-21
- 周俊英, 姚树坤. NADPH氧化酶在酒精性肝病发病机制中的作用. 中华肝病杂志 2005; 13: 633-635
- Venkatraman A, Landar A, Davis AJ, Chamlee L, Sanderson T, Kim H, Page G, Pompilius M, Ballinger S, Darley-Usmar V, Bailey SM. Modification of the mitochondrial proteome in response to the stress of ethanol-dependent hepatotoxicity. *J Biol Chem* 2004; 279: 22092-22101
- McClain CJ, Song Z, Barve SS, Hill DB, Deaciuc I. Recent advances in alcoholic liver disease. IV. Dysregulated cytokine metabolism in alcoholic liver disease. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2004; 287: G497-G502
- Enomoto N, Takei Y, Yamashina S, Ikejima K, Kitamura T, Sato N. Anti-inflammatory strategies in alcoholic steatohepatitis. *J Gastroenterol Hepatol* 2007; 22 Suppl 1: S59-S61
- 戴宁, 曾民德, 李继强, 邱德凯. 清脂健肝方对酒精性肝损伤的防治作用. 世界华人消化杂志 2005; 13: 1457-1459
- Caballería J, Parés A, Brú C, Mercader J, García Plaza A, Caballería L, Clemente G, Rodrigo L, Rodés J. Metadoxine accelerates fatty liver recovery in alco-

- holic patients: results of a randomized double-blind, placebo-control trial. Spanish Group for the Study of Alcoholic Fatty Liver. *J Hepatol* 1998; 28: 54-60
- 22 潘洁, 万德芬, 吴小友, 胡红丁, 冯耀, 万莉萍.  $\beta$ 胡萝卜素对酒精性肝纤维化的防治效果. *世界华人消化杂志* 2011; 19: 800-806
- 23 Stickel F, Hoehn B, Schuppan D, Seitz HK. Review article: Nutritional therapy in alcoholic liver disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2003; 18: 357-373
- 24 王君, 龙朝霞. 酒精性脂肪肝的诊治. *工企医刊* 2004; 17: 92-93
- 25 Storlien LH, Higgins JA, Thomas TC, Brown MA, Wang HQ, Huang XF, Else PL. Diet composition and insulin action in animal models. *Br J Nutr* 2000; 83 Suppl 1: S85-S90
- 26 Su HM, Zhang ZX, Pan L, Guo YR, Liu YK, Zhang Q. [Metabolic characteristics of a fatty liver disease model induced by high-fat feeding in young rats]. *Zhonghua Ganzangbing Zazhi* 2010; 18: 54-58
- 27 Molkentin J. Occurrence and biochemical characteristics of natural bioactive substances in bovine milk lipids. *Br J Nutr* 2000; 84 Suppl 1: S47-S53
- 28 Hornung B, Amtmann E, Sauer G. Lauric acid inhibits the maturation of vesicular stomatitis virus. *J Gen Virol* 1994; 75 (Pt 2): 353-361
- 29 Temme EH, Mensink RP, Hornstra G. Effects of medium chain fatty acids (MCFA), myristic acid, and oleic acid on serum lipoproteins in healthy subjects. *J Lipid Res* 1997; 38: 1746-1754
- 30 Grundy SM. Influence of stearic acid on cholesterol metabolism relative to other long-chain fatty acids. *Am J Clin Nutr* 1994; 60: 986S-990S

编辑 李薇 电编 何基才

ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) CN 14-1260/R 2011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<sup>H</sup>, *H pylori*不能写成HP, T<sub>1/2</sub>不能写成t<sub>1/2</sub>或T<sub>1/2</sub>, Vmax不能Vmax,  $\mu$ 不写为英文u. 需排斜体的外文字, 用斜体表示。如生物学中拉丁学名的属名与种名, 包括亚属、亚种、变种。如幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *H. pylori*), *Ilex pubescens* Hook, et Arn. var. *glaber* Chang(命名者勿划横线); 常数K; 一些统计学符号(如样本数n, 均数mean, 标准差SD, F检验, t检验和概率P, 相关系数r); 化学名中标明取代位的元素、旋光性和构型符号(如N, O, P, S, d, l)如n-(normal, 正), N-(nitrogen, 氮), o-(ortho, 邻), O-(oxygen, 氧, 习惯不译), d-(dextro, 右旋), p-(para, 对), 例如n-butyl acetate(醋酸正丁酯), N-methylacetanilide(N-甲基乙酰苯胺), o-cresol(邻甲酚), 3-O-methyl-adrenaline(3-O-甲基肾上腺素), d-amphetamine(右旋苯丙胺), l-dopa(左旋多巴), p-aminosalicylic acid(对氨基水杨酸)。拉丁字及缩写in vitro, in vivo, in situ, Ibid, et al, po, vs; 用外文字母代表的物理量, 如m(质量), V(体积), F(力), p(压力), W(功), v(速度), Q(热量), E(电场强度), S(面积), t(时间), z(酶活性, kat), t(摄氏温度, °C), D(吸收剂量, Gy), A(放射性活度, Bq),  $\rho$ (密度, 体积质量, g/L), c(浓度, mol/L),  $\varphi$ (体积分数, mL/L), w(质量分数, mg/g), b(质量摩尔浓度, mol/g), l(长度), b(宽度), h(高度), d(厚度), R(半径), D(直径), T<sub>max</sub>, C<sub>max</sub>, Vd, T<sub>1/2</sub> CI等。基因符号通常用小写斜体, 如ras, c-myc; 基因产物用大写正体, 如P16蛋白。



# 选择性环氧合酶-2抑制剂塞来昔布对大鼠肝纤维化的作用

田丰, 王琳, 张亚杰

## ■背景资料

肝纤维化是各种慢性肝病向肝硬化、肝癌发展所共有的病理改变和必经途径, 因而在我国抗肝纤维化治疗尤为重要。近年来发现在肝纤维化及肝硬化组织中COX-2的表达是明显升高的, 而正常肝组织表达甚微。因此, 推测COX-2可能在肝纤维化形成过程中起关键作用, 选择性COX-2抑制剂塞来昔布可能有抗肝纤维化的作用。但COX-2抑制剂塞来昔布抗肝纤维化生成的具体分子机制还不十分清楚。

田丰, 张亚杰, 中国医科大学附属盛京医院消化内科 辽宁省沈阳市 110004

王琳, 大连市第六人民医院消化内科 辽宁省大连市 116031  
田丰, 副教授, 主要从事消化系统疾病的研究。

辽宁省教育高等学校科学技术研究基金资助项目, No. 05L556  
作者贡献分布: 田丰与王琳对此文所作贡献均等; 此课题由田丰设计; 研究过程由王琳与张亚杰完成; 研究所用新试剂及分析工具由王琳提供; 数据分析由王琳与张亚杰完成; 本论文写作由王琳与田丰完成。

通讯作者: 田丰, 副教授, 副主任医师, 110004, 辽宁省沈阳市, 中国医科大学附属盛京医院消化内科。tianfeng@sj-hospital.org

收稿日期: 2011-05-10 修回日期: 2011-06-22

接受日期: 2011-06-28 在线出版日期: 2011-07-08

## Selective COX-2 inhibitor celecoxib inhibits liver fibrogenesis in rats

Feng Tian, Lin Wang, Ya-Jie Zhang

Feng Tian, Ya-Jie Zhang, Department of Gastroenterology, Shengjing Hospital of China Medical University, Shenyang 110004, Liaoning Province, China

Lin Wang, Department of Gastroenterology, Dalian Sixth People's Hospital, Dalian 116031, Liaoning Province, China  
Supported by: the Liaoning Science and Technology Research Foundation for Higher Education Institutions, No. 05L556

Correspondence to: Associate Professor Feng Tian, Department of Gastroenterology, Shengjing Hospital of China Medical University, Shenyang 110004, Liaoning Province, China. tianfeng@sj-hospital.org

Received: 2011-05-10 Revised: 2011-06-22

Accepted: 2011-06-28 Published online: 2011-07-08

## Abstract

**AIM:** To investigate whether celecoxib, a selective cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitor, protects from carbon tetrachloride (CCl<sub>4</sub>)-induced liver fibrosis in rats.

**METHODS:** Fifty male SD rats were randomly divided into six groups. Group A ( $n = 10$ ) was subcutaneously injected with 50% 1 mL/kg CCl<sub>4</sub> olive oil solution, twice per week, to induce hepatic fibrosis and intragastrically given saline. Groups B ( $n = 10$ ), C ( $n = 10$ ) and D ( $n = 10$ ) were also subjected to induction of hepatic fibrosis and intragastrically given celecoxib 15 mg/kg once daily from day 1, week 3, and week 5 after CCl<sub>4</sub> injection. Group E ( $n = 5$ ) was subcutaneously injected with equal volume of olive oil

and intragastrically given the same dose of celecoxib, while group F ( $n = 5$ ) was subcutaneously injected with equal volume of olive oil and intragastrically given saline. The treatment lasted for 8 weeks. At the end of the experiment, blood samples were collected to measure serum ALT, HA and LN levels, while hepatic tissue samples were taken to evaluate the degree of liver fibrosis by HE staining and to detect the expression of type I collagen, alpha SMA, COX-1, and COX-2 by immunohistochemistry.

**RESULTS:** Compared to group F, significant hepatic fibrosis was observed in group A ( $P < 0.01$ ). Compared to group A, liver fibrosis was significantly reduced ( $P < 0.01$ ), serum ALT, HA and LN levels significantly decreased ( $100.4 \text{ U/L} \pm 8.7 \text{ U/L}$  vs  $287.8 \text{ U/L} \pm 9.6 \text{ U/L}$ ,  $189.6 \text{ } \mu\text{g/L} \pm 83.0 \text{ } \mu\text{g/L}$  vs  $382.6 \text{ } \mu\text{g/L} \pm 136.0 \text{ } \mu\text{g/L}$ ,  $71.4 \text{ } \mu\text{g/L} \pm 4.6 \text{ } \mu\text{g/L}$  vs  $108.7 \text{ } \mu\text{g/L} \pm 9.8 \text{ } \mu\text{g/L}$ , all  $P < 0.01$ ), and the areas positive for type I collagen, alpha SMA, and COX-2 were reduced (all  $P < 0.01$ ). The above parameters showed significant differences among groups B, C and D (all  $P < 0.05$ ). No significant differences were observed in the above parameters between groups E and F. COX-1-positive area showed no significant difference among each group.

**CONCLUSION:** COX-2 plays an important role in liver fibrogenesis. Celecoxib can reduce or prevent liver fibrosis in a time-dependent manner probably by inhibiting hepatic stellate cell activation and inflammation.

**Key Words:** Cyclooxygenase-2; Selective COX-2 inhibitor; Hepatic fibrosis; Celecoxib

Tian F, Wang L, Zhang YJ. Selective COX-2 inhibitor celecoxib inhibits liver fibrogenesis in rats. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(19): 2002-2010

## 摘要

**目的:** 探讨选择性COX-2抑制剂塞来昔布对CCl<sub>4</sub>诱导的大鼠肝纤维化的作用。

**方法:** 5-6周龄的♂SD大鼠50只, 随机分为6组。A组(肝纤维化模型组): 10只, 50% CCl<sub>4</sub>橄

## ■同行评议者

吴俊华, 副主任医师, 南京大学医学院功能评价中心



橄榄油溶液1 mL/kg, 每周2次皮下注射, 同时给予生理盐水灌胃; B组(早期治疗组): 10只, 造模同时给予塞来昔布15 mg/kg溶于生理盐水中灌胃, 每天1次; C组(中期治疗组): 10只, 造模同时给予生理盐水灌胃, 第3周起改为塞来昔布灌胃; D组(晚期治疗组): 10只, 造模同时给予生理盐水灌胃, 第5周起改为塞来昔布灌胃; E组: 5只, 给予相同体积的橄榄油皮下注射, 同时给予相同剂量的塞来昔布灌胃; F组: 5只, 给予相同体积的橄榄油皮下注射和生理盐水中灌胃。上述处置共8 wk。实验结束后腹主动脉取血, 取肝组织, 检测血清谷丙转氨酶(ALT)、透明质酸(HA)、层粘连蛋白(LN)水平; 病理组织学HE染色及Masson染色观察肝纤维化严重程度并评分, 免疫组织化学方法检测肝组织I胶原、 $\alpha$ -SMA、COX-1、COX-2的表达。

**结果:** A组与F组相比, 可见显著的肝纤维化改变( $P<0.01$ ); 与A组相比, B组病理染色可见肝纤维化程度明显减轻( $P<0.01$ ), 血清ALT、HA、LN水平明显降低( $100.4 \text{ U/L} \pm 8.7 \text{ U/L}$  vs  $287.8 \text{ U/L} \pm 9.6 \text{ U/L}$ ,  $189.6 \mu\text{g/L} \pm 83.0 \mu\text{g/L}$  vs  $382.6 \mu\text{g/L} \pm 136.0 \mu\text{g/L}$ ,  $71.4 \mu\text{g/L} \pm 4.6 \mu\text{g/L}$  vs  $108.7 \mu\text{g/L} \pm 9.8 \mu\text{g/L}$ , 均 $P<0.01$ ), 免疫组织化学示I型原、 $\alpha$ -SMA、COX-2阳性表达面积减少( $P<0.01$ ); B组、C组、D组间两两比较, 各项指标差异有统计学意义( $P<0.05$ ); E组与F组比较无显著性差异; COX-1阳性表达各组间无显著性差异。

**结论:** COX-2在肝纤维化的形成过程中发挥重要作用; 选择性COX-2抑制剂塞来昔布具有抗肝纤维化的作用, 并呈时间依赖性, 越早给药效果越好, 其机制可能是抑制肝星状细胞的活化和炎症反应。

**关键词:** 环氧合酶-2; 选择性环氧合酶-2抑制剂; 肝纤维化; 塞来昔布

田丰, 王琳, 张亚杰. 选择性环氧合酶-2抑制剂塞来昔布对大鼠肝纤维化的作用. 世界华人消化杂志 2011; 19(19): 2002-2010

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/2002.asp>

## 0 引言

肝纤维化是各种慢性肝病向肝硬化、肝癌发展所共有的病理改变和必经途径, 因而在我国抗肝纤维化治疗尤为重要。肝纤维化形成实质是细胞外基质(extracellular matrix, ECM)的生成超过肝脏的降解能力导致过多的ECM在肝脏的沉

积<sup>[1]</sup>。目前认为活化的肝星状细胞(hepatic stellate cell, HSC)是肝纤维化ECM的主要来源。抑制HSC活化是治疗肝纤维化的关键之一<sup>[1,2]</sup>。近年来发现在肝纤维化及肝硬化组织中环氧合酶-2(cyclooxygenase-2, COX-2)的表达是明显升高的, 而正常肝组织表达甚微<sup>[3-5]</sup>。因此, 推测COX-2可能在肝纤维化形成过程中起关键作用, 选择性COX-2抑制剂可能有抗肝纤维化的作用。为了进一步探讨COX-2在肝纤维化形成过程中的作用及其对HSC活化的影响与机制, 我们采取CCl<sub>4</sub>诱导大鼠肝纤维化形成, 同时给予选择性的COX-2抑制剂塞来昔布(celecoxib)进行干预研究。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** CCl<sub>4</sub>由沈阳化学试剂厂生产; 选择性COX-2抑制剂塞来昔布美国辉瑞公司生产; 透明质酸(hyaluronic acid, HA)、层粘连蛋白(laminin, LN)放免试剂盒由上海海军医学研究所提供; I、III型胶原、 $\alpha$ -SMA免疫组织化学试剂盒购自武汉博士德公司; COX-1、COX-2多克隆抗体购自美国Santa Cruz公司。

### 1.2 方法

**1.2.1 造模及分组:** 5-6周龄的♂SD大鼠(中国医科大学实验动物中心提供)50只, 质量180-240 g, 按昼夜时程, 在室温及稳定湿度条件下, 用平衡饲料喂养1 wk后, 随机分为6组, 给予以下处理。A组: 10只, 50% CCl<sub>4</sub>橄榄油溶液1 mL/kg, 每周2次皮下注射, 同时给予生理盐水灌胃, 每天1次; B组: 10只, 50% CCl<sub>4</sub>橄榄油皮下注射同时给予塞来昔布15 mg/kg<sup>[6]</sup>溶于生理盐水中灌胃, 每天1次; C组: 10只, 50% CCl<sub>4</sub>橄榄油溶液皮下注射同时给予生理盐水灌胃, 第3周改为塞来昔布灌胃; D组: 10只, 50% CCl<sub>4</sub>橄榄油溶液皮下注射同时给予生理盐水灌胃, 第5周改为塞来昔布灌胃; E组: 5只, 给予相同体积的橄榄油皮下注射同时给予塞来昔布灌胃; F组: 5只, 给予相同体积的橄榄油皮下注射和生理盐水中灌胃, 共8 wk。大鼠正常进食和饮水, 每周称量体质量以调整给药剂量。实验结束后, 禁食24 h, 用10%水合氯醛(5 mL/kg)腹腔注射麻醉, 腹主动脉取血, 分离血清, -20 °C保存; 用锋利的手术刀于肝脏中叶取1块肝组织, 置于40 g/L甲醛中。

**1.2.2 肝脏组织病理学检测:** 取肝中叶组织一块, 用40 g/L甲醛溶液固定, 石蜡包埋, 3  $\mu\text{m}$ 厚切片, 常规HE及Masson染色, 肝纤维化分期按Scheuer's分期系统<sup>[4]</sup>, 肝组织炎症与纤维化程度

## ■研发前沿

COX-2抑制剂塞来昔布抗肝纤维化生成的具体分子机制是国内外研究的热点, 存在广泛争议, 以动物实验和体外实验居多, 其具体分子机制已经成为研究热点。

### ■相关报道

Cheng等的体外细胞培养研究表明,选择性COX-2抑制剂NS-398能抑制HSC的活化,进而减少活化产物胶原的产生.

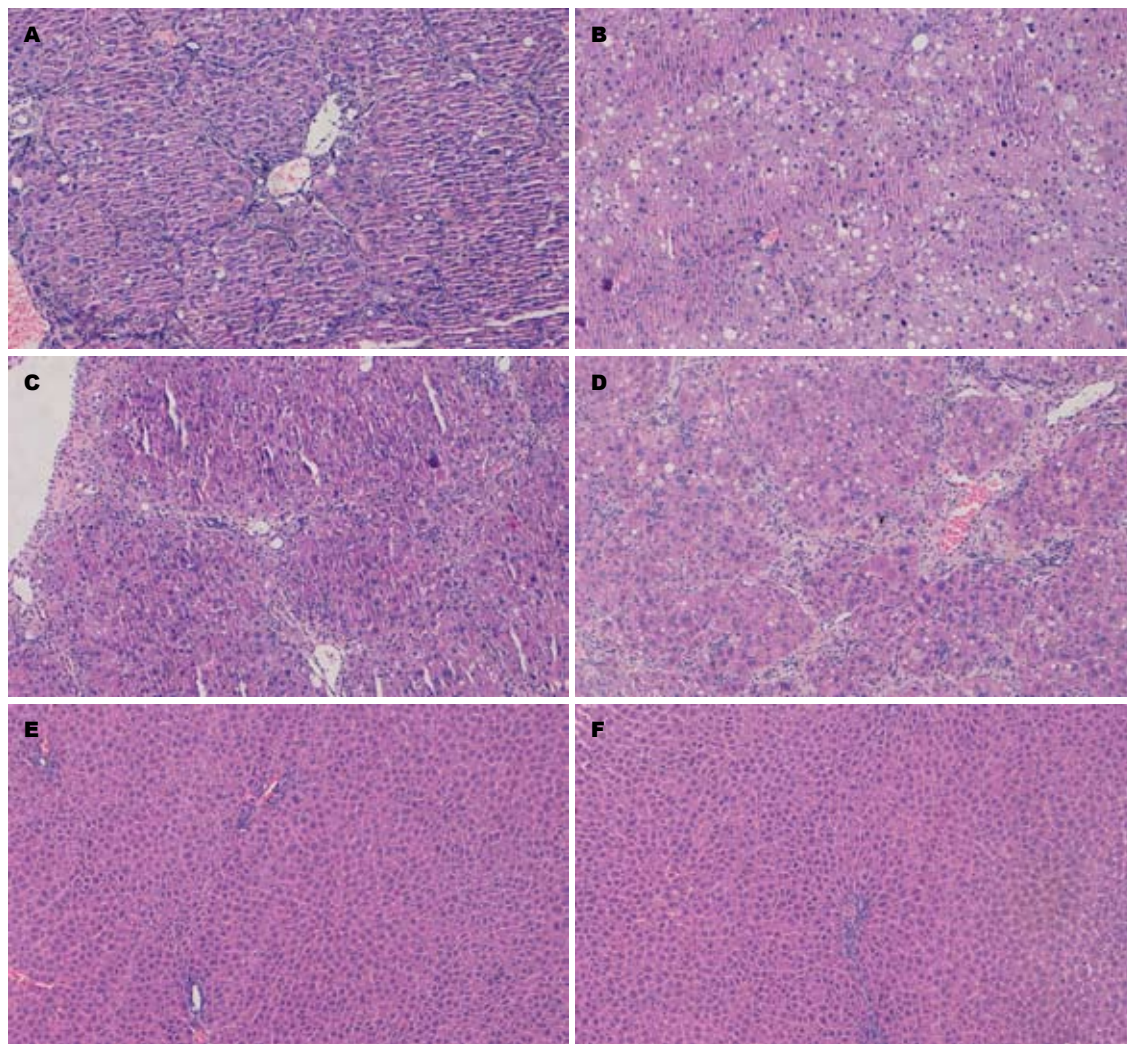


图1 大鼠肝脏HE染色(×100). A: A组; B: B组; C: C组; D: D组; E: E组; F: F组.

由有经验的病理医生进行评分.

1.2.3 血清学检测: 谷丙转氨酶(ALT)检测用自动生物化学分析仪进行; HA、LN检测采用放射免疫分析法进行.

1.2.4  $\alpha$ -SMA、I型胶原、COX-1、COX-2免疫组织化学及半定量分析: 采用肝组织常规脱石蜡水化; 自来水冲洗; 3%过氧化氢溶液浸泡20 min, 去除内源性过氧化物酶; PBS液(pH7.4)冲洗3次, 每次3-5 min; 40%火力微波修复抗原10 min, 自然冷却至40 °C; PBS液冲洗; 加一抗(抗大鼠I型胶原、 $\alpha$ -SMA、COX-1、COX-2抗体, 1:160稀释), 置37 °C温箱2 h; PBS液冲洗; 加羊抗大鼠IgG-HRP, 37 °C孵育20 min; PBS液冲洗; 加配制的DAB溶液, 显色后封片. 另外以结肠癌作阳性对照, 阳性表达在细胞的胞质中, 一抗用PBS液代替以作阴性对照. 阳性细胞表达半定量分析: 用病理图像分析仪进行分析, 每张切片选取四周及中央5个区域, 取该区域中阳性反应最

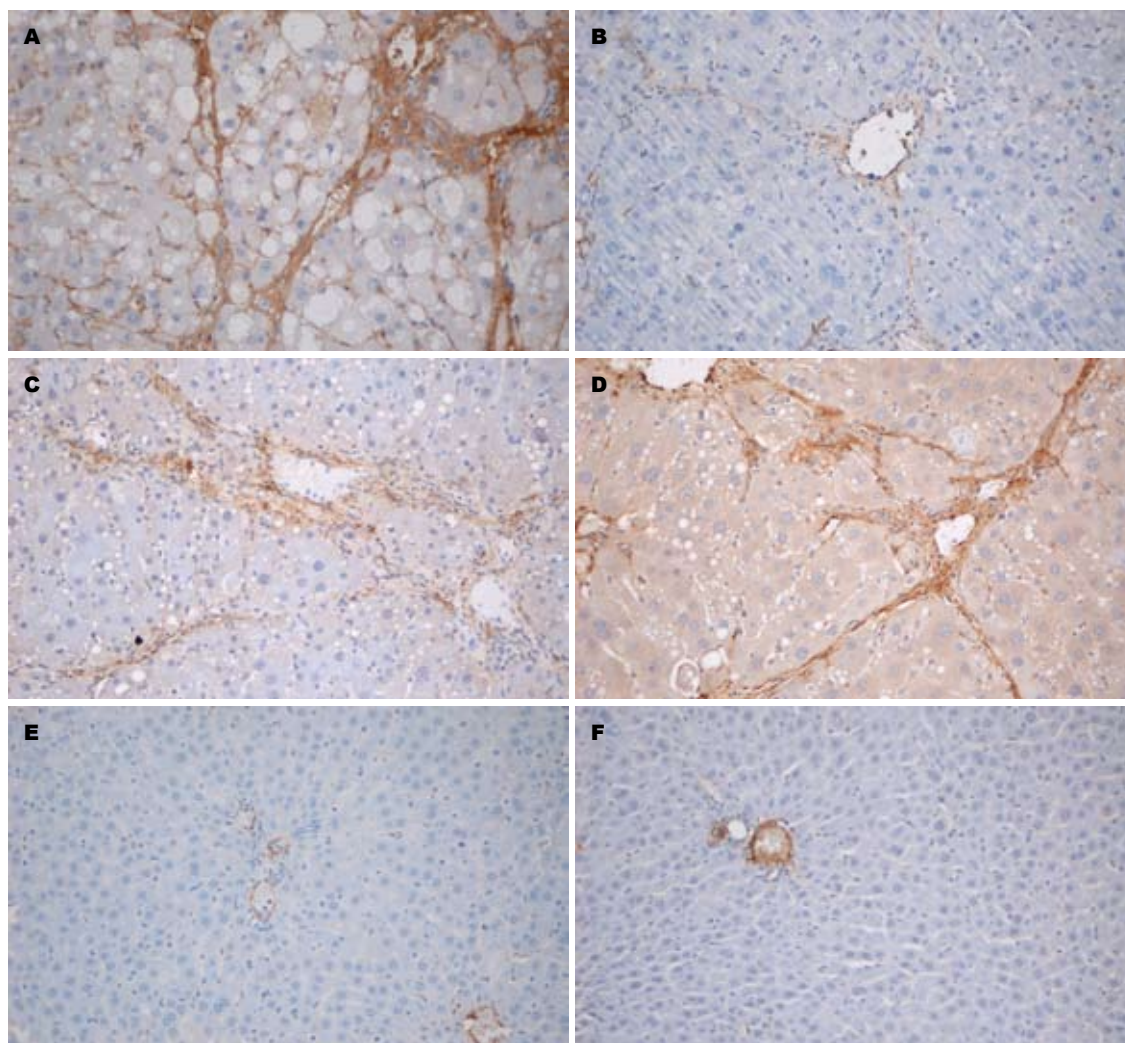
多的视野, 10倍物镜下测定阳性反应面积比(阳性面积/肝组织面积×100%), 取平均值.

**统计学处理** 数据用mean±SD表示, 用SPSS 11.0统计分析软件进行分析, 各组间均数比较用方差分析,  $P<0.05$ 有统计学意义.

## 2 结果

2.1 肝脏组织病理学检测 大鼠肝组织HE染色及Masson染色, A组与F组相比, A组可见明显的肝硬化组织学改变, 汇管区结缔组织增多, 形成粗大的纤维间隔并且与邻近的汇管区和中央静脉区相连, 正常肝小叶结构完全破坏, 有再生结节和假小叶形成, 形成典型的肝硬化病理改变(图1A); 与A组相比, B组肝纤维化程度明显减轻, COX-2抑制剂B组大鼠肝组织可见少量肝纤维化形成, 呈明显脂肪变性、碎片样坏死伴有少量炎症细胞浸润(图1B), 与A组比较有显著差异( $P<0.01$ ). C组和D组可见汇管区扩大, 纤维增多,





## ■创新盘点

本实验从血清学, 病理组织学和免疫组织化学方面全面检测了肝纤维化相关指标和 I 胶原、 $\alpha$ -SMA、COX-1、COX-2 表达, 并且组间进行多重比较, 为 COX-2 抑制剂塞来昔布具有抗肝纤维化作用提供重要理论依据。

图 2 大鼠肝脏 $\alpha$ -SMA免疫组织化学( $\times 200$ )。A: A组; B: B组; C: C组; D: D组; E: E组; F: F组。

小的纤维间隔形成, 大部分标本汇管-汇管、汇管-中央静脉区纤维间隔的延伸以至连接, 正常肝小叶结构部分毁损(图1C, D)。E组和F组可见正常的肝组织结构, 肝小叶结构清楚, 肝细胞索排列整齐、规则, 无纤维化(评分为0), 两组间比较没有明显差异( $P>0.05$ , 图1E, F); 总之, 与A组相比, B组能减轻肝纤维化程度, 越早给药纤维化程度越低(表1)。

**2.2 血清学检测** A组、B组、C组、D组的ALT、HA、LN水平较E组、F组升高, B组的ALT、HA、LN指标明显低于A组, 差异有显著性( $P<0.01$ ); B组、C组、D组之间的ALT、HA、LN指标进行两两比较, 各组间差异有显著性( $P<0.05$ ), 提示越早给药纤维化程度越低, 其作用呈时间依赖性, E组与F组比较未见显著差异, 提示塞来昔布对肝脏无明显损害(表1)。

**2.3  $\alpha$ -SMA、I 型胶原、COX-1、COX-2免疫组织化学及半定量分析** E组、F组可见血管壁

少量 $\alpha$ -SMA阳性表达, E组与F组之间无显著差异( $P>0.05$ ), A组 $\alpha$ -SMA阳性表达细胞明显增多, 胞质呈棕黄色, 有的细胞有2-3个较长突起, 主要分布于门静脉, 汇管区, 纤维间隔和邻近肝窦, 与E组、F组比较有显著差异( $P<0.01$ ); B组汇管区, 纤维间隔和邻近肝窦阳性表达面积显著减少, 胞质阳性染色显著减轻, 与A组比较, 差异有显著统计学意义( $P<0.01$ )。C组、D组与A组比较, 胞质阳性染色略有减轻, 差异有统计学意义( $P<0.05$ , 图2); B组、C组、D组各组间差异有统计学意义( $P<0.05$ , 表2)。I 型胶原阳性表达面积变化与 $\alpha$ -SMA结果是一致的, 且随着给药时间的延长, 肝纤维化的抑制作用越明显, 呈时间依赖性(表2, 图3)。在E组及F组大鼠肝组织中COX-2无表达, 在肝纤维化模型组中大量表达, B组COX-2阳性表达面积明显少于A组( $P<0.01$ ), B组、C组、D组COX-2阳性表达各组间比较有明显差异

## ■应用要点

本实验为肝纤维化的临床治疗提供了心得思路和可靠的理论依据, 如何下调肝组织COX-2的基因表达或抑制COX-2的活性可能是重要的抗肝纤维化策略之一. 如果应用于临床, 必将给我国这样一个肝炎、肝硬化、肝癌大国带来广泛的社会效益和经济效益.

表 1 不同组别间肝纤维化评分、血清ALT、HA、LN测定结果比较 (mean ± SD)

分组	n	Scheuer's评分	ALT(U/L)	HA(μg/L)	LN(μg/L)
A组	10	3.90 ± 0.20 <sup>d</sup>	287.8 ± 9.6 <sup>d</sup>	382.6 ± 136.0 <sup>d</sup>	108.7 ± 9.8 <sup>d</sup>
B组	10	1.28 ± 0.20 <sup>df</sup>	100.4 ± 8.7 <sup>df</sup>	189.6 ± 83.0 <sup>df</sup>	71.4 ± 4.6 <sup>df</sup>
C组	10	2.45 ± 0.30 <sup>ad</sup>	150.7 ± 6.9 <sup>ad</sup>	234.6 ± 75.0 <sup>ad</sup>	80.3 ± 7.2 <sup>ad</sup>
D组	10	3.21 ± 0.20 <sup>ad</sup>	200.8 ± 7.5 <sup>ad</sup>	308.8 ± 102.0 <sup>ad</sup>	90.7 ± 5.6 <sup>ad</sup>
E组	5	0.00 ± 0.00	28.3 ± 5.9	115.7 ± 28.0	50.4 ± 5.6
F组	5	0.00 ± 0.00	27.9 ± 5.9	114.9 ± 25.0	51.2 ± 6.7

<sup>a</sup>P<0.05 vs B组; <sup>d</sup>P<0.01 vs E、F组; <sup>f</sup>P<0.01 vs A组.

表 2 不同组别α-SMA、I、III胶原、COX-1、COX-2阳性面积百分比测定结果 (mean ± SD, %)

分组	n	α-SMA	I型胶原	COX-1	COX-2
A组	10	8.4 ± 1.2 <sup>d</sup>	12.6 ± 0.6 <sup>d</sup>	8.4 ± 0.8	75.8 ± 3.4 <sup>d</sup>
B组	10	2.5 ± 0.6 <sup>df</sup>	3.7 ± 0.4 <sup>df</sup>	8.7 ± 0.9	15.7 ± 2.8 <sup>df</sup>
C组	10	4.6 ± 0.8 <sup>ad</sup>	7.5 ± 0.6 <sup>ad</sup>	8.8 ± 0.7	34.9 ± 4.6 <sup>ad</sup>
D组	10	6.3 ± 1.0 <sup>ad</sup>	9.3 ± 0.8 <sup>ad</sup>	8.2 ± 1.0	57.8 ± 5.7 <sup>ad</sup>
E组	5	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	8.9 ± 0.4	0.0 ± 0.0
F组	5	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	8.5 ± 0.3	0.0 ± 0.0

<sup>a</sup>P<0.05 vs B组; <sup>d</sup>P<0.01 vs E、F组; <sup>f</sup>P<0.01 vs A组.

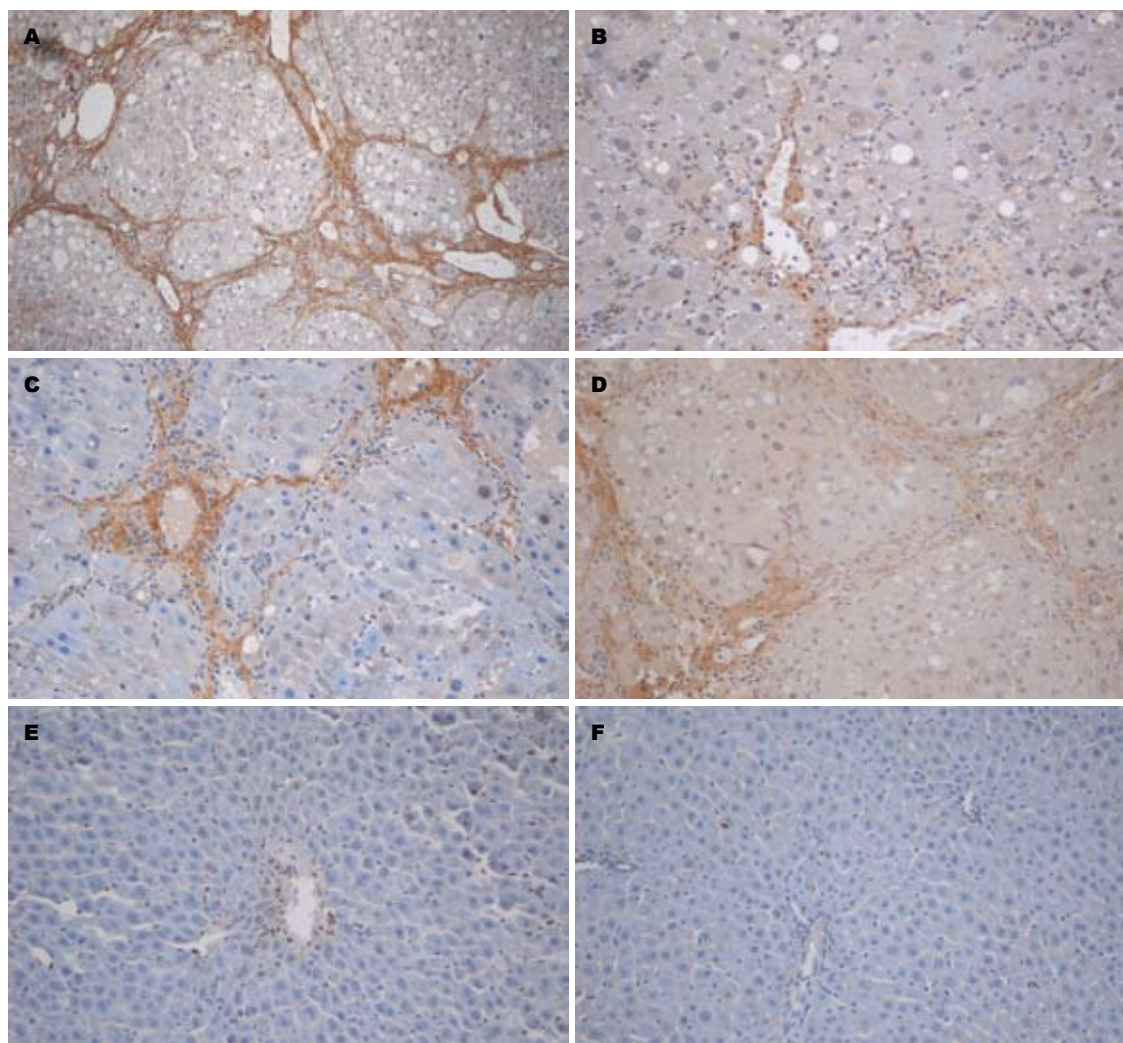
(P<0.05, 表2, 图4); 各组均有少量COX-1阳性表达, 但各组间COX-1阳性表达无显著性差异(P>0.05, 图5).

### 3 讨论

COX是前列腺素类(prostaglandins, PGs)物质在体内合成的限速酶. COX在体内有两种同工酶: 即COX-1和COX-2, 两者的氨基酸序列有61%的同源性, 一级结构的差异引起二、三级结构的不同, 从而影响两种酶的活性和功能. 其中COX-1为结构酶, 在生理状态下表达于绝大多数组织和器官, 主要参与正常生理过程, 如保护胃黏膜、扩张肾血管等; COX-2是可诱导的酶, 在正常组织或器官中不表达或极少量表达, 但在病理状态下很多因素如细胞因子、内毒素及致癌物可诱导其高表达<sup>[7,8]</sup>, 催化花生四烯酸合成PGs, 如血栓素2(thromboxane 2, TXA2)、PGD2、PGE2、PGF2、PGI2等参与炎症反应, 近年来发现在各种慢性炎症疾病中COX-2的表达明显升高<sup>[9]</sup>. 国外研究证实<sup>[10-12]</sup>: COX-1在正常肝组织和肝纤维化组织中均有少量表达; COX-2在正常肝组织中无表达, 在肝纤维化组织中却显著高表达, 合成大量PGE2, 进一步激活HSC, 产生大量ECM促进肝硬化的形成; COX-2在肝

组织中高表达与炎症和纤维化水平呈显著的正相关; 高表达的COX-2引起TXA2合成增加, 导致肝脏局部微循环对缩血管物质反应性增高, 是肝硬化门脉高压形成的重要因素, 可见COX-2通过多种途径导致肝硬化极其并发症的产生. 此外<sup>[13]</sup>, 在肝硬化的基础上, COX-2通过提高炎症坏死反应、促进细胞增殖和血管生成、抑制凋亡而促进肝癌的发生. 总之, 在肝纤维化、肝硬化、肝癌的发生、发展过程中起作用的是COX-2, 而非COX-1. 本研究结果提示, COX-2在肝纤维化的形成过程中表达增加, 选择性抑制剂塞来昔布具有减轻或阻止肝纤维生成的作用, 且随着给药时间的延长, 肝纤维化的抑制作用越明显. 因此, COX-2介导的信号途径可能具有重要的促肝纤维化形成的作用. 即往研究证实<sup>[14,15]</sup>: 非选择性COX抑制剂可以抑制HSC的激活, 从而阻止肝纤维化的发生, 但同时导致胃溃疡、出血、肾功能损害等严重不良反应, 这主要是由于COX-1被抑制所致; Yamamoto等<sup>[10]</sup>证实, 单独使用选择性COX-2抑制剂即可达到显著的抗肝纤维化和降低门脉压力作用, 且无上述不良反应产生. 可见, 选择性COX-2抑制剂是一种有前途的抗肝纤维化、抑制肝硬化和肝癌发生的药物.





■同行评价  
本文选题恰当, 内容详实, 有一定的临床参考意义.

图3 大鼠肝脏I型胶原免疫组织化学( $\times 200$ ). A: A组; B: B组; C: C组; D: D组; E: E组; F: F组.

目前已经明确HSC是肝脏纤维生成过程中ECM的主要来源, HSC要产生ECM必须经历活化的过程, HSC的活化是肝纤维化形成过程中的中心事件<sup>[1]</sup>. 如何通过有效的药物抑制HSC活化, 一直是抗肝纤维化治疗的关键环节<sup>[1,2]</sup>. 本实验在利用CCl<sub>4</sub>诱导的肝硬化大鼠模型时, 给予高度选择性的COX-2抑制剂塞来昔布(每日15 mg/kg)可在体内抑制 $\alpha$ -SMA的表达, 后者是HSC活化的标志物, 说明COX-2具有促进HSC活化的作用. 另外, 选择性COX-2抑制剂具有抗血管生成作用<sup>[16]</sup>, 从理论上推测选择性COX-2抑制剂有减轻肝窦毛细血管化的作用. Cheng等<sup>[17]</sup>在体外细胞培养研究表明, 选择性COX-2抑制剂NS-398能抑制HSC的活化, 进而减少活化产物胶原的产生, 涂传涛等<sup>[18]</sup>研究选择性COX-2抑制剂能改善肝硬化门脉高压. 日本学者利用其他肝硬化动物模型的体内研究, 也同样证实COX-2具有活性HSC的作用<sup>[10]</sup>. 但是也有研究认为COX-2抑制

剂对肝纤维化可能有促进作用<sup>[6,19]</sup>, 对于COX-2抑制剂对肝纤维化的作用影响当前尚存在争议, 然而我们及其他学者研究证实: COX-2抑制剂具有抗肝纤维化作用<sup>[20-26]</sup>. 但COX-2抑制剂抗肝纤维化生成的具体分子机制还不十分清楚.

转化生长因子 $\beta 1$ (transforming growth factor  $\beta 1$ , TGF- $\beta 1$ )是目前研究最深入的与肝脏疾病密切相关的细胞因子. 现已证明, TGF- $\beta 1$ 在肝纤维化的发生中占有重要地位. 其促肝纤维化的机制包括: 诱导肝细胞凋亡, 抑制肝细胞再生, 并影响其功能; 活化HSC, 增加ECM合成和抑制ECM降解; 调节ECM受体的表达, 增加了细胞与基质的黏附, 有利于ECM在肝内沉积, 促进了肝纤维化乃至肝硬化形成. 国外研究结果证实<sup>[27]</sup>, TGF- $\beta 1$ 随炎症和纤维化进展而呈逐渐升高趋势, 其升高与肝病的严重程度一致. 目前, 国内外已将TGF- $\beta 1$ 作为一种客观、无创的肝纤维化指标用于临床. 近来研究表明<sup>[28]</sup>, TGF- $\beta 1$ 在促进



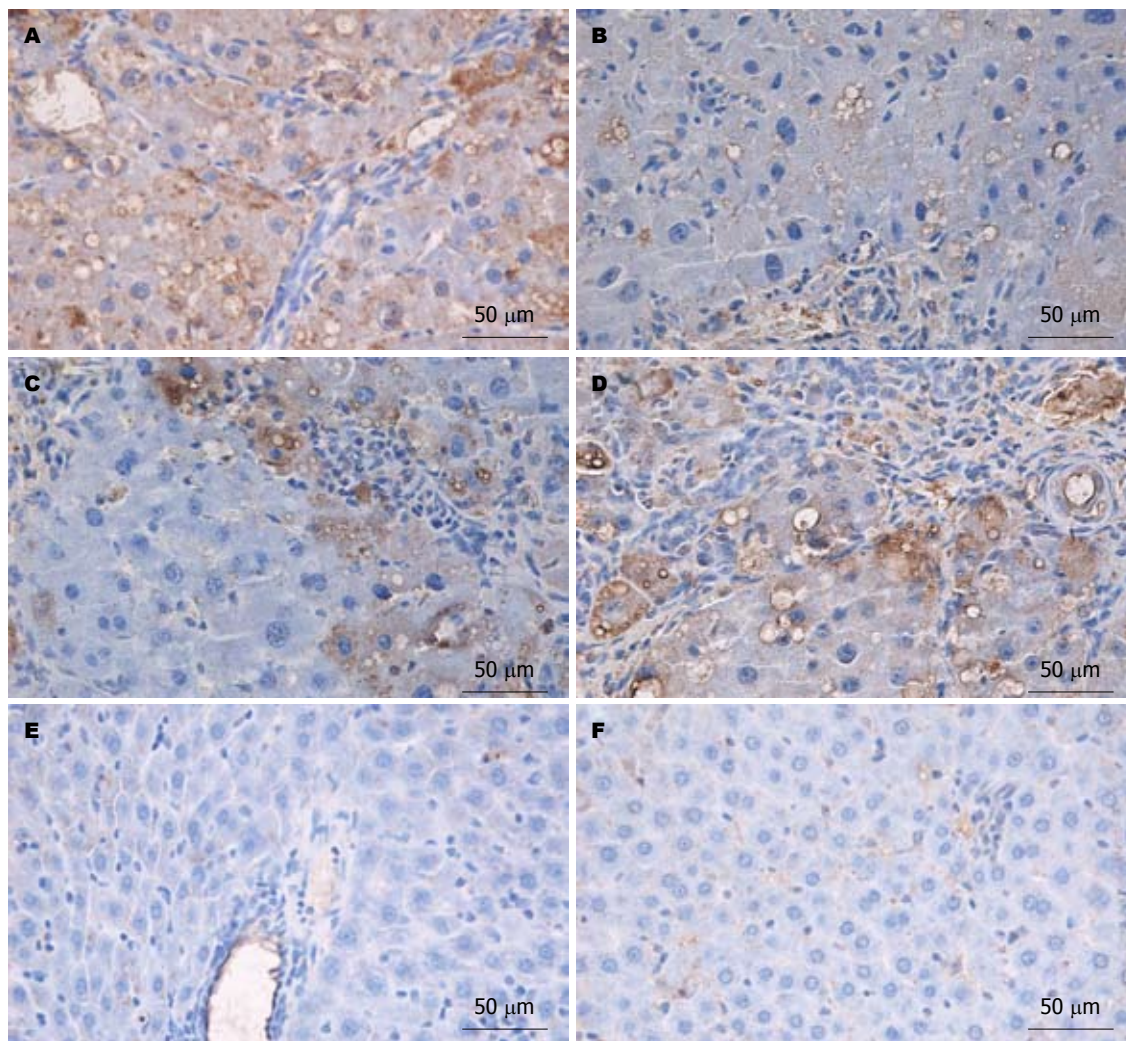


图 4 大鼠肝脏COX-2免疫组织化学( $\times 200$ ). A: A组; B: B组; C: C组; D: D组; E: E组; F: F组.

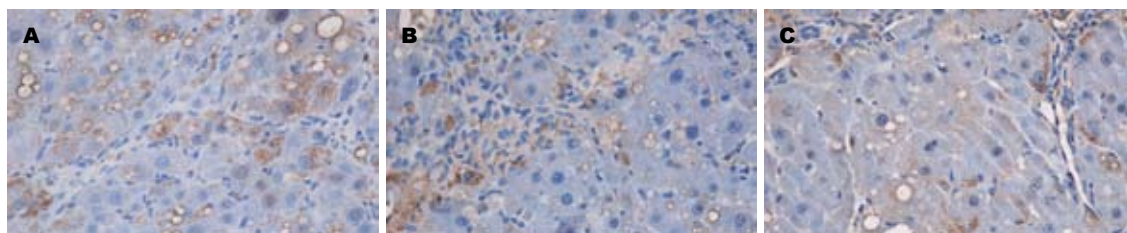


图 5 大鼠肝脏COX-1免疫组织化学( $\times 200$ ). A: A组; B: B组; C: F组.

COX-2表达中发挥着重要的作用, 他通过促进IL-1和TNF- $\alpha$ 的转录而间接促进COX-2表达的, 由此可见, COX-2是TGF- $\beta$ 1下游的肝纤维化调控因子. 针对TGF- $\beta$ 1在肝纤维化发生中的重要作用, 有人提出通过拮抗其活性来进行抗纤维化治疗, 但是, TGF- $\beta$ 1作用的靶细胞种类多、效果复杂, 因此完全阻断其表达或活性的后果是难以预料的. 例如, 去除TGF- $\beta$ 1基因的小鼠因失去对炎症过程的抑制而在出生后很快死于全身性炎症<sup>[29]</sup>. 而通过抑制TGF- $\beta$ 1下游的肝纤维化

调控因子COX-2活性, 可能是更特异、更有效、更安全的抗肝纤维化手段.

消化系炎症、溃疡、肿瘤和肝纤维化是中国致残、致死的常见疾病, COX-2在其中均有较高表达, 且与其发生发展密切相关, 合理阻遏COX-2的合成, 减少以上疾病的发生率, 已成为现阶段研究的热点. 总之, 本研究进一步证实COX-2在肝纤维化形成过程中具有重要作用, 应用COX-2抑制剂塞来昔布能够抑制HSC活化, 降低血清中ALT、HA、LN水平, 减少I型胶

原形成及 $\alpha$ -SMA表达, 延缓或减轻肝纤维化的发生发展, 越早给药效果越好. 如何下调肝组织COX-2的基因表达或抑制COX-2的活性可能是重要的抗肝纤维化策略之一.

**志谢:** 感谢周卓、马颖及马铁同志在本实验中给予的大力帮助.

#### 4 参考文献

- 1 王吉耀, 涂传涛. 肝纤维化研究的若干进展. 国际消化病杂志 2003; 23: 15
- 2 曾民德. 肝纤维化的治疗对策. 中华肝病杂志 2001; 9: 68
- 3 Nakamura T, Akiyoshi H, Saito I, Sato K. Adenovirus-mediated gene expression in the septal cells of cirrhotic rat livers. *J Hepatol* 1999; 30: 101-106
- 4 Scheuer PJ. Classification of chronic viral hepatitis: a need for reassessment. *J Hepatol* 1991; 13: 372-374
- 5 Dooley S, Hamzavi J, Breitkopf K, Wiercinska E, Said HM, Lorenzen J, Ten Dijke P, Gressner AM. Smad7 prevents activation of hepatic stellate cells and liver fibrosis in rats. *Gastroenterology* 2003; 125: 178-191
- 6 Hui AY, Leung WK, Chan HL, Chan FK, Go MY, Chan KK, Tang BD, Chu ES, Sung JJ. Effect of celecoxib on experimental liver fibrosis in rat. *Liver Int* 2006; 26: 125-136
- 7 Graupera M, García-Pagán JC, Abalde JG, Peralta C, Bragulat M, Corominola H, Bosch J, Rodés J. Cyclooxygenase-derived products modulate the increased intrahepatic resistance of cirrhotic rat livers. *Hepatology* 2003; 37: 172-181
- 8 Tsugawa K, Hashizume M, Migou S, Kishihara F, Kawanaka H, Tomikawa M, Sugimachi K. A selective cyclo-oxygenase-2 inhibitor, NS-398, may improve portal hypertension without inducing gastric mucosal injury. *J Gastroenterol Hepatol* 1999; 14: 642-651
- 9 Caceres A. [Considerations on neuropsychology]. *Rev Neuropsiquiatr* 1968; 31: 56-62
- 10 Yamamoto H, Kondo M, Nakamori S, Nagano H, Wakasa K, Sugita Y, Chang-De J, Kobayashi S, Damdinsuren B, Dono K, Umeshita K, Sekimoto M, Sakon M, Matsuura N, Monden M. JTE-522, a cyclooxygenase-2 inhibitor, is an effective chemopreventive agent against rat experimental liver fibrosis. *Gastroenterology* 2003; 125: 556-571
- 11 Kondo M, Yamamoto H, Nagano H, Okami J, Ito Y, Shimizu J, Eguchi H, Miyamoto A, Dono K, Umeshita K, Matsuura N, Wakasa K, Nakamori S, Sakon M, Monden M. Increased expression of COX-2 in nontumor liver tissue is associated with shorter disease-free survival in patients with hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res* 1999; 5: 4005-4012
- 12 Cheng J, Imanishi H, Iijima H, Shimomura S, Yamamoto T, Amuro Y, Kubota A, Hada T. Expression of cyclooxygenase 2 and cytosolic phospholipase A(2) in the liver tissue of patients with chronic hepatitis and liver cirrhosis. *Hepatol Res* 2002; 23: 185-195
- 13 Mohammed NA, Abd El-Aleem SA, El-Hafiz HA, McMahon RF. Distribution of constitutive (COX-1) and inducible (COX-2) cyclooxygenase in postviral human liver cirrhosis: a possible role for COX-2 in the pathogenesis of liver cirrhosis. *J Clin Pathol* 2004; 57: 350-354
- 14 Denda A, Endoh T, Kitayama W, Tang Q, Noguchi O, Kobayashi Y, Akai H, Okajima E, Tsujiuchi T, Tsutsumi M, Nakae D, Konishi Y. Inhibition by piroxicam of oxidative DNA damage, liver cirrhosis and development of enzyme-altered nodules caused by a choline-deficient, L-amino acid-defined diet in rats. *Carcinogenesis* 1997; 18: 1921-1930
- 15 Mathew NT, Meyer JS, Ott EO. Increased cerebral blood volume in benign intracranial hypertension. *Neurology* 1975; 25: 646-649
- 16 Masferrer JL, Leahy KM, Koki AT, Zweifel BS, Settle SL, Woerner BM, Edwards DA, Flickinger AG, Moore RJ, Seibert K. Antiangiogenic and antitumor activities of cyclooxygenase-2 inhibitors. *Cancer Res* 2000; 60: 1306-1311
- 17 Cheng J, Imanishi H, Liu W, Iwasaki A, Ueki N, Nakamura H, Hada T. Inhibition of the expression of alpha-smooth muscle actin in human hepatic stellate cell line, LI90, by a selective cyclooxygenase 2 inhibitor, NS-398. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 297: 1128-1134
- 18 涂传涛, 郭津生, 王吉耀. 选择性环氧合酶-2抑制剂对肝硬化大鼠门脉压力的影响. 中华消化杂志 2004; 24: 411-413
- 19 Liu H, Wei W, Li X. Celecoxib exacerbates hepatic fibrosis and induces hepatocellular necrosis in rats treated with porcine serum. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 2009; 88: 63-67
- 20 Paik YH, Kim JK, Lee JI, Kang SH, Kim DY, An SH, Lee SJ, Lee DK, Han KH, Chon CY, Lee SI, Lee KS, Brenner DA. Celecoxib induces hepatic stellate cell apoptosis through inhibition of Akt activation and suppresses hepatic fibrosis in rats. *Gut* 2009; 58: 1517-1527
- 21 涂传涛, 王吉耀, 郭津生. 选择性COX-2抑制剂、PGE1对肝硬化大鼠VEGF和CTGF表达的影响. 胃肠病学和肝病杂志 2009; 18: 69-72
- 22 Horrillo R, Planagumà A, González-Pérez A, Ferré N, Titos E, Miquel R, López-Parra M, Masferrer JL, Arroyo V, Clària J. Comparative protection against liver inflammation and fibrosis by a selective cyclooxygenase-2 inhibitor and a nonredox-type 5-lipoxygenase inhibitor. *J Pharmacol Exp Ther* 2007; 323: 778-786
- 23 周筱艳, 阳学风. 环氧合酶-2抑制剂尼美舒利对大鼠肝纤维化的影响. 中华消化杂志 2004; 24: 441-442
- 24 胡迎宾, 田德安, 王家骥, 刘南植. 环氧合酶-2在大鼠酒精性肝炎中的表达及作用机制. 胃肠病学和肝病杂志 2004; 13: 105-107
- 25 唐保东, 徐雅, 刘思纯, 马博. 选择性COX-2抑制剂塞来昔布对肝星状细胞增殖及活化的影响. 胃肠病学和肝病杂志 2007; 16: 468-470
- 26 易辉, 王新, 苗继延, 杜静平, 潘阳林, 刘娜, 张宇梅, 樊代明. 选择性环氧合酶-2抑制剂对大鼠酒精性肝损伤的保护作用. 中华肝病杂志 2003; 11: 663-666
- 27 Kropf J, Schurek JO, Wollner A, Gressner AM. Immunological measurement of transforming growth factor-beta 1 (TGF-beta1) in blood; assay development and comparison. *Clin Chem* 1997; 43: 1965-1974
- 28 Diaz A, Chepenik KP, Korn JH, Reginato AM,

Jimenez SA. Differential regulation of cyclooxygenases 1 and 2 by interleukin-1 beta, tumor necrosis factor-alpha, and transforming growth factor-beta 1 in human lung fibroblasts. *Exp Cell Res* 1998; 241:

222-229  
29 Letterio JJ, Böttinger EP. TGF-beta knockout and dominant-negative receptor transgenic mice. *Miner Electrolyte Metab* 1998; 24: 161-167

编辑 曹丽鸥 电编 何基才

ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) CN 14-1260/R 2011年版权归世界华人消化杂志

## • 消息 •

### 招聘生物医学编辑部主任

**本刊讯** 百世登出版集团(Baishideng Publishing Group Co., Limited, BPG)已经为各位编辑部主任搭建好整体架构, 希望培养出对编辑与出版行业真正感兴趣甚至愿意将其作为终身事业的专业人才, 成为BPG的核心人物. 欢迎应届毕业生加盟BPG团队, 请将您的简历E-mail发至: j.l.li@wjgnet.com

#### ■ 工作职责

- 1 贯彻执行员工手册、编辑手册、编委手册和作者手册.
- 2 根据作者指南及学科发展动向和读者的需求, 制订期刊的总体发展规划, 负责编辑、出版、发行和经营管理.
- 3 策划年度编委会成员的社论和专题亮点等栏目约稿, 并按照计划负责监督落实.
- 4 负责期刊同行评议和定稿会, 按期编排、加工, 发排稿件, 发排后参与校对或审核校样、核红、签字付印.
- 5 组织期刊印刷版或网络版出版后审读, 发现问题及时修改.

#### ■ 职位要求

硕士及以上学历, 具有生物医学专业学科背景及丰富的写作和发表生物医学文章者优先录用.

#### ■ 薪资待遇面议

#### ■ 培训流程

第一步学习手册; 第二步编务; 第三步排版制作; 第四步编辑; 第五步投稿办公系统操作; 第六步期刊网络系统学习; 第七步期刊管理培训; 第八步BPG管理委员会考核; 第九步考核通过后正式签订劳动合同, 并颁发编辑部主任聘任书.

# 洋葱提取物对结肠癌细胞增殖的抑制作用

周阿成, 金黑鹰, 谈瑄忠, 钱晓磊, 张春霞, 何勇山, 王水明

周阿成, 钱晓磊, 张春霞, 何勇山, 南京中医药大学第一临床医学院 江苏省南京市 210046  
金黑鹰, 王水明, 南京中医药大学第三附属医院 全国肛肠医疗中心全国肛肠医疗中心 江苏省中西医结合结直肠癌诊疗中心 江苏省南京市 210001  
谈瑄忠, 南京中医药大学第三附属医院 全国肛肠医疗中心 全国肛肠医疗中心药剂科 江苏省南京市 210001  
周阿成, 研究生, 主要从事中西医结合肛肠病学研究.  
国家自然科学基金资助项目, No. 30572447; No. 30973837  
江苏省自然科学基金资助项目, No. BK2007009  
作者贡献分布: 本文由周阿成撰写完成; 金黑鹰审核; 谈瑄忠与钱晓磊实验设计; 张春霞、何勇山及王水明收集整理资料.  
通讯作者: 金黑鹰, 副主任医师, 硕士生导师, 210001, 江苏省南京市, 南京中医药大学第三附属医院, 全国肛肠医疗中心全国肛肠医疗中心, 江苏省中西医结合结直肠癌诊疗中心.  
jinheiyang@yahoo.com.cn  
收稿日期: 2011-05-02 修回日期: 2011-06-10  
接受日期: 2011-06-15 在线出版日期: 2011-07-08

## Allium cepa extracts inhibit the proliferation of colorectal cancer *in vitro*

A-Cheng Zhou, Hei-Ying Jin, Xuan-Zhong Tan, Xiao-Lei Qian, Chun-Xia Zhang, Yong-Shan He, Shui-Ming Wang

A-Cheng Zhou, Xiao-Lei Qian, Chun-Xia Zhang, Yong-Shan He, the First Clinical College of Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210046, Jiangsu Province, China

Hei-Ying Jin, Shui-Ming Wang, National Center for Colorectal Surgery, the Third Affiliated Hospital of Nanjing University of Chinese Medicine; Jiangsu Center for Treatment of Colorectal Cancer by Integrated Chinese and Western Medicine, Nanjing 210001, Jiangsu Province, China  
Xuan-Zhong Tan, National Center for Colorectal Surgery, the Third Affiliated Hospital of Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210001, Jiangsu Province, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, Nos. 30572447, 30973837; and the Natural Science Foundation of Jiangsu Province, No. BK2007009

Correspondence to: Hei-Ying Jin, National Center for Colorectal Surgery, the Third Affiliated Hospital of Nanjing University of Chinese Medicine, Jiangsu Center for Treatment of Colorectal Cancer by Integrated Chinese and Western Medicine, Nanjing 210001, Jiangsu Province, China. jinheiyang@yahoo.com.cn

Received: 2011-05-02 Revised: 2011-06-10

Accepted: 2011-06-15 Published online: 2011-07-08

## Abstract

**AIM:** To determine the contents of flavonoids in water and alcohol extracts of *Allium cepa* and to investigate their inhibitory effect on the proliferation of colorectal cancer cells.

**METHODS:** The contents of flavonoids extracted from *Allium cepa* with water and alcohol were determined by ultraviolet-visible spectroscopy. Colorectal cancer cells (Lovo cells, SW480 cells, HT-29 cells and HCT-8 cells) were cultured *in vitro* and incubated with different concentration of flavonoids (0, 2.5, 5, 10, 20, 40, 60, 80 mg/L). Cell proliferation was tested by WST-8 assay.

**RESULTS:** The content of flavonoids was higher than in the water extract of *Allium cepa* than in the alcohol extract. Both the water and alcohol extracts of *Allium cepa* inhibited the proliferation of colorectal cancer cells in a dose- and time-dependent manner. The water extract of *Allium cepa* had a more significant inhibitory effect on cell proliferation than the alcohol extract (10 mg/L:  $37.77 \pm 5.84$  vs  $17.36 \pm 5.24$ ; 20 mg/L:  $52.35 \pm 5.72$  vs  $24.15 \pm 5.54$ ; 40 mg/L:  $68.17 \pm 7.76$  vs  $32.79 \pm 6.02$ ; 60 mg/L:  $71.08 \pm 8.16$  vs  $47.55 \pm 2.45$ ; 80 mg/L:  $76.00 \pm 5.87$  vs  $60.35 \pm 6.61$ , all  $P < 0.05$ ).

**CONCLUSION:** *Allium cepa* extracts can significantly inhibit the proliferation of colorectal cancer cells.

**Key Words:** *Allium cepa* extract; Colorectal cancer cells; WST-8 analysis; Cell proliferation

Zhou AC, Jin HY, Tan XZ, Qian XL, Zhang CX, He YS, Wang SM. *Allium cepa* extracts inhibit the proliferation of colorectal cancer *in vitro*. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(19): 2011-2015

## 摘要

**目的:** 研究洋葱水提取物和乙醇提取物中黄酮类化合物的含量及其各自对结肠癌细胞株增殖的抑制作用.

**方法:** 采用水提取和乙醇提取洋葱后, 用紫外可见分光光度仪检测提取物中黄酮类化合物含量. 体外培养结肠癌细胞株(Lovo cells、SW480 cells、HT-29 cells、HCT-8 cells), 采用不同浓度的黄酮类化合物(0、2.5、5、10、20、40、60、80 mg/L)对其进行干预, WST-8法检测洋葱水提取物和乙醇提取物对结肠癌细胞株增殖的抑制作用.

## ■背景资料

洋葱是一种常见的食物, 其具有抑癌作用的成分主要包括含硫化合物和黄酮类化合物. 近年来, 国外的多项回顾性研究发现, 洋葱的摄入能够减少多种肿瘤的发生率, 包括口腔癌、卵巢癌、前列腺癌、乳腺癌等.

## ■同行评议者

沈克平, 主任医师, 上海龙华医院肿瘤五科



## ■相关报道

回顾性研究发现, 摄入洋葱能够减少多种肿瘤的发生, 尤其是消化系统肿瘤, 陈凤秀等研究发现, 洋葱黄酮类物质能够抑制结肠癌细胞HCT116细胞的增殖, 增加细胞的凋亡。

**结果:** 洋葱水提取物中黄酮类化合物含量较乙醇提取物高. WST-8法检测洋葱水提取物和乙醇提取物对结肠癌细胞株的抑制作用具有剂量和时间依赖性, 且72 h时水提取物较乙醇提取物对结肠癌细胞株(SW480)增殖抑制(%)更显著(10 mg/L:  $37.77 \pm 5.84$  vs  $17.36 \pm 5.24$ ; 20 mg/L:  $52.35 \pm 5.72$  vs  $24.15 \pm 5.54$ ; 40 mg/L:  $68.17 \pm 7.76$  vs  $32.79 \pm 6.02$ ; 60 mg/L:  $71.08 \pm 8.16$  vs  $47.55 \pm 2.45$ ; 80 mg/L:  $76.00 \pm 5.87$  vs  $60.35 \pm 6.61$ , 均 $P < 0.05$ ).

**结论:** 洋葱水提取物和乙醇提取物对体外培养的结肠癌细胞株的增殖有明显抑制作用, 其作用机制有待进一步研究.

**关键词:** 洋葱提取物; 结肠癌细胞; WST-8分析; 细胞增殖

周阿成, 金黑鹰, 谈瑄忠, 钱晓磊, 张春霞, 何勇山, 王水明. 洋葱提取物对结肠癌细胞增殖的抑制作用. 世界华人消化杂志 2011; 19(19): 2011-2015  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/2011.asp>

## 0 引言

洋葱(*allium cepa*)是一种常见的食物, 其具有抑癌作用的成分主要包括含硫化合物和黄酮类化合物<sup>[1]</sup>, 前者具有挥发性, 能够发出刺激性味道, 后者无挥发性, 实验主要提取黄酮类化合物. 回顾性调查研究发现, 摄入洋葱对胃癌、结直肠癌及前列腺癌等具有预防作用<sup>[2]</sup>. Taché等<sup>[3]</sup>发现洋葱的摄入能够减少大鼠结肠中畸形腺隐窝(aberrant crypt foci, ACF)的数目和大小. 本实验分别用纯净水和500 mL/L乙醇对洋葱进行提取, 研究提取物对结肠癌细胞增殖的抑制作用.

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 洋葱选择紫皮洋葱(购于南京夫子庙农贸市场); 芦丁购于中国药品生物制品检定所; 酒精检测条购于常州赛德瑞尔生物科技有限公司; 双光束紫外可见分光光度计购于北京普析通用仪器有限责任公司(型号TV-1900); 结肠癌细胞株(LoVo细胞、SW480细胞、HT-29细胞、HCT-8细胞)购自中科院细胞所; CCK-8购自Dojindo公司(编号Cat # CK04-13); 胎牛血清购于Invitrogen公司(编号Gibco® Cat # 10437028).

### 1.2 方法

**1.2.1 洋葱黄酮类化合物的检测及提取:** (1)测定波长的选择. 精密称取干燥至恒重的芦丁对照品11.80 mg, 置100 mL量瓶中, 用无水乙醇溶

解后, 再用500 mL/L的乙醇溶定容至刻度, 摇匀, 即为对照品溶液(0.118 g/L). 精密吸取对照品溶液5 mL, 置于25 mL量瓶中, 加1% AlCl<sub>3</sub>溶液4 mL, 用500 mL/L乙醇定容至刻度, 摇匀, 放置15 min. 在190-550 nm扫描; (2)标准曲线的绘制. 按照表1精密吸取一定量的对照品溶液, 于相应的容量瓶中, 分别加入16、4、8、8、4 mL的AlCl<sub>3</sub>, 用500 mL/L乙醇定容至相应刻度, 摇匀, 放置15 min; (3)热水煎煮法. 取一定量新鲜紫皮洋葱, 洗净后放入粉碎机中粉碎, 用10倍体积的水溶液煮沸回流1 h, 用100目的滤网过滤, 将滤渣按照上述方式再提取2次, 合并3次滤液, 在水浴锅(温度95 °C)中加热浓缩, 浓缩至1 000 mL左右用滤纸过滤, 所得滤液在190-550 nm扫描; (4)乙醇回流法. 取一定量新鲜紫皮洋葱, 洗净后放入粉碎机中粉碎, 用8倍体积的500 mL/L乙醇煮沸回流1.5 h, 用100目的滤网过滤, 将滤渣按照上述方式提取2次, 合并3次滤液, 在水浴锅(温度95 °C)中加热浓缩, 浓缩至1 000 mL左右用滤纸过滤, 所得滤液继续在水浴锅中加热, 使其中的乙醇完全挥发, 用酒精检测条检测溶液, 确定酒精完全挥发. 此样品溶液在190-550 nm扫描.

**1.2.2 WST-8法检测洋葱提取物对结肠癌细胞株增殖的抑制作用:** 将LoVo细胞、SW480细胞、HT-29细胞、HCT-8细胞分别以 $5 \times 10^3$ 的数目分别接种于96板中, 每种细胞种48个孔, 并将孔周围的孔中加100 μL不含细胞的培养基. 24 h后且细胞状态正常时, 将每种细胞48孔分为16小组, 每组3个孔, 并分别将孔中的培养基添加至200 μL分别含黄酮类化合物终浓度为0(对照组), 2.5、5.0、10.0、20.0、40.0、60.0、80.0 mg/L(实验组)水提取物和乙醇提取物的完全培养基, 其中乙醇提取物加入DMSO(浓度低于0.01%)溶解, 放置于37 °C、50 mL/L CO<sub>2</sub>细胞培养箱, 孵育24、72 h. 细胞孵育到达24、72 h时, 按照100 μL加入10 μL CCK-8溶液的比例, 在孔中加入CCK-8反应液. 在37度培养箱中放置1h后, 利用酶标仪读取450 nm波长处的吸光度(A值). 抑制率 =  $[1 - (\text{加药组A值} - \text{空白对照A值}) / (\text{对照组A值} - \text{空白对照A值})] \times 100\%$ .

**统计学处理** 应用SPSS17.0统计软件处理数据, 计量资料采用mean ± SD表示, 采用单因素方差分析(ANOVA)进行检验, 应用LSD法进行两两比较,  $P < 0.05$ 为差异有统计学意义.

## 2 结果

**2.1 测定波长的选择和标准曲线制定** 芦丁对照



表 1 标准曲线数据

取样量/mL	容量瓶体积/mL	芦丁浓度(g/L)	吸光度(A)
5	100	0.00590	0.208
2	25	0.00944	0.317
5	50	0.01180	0.415
10	50	0.02360	0.832
10	25	0.04720	1.641

品溶液270 nm处有最大吸收(图1), 水提物和醇提物均在270 nm有最大吸收(图2, 3). 不同浓度的芦丁对照品在270 nm波长处测定吸光度(表1). 以吸光度 $A$ 为纵坐标, 芦丁浓度 $C$ (g/L)为横坐标, 绘制标准曲线. 结果表明, 芦丁标准品溶液在浓度在0.0059-0.0472范围内, 浓度和吸光度线性关系良好. 得到回归方程:  $Y = 34.841X + 0.0001$ , 相关系数 $R = 0.9998$ .

2.2 黄酮类化合物含量比较 每克紫皮洋葱的热水煎煮法提取的黄酮类化合物( $1.891 \text{ mg} \pm 0.075 \text{ mg}$ )较500 mL/L乙醇回流法提取的黄酮类化合物( $1.474 \text{ mg} \pm 0.226 \text{ mg}$ )含量高, 两者间有统计学差异( $P = 0.039$ ).

2.3 洋葱提取物在不同时间对结肠癌细胞的增殖抑制 WST-8法检测不同浓度的洋葱水提取物和乙醇提取物对LoVo细胞、SW480细胞、HT-29细胞、HCT-8细胞增殖的抑制作用, 结果显示随着黄酮类化合物浓度的增加, 24 h与72 h时LoVo细胞、SW480细胞、HT-29细胞、HCT-8细胞的增殖抑制率均逐渐升高, 均在含黄酮类化合物浓度为80 mg/L时抑制率达到最高, 且在72 h较24 h抑制率高, 说明洋葱的水提物和乙醇提取物(黄酮类化合物浓度在0-80 mg/L之间)对LoVo细胞、SW480细胞、HT-29细胞、HCT-8细胞增殖的抑制作用具有剂量依赖性和时间依赖性(表2, 3). 洋葱提取物对不同细胞的 $IC_{50}$ 同样可以反映洋葱的水提取物和乙醇提取物在72 h较24 h对细胞增殖抑制较显著(表4).

2.4 洋葱的水提取物与乙醇提取物对结肠癌细胞株的增殖抑制作用 洋葱的水提取物在24 h对LoVo细胞、SW480细胞、HT-29细胞、HCT-8细胞的增殖抑制作用较乙醇提取物显著; 且水提取物在72 h对SW480细胞、HT-29细胞、HCT-8细胞的增殖抑制作用较乙醇提取物显著, 但在72 h含黄酮类化合物在2.5-20.0 mg/L时, 乙醇提取物对LoVo细胞的增殖抑制较水提取物显著(表5, 6).

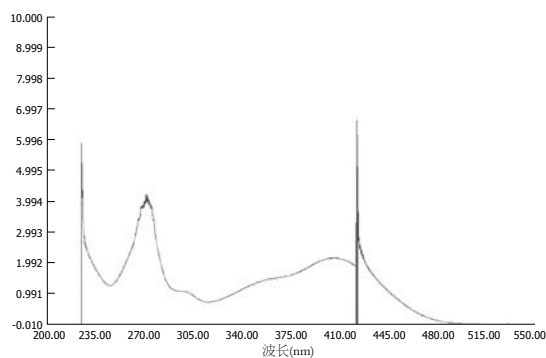


图 1 芦丁加显色剂光谱扫描线.

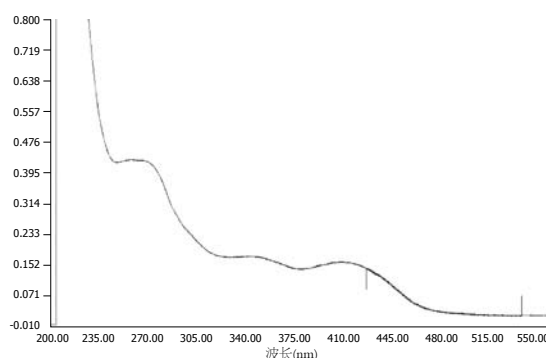


图 2 水提取物加显色剂光谱扫描线.

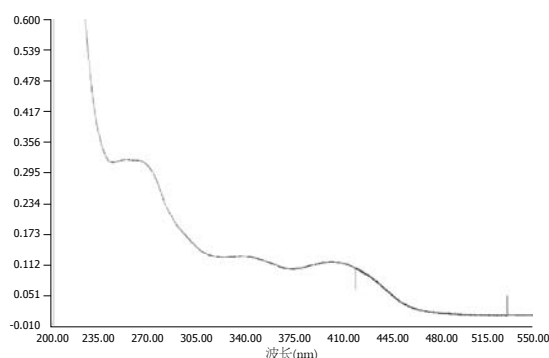


图 3 500 mL/L乙醇提取物加显色剂光谱扫描线.

洋葱的提取物对不同细胞的增殖抑制作用的比较显示, 水提取物在24 h含黄酮类化合物浓度在20-80 mg/L时, 对HCT-8细胞的增殖抑制显著高于其他3组细胞, 具有统计学差异( $P < 0.05$ ); 乙醇提取物在24 h含黄酮类化合物浓度在5-80 mg/L时, 对HCT-8细胞的增殖抑制高于其他3组细胞, 且在10和40 mg/L具有统计学差异( $P < 0.05$ ), 水提取物在72 h含黄酮类化合物浓度在5-80 mg/L时, 对SW480细胞的增殖抑制率高于其他3组细胞, 在10和20 mg/L具有统计学差异( $P < 0.05$ , 表5, 6).

### 3 讨论

近年来, 国外的多项回顾性研究发现, 洋葱的摄

### ■创新盘点

本文通过不同的提取方法研究洋葱提取物对不同结肠癌细胞的增殖抑制作用, 为在体研究提供依据.

## ■应用要点

洋葱水提取物和乙醇提取物对体外培养的结肠癌细胞株的增殖有明显抑制作用,其作用机制有待进一步研究.

表 2 不同浓度的水提黄酮类化合物对结肠癌细胞株增殖的抑制率 (mean ± SD, %)

浓度 (mg/L)	24 h				72 h			
	LoVo	SW480	HT-29	HCT-8	LoVo	SW480	HT-29	HCT-8
2.5	3.15 ± 2.23	4.48 ± 10.95	7.90 ± 10.72	3.79 ± 4.63	2.50 ± 2.25	11.82 ± 10.63	13.69 ± 5.46	1.40 ± 7.15
5.0	6.78 ± 2.80	8.36 ± 11.77 <sup>a</sup>	14.45 ± 5.14	10.13 ± 3.31 <sup>a</sup>	9.49 ± 3.87	33.27 ± 8.42	14.36 ± 3.05	19.59 ± 4.50
10.0	10.84 ± 3.35	13.67 ± 6.60 <sup>a</sup>	19.27 ± 3.76	22.36 ± 1.40	9.85 ± 1.36	37.77 ± 5.84	17.04 ± 2.04	23.25 ± 3.58
20.0	13.34 ± 2.67	17.53 ± 7.78 <sup>a</sup>	21.65 ± 1.31	34.62 ± 2.32	16.12 ± 1.93	52.35 ± 5.72	21.82 ± 5.90	34.54 ± 5.34
40.0	17.83 ± 1.63 <sup>a</sup>	20.84 ± 7.80 <sup>a</sup>	22.23 ± 2.13	37.51 ± 0.58 <sup>a</sup>	34.51 ± 5.26	68.17 ± 7.76	25.02 ± 15.42	54.51 ± 5.15
60.0	24.34 ± 2.54 <sup>a</sup>	32.79 ± 4.69 <sup>a</sup>	24.20 ± 2.41 <sup>a</sup>	49.75 ± 4.89	56.37 ± 2.31	71.08 ± 8.16	49.15 ± 5.64	57.02 ± 6.76
80.0	30.37 ± 2.05 <sup>a</sup>	41.69 ± 0.89 <sup>a</sup>	32.25 ± 3.70 <sup>a</sup>	52.50 ± 3.39 <sup>a</sup>	66.43 ± 2.76	76.00 ± 5.87	56.25 ± 2.09	69.87 ± 3.52

<sup>a</sup>*P* < 0.05 vs 72 h.

表 3 不同浓度的醇提黄酮类化合物对结肠癌细胞株增殖的抑制率 (mean ± SD, %)

浓度 (mg/L)	24 h				72 h			
	LoVo	SW480	HT-29	HCT-8	LoVo	SW480	HT-29	HCT-8
2.5	2.40 ± 0.95	3.90 ± 1.69 <sup>a</sup>	2.67 ± 2.65	2.84 ± 2.31	12.59 ± 7.03	9.41 ± 2.88	4.05 ± 6.91	10.09 ± 5.31
5.0	5.56 ± 1.21 <sup>a</sup>	8.24 ± 2.97	6.78 ± 0.67	10.22 ± 7.49	17.66 ± 2.80	13.28 ± 11.96	6.24 ± 13.51	13.02 ± 6.02
10.0	6.97 ± 0.79 <sup>a</sup>	12.03 ± 4.67	8.44 ± 1.82	21.40 ± 1.27	20.36 ± 3.54	17.36 ± 5.24	8.28 ± 9.01	22.66 ± 8.12
20.0	8.71 ± 1.15 <sup>a</sup>	14.71 ± 3.82	14.90 ± 10.27	27.42 ± 5.99	21.52 ± 4.60	24.15 ± 5.54	10.64 ± 10.88	26.52 ± 7.74
40.0	11.87 ± 0.93 <sup>a</sup>	18.02 ± 4.14 <sup>a</sup>	16.37 ± 5.59	29.68 ± 5.95	25.49 ± 3.47	32.79 ± 6.02	36.57 ± 12.85	38.37 ± 1.70
60.0	17.00 ± 2.06 <sup>a</sup>	21.94 ± 4.81 <sup>a</sup>	24.25 ± 11.29	30.30 ± 4.17 <sup>a</sup>	39.53 ± 2.18	47.55 ± 2.45	42.63 ± 14.22	44.82 ± 5.99
80.0	22.34 ± 2.61 <sup>a</sup>	29.91 ± 3.43 <sup>a</sup>	27.72 ± 13.86	33.59 ± 2.39 <sup>a</sup>	53.90 ± 1.81	60.35 ± 6.61	50.04 ± 8.89	47.37 ± 2.71

<sup>a</sup>*P* < 0.05 vs 72 h.

表 4 洋葱提取物对不同细胞的IC<sub>50</sub> (mg/L)

细胞	24 h		72 h	
	水	乙醇	水	乙醇
LoVo	426.120	1 246.504	55.106	141.085
SW480	193.312	618.633	17.005	71.438
HT-29	94.883	463.346	17.005	84.062
HCT-8	62.612	223.163	35.823	92.338

入能够减少多种肿瘤的发生率,包括口腔癌、卵巢癌、前列腺癌、乳腺癌等<sup>[4-6]</sup>. 2006年Gonzalez等<sup>[7]</sup>进行的一项前瞻性研究发现,增加洋葱的摄入能够降低消化系肿瘤的发生率.尤其在结直肠癌方面,多项回顾性研究发现,洋葱的摄入能减少结直肠癌的发生率<sup>[2,8]</sup>. 洋葱发挥抗癌作用主要为黄酮类化合物<sup>[9]</sup>,尤其是其中的槲皮素,能够通过多种途径抑制结直肠癌细胞的增殖<sup>[10]</sup>. 尉艳霞等<sup>[11]</sup>研究发现,洋葱水提取物和乙醇提取物均能够抑制肝癌细胞的增殖. 陈凤秀等<sup>[12]</sup>发现洋葱中黄酮类化合物能够抑制HCT116结肠癌细胞的增殖. 本研究旨在探讨洋

葱的水提取物和乙醇提取物对结肠癌细胞株的抑制作用比较. 紫外可见分光光度仪检测发现热水煎煮法较乙醇回流法所得黄酮类化合物含量较高,与尉艳霞等<sup>[11]</sup>的结果一致,但黄酮类化合物的总量较尉艳霞等<sup>[11]</sup>的高,可能的原因是洋葱的品种不同. WST-8法检测发现含不同浓度的黄酮类化合物的水提取物和乙醇提取物对LoVo细胞、SW480细胞、HT-29细胞、HCT-8细胞增殖均有抑制作用,且具有剂量和时间依赖性,从不同提取物对细胞的IC<sub>50</sub>同样可以发现72 h较24 h对细胞的增殖抑制较显著. 洋葱的水提取物在24 h对LoVo细胞、SW480细胞、HT-29细胞、HCT-8细胞的增殖抑制作用较乙醇提取物显著;同样水提取物在72 h对SW480细胞、HT-29细胞、HCT-8细胞的增殖抑制作用较乙醇提取物显著,但在含黄酮类化合物浓度在2.5-20.0 mg/L时,乙醇提取物对LoVo细胞的增殖抑制较水提取物显著,LoVo细胞是由于错配修复基因缺失引起的微卫星不稳定的结肠癌细胞,该结果推测乙醇提取物对微卫星不稳定的结肠癌细胞具有更显著的抑制作用. 本实验结果还显示洋葱的水提

表 5 24 h相同浓度下水提取物与醇提取物对结肠癌细胞株增殖的抑制作用 (mean ± SD, %)

浓度 (mg/L)	水提取物				醇提取物			
	LoVo	SW480	HT-29	HCT-8	LoVo	SW480	HT-29	HCT-8
2.5	3.15 ± 2.23	4.48 ± 10.95	7.90 ± 10.72	3.79 ± 4.63	2.40 ± 0.95	3.90 ± 1.69	2.67 ± 2.65	2.84 ± 2.31
5.0	6.78 ± 2.80	8.36 ± 11.77	14.45 ± 5.14	10.13 ± 3.31	5.56 ± 1.21	8.24 ± 2.97	6.78 ± 0.67	10.22 ± 7.49
10.0	10.84 ± 3.35	13.67 ± 6.60	19.27 ± 3.76 <sup>a</sup>	22.36 ± 1.40	6.97 ± 0.79	12.03 ± 4.67	8.44 ± 1.82	21.40 ± 1.27 <sup>d</sup>
20.0	13.34 ± 2.67	17.53 ± 7.78	21.65 ± 1.31	34.62 ± 2.32 <sup>d</sup>	8.71 ± 1.15	14.71 ± 3.82	14.90 ± 10.27	27.42 ± 5.99
40.0	17.83 ± 1.63 <sup>a</sup>	20.84 ± 7.80	22.23 ± 2.13	37.51 ± 0.58 <sup>d</sup>	11.87 ± 0.93	18.02 ± 4.14	16.37 ± 5.59	29.68 ± 5.95 <sup>d</sup>
60.0	24.34 ± 2.54 <sup>a</sup>	32.79 ± 4.69 <sup>a</sup>	24.20 ± 2.41	49.75 ± 4.89 <sup>ad</sup>	17.00 ± 2.06	21.94 ± 4.81	24.25 ± 11.29	30.30 ± 4.17
80.0	30.37 ± 2.05 <sup>a</sup>	41.69 ± 0.89 <sup>a</sup>	32.25 ± 3.70	52.50 ± 3.39 <sup>ad</sup>	22.34 ± 2.61	29.91 ± 3.43	27.72 ± 13.86	33.59 ± 2.39

<sup>a</sup>*P* < 0.05 vs 醇提取物; <sup>d</sup>*P* < 0.01 vs 其他细胞。

表 6 72 h相同浓度下水提取物与醇提取物对结肠癌细胞株增殖的抑制作用 (mean ± SD, %)

浓度 (mg/L)	24 h				72 h			
	LoVo	SW480	HT-29	HCT-8	LoVo	SW480	HT-29	HCT-8
2.5	2.50 ± 2.25	11.82 ± 10.63	13.69 ± 5.46	1.40 ± 7.15	12.59 ± 7.03	9.41 ± 2.88	4.05 ± 6.91	10.09 ± 5.31
5.0	9.49 ± 3.87 <sup>a</sup>	33.27 ± 8.42	14.36 ± 3.05	19.59 ± 4.50	17.66 ± 2.80	13.28 ± 11.96	6.24 ± 13.51	13.02 ± 6.02
10.0	9.85 ± 1.36 <sup>a</sup>	37.77 ± 5.84 <sup>ad</sup>	17.04 ± 2.04	23.25 ± 3.58	20.36 ± 3.54	17.36 ± 5.24	8.28 ± 9.01	22.66 ± 8.12
20.0	16.12 ± 1.93	52.35 ± 5.72 <sup>ad</sup>	21.82 ± 5.90	34.54 ± 5.34	21.52 ± 4.60	24.15 ± 5.54	10.64 ± 10.88	26.52 ± 7.74
40.0	34.51 ± 5.26	68.17 ± 7.76 <sup>a</sup>	25.02 ± 15.42	54.51 ± 5.15 <sup>a</sup>	25.49 ± 3.47	32.79 ± 6.02	36.57 ± 12.85	38.37 ± 1.70
60.0	56.37 ± 2.31 <sup>a</sup>	71.08 ± 8.16 <sup>a</sup>	49.15 ± 5.64	57.02 ± 6.76	39.53 ± 2.18	47.55 ± 2.45	42.63 ± 14.22	44.82 ± 5.99
80.0	66.43 ± 2.76 <sup>a</sup>	76.00 ± 5.87 <sup>a</sup>	56.25 ± 2.09	69.87 ± 3.52 <sup>a</sup>	53.90 ± 1.81	60.35 ± 6.61	50.04 ± 8.89	47.37 ± 2.71

<sup>a</sup>*P* < 0.05 vs 醇提取物; <sup>d</sup>*P* < 0.01 vs 其他细胞。

取物和乙醇提取物在24 h对HCT-8细胞的增殖抑制较其他3组细胞明显, HCT-8细胞由于回盲肠腺癌细胞分化, 结果推测洋葱的水提取物和醇提取在短时间对回盲肠腺癌细胞的抑制更为显著; 在72 h水提取物对SW480细胞的增殖抑制率较其他3组细胞显著, SW480细胞来自结肠癌原发灶, 推测洋葱水提取物可能在长时间下对原发性结肠癌的抑制更为显著。

通过本实验, 我们推断, 洋葱提取物对LoVo细胞、SW480细胞、HT-29细胞、HCT-8细胞的增殖具有抑制作用, 其中水提取物对结肠癌细胞株的抑制作用相对较高, 但是其具体作用机制目前不明确。洋葱的提取物对其他肿瘤是否有抑制作用以及在体作用需进一步深入研究。

#### 4 参考文献

- 李旻, 赵磊, 王金鹏, 王砚, 王书林. 洋葱的研究. 长春中医药大学学报 2010; 26: 603-604
- Izzo AA, Capasso R, Capasso F. Eating garlic and onion: a matter of life or death. *Br J Cancer* 2004; 91: 194
- Taché S, Ladam A, Corpet DE. Chemoprevention of aberrant crypt foci in the colon of rats by dietary onion. *Eur J Cancer* 2007; 43: 454-458

- Galeone C, Pelucchi C, Levi F, Negri E, Franceschi S, Talamini R, Giacosa A, La Vecchia C. Onion and garlic use and human cancer. *Am J Clin Nutr* 2006; 84: 1027-1032
- Hsing AW, Chokkalingam AP, Gao YT, Madigan MP, Deng J, Gridley G, Fraumeni JF. Allium vegetables and risk of prostate cancer: a population-based study. *J Natl Cancer Inst* 2002; 94: 1648-1651
- Galeone C, Pelucchi C, Dal Maso L, Negri E, Montella M, Zucchetto A, Talamini R, La Vecchia C. Allium vegetables intake and endometrial cancer risk. *Public Health Nutr* 2009; 12: 1576-1579
- Gonzalez CA, Riboli E. Diet and cancer prevention: where we are, where we are going. *Nutr Cancer* 2006; 56: 225-231
- Millen AE, Subar AF, Graubard BI, Peters U, Hayes RB, Weissfeld JL, Yokochi LA, Ziegler RG. Fruit and vegetable intake and prevalence of colorectal adenoma in a cancer screening trial. *Am J Clin Nutr* 2007; 86: 1754-1764
- 张京春, 陈可毅. 洋葱—全球性保健食品. 国外医学·中医中药分册 2003; 25: 335-337
- 周阿成, 金黑鹰, 张春霞, 王水明. 槲皮素对结肠癌作用及其机制的研究进展. 世界华人消化杂志 2011; 19: 936-939
- 尉艳霞, 何宣霖, 王若茵, 刘戟. 3种方法提取洋葱中的类黄酮物质对肝癌细胞株HepG2的作用. 华西药理学杂志 2008; 23: 315-317
- 陈凤秀, 尉艳霞, 潘虹, 何宣霖, 任思冲, 刘戟. 洋葱黄酮类物质对人结肠癌HCT116细胞增殖和凋亡的影响. 中药药理与临床 2008; 24: 36-40

#### ■同行评价

本文观察了洋葱提取物对结肠癌细胞增殖的作用, 为结肠癌药食疗提供了依据, 有较重要的科学意义。

# 成人原代肝细胞的分离、培养及冻存

杭化莲, 张磊, 施晓雷, 卞建民, 丁义涛

## ■背景资料

急性肝功能衰竭(ALF)是指患者突然发生肝细胞坏死或严重的肝功能损害,并在发病8-24 wk内出现肝昏迷的一种综合征。肝细胞移植和生物人工肝是目前最有前途的肝脏替代治疗手段。两种方法都需要充足的肝细胞来源和良好的细胞生物代谢功能。人肝细胞最为理想,但其分离、培养、保存较为困难,要解决这一难题仍需要大量的研究工作。

杭化莲, 张磊, 卞建民, 南京医科大学附属南京第一医院普外科 江苏省南京市 210006

施晓雷, 丁义涛, 南京大学医学院附属鼓楼医院肝胆外科 江苏省南京市 210008

杭化莲, 主治医师, 医学博士, 主要从事肝胆疾病的研究。

作者贡献分布: 此课题由杭化莲、施晓雷及丁义涛设计; 研究过程由杭化莲、张磊及施晓雷操作完成; 研究所用试剂及分析工具由丁义涛提供; 数据分析由杭化莲完成; 本论文写作由杭化莲、张磊及卞建民完成。

通讯作者: 丁义涛, 主任医师, 210008, 江苏省南京市, 南京大学医学院附属鼓楼医院肝胆外科。 yitaoding@hotmail.com

收稿日期: 2011-04-27 修回日期: 2011-06-21

接受日期: 2011-06-28 在线出版日期: 2011-07-08

## Isolation, culture and cryopreservation of adult human hepatocytes

Hua-Lian Hang, Lei Zhang, Xiao-Lei Shi, Jian-Min Bian, Yi-Tao Ding

Hua-Lian Hang, Lei Zhang, Jian-Min Bian, Department of General Surgery, Nanjing First Hospital, Nanjing Medical University, Nanjing 210006 Jiangsu Province, China  
Xiao-Lei Shi, Yi-Tao Ding, Department of Hepatobiliary Surgery, Affiliated Drum Tower Hospital of Nanjing University Medical School, Nanjing 210008, Jiangsu Province, China

Correspondence to: Yi-Tao Ding, Department of Hepatobiliary Surgery, Affiliated Drum Tower Hospital of Nanjing University Medical School, Nanjing 210008, Jiangsu Province, China. yitaoding@hotmail.com

Received: 2011-04-27 Revised: 2011-06-21

Accepted: 2011-06-28 Published online: 2011-07-08

## Abstract

**AIM:** To establish a stable method for the isolation, culture and cryopreservation of adult primary hepatocytes to provide a potential hepatocyte resource for the treatment of acute and chronic liver diseases using hepatocyte transplantation and bioartificial liver support systems, and for the use of hepatocytes as an in vitro model of the liver.

**METHODS:** Adult hepatocytes were isolated from 20 separate donors using a two-step extracorporeal collagenase perfusion technique. The hepatocytes were preincubated in HepatoZYME-SFM medium for 2, 6, 12, 24, 36, 48 or 72 h, transferred to HepatoZYME-SFM medium containing 10% FBS and 10% DMSO, immediately put into an isopropanol progressive freezing container at

-80 °C overnight, and immersed in liquid nitrogen the next day. During the post-thaw culture period, cell viability, plating efficiency, albumin secretion and urea synthesis were analyzed.

**RESULTS:** The viability and plating efficiency of hepatocytes isolated using the two-step extracorporeal collagenase perfusion technique were  $75.0\% \pm 4.6\%$  and  $72.0\% \pm 6.0\%$ , respectively. Preincubation at 4 °C for 12 or 24 hours proved to be optimal for albumin secretion. Compared to the immediate cryopreservation group, significant improvement was observed in viability ( $61.4\% \pm 4.8\%$ ,  $62.0\% \pm 5.6\%$  vs  $53.4\% \pm 4.2\%$ , both  $P < 0.05$ ), plating efficiency ( $63.2\% \pm 5.8\%$ ,  $62.6\% \pm 3.6\%$  vs  $55.2\% \pm 4.6\%$ , both  $P < 0.05$ ), albumin secretion and urea synthesis ( $P < 0.05$ ) in cells preincubated at 4 °C for 12 and 24 hours.

**CONCLUSION:** The two-step extracorporeal collagenase perfusion technique provides a novel, simple, and reliable method for hepatocyte isolation. Preincubation of human hepatocytes at 4 °C for 12 to 24 hours prior to cryopreservation allows to obtain hepatocytes ideal for use in pharmacotoxicology, bioartificial liver and cell therapy.

**Key Words:** Human hepatocytes; Hepatocyte isolation; Cryopreservation

Hang HL, Zhang L, Shi XL, Bian JM, Ding YT. Isolation, culture and cryopreservation of adult human hepatocytes. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(19): 2016-2021

## 摘要

**目的:** 建立一种稳定的成人原代肝细胞分离、培养、冻存方法, 为肝细胞移植、生物人工肝支持系统治疗急慢性肝病以及肝细胞体外应用模型提供潜在的肝细胞资源。

**方法:** 20例供肝采用离体两步胶原酶灌注技术分离成人原代肝细胞。选择7个不同的预培养时间点(2、6、12、24、36、48和72 h), 分离所获肝细胞按上述不同预培养时间在4 °C人无血清培养基(HepatoZYME-SFM)中培养, 然后收集预培养肝细胞转移到含100 mL/L胎牛血清和DMSO的HepatoZYME-SFM中, 再

## ■同行评议者

刘云鹏, 教授, 中国医科大学附属第一医院肿瘤内科



立即放入 $-80^{\circ}\text{C}$ 异丙醇冷冻盒过夜, 次日投入液氮. 分析比较各肝细胞在解冻后细胞活力率、贴壁率、白蛋白分泌及尿素合成.

**结果:** 在部分肝叶切除后使用离体两步胶原酶灌注技术分离所得肝细胞活率和贴壁率分别是 $75.0\% \pm 4.6\%$ 和 $72.0\% \pm 6.0\%$ .  $4^{\circ}\text{C}$ 预培养12或24 h被证明是最适预培养时间, 这两个时间点的白蛋白分泌高于其他时间点( $P < 0.05$ ). 与立即冷冻组相比较, 预培养12或24 h肝细胞解冻后活力( $61.4\% \pm 4.8\%$ ,  $62.0\% \pm 5.6\%$  vs  $53.4\% \pm 4.2\%$ )、贴壁率( $63.2\% \pm 5.8\%$ ,  $62.6\% \pm 3.6\%$  vs  $55.2\% \pm 4.6\%$ )、白蛋白分泌及尿素合成水平明显提高(均 $P < 0.05$ ).

**结论:** 人肝细胞在冷冻前 $4^{\circ}\text{C}$ 预培养12-24 h可以获得较理想的肝细胞, 为药理毒理学、生物人工肝以及细胞治疗的临床应用提供了可能性.

**关键词:** 人原代肝细胞; 肝细胞分离; 冷冻保存

杭化莲, 张磊, 施晓雷, 卞建民, 丁义涛. 成人原代肝细胞的分离、培养及冻存. 世界华人消化杂志 2011; 19(19): 2016-2021 <http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/2016.asp>

## 0 引言

成人原代肝细胞是可用于药理毒理学研究、细胞移植、和体外生物人工肝支持系统的一种最适合的细胞模型. 然而, 由于原代人肝细胞来源有限、获取较费时困难且价格昂贵限制了其进一步广泛应用<sup>[1]</sup>. 当前已有较多有关人肝细胞分离冷冻方法的报道<sup>[2,3]</sup>. 近年来, 很多方法被使用来提高肝细胞解冻后功能, 例如添加冷冻保护剂<sup>[4]</sup>、预培养<sup>[5,6]</sup>、微囊化冷冻<sup>[7]</sup>等. 然而仍然没有一种可靠、适合的有关成人原代肝细胞分离培养冷冻方法. 因此, 有必要建立一种简单、可靠的方法长期保存大量高质量的肝细胞以便可较方便地获取使用. 本研究的目的是使用部分肝切除后肝脏, 确立一种新的成人原代肝细胞分离、培养及冷冻方法, 通过比较解冻后肝细胞活力的功能, 研究人肝细胞预培养冷冻的效果.

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 在征得患者同意以及符合伦理委员会规定的条件下, 两年时间共收集从部分肝叶切除等手术中获取的20例成人肝脏标本, 其中, 男8例, 女12例. 平均年龄( $44 \pm 2$ )岁. 肝血管瘤8例(40%), 肝移植供肝3例(15%), 肝细胞癌6例

(30%), 胆管细胞肝癌3例(15%). 大部分肝脏标本来自肝脏良性疾病(肝血管瘤和肝移植供肝), 有严重传染性疾病(乙、丙型肝炎或艾滋病)、肝硬化肝脏以及根据Vondran等<sup>[8]</sup>报道 $\text{GGT} > 460 \text{ U/L}$ 的病例都被排除在外(表1). 所有20例患者外科手术均在南京鼓楼医院肝胆外科完成, 手术方法肝血管瘤患者采用Pringle法(间歇阻断15 min)避免对健康肝组织不必要的损伤. 热缺血时间不超过15 min. 从手术患者切除的肝脏组织质量300-400 g, 在手术室当即行肝脏灌洗消化. 消化之后肝脏组织被保存在 $4^{\circ}\text{C}$  UW液中并运送至实验室做进一步肝细胞分离, 其中冷缺血时间被控制在20-30 min. Hepatozyme-SFM、IV胶原酶(Collagenase IV)、胰酶购自GIBCO公司; 死细胞荧光染料(SYTOX<sup>®</sup> AADvanced<sup>™</sup> Dead Cell Stain Kits)、活细胞荧光染料[(acetoxymethyl, AM)和Acetate Esters]购自invitrogen公司; 二甲基亚砜(DMSO)购自Sigma公司; 白蛋白定量检测ELISA试剂盒(ELISA using goat anti-human albumin)购自Adlitteram Diagnostic Laboratories公司; 尿素浓度定量检测试剂盒(urea assay kit)购自Biochain Institute公司; 肝细胞生长因子(Recombinant Human HGF)购自BioVision公司; UW保存液购自Bristol-Myers Squibb Company; 胎牛血清购自杭州四季青生物工程材料有限公司; 红细胞裂解液购自碧云天生物技术研究; PBS液的配制:  $140 \text{ mmol/L NaCl}$ ;  $2.7 \text{ mmol/L KCl}$ ;  $10 \text{ mmol/L Na}_2\text{HPO}_4$ ;  $1.8 \text{ mmol/L KH}_2\text{PO}_4$ . 定容到1 L, pH值调整为7.3; D-Hanks液的配制:  $\text{NaCl } 136.75 \text{ mmol/L}$ ;  $\text{KCl } 5.37 \text{ mmol/L}$ ;  $\text{KH}_2\text{PO}_4 0.441 \text{ mmol/L}$ ;  $\text{NaHCO}_3 4.17 \text{ mmol/L}$ . 定容到1 L, pH7.3.

### 1.2 方法

**1.2.1 成人原代肝细胞的分离、培养:** 肝细胞分离在无菌条件下采用Dorko等<sup>[9]</sup>报道的两步胶原酶灌注技术, 我们在此基础上进行改进, 称之为“离体两步胶原酶灌注法”, 具体如下: 肝叶切除后离体的肝叶立即在D-Hanks液中清洗, 寻找肝叶中的门静脉和肝动脉分支分别用婴儿胃管或输液皮条插管固定作为流入道, 随即D-Hanks液循环灌注至肝脏变土黄, 阻断肝上下腔静脉, 继续用胶原酶灌注消化20-30 min, 切取灌注消化较好的肝脏组织置入 $4^{\circ}\text{C}$  UW液中保存运输, PBS冲洗肝组织块, 用小剪刀和镊子将其捣碎, 收集肝细胞悬液过滤网, 将肝脏置于200目不锈钢网筛, 边用玻璃注射器内芯研磨边用PBS冲

**■ 研发前沿**  
有关预培养冷冻效果机制的深入研究以及冷冻过程中对肝细胞的保护仍是下一步要研究的热点.



### ■相关报道

有研究表明,猪肝细胞冷冻前预培养一段时间可提高细胞解冻后活力和功能。

洗,收集滤过液1 200 r/min离心3 min去上清,用滴管吸取上层红细胞沉淀,PBS洗涤后再次离心弃上清,根据上层红细胞沉淀量加入3-5倍细胞体积的红细胞裂解液,轻轻吹打混匀,裂解1-2 min,4 °C 1 200 r/min离心3 min,弃红色上清,如果发现红细胞裂解不完全,可以重复上述步骤1次,PBS洗涤离心直至上清液澄清,向肝细胞沉淀中加入DMEM培养液,调整细胞密度接种到培养皿,待肝细胞贴壁后(约6 h)换Hepatozyme-SFM培养液培养,每2-3 d换液1次,肝细胞培养1 wk,台盼蓝拒染试验计算细胞活力>95%者符合下一步实验要求。

**1.2.2 成人原代肝细胞的预培养、冷冻及解冻:**肝细胞分离后被重悬在HepatoZYME-SFM无血清预培养液中(pH值调制7.4),预培养细胞密度调至 $1 \times 10^9/L$ (即5 mL预培养液中加入细胞数量为 $0.5 \times 10^7$ )。实验分为3组(每组 $n = 6$ ):(1)肝细胞直接培养组(阳性对照组,DC):将肝细胞分离后直接接种贴壁培养( $3 \times 10^9/L$ );(2)预培养冷冻肝细胞组(实验组):指肝细胞冷冻前在4 °C预先培养一段时间,选择7个预培养时间点(2、6、12、24、36、48和72 h);(3)肝细胞立即冷冻组(阴性对照组,IC):将肝细胞分离后直接放置入冷冻盒,置-80 °C过夜,次日投液氮,冷冻1 wk后复苏测各项指标。各组肝细胞冷冻密度为 $1 \times 10^{10}/L$ ;各冷冻组在液氮冷冻7 d后37 °C复苏后以 $3 \times 10^9/L$ 接种,肝细胞预培养及复苏后第1次接种均使用无血清人肝细胞培养基,分别于复苏后1、2、3、4、5、6、7 d观察比较各组肝细胞形态、活力和功能。

**1.2.3 肝细胞活力和贴壁率:**各组肝细胞细胞活性及计数测定采用Mahler等<sup>[7]</sup>报道台盼蓝染色法,细胞贴壁率计算方法如下:各组细胞相同数目的肝细胞被接种,18-20 h后培养基中非贴壁细胞被收集计数,细胞贴壁率指活性贴壁细胞占最初接种细胞的百分比。

**1.2.4 死活细胞荧光染色:**各组肝细胞分离培养或解冻后以 $3 \times 10^9/L$ 爬片接种至35 mm × 10 mm培养皿,加培养液过夜培养;次日吸去培养液,先用PBS或生理盐水冲洗爬片细胞,Acetoxymethyl(AM)和Acetate Esters(活细胞染料)配制工作浓度1  $\mu\text{mol}/L$ ,吸取200  $\mu\text{L}$ 滴入载玻片,置50 mL/L CO<sub>2</sub>、37 °C培养箱孵育20 min,取出后再次用PBS冲洗干净,SYTOX(死细胞染料)配制工作浓度1  $\mu\text{mol}/L$ ,吸取200  $\mu\text{L}$ 滴入载玻片,4 °C避光孵育5 min,取出后再次用生理盐

水冲洗干净,用荧光显微镜观察,激发光波长分别为488 nm(AM)和530 nm(SYTOX),发色光波长分别为520 nm(AM)和575 nm(SYTOX)。

**1.2.5 肝细胞功能检测:**肝细胞功能检测参照我们曾在猪肝细胞研究中的方法<sup>[10]</sup>,各组肝细胞以 $1 \times 10^6$  mL接种培养24 h后,收集上清待检测;上清中白蛋白分泌定量测定使用抗-人白蛋白ELISA试剂盒(adlitteram diagnostic laboratories Inc., USA),于波长450 nm的酶标仪上读取各孔的A值,根据样品的A值查找对应的浓度范围。尿素合成水平采用尿素检测试剂盒(Biochain Institute Inc., Hayward, USA),所有操作方法均根据试剂盒说明书。

**统计学处理** 本实验所涉及的计量资料以mean ± SD表示,两组间数据比较均采用方差分析,所有数据比较均采用SPSS13.0软件处理, $P < 0.05$ 有统计学意义。

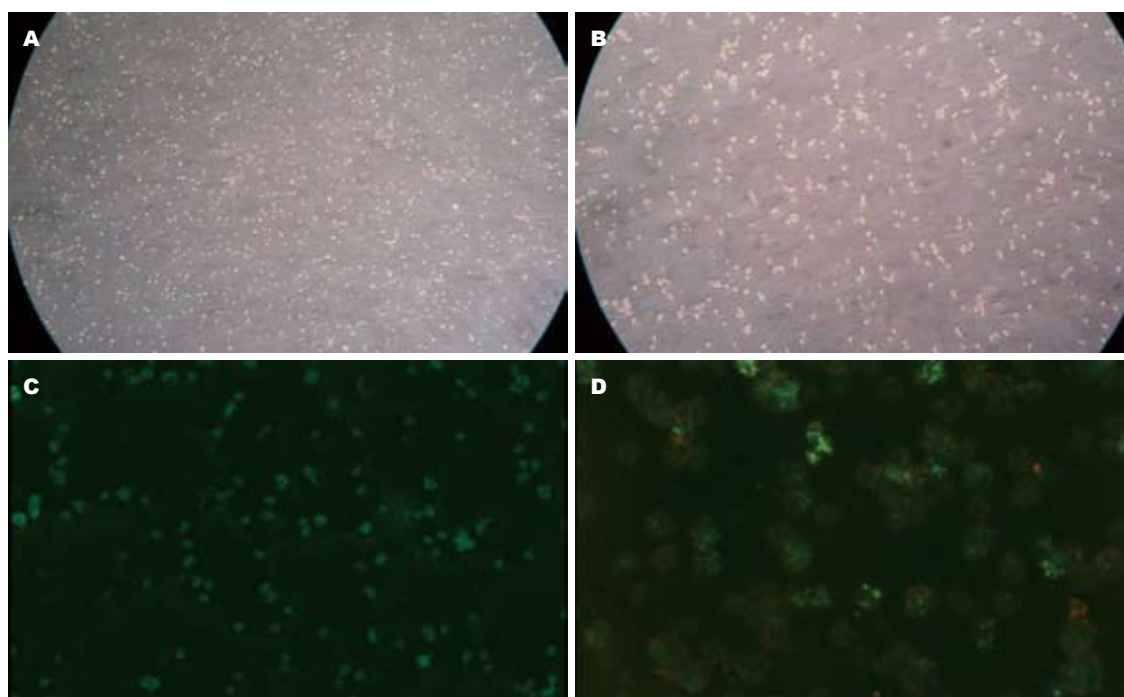
## 2 结果

**2.1 肝细胞分离结果** 20例肝脏外科标本被成功的行肝细胞分离手术,结果每克肝组织平均所获有活性肝细胞数目为 $23.1 \times 10^6 \pm 1.8 \times 10^6$ 。分离所得肝细胞活力由胎盼兰拒染试验大于70%,由大小及形态学判断非实质细胞少于1%(图1A, B)。另外,死活细胞荧光染色(分别采用calcein-AM和0.5  $\mu\text{mol}/L$  SYTOX Orange dye)也被用来鉴定分离肝细胞的活力,结果显示出大部分视野可见胞质被染成绿色的活细胞,极少胞核被染成红色的死细胞(图1C, D)。

### 2.2 预培养冷冻

**2.2.1 活率和贴壁率:**与直接培养组比较,在冷冻解冻后,冷冻组细胞这些参数均明显减少( $P < 0.05$ )。但是,冷冻前预培养12和24 h两组肝细胞解冻后活率明显较立即冷冻组升高,差异有统计学意义( $61.4 \pm 4.8\%$ ,  $62.0 \pm 5.6\%$  vs  $53.4 \pm 4.2\%$ ,  $P < 0.05$ )。然而,这两组肝细胞解冻后在纤维蛋白包被皿上的贴壁率也较立即冷冻组明显提高,差异有统计学意义( $63.2 \pm 5.8\%$ ,  $62.6 \pm 3.6\%$  vs  $55.2 \pm 4.6\%$ ,  $P < 0.05$ ,表2)。

**2.2.2 肝细胞功能:**尽管白蛋白分泌随着时间逐渐下降,但分泌最高峰是在预培养12 h和24 h组,峰值时间是第2天。在整个肝细胞培养期间,这两组在第2、3、4天的白蛋白分泌明显较其他组有所增高( $P < 0.05$ )。在其他时间点,白蛋白分泌较对照组升高,但其间差异无统计学意义(图2A)。另外,尿素合成水平随时间的变化趋势与



**■应用要点**  
该方法有望获得高质量的肝细胞并建立冷冻肝细胞库, 为药理毒理学研究、生物人工肝及细胞治疗提供理想细胞材料。

图 1 肝细胞分离培养后倒置相差显微镜及荧光显微镜下. A, B: 倒置相差显微镜(A:  $\times 40$ ; B:  $\times 100$ ); C, D: 荧光显微镜(C:  $\times 100$ ; D:  $\times 200$ ).

表 2 肝细胞冷冻前预培养时间与效果情况 (mean  $\pm$  SD, %)

	IC	预培养时间(h)							DC
		2	6	12	24	36	48	72	
活率	53.4 $\pm$ 4.2	55.0 $\pm$ 4.2	56.2 $\pm$ 5.5	61.4 $\pm$ 4.8 <sup>a</sup>	62.0 $\pm$ 5.6 <sup>b</sup>	55.0 $\pm$ 6.0	52.2 $\pm$ 5.1	48.4 $\pm$ 4.8	75.0 $\pm$ 4.6 <sup>b</sup>
贴壁率	55.2 $\pm$ 4.6	56.4 $\pm$ 5.6	57.0 $\pm$ 6.4	63.2 $\pm$ 5.8 <sup>a</sup>	62.6 $\pm$ 3.6 <sup>a</sup>	56.8 $\pm$ 6.6	55.8 $\pm$ 6.1	51.6 $\pm$ 4.9	72.0 $\pm$ 6.0 <sup>b</sup>

IC: 阴性对照; DC: 阳性对照. <sup>a</sup> $P < 0.05$ , <sup>b</sup> $P < 0.01$  vs IC组.

白蛋白一致. 尽管预培养12和24 h组在各时间点较其他组有更高的尿素合成水平, 但其间差异未见统计学意义(图2B).

根据上述实验结果可得出, 成人原代肝细胞冷冻前最适预培养时间是12和24 h, 肝细胞发挥最佳功能是在解冻培养后第2天.

### 3 讨论

生物人工肝和肝细胞移植通过对肝衰竭患者提供代谢支持, 已经被认为是患者过渡到全肝移植的桥梁<sup>[11,12]</sup>. 肝细胞移植在治疗特定的代谢性肝脏疾病也可以代替全肝移植<sup>[13]</sup>. 很多肝脏来源的细胞已经被研究作为分离人肝细胞的替代品, 例如人肿瘤源性肝细胞株<sup>[14]</sup>、永生化人肝细胞<sup>[15,16]</sup>以及近来我们已经使用在生物人工肝支持系统中的猪肝细胞<sup>[17-19]</sup>. 这些来源的细胞若应用于临床都将展现出不同程度的问题及相应的矛盾, 例如新生肿瘤的转移或传播、动物组

织的生物安全性和生物相容性问题等. 理论上, 原代人肝细胞将是最适合的肝细胞治疗来源. 目前使用原代人肝细胞主要的障碍是发展一种标准化、高效的肝细胞分离、培养、冷冻方法仍有困难. 因此, 我们提出了一种简单、有效的人肝细胞分离冷冻培养方法, 可以提高肝细胞获得率并可为临床应用和基础研究提供足够数量的人肝细胞.

成人原代肝细胞分离培养方法较多<sup>[20]</sup>, 来源主要有3种, 包括外科手术切除下来后的肝组织<sup>[2]</sup>、脑死亡供体和肝移植供肝<sup>[21]</sup>. 我们认为第1种方法是一种方便、经济适合的来源并能够被广泛应用于获取肝细胞. 我们起先使用从肝脏切除的小块肝组织行剖面血管插管, 再通过胶原酶消化<sup>[2]</sup>, 但是最终所得总的有活力肝细胞百分率较低. 因此, 我们选择采用半肝、肝叶或肝段分支血管插管灌注分离肝细胞的方法, 所有上述17例患者均是肝脏标本在手术室刚从腹

### ■同行评价

本文探讨了成人原代肝细胞分离、培养、冻存的方法,结果有一定的创新性和应用价值,学术价值较好。

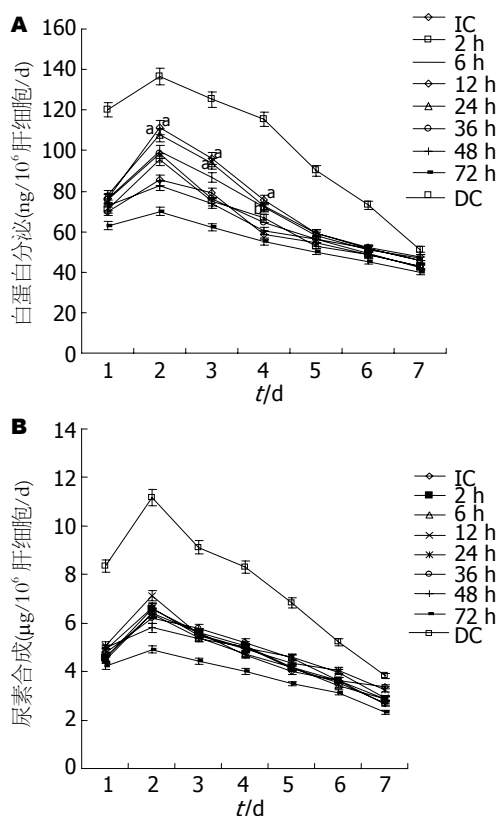


图2 各组白蛋白分泌和尿素合成随时间变化曲线图. A: 白蛋白; B: 尿素. IC: 阴性对照; DC: 阳性对照. <sup>a</sup> $P < 0.05$ , <sup>b</sup> $P < 0.01$  vs IC组.

腔移除就行插管消化,目的是防止肝脏内血液凝固以及获得充足的灌注和消化;其他3例肝移植供肝在取肝时已经灌洗彻底完全,只需消化即可.采用这种创新的方法可获得高产量、高活力的成人肝细胞.因此,我们命名之为离体两步胶原酶灌注技术.

Ellis等<sup>[14]</sup>发现肝细胞在培养4-5 d后酶释放才达到稳定的水平. Flendrig等<sup>[22]</sup>发现由肝细胞释放的LDH仅在第1天较明显, GOT水平在第培养3 d后开始下降,而GPT的释放水平是低的但仅在第1、2天较明显.这些结果揭示肝细胞膜需要一段时间才能恢复其完整性. Koebe等<sup>[23]</sup>研究指出猪肝细胞在冷冻保存前最好培养48 h, Terry等<sup>[6]</sup>发现大鼠肝细胞在冷冻前与冷冻保护剂预培养2 h可提高解冻后细胞的活力和功能.但是目前为止人肝细胞最适合的预培养时间仍没有被仔细研究,我们首次比较不同预培养时间点并提出成人肝细胞冷冻前最适的预培养时间是12-24 h.有关预培养温度, Wigg等<sup>[24]</sup>报道大鼠肝细胞分离后在25 °C悬浮培养可维持细胞的功能和完整性.有报道显示人肝细胞在4 °C或37 °C无血清培养基中预培养对解冻后细胞活力和功能

无显著差异<sup>[6]</sup>,然而低温可以减少葡萄糖的消耗,其可为解冻后细胞能量代谢提供来源.因此,我们提出人肝细胞在冷冻前最适的预培养条件为4 °C HepatoZYME-SFM中预培养12-24 h.在这个基础上,我们采用预培养冷冻的方法来保存肝细胞,可以建立成人原代肝细胞库,为进一步临床应用和基础研究提供理想细胞材料.

目前主要有两种冷冻方法被广泛应用,第1种是由Dou等<sup>[25]</sup>叙述的采用计算机程序降温仪分级冷冻法,此种方法我们曾用来冷冻保存猪肝细胞<sup>[5]</sup>;第2种是使用异丙醇冻盒的逐级冷冻法,冷冻盒被放入-80 °C 18 h温度以1 °C/min的速度下降,次日冷冻肝细胞被投入-196 °C液氮中. Alexandre等<sup>[26]</sup>甚至比较不同的方法并发现逐级冷冻结合预培养组贴壁培养人肝细胞解冻后白蛋白分泌、谷胱甘肽含量与新分离培养肝细胞无明显差异.最终他们提议人肝细胞分离后采用异丙醇逐级冷冻法可以建立人肝细胞库,为药理毒理学及细胞治疗研究提供细胞材料.我们也通过比较上述两种冷冻保存肝细胞的方法并发现异丙醇冻盒逐级冷冻法是一种简单、方便且可行的大规模分离、培养、冷冻保存人肝细胞的方法.

总之,我们通过研究提出成人原代肝细胞在冷冻前最适的预培养条件是4 °C HepatoZYME-SFM培养12-24 h,并且在解冻后第2天可发挥最大肝细胞功能从而用于下一步实验研究和临床应用.本研究阐述了一种创新、稳定而又简单可行的人肝细胞分离、培养及冷冻方法,通过这种方法可有望获得高质量的肝细胞并建立冷冻肝细胞库,为药理毒理学研究、生物人工肝及细胞治疗提供理想细胞材料,该技术也为将来广泛应用和冷冻肝细胞奠定了坚实的基础.当然,有关预培养冷冻效果机制的深入研究以及冷冻过程中对肝细胞的保护仍是下一步要研究的热点.

## 4 参考文献

- 1 Ilan Y. Towards a bank of cryopreserved hepatocytes: which cell to freeze? *J Hepatol* 2002; 37: 145-146
- 2 Richert L, Alexandre E, Lloyd T, Orr S, Viollon-Abadie C, Patel R, Kingston S, Berry D, Dennison A, Heyd B, Manton G, Jaek D. Tissue collection, transport and isolation procedures required to optimize human hepatocyte isolation from waste liver surgical resections. A multilaboratory study. *Liver Int* 2004; 24: 371-378
- 3 Caruana M, Battle T, Fuller B, Davidson B. Isolation of human hepatocytes after hepatic warm and cold ischemia: a practical approach using University of Wisconsin solution. *Cryobiology* 1999; 38: 165-168
- 4 Katenz E, Vondran FW, Schwartlander R, Pless

- G, Gong X, Cheng X, Neuhaus P, Sauer IM. Cryopreservation of primary human hepatocytes: the benefit of trehalose as an additional cryoprotective agent. *Liver Transpl* 2007; 13: 38-45
- 5 Chen Z, Ding Y, Zhang H. Cryopreservation of suckling pig hepatocytes. *Ann Clin Lab Sci* 2001; 31: 391-398
- 6 Terry C, Dhawan A, Mitry RR, Lehec SC, Hughes RD. Preincubation of rat and human hepatocytes with cytoprotectants prior to cryopreservation can improve viability and function upon thawing. *Liver Transpl* 2006; 12: 165-177
- 7 Mahler S, Desille M, Frémond B, Chesné C, Guilouzo A, Campion JP, Clément B. Hypothermic storage and cryopreservation of hepatocytes: the protective effect of alginate gel against cell damages. *Cell Transplant* 2003; 12: 579-592
- 8 Vondran FW, Katenz E, Schwartlander R, Morgul MH, Raschzok N, Gong X, Cheng X, Kehr D, Sauer IM. Isolation of primary human hepatocytes after partial hepatectomy: criteria for identification of the most promising liver specimen. *Artif Organs* 2008; 32: 205-213
- 9 Dorko K, Freeswick PD, Bartoli F, Cicalese L, Bardsley BA, Tzakis A, Nussler AK. A new technique for isolating and culturing human hepatocytes from whole or split livers not used for transplantation. *Cell Transplant* 1994; 3: 387-395
- 10 Chen Z, Ding Y, Zhang H. Morphology, viability and functions of suckling pig hepatocytes cultured in serum-free medium at high density. *Dig Surg* 2002; 19: 184-191
- 11 Strain AJ, Neuberger JM. A bioartificial liver--state of the art. *Science* 2002; 295: 1005-1009
- 12 Terry C, Dhawan A, Mitry RR, Hughes RD. Cryopreservation of isolated human hepatocytes for transplantation: State of the art. *Cryobiology* 2006; 53: 149-159
- 13 Guha C, Deb NJ, Sappal BS, Ghosh SS, Roy-Chowdhury N, Roy-Chowdhury J. Amplification of engrafted hepatocytes by preparative manipulation of the host liver. *Artif Organs* 2001; 25: 522-528
- 14 Ellis AJ, Hughes RD, Wendon JA, Dunne J, Langley PG, Kelly JH, Gislason GT, Sussman NL, Williams R. Pilot-controlled trial of the extracorporeal liver assist device in acute liver failure. *Hepatology* 1996; 24: 1446-1451
- 15 Totsugawa T, Yong C, Rivas-Carrillo JD, Soto-Gutierrez A, Navarro-Alvarez N, Noguchi H, Okitsu T, Westerman KA, Kohara M, Reth M, Tanaka N, Leboulch P, Kobayashi N. Survival of liver failure pigs by transplantation of reversibly immortalized human hepatocytes with Tamoxifen-mediated self-recombination. *J Hepatol* 2007; 47: 74-82
- 16 Wege H, Le HT, Chui MS, Liu L, Wu J, Giri R, Malhi H, Sappal BS, Kumaran V, Gupta S, Zern MA. Telomerase reconstitution immortalizes human fetal hepatocytes without disrupting their differentiation potential. *Gastroenterology* 2003; 124: 432-444
- 17 Chen Z, Ding Y, Xu Q, Yu D. Bioartificial liver inoculated with porcine hepatocyte spheroids for treatment of canine acute liver failure model. *Artif Organs* 2003; 27: 613-622
- 18 Chu XH, Shi XL, Feng ZQ, Gu JY, Xu HY, Zhang Y, Gu ZZ, Ding YT. In vitro evaluation of a multi-layer radial-flow bioreactor based on galactosylated chitosan nanofiber scaffolds. *Biomaterials* 2009; 30: 4533-4538
- 19 Gu J, Shi X, Zhang Y, Ding Y. Heterotypic interactions in the preservation of morphology and functionality of porcine hepatocytes by bone marrow mesenchymal stem cells in vitro. *J Cell Physiol* 2009; 219: 100-108
- 20 牟卉卉, 胡康洪. 原代肝细胞分离培养技术现状及展望. *世界华人消化杂志* 2009; 17: 2164-2170
- 21 Baccarani U, Sanna A, Cariani A, Sainz-Barriga M, Adani GL, Zambito AM, Piccolo G, Risaliti A, Nanni-Costa A, Ridolfi L, Scalamogna M, Bresadola F, Donini A. Isolation of human hepatocytes from livers rejected for liver transplantation on a national basis: results of a 2-year experience. *Liver Transpl* 2003; 9: 506-512
- 22 Flendrig LM, la Soe JW, Jörning GG, Steenbeek A, Karlsen OT, Bovée WM, Ladiges NC, te Velde AA, Chamuleau RA. In vitro evaluation of a novel bioreactor based on an integral oxygenator and a spirally wound nonwoven polyester matrix for hepatocyte culture as small aggregates. *J Hepatol* 1997; 26: 1379-1392
- 23 Koebe HG, Mühling B, Deglmann CJ, Schildberg FW. Cryopreserved porcine hepatocyte cultures. *Chem Biol Interact* 1999; 121: 99-115
- 24 Wigg AJ, Phillips JW, Berry MN. Maintenance of integrity and function of isolated hepatocytes during extended suspension culture at 25 degrees C. *Liver Int* 2003; 23: 201-211
- 25 Dou M, de Sousa G, Lacarelle B, Placidi M, Lechene de la Porte P, Domingo M, Lafont H, Rahmani R. Thawed human hepatocytes in primary culture. *Cryobiology* 1992; 29: 454-469
- 26 Alexandre E, Viollon-Abadie C, David P, Gandillet A, Coassolo P, Heyd B, Mantion G, Wolf P, Bachellier P, Jaeck D, Richert L. Cryopreservation of adult human hepatocytes obtained from resected liver biopsies. *Cryobiology* 2002; 44: 103-113

编辑 李薇 电编 何基才



# HIF-1 $\alpha$ 和EMT相关蛋白在胰腺癌组织中的表达及临床意义

朱光辉, 岑刚, 黄陈, 张志华, 冯正中, 吕秀红, 裴正军

## ■背景资料

缺氧是实体瘤微环境的一个重要特征, 癌细胞为适应缺氧而发生一系列生物学特性的改变。HIF-1 $\alpha$ 和EMT相关因子在其中发挥重要作用。

朱光辉, 岑刚, 黄陈, 张志华, 裴正军, 上海交通大学附属第一人民医院普外科 上海市胰腺疾病重点实验室 上海市 200080

冯正中, 吕秀红, 上海交通大学附属第一人民医院病理科 上海市 200080

朱光辉, 在读博士, 主要从事胰腺癌的基础与临床研究。

作者贡献分布: 朱光辉与裴正军对此文所作贡献均等; 此课题由裴正军设计; 研究过程由朱光辉、冯正中及吕秀红操作完成; 研究所用新试剂及分析工具由黄陈提供; 数据分析由岑刚与张志华完成; 本论文写作由朱光辉与岑刚完成。

通讯作者: 裴正军, 教授, 主任医师, 200080, 上海市, 上海交通大学附属第一人民医院普外科。qiuwryb@gmail.com

电话: 021-63240090-3122

收稿日期: 2011-04-29 修回日期: 2011-06-16

接受日期: 2011-06-21 在线出版日期: 2011-07-08

## Clinical significance of expression of HIF-1 $\alpha$ and EMT-related factors in pancreatic ductal adenocarcinoma

Guang-Hui Zhu, Gang Cen, Chen Huang, Zhi-Hua Zhang, Zheng-Zhong Feng, Xiu-Hong Lv, Zheng-Jun Qiu

Guang-Hui Zhu, Gang Cen, Chen Huang, Zhi-Hua Zhang, Zheng-Jun Qiu, Department of General Surgery, Shanghai First People's Hospital, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai Key Laboratory of Pancreatic Diseases, Shanghai 200080, China

Zheng-Zhong Feng, Xiu-Hong Lv, Department of Clinical Pathology, Shanghai First People's Hospital, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200080, China

Correspondence to: Professor Zheng-Jun Qiu, Department of General Surgery, Shanghai First People's Hospital, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200080, China. qiuwryb@gmail.com

Received: 2011-04-29 Revised: 2011-06-16

Accepted: 2011-06-21 Published online: 2011-07-08

## Abstract

**AIM:** To investigate the expression of hypoxia inducible factor-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) and epithelial-mesenchymal transition (EMT)-related factors in pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) and to analyze their clinical significance.

**METHODS:** Immunohistochemistry was used to examine the expression of HIF-1 $\alpha$ , Snail, Slug, E-cadherin and N-cadherin in 92 cases of PDAC and 10 cases of normal pancreatic tissue.

**RESULTS:** The positive expression rates of HIF-1 $\alpha$ , Snail, Slug, E-cadherin and N-cadherin were 69.57%, 69.57%, 58.70%, 36.96% and 73.91% in PDAC, and 10%, 0%, 0%, 90% and 0% in normal pancreas tissue. HIF-1 $\alpha$  expression was significantly associated with lymph node metastasis. Snail expression was correlated with TNM stage. Slug expression was positively associated with TNM stage and lymph node metastasis. N-cadherin expression was significantly related to TNM stage, lymph node metastasis and histological grade. HIF-1 $\alpha$  expression in PDAC was positively correlated with Snail and Slug expression. There was a negative correlation between Snail and E-cadherin expression in PDAC. Expression of E-cadherin was negatively related to that of N-cadherin. Multivariate Cox analysis demonstrated that HIF-1 $\alpha$ , Snail and E-cadherin were independent factors for prognosis of PDAC.

**CONCLUSION:** HIF-1 $\alpha$ , Snail, Slug, E-cadherin and N-cadherin play significant roles in the progression and prognosis of PDAC.

**Key Words:** Pancreas neoplasm; Hypoxia inducible factor-1 $\alpha$ ; Epithelial-mesenchymal transition; Prognosis

Zhu GH, Cen G, Huang C, Zhang ZH, Feng ZZ, Lv XH, Qiu ZJ. Clinical significance of expression of HIF-1 $\alpha$  and EMT-related factors in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(19): 2022-2030

## 摘要

**目的:** 探讨缺氧诱导因子-1 $\alpha$ (HIF-1 $\alpha$ )和上皮细胞间质转化(EMT)相关蛋白在胰腺导管腺癌(PDAC)组织中的表达及临床意义。

**方法:** 采用免疫组织化学法检测92例PDAC和10例正常胰腺组织中HIF-1 $\alpha$ 、Snail、Slug、E-cadherin、N-cadherin的表达, 并分析其与患者临床病理特征和预后的关系。

**结果:** HIF-1 $\alpha$ 、Snail、Slug、E-cadherin、N-cadherin在PDAC和正常胰腺组织中表达

## ■同行评议者

孙诚谊, 教授, 贵阳医学院附属医院院长办

的阳性率分别为: 69.57%, 69.57%, 58.70%, 36.96%, 73.91%; 10%, 0%, 0%, 90%, 0%. HIF-1 $\alpha$ 的表达与淋巴结转移有关; Snail的表达与TNM分期有关; Slug的表达与TNM分期和淋巴结转移有关; N-cadherin的表达与TNM分期、淋巴结转移和肿瘤分化程度有关. HIF-1 $\alpha$ 表达与Snail、Slug表达呈正相关( $r = 0.309, P = 0.005; r = 0.231, P = 0.027$ ); Snail表达与E-cadherin表达呈负相关( $r = -0.223, P = 0.033$ ); E-cadherin表达与N-cadherin表达呈负相关( $r = -0.478, P = 0.000$ ). HIF-1 $\alpha$ 、Snail和E-cadherin是患者术后独立的预后因子.

**结论:** HIF-1 $\alpha$ 、Snail、Slug、E-cadherin、N-cadherin在PDAC的演进及预后中发挥作用.

**关键词:** 胰腺肿瘤; 缺氧诱导因子-1 $\alpha$ ; 上皮细胞间质转化; 预后

朱光辉, 岑刚, 黄陈, 张志华, 冯正中, 吕秀红, 裘正军. HIF-1 $\alpha$ 和EMT相关蛋白在胰腺癌组织中的表达及临床意义. 世界华人消化杂志 2011; 19(19): 2022-2030

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/2022.asp>

## 0 引言

缺氧是实体瘤微环境的一个重要特征<sup>[1]</sup>, 癌细胞为适应缺氧而发生一系列生物学特性的改变<sup>[2]</sup>. 缺氧诱导因子-1 $\alpha$ (hypoxia inducible factor-1 $\alpha$ , HIF-1 $\alpha$ )在其中发挥重要作用<sup>[3]</sup>, 他与下游靶基因启动子区域的缺氧反应元件(hypoxia responsive element, HRE)结合, 调控其转录<sup>[4]</sup>. 目前已确定的HIF-1 $\alpha$ 靶基因大部分参与了转移级联反应过程, 包括上皮细胞间质转型(epithelial-mesenchymal transition, EMT)、细胞外基质和基底膜降解、肿瘤细胞运动能力增加、新生血管形成等<sup>[5]</sup>. 我们前期研究证实胰腺导管腺癌(pancreatic ductal adenocarcinoma, PDAC)组织中亦存在HIF-1 $\alpha$ 过表达, 且其表达与淋巴结转移、临床病理分期有关<sup>[6]</sup>. EMT指上皮细胞失去上皮细胞的特征而获得间充质细胞的表型<sup>[7]</sup>. 目前有学者认为他是肿瘤转移的起始事件<sup>[8]</sup>, 其中钙黏素转换和转录因子的表达上调是EMT发生过程中重要的分子事件<sup>[9]</sup>. 但HIF-1 $\alpha$ 与EMT相关因子在胰腺癌组织中的表达是否相关及其在胰腺癌演进中的作用还不明确. 因此, 本课题采用免疫组织化学法检测92例PDAC和10例正常胰腺组织中HIF-1 $\alpha$ 、Snail、Slug、E-钙黏素(epithelial cadherin, E-cadherin)、N-钙黏素(neuronal cadherin, N-cadherin)蛋白的表达, 并统计分析其

表达的相关性及与临床病理特征和预后的关系.

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 收集上海交通大学附属第一人民医院1993-08/2009-12的92例PDAC患者手术切除的胰腺癌标本. 切取供肝附带的胰腺组织10例作为正常胰腺组织标本对照组. 所有标本均经40 g/L中性甲醛固定, 常规石蜡包埋, 连续切片, 厚度4  $\mu$ m, 行HE染色, 经组织病理学明确诊断. 术前均未接受放、化疗, 按国际抗癌联盟(UICC, 2002版)标准<sup>[10]</sup>确定胰腺癌TNM分期, 世界卫生组织(WHO, 2000版)<sup>[11]</sup>标准确定胰腺癌组织学分级. 92例患者中, 男64例, 女28例, 平均年龄(64.73 $\pm$ 10.42)岁. 胰头癌79例, 胰体尾癌13例. 组织学分级: 高分化14例, 中分化60例, 低分化16例, 2例分化程度不明; 局部淋巴结: 无淋巴结转移57例, 有淋巴结转移35例; 神经浸润: 无神经浸润42例, 有神经浸润40例, 不明10例; 切缘(镜下): 阴性83例, 阳性9例; TNM分期: I a期2例, I b期19例, II a期37例, II b期29例, III期0例, IV期5例. 随访截止至2009-12-31, 平均随访时间15.1(1-121) mo. 随访期限从手术后病理确诊为PDAC开始至因复发转移或其他原因死亡或随访终止时间. 至随访截止日期, 57例死亡, 29例存活, 6例失随访, 失访率6.52%. 兔抗人HIF-1 $\alpha$ 、Snail、Slug多克隆抗体均购自英国Abcam公司、兔抗人E-cadherin、N-cadherin多克隆抗体均购自美国Cell Signaling公司, 超敏SP试剂盒、DAB显色液均购自福州迈新公司.

## 1.2 方法

**1.2.1 免疫组织化学SP法:** 组织切片, 经脱蜡、枸橼酸盐抗原修复液热修复、过氧化氢、正常羊血清封闭后滴加一抗, HIF-1 $\alpha$ (1:50), Snail(1:100), Slug(1:100), E-cadherin(1:25), N-cadherin(1:100). 4 $^{\circ}$ C过夜, 复温后滴加二抗, 37 $^{\circ}$ C孵育30 min, 滴加辣根过氧化物酶标记的链霉素卵白素工作液, 37 $^{\circ}$ C孵育30 min, 最后DAB显色、苏木素复染、封片.

**1.2.2 结果判定:** 每张切片随机选取10个400倍视野, 每个视野计数100个细胞, 取其均值. HIF-1 $\alpha$ 评级标准参考<sup>[6]</sup>. HIF-1 $\alpha$ 主要位于胞质和胞核, 呈棕黄色到棕褐色. 阳性细胞比例 = 0%, 1%-9%, 10%-50%, >50%, 计分分别为0-3分, 即: -, +, ++, ++++. 结果统计时, 分为HIF-1 $\alpha$ 高表达组(++和+++ )和低表达组(-和+). Snail、Slug、E-cadherin、N-cadherin评级标准参考<sup>[12]</sup>. Snail和Slug主要位于胞核, 呈棕黄色到棕褐色. 阳性

## ■ 研发前沿

近年来, 缺氧微环境下EMT与肿瘤转移的相关研究已成为肿瘤研究领域的新热点. 其中钙黏素转换和转录因子的表达上调是EMT发生过程中重要的分子事件. 但HIF-1 $\alpha$ 与EMT相关因子在胰腺癌组织中的表达是否相关及其在胰腺癌演进中的作用还不明确.

## ■相关报道

Imai等采用缺氧处理卵巢癌细胞发现, 缺氧活化HIF-1 $\alpha$ , 促使Snail表达上调, 抑制E-cadherin的表达.

细胞比例 = 0%, 1%-49%, 50%-70%, >70%, 分别为-, +, ++, +++。结果统计时, 将其分为Snail、Slug高表达组(++和+++ )和低表达组(-和+)。E-cadherin主要位于胞膜和胞质, 呈棕黄色。按显色细胞比例评分: 阳性细胞比例<10%, 10%-49%, 50%-70%, >70%, 计分分别为0-3分, 即: -, +, ++, +++。结果统计时, 分为E-cadherin阳性表达组(+, ++和+++ )和阴性表达组(-)。N-cadherin主要位于胞膜和胞质, 呈棕黄色到棕褐色。按显色细胞比例评分: 阳性细胞比例 = 0%, 1%-49%, 50%-70%, >70%, 计分分别为0-3分, 即: -, +, ++, +++。结果统计时, 分为N-cadherin高表达组(++和+++ )和低表达组(-和+)。

**统计学处理** 数据采用SPSS13.0统计软件包进行统计分析。计数资料采用 $\chi^2$ 检验或Fisher精确概率法。双变量非正态分布资料采用Spearman等级相关系数检验。单因素生存分析采用Kaplan-Meier法和Log-rank检验, 多因素生存分析采用Cox比例风险模型。

## 2 结果

**2.1 PDAC与正常胰腺组织中HIF-1 $\alpha$ 和EMT相关蛋白的表达** 92例胰腺癌组织, HIF-1 $\alpha$ 、Snail、Slug、E-cadherin、N-cadherin的阳性表达率分别为69.57%(64/92)、69.57%(64/92)、58.70%(54/92)、36.96%(34/92)、73.91%(68/92)(表1, 图1)。HIF-1 $\alpha$ 主要表达在胰腺癌细胞核和胞质, 呈棕黄色到棕褐色, 尤其在具有腺体结构的癌细胞中表达明显; Snail和Slug主要表达在胰腺癌细胞核, 呈棕黄色到棕褐色; E-cadherin和N-cadherin主要表达在胰腺癌细胞膜和胞质, 呈棕黄色。10例正常胰腺组织中HIF-1 $\alpha$ 阳性率为10%(1/10), E-cadherin阳性率为90%(9/10), Snail、Slug、N-cadherin均不表达。1例正常胰腺组织中HIF-1 $\alpha$ 表达在胰腺细胞胞质, 呈棕黄色。正常胰腺组织中E-cadherin主要表达在胰腺细胞膜和胞质, 呈棕黄色(图2)。

**2.2 HIF-1 $\alpha$ 和EMT相关蛋白在PDAC中表达的相互关系** 胰腺癌中HIF-1 $\alpha$ 表达与Snail、Slug表达呈正相关( $r = 0.309$ ,  $P = 0.005$ ;  $r = 0.231$ ,  $P = 0.027$ ), 即随HIF-1 $\alpha$ 阳性表达细胞的增多, Snail、Slug阳性表达也随之增多(表2); Snail表达与E-cadherin表达呈负相关( $r = -0.223$ ,  $P = 0.033$ ), 即随着Snail阳性表达细胞的增多, E-cadherin阳性表达随之减少(表3); Slug表达与E-cadherin表达不相关( $P = 0.194$ , 表4); E-cad-

表1 HIF-1 $\alpha$ 、Snail、Slug、E-cadherin、E-cadherin蛋白在PDAC和正常胰腺组织中的表达

蛋白	评级(n)				阳性率(%)
	-	+	++	+++	
HIF-1 $\alpha$					
PDAC	28	22	31	11	69.57
对照组	0	0	1	0	10.00
Snail					
PDAC	28	14	45	5	69.57
对照组	0	0	0	0	0.00
Slug					
PDAC	38	6	36	12	58.70
对照组	0	0	0	0	0.00
E-cadherin					
PDAC	58	12	17	5	36.96
对照组	1	2	4	3	90.00
N-cadherin					
PDAC	24	18	44	6	73.91
对照组	0	0	0	0	0.00

herin表达与N-cadherin表达呈负相关( $r = -0.478$ ,  $P = 0.000$ ), 即随着E-cadherin阳性表达细胞的减少, N-cadherin的阳性表达随之增多(表5)。

**2.3 HIF-1 $\alpha$ 和EMT相关蛋白的表达与PDAC临床病理特征的关系** HIF-1 $\alpha$ 的表达与淋巴结转移有关( $P = 0.030$ ); Snail的表达与TNM分期有关( $P = 0.031$ ); Slug的表达与TNM分期和淋巴结转移有关( $P = 0.003$ ;  $P = 0.002$ ); N-cadherin的表达与TNM分期、淋巴结转移和肿瘤分化程度有关( $P = 0.000$ ;  $P = 0.001$ ;  $P = 0.010$ ); 而年龄、性别、肿瘤部位、肿瘤大小、神经侵犯、切缘与这些蛋白的表达均无关(表6)。

**2.4 HIF-1 $\alpha$ 和EMT相关蛋白的表达及临床病理特征与胰腺癌预后的关系** 单因素生存分析结果显示, TNM分期、淋巴结转移、切缘、HIF-1 $\alpha$ 、Snail、Slug、E-cadherin、N-cadherin的表达与患者预后有关( $P < 0.05$ ), 而年龄、性别、肿瘤部位、肿瘤大小、神经浸润、组织病理学分级与患者预后均无关( $P > 0.05$ , 表7, 图3)。

将单因素分析有统计学意义的8个因素引入Cox比例风险模型进行多因素分析。根据多因素生存分析结果, TNM分期、HIF-1 $\alpha$ 、Snail和E-cadherin的表达是胰腺癌患者术后的独立预后因素( $P < 0.05$ , 表7)。

## 3 讨论

肿瘤缺氧微环境与肿瘤的演进密切相关<sup>[13,14]</sup>。影像学显示胰腺癌特有的乏血管表现<sup>[15]</sup>和肿瘤内



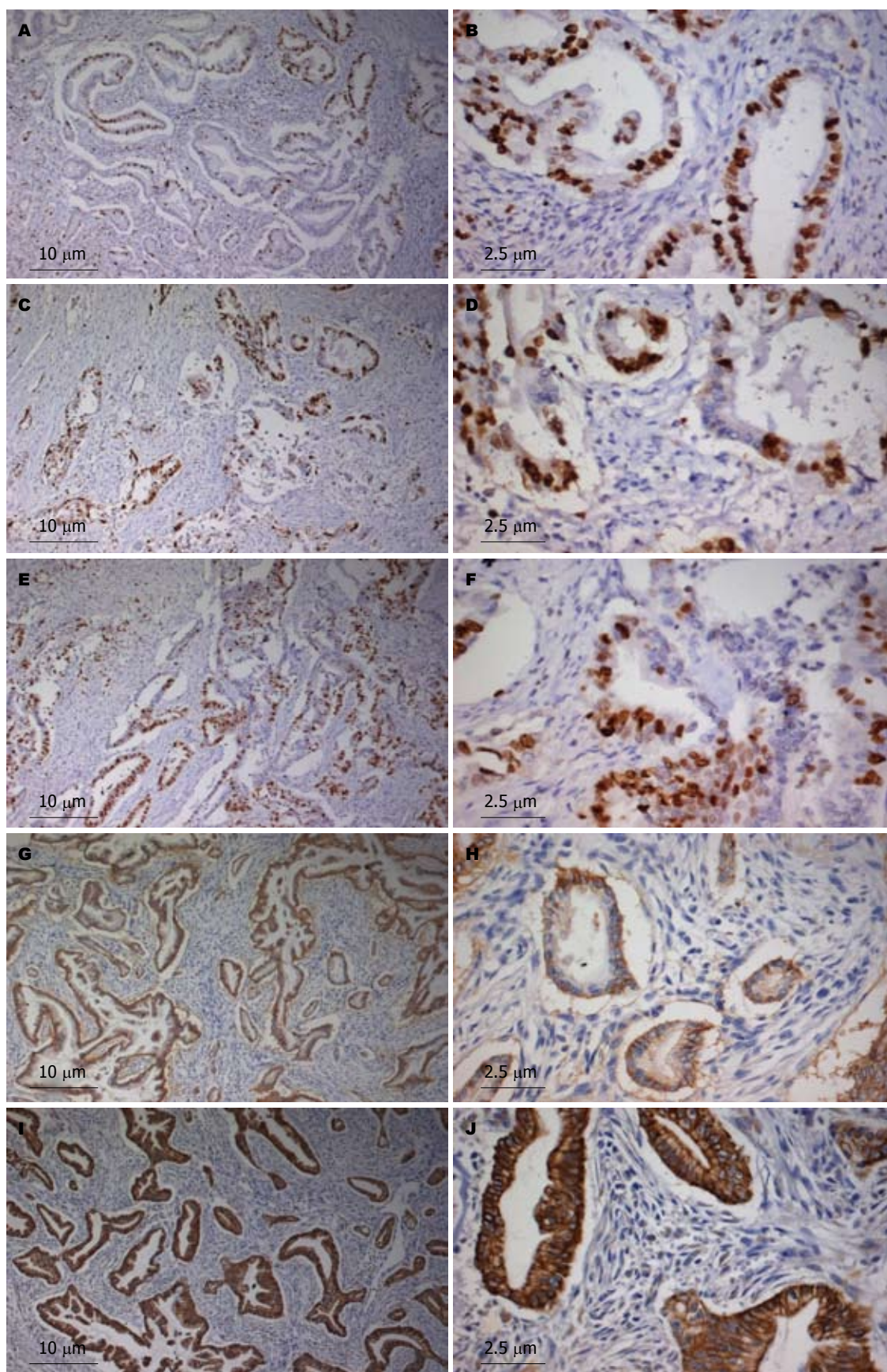


图 1 HIF-1 $\alpha$ 、Snail、Slug、E-cadherin、N-cadherin蛋白在PDAC组织中的表达(SP法). A, B: HIF-1 $\alpha$ (A $\times$ 100, B $\times$ 400); C, D: Snail(C $\times$ 100, D $\times$ 400); E, F: Slug(E $\times$ 100, F $\times$ 400); G, H: E-cadherin(G $\times$ 100, H $\times$ 400); I, J: N-cadherin(I $\times$ 100, J $\times$ 400).

#### ■创新盘点

本课题采用免疫组织化学法检测胰腺癌组织中HIF-1 $\alpha$ 、Snail、Slug、E-cadherin、N-cadherin蛋白的表达,并统计分析其表达的相关性及与临床病理特征和预后的关系.首次在胰腺导管腺癌手术标本中证实缺氧的肿瘤细胞可能发生EMT,在胰腺癌的恶性进展中发挥重要作用.

部氧分压测定<sup>[16]</sup>都提示胰腺癌组织缺氧,充分说明胰腺癌是一个乏氧性肿瘤.但缺氧与胰腺癌



■应用要点

HIF-1 $\alpha$ 和EMT相关蛋白在胰腺癌的演进及预后中发挥重要作用,联合使用免疫组织化学检测,可考虑他作为胰腺癌临床评价生物学行为及判断预后的有用指标.

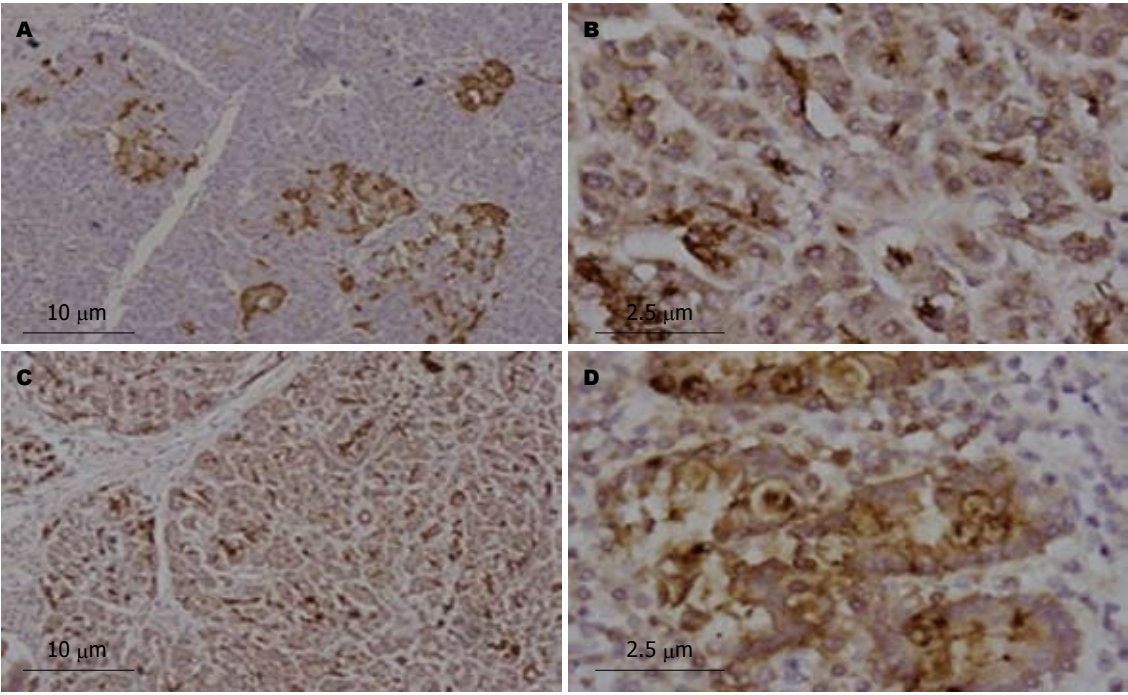


图 2 HIF-1 $\alpha$ 和E-cadherin蛋白在正常胰腺组织中的表达(SP法). A, B: HIF-1 $\alpha$ (A  $\times$  100, B  $\times$  400); C, D: E-cadherin(C  $\times$  100, D  $\times$  400).

表 2 PDAC中HIF-1 $\alpha$ 与Snail、Slug表达的关系

	<i>n</i>	HIF-1 $\alpha$				<i>r</i> 值	<i>P</i> 值
		-	+	++	+++		
Snail							
-	28	11	6	11	0	0.309	0.005
+	14	1	8	2	3		
++	45	14	8	18	5		
+++	5	2	0	0	3		
<i>n</i>		28	22	31	11		
Slug							
-	38	18	5	12	3	0.231	0.027
+	6	0	3	3	0		
++	36	7	12	14	3		
+++	12	3	2	2	5		
<i>n</i>		28	22	31	11		

表 3 PDAC中Snail与E-cadherin表达的关系

E-cadherin	<i>n</i>	Snail				<i>r</i> 值	<i>P</i> 值
		-	+	++	+++		
-	58	13	12	30	3	-0.223	0.033
+	12	3	0	9	0		
++	17	8	2	5	2		
+++	5	4	0	1	0		
<i>n</i>		28	14	45	5		

恶性生物学特征之间的关系仍然是未解之谜。HIF-1是在缺氧状态下发挥特异性活性的

表 4 PDAC中Slug与E-cadherin表达的关系

E-cadherin	n	Slug				r值	P值
		-	+	++	+++		
-	58	2	25	30	8	-0.137	0.194
+	12	1	7	9	2		
++	17	2	3	5	2		
+++	5	1	1	1	0		
n		38	6	36	12		

## ■同行评价

本文学术性较好, 具有较好的实用性和创新性。

表 5 PDAC中E-cadherin与N-cadherin表达的关系

N-cadherin	n	E-cadherin				r值	P值
		-	+	++	+++		
-	24	7	2	11	4	-0.478	0.000
+	18	11	2	4	1		
++	44	36	6	2	0		
+++	6	4	2	0	0		
n		58	12	17	5		

表 6 HIF-1 $\alpha$ 、Snail、Slug、E-cadherin、N-cadherin蛋白的表达与PDAC临床病理特征的关系

参数	n	HIF-1 $\alpha$			Snail			Slug			E-cadherin			N-cadherin		
		低	高	P值	低	高	P值	低	高	P值	阴性	阳性	P值	低	高	P值
TNM分期																
I	21	15	6	0.085	8	13	0.031	16	5	0.003	12	9	0.718	17	4	0.000
II a	37	21	16		23	14		19	18		25	12		17	20	
II b, III, IV	34	14	20		11	23		10	24		21	13		8	26	
淋巴结转移																
阴性	57	36	21	0.030	30	27	0.086	35	22	0.002	36	21	0.977	34	23	0.001
阳性	35	14	21		12	23		10	25		22	13		8	27	
分化																
G1	14	10	4	0.336	8	6	0.349	7	7	0.290	8	6	0.857	9	5	0.010
G2	60	30	30		28	32		32	28		39	21		29	31	
G3	16	8	8		5	11		5	11		10	6		2	14	

核转录因子<sup>[17]</sup>, 含有 $\alpha$ 及 $\beta$ 亚基的异源二聚体, 生理活性主要取决于 $\alpha$ 亚基,  $\beta$ 亚基组成表达<sup>[18]</sup>. 多位学者采用免疫组织化学的方法检测了实体癌中HIF-1 $\alpha$ 的表达, 并研究其表达与肿瘤生物学行为及预后之间的关系. Cao等<sup>[19]</sup>研究发现71例结肠直肠癌患者手术标本HIF-1 $\alpha$ 阳性率为54.93%, 并且HIF-1 $\alpha$ 的表达与TNM分期、淋巴结和肝转移及预后有关. Chen等<sup>[20]</sup>在54例食管癌中研究发现HIF-1 $\alpha$ 阳性率为46%, 与预后密切相关. 在胰腺癌中, 我们前期研究也发现PDAC组织中亦存在HIF-1 $\alpha$ 过表达, 且HIF-1 $\alpha$ 的表达与淋巴结转移、临床病理分期及预后有关<sup>[6]</sup>. Hoffmann

等<sup>[21]</sup>检测了41例PDAC患者手术标本HIF-1 $\alpha$ 阳性率为87.1%, 与预后有关. 但也有相反的研究报道. Zhu等<sup>[22]</sup>检测了60例PDAC患者手术标本和正常胰腺组织内HIF-1 $\alpha$ 的表达, 发现两者没有差异, 并且PDAC患者手术标本中HIF-1 $\alpha$ 的表达与预后无关. 本研究结果显示: 92例PDAC患者手术标本HIF-1 $\alpha$ 阳性率为69.57%, 且HIF-1 $\alpha$ 的表达与淋巴结转移有关, 即患者胰腺癌组织中的HIF-1 $\alpha$ 表达阳性细胞越多, 其发生淋巴结转移的可能性就越大. 生存分析显示HIF-1 $\alpha$ 是PDAC患者术后的独立预后因子. HIF-1 $\alpha$ 是胰腺癌细胞缺氧的一个标志物, 这提示胰腺癌的恶

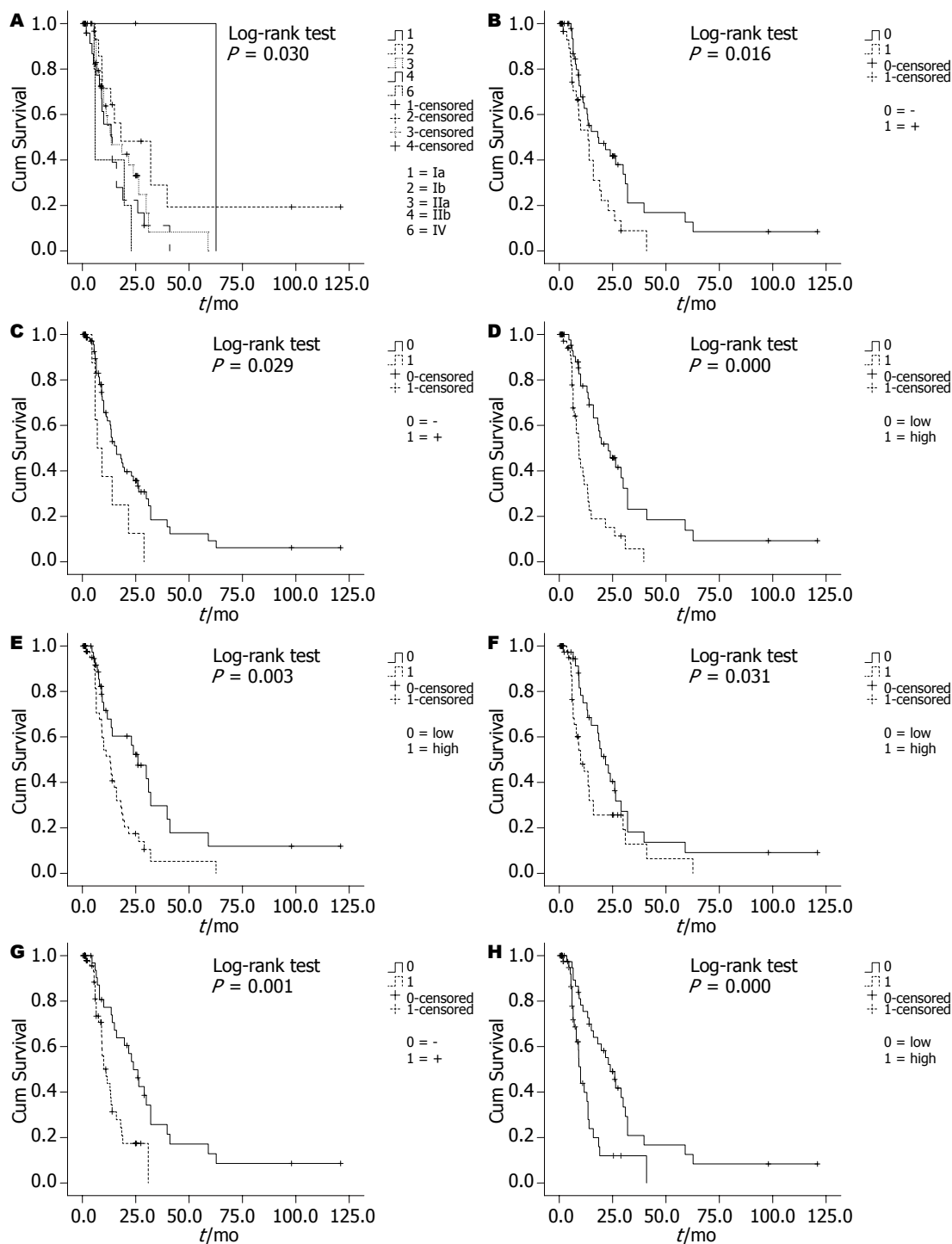


图 3 92例PDAC患者术后的单因素生存分析。A: TNM; B: 淋巴结; C: margin; D: HIF-1 $\alpha$ ; E: Snail; F: Slug; G: E-cadherin; H: N-cadherin.

性生物学行为与胰腺癌缺氧微环境之间可能存在密切联系。

EMT是近年来肿瘤转移过程中的一个研究热点<sup>[23]</sup>。目前EMT的形成机制中比较明确的是转录因子Snail、Slug通过结合到E-cadherin启动子区域的E盒结构,进而下调E-cadherin的表达<sup>[24]</sup>。Hotz等<sup>[12]</sup>研究发现78%的人胰腺癌组织中表达Snail, 50%的癌组织阳性表达Slug。Snail在未分

化癌细胞株MiaPaCa-2和Panc-1中的表达明显高于分化程度高的细胞株Capan-1、HPAF-2和AsPC-1。Slug在所有细胞株的表达强度不同。源于两个未分化肿瘤细胞株MiaPaCa-2和Panc-1转移能力显著强于来自中等分化的HPAF-2和分化良好的Capan-1, Snail mRNA的表达和转移潜能呈正相关。Yin等<sup>[25]</sup>检测了56例胰腺癌手术标本中Snail的表达,结果发现Snail的表达阳

表 7 92例PDAC患者的生存分析

参数	单因素 P值	多因素		
		P值	RR	95%CI
年龄( $\leq 60$ 岁 vs $> 60$ 岁)	0.796			
性别(男 vs 女)	0.217			
部位(头部 vs 体尾部)	0.194			
大小( $\leq 2$ cm vs $> 2$ cm)	0.203			
TNM分期(I a/ I b/ II a/ II b/ III/ IV)	0.030	0.001	1.545	1.206–1.978
淋巴结(阴性 vs 阳性)	0.016	0.433		
切缘(阴性 vs 阳性)	0.029	0.733		
神经(阴性 vs 阳性)	0.902			
分化(G1/G2/G3)	0.167			
HIF-1 $\alpha$ (高表达 vs 低表达)	0.000	0.001	2.678	1.500–4.781
Snail(高表达 vs 低表达)	0.003	0.002	2.553	1.411–4.616
Slug(高表达 vs 低表达)	0.031	0.455		
E-cadherin(阳性 vs 阴性)	0.001	0.001	0.327	0.173–0.618
N-cadherin(高表达 vs 低表达)	0.000	0.370		

性率为36%, 与淋巴结和远处转移呈正相关. 他们还将Snail cDNA转染Panc-1细胞, 转染后的细胞侵袭能力明显增加. 但也有学者的研究结果与之不同. Cates等<sup>[26]</sup>的研究结果显示在正常胰腺上皮、慢性胰腺炎、PDAC标本中胞质和胞核均有Slug阳性染色. Slug的表达与癌组织病理分级、肿瘤分期和淋巴结转移无关. 本研究结果显示, 92例PDAC组织中, Snail、Slug、E-cadherin、N-cadherin的阳性表达率分别为69.57%、58.70%、36.96%、73.91%; 10例正常胰腺组织中Snail、Slug、N-cadherin均不表达, E-cadherin阳性率为90%. Snail的表达与TNM分期有关; Slug的表达与TNM分期和淋巴结转移有关; N-cadherin的表达与TNM分期、淋巴结转移和肿瘤分化程度有关. 生存分析显示Snail和E-cadherin的表达是影响患者预后的独立因素. 这在组织学层面上证实EMT的发生与胰腺癌转移有关, 参与胰腺癌的恶性进展而影响预后. 此外, 我们还证实胰腺癌中Snail的表达与E-cadherin的表达呈负相关, 提示Snail可能调控胰腺癌组织中E-cadherin的表达.

目前的研究表明: HIF-1 $\alpha$ 和EMT相关因子都在肿瘤的转移方面发挥重要的作用<sup>[5,18,27-30]</sup>. HIF-1 $\alpha$ 对EMT相关转录因子Twist、Snail、Slug的调控是缺氧诱导肿瘤EMT的重要机制, 其在肿瘤的侵袭转移方面发挥重要作用. Yang等<sup>[31]</sup>研究发现Twist启动子区域存在HRE, 受HIF-1 $\alpha$ 调控. Imai等<sup>[32]</sup>采用缺氧处理卵巢癌细胞发现, 缺氧活化HIF-1 $\alpha$ , 促使Snail表达上调, 抑制

E-cadherin的表达. Huang等<sup>[33]</sup>通过体内外实验证实HIF-1 $\alpha$ 上调Slug的表达, 且Slug与MMP4启动子区域的E盒结合, 进而上调MMP4的表达. 另外在头颈部癌手术标本中发现HIF-1 $\alpha$ 和MMP4的表达与预后负相关. 我们的研究表明: 胰腺癌中HIF-1 $\alpha$ 的表达与Snail、Slug表达呈正相关, 即随着HIF-1 $\alpha$ 阳性表达细胞的增多, Snail、Slug阳性表达也随之增多. 首次在PDAC手术标本中证实缺氧的肿瘤细胞可能发生EMT, 提示缺氧微环境下胰腺癌细胞可能通过EMT获得高侵袭转移能力, 在胰腺癌的恶性进展中发挥重要作用.

总之, HIF-1 $\alpha$ 和EMT相关蛋白在胰腺癌的演进及预后中发挥重要作用, 联合使用免疫组织化学检测, 可考虑作为胰腺癌临床评价生物学行为及判断预后的有用指标.

#### 4 参考文献

- Melillo G. Targeting hypoxia cell signaling for cancer therapy. *Cancer Metastasis Rev* 2007; 26: 341-352
- 孙学英, 姜宪, 姜洪池. 针对肿瘤缺氧微环境探寻新的治疗方法. *世界华人消化杂志* 2010; 18: 1741-1746
- Koh MY, Spivak-Kroizman TR, Powis G. HIF-1 $\alpha$ -alpha and cancer therapy. *Recent Results Cancer Res* 2010; 180: 15-34
- Majmundar AJ, Wong WJ, Simon MC. Hypoxia-inducible factors and the response to hypoxic stress. *Mol Cell* 2010; 40: 294-309
- DeClerck K, Elble RC. The role of hypoxia and acidosis in promoting metastasis and resistance to chemotherapy. *Front Biosci* 2010; 15: 213-225
- Sun HC, Qiu ZJ, Liu J, Sun J, Jiang T, Huang KJ, Yao M, Huang C. Expression of hypoxia-inducible factor-1 alpha and associated proteins in pancreatic



- ductal adenocarcinoma and their impact on prognosis. *Int J Oncol* 2007; 30: 1359-1367
- 7 Acloque H, Adams MS, Fishwick K, Bronner-Fraser M, Nieto MA. Epithelial-mesenchymal transitions: the importance of changing cell state in development and disease. *J Clin Invest* 2009; 119: 1438-1449
- 8 Brabletz T, Jung A, Spaderna S, Hlubek F, Kirchner T. Opinion: migrating cancer stem cells - an integrated concept of malignant tumour progression. *Nat Rev Cancer* 2005; 5: 744-749
- 9 Yilmaz M, Christofori G. EMT, the cytoskeleton, and cancer cell invasion. *Cancer Metastasis Rev* 2009; 28: 15-33
- 10 Gospodarowicz MK. International Union against Cancer: Pancreas. In: Sobin LH, Wittekind C, eds. UICC-TNM classification of malignant tumours, 6th ed. New York: Wiley-Liss 2002: 132-135
- 11 Lüttges J, Schemm S, Vogel I, Hedderich J, Kremer B, Klöppel G. The grade of pancreatic ductal carcinoma is an independent prognostic factor and is superior to the immunohistochemical assessment of proliferation. *J Pathol* 2000; 191: 154-161
- 12 Hotz B, Arndt M, Dullat S, Bhargava S, Buhr HJ, Hotz HG. Epithelial to mesenchymal transition: expression of the regulators snail, slug, and twist in pancreatic cancer. *Clin Cancer Res* 2007; 13: 4769-4776
- 13 Klein TJ, Glazer PM. The tumor microenvironment and DNA repair. *Semin Radiat Oncol* 2010; 20: 282-287
- 14 Grek CL, Tew KD. Redox metabolism and malignancy. *Curr Opin Pharmacol* 2010; 10: 362-368
- 15 Megibow AJ. Pancreatic adenocarcinoma: designing the examination to evaluate the clinical questions. *Radiology* 1992; 183: 297-303
- 16 Koong AC, Mehta VK, Le QT, Fisher GA, Terris DJ, Brown JM, Bastidas AJ, Vierra M. Pancreatic tumors show high levels of hypoxia. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2000; 48: 919-922
- 17 Chitneni SK, Palmer GM, Zalutsky MR, Dewhirst MW. Molecular imaging of hypoxia. *J Nucl Med* 2011; 52: 165-168
- 18 Lu X, Kang Y. Hypoxia and hypoxia-inducible factors: master regulators of metastasis. *Clin Cancer Res* 2010; 16: 5928-5935
- 19 Cao D, Hou M, Guan YS, Jiang M, Yang Y, Gou HF. Expression of HIF-1 $\alpha$  and VEGF in colorectal cancer: association with clinical outcomes and prognostic implications. *BMC Cancer* 2009; 9: 432
- 20 Chen Y, Lu Y, Lu C, Zhang L. Beclin-1 expression is a predictor of clinical outcome in patients with esophageal squamous cell carcinoma and correlated to hypoxia-inducible factor (HIF)-1 $\alpha$  expression. *Pathol Oncol Res* 2009; 15: 487-493
- 21 Hoffmann AC, Mori R, Vallbohmer D, Brabender J, Klein E, Drebber U, Baldus SE, Cooc J, Azuma M, Metzger R, Hoelscher AH, Danenberg KD, Prenzel KL, Danenberg PV. High expression of HIF1 $\alpha$  is a predictor of clinical outcome in patients with pancreatic ductal adenocarcinomas and correlated to PDGFA, VEGF, and bFGF. *Neoplasia* 2008; 10: 674-679
- 22 Zhu DM, Li DC, Zhang ZX, Zhang XY. Effect of endothelial PAS domain protein 1 and hypoxia inducible factor 1 $\alpha$  on vascular endothelial growth factor expression in human pancreatic carcinoma. *Chin Med J (Engl)* 2008; 121: 2258-2264
- 23 王宏刚, 黄晓丹, 季国忠. EMT的信号通路及microRNA在肿瘤中的研究进展. *世界华人消化杂志* 2010; 18: 3672-3678
- 24 Peinado H, Olmeda D, Cano A. Snail, Zeb and bHLH factors in tumour progression: an alliance against the epithelial phenotype? *Nat Rev Cancer* 2007; 7: 415-428
- 25 Yin T, Wang C, Liu T, Zhao G, Zha Y, Yang M. Expression of snail in pancreatic cancer promotes metastasis and chemoresistance. *J Surg Res* 2007; 141: 196-203
- 26 Cates JM, Byrd RH, Fohn LE, Tatsas AD, Washington MK, Black CC. Epithelial-mesenchymal transition markers in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Pancreas* 2009; 38: e1-e6
- 27 Ruan K, Song G, Ouyang G. Role of hypoxia in the hallmarks of human cancer. *J Cell Biochem* 2009; 107: 1053-1062
- 28 Micalizzi DS, Farabaugh SM, Ford HL. Epithelial-mesenchymal transition in cancer: parallels between normal development and tumor progression. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2010; 15: 117-134
- 29 Iwatsuki M, Mimori K, Yokobori T, Ishi H, Beppu T, Nakamori S, Baba H, Mori M. Epithelial-mesenchymal transition in cancer development and its clinical significance. *Cancer Sci* 2010; 101: 293-299
- 30 Tsuji T, Ibaragi S, Hu GF. Epithelial-mesenchymal transition and cell cooperativity in metastasis. *Cancer Res* 2009; 69: 7135-7139
- 31 Yang MH, Wu MZ, Chiou SH, Chen PM, Chang SY, Liu CJ, Teng SC, Wu KJ. Direct regulation of TWIST by HIF-1 $\alpha$  promotes metastasis. *Nat Cell Biol* 2008; 10: 295-305
- 32 Imai T, Horiuchi A, Wang C, Oka K, Ohira S, Nikaido T, Konishi I. Hypoxia attenuates the expression of E-cadherin via up-regulation of SNAIL in ovarian carcinoma cells. *Am J Pathol* 2003; 163: 1437-1447
- 33 Huang CH, Yang WH, Chang SY, Tai SK, Tzeng CH, Kao JY, Wu KJ, Yang MH. Regulation of membrane-type 4 matrix metalloproteinase by SLUG contributes to hypoxia-mediated metastasis. *Neoplasia* 2009; 11: 1371-1382

编辑 李薇 电编 何基才

# 内镜黏膜下剥离术在早期胃癌治疗中的应用进展

冯倩, 戈之铮

冯倩, 戈之铮, 上海交通大学附属仁济医院消化内科 上海市  
消化疾病研究所 上海市 200001

作者贡献分布: 本文综述由冯倩完成; 戈之铮审核。

通讯作者: 戈之铮, 教授, 主任医师, 200001, 上海市, 上海交通大学附属仁济医院消化内科, 上海市消化疾病研究所。  
zhizhengge@yahoo.com.cn

收稿日期: 2011-05-01 修回日期: 2011-06-18

接受日期: 2011-06-21 在线出版日期: 2011-07-08

## Advances in treatment of early gastric cancer by endoscopic submucosal dissection

Qian Feng, Zhi-Zheng Ge

Qian Feng, Zhi-Zheng Ge, Department of Gastroenterology, Renji Hospital, Shanghai Jiao Tong University; Shanghai Institute of Digestive Disease, Shanghai 200001, China  
Correspondence to: Professor Zhi-Zheng Ge, Department of Gastroenterology, Renji Hospital, Shanghai Jiao Tong University; Shanghai Institute of Digestive Disease, Shanghai 200001, China. zhizhengge@yahoo.com.cn

Received: 2011-05-01 Revised: 2011-06-18

Accepted: 2011-06-21 Published online: 2011-07-08

## Abstract

As a result of the emergence and application of magnifying chromoendoscopy, narrow band imaging, confocal laser endoscopy and the enhancement of the awareness of malignant tumors, more and more people have been diagnosed with gastric cancer at early stages. The postoperative five-year survival rate for early gastric cancer (EGC) can reach as high as 90%. Since the emergence of endoscopic submucosal dissection (ESD), its advantage in the treatment of EGC has become more and more evident due to definite therapeutic effect, less physical trauma, high safety, excellent patient compliance, and low therapeutic cost. This paper focuses on the clinical application of ESD in the management of EGC.

**Key Words:** Endoscopic submucosal dissection; Early gastric cancer; Indication; Contraindication; Clinical therapeutic effect; Complication

Feng Q, Ge ZZ. Advances in treatment of early gastric cancer by endoscopic submucosal dissection. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(19): 2031-2035

## 摘要

随着色素放大内镜、窄带成像技术、共聚焦内镜等的出现和应用, 以及人们对恶性肿瘤认识的提高, 越来越多的胃癌在早期阶段即被发现, 其手术后5年生存率可达90%。自内镜黏膜下剥离术(endoscopic submucosal dissection, ESD)出现以来, 在消化系早期肿瘤中的治疗优势越来越明显。因其治疗效果确切、创伤小、安全性高、患者依从性好、治疗成本低、可完整切除癌灶等而备受各界关注。本文就ESD在早期胃癌(early gastric cancer, EGC)中的临床应用作一综述。

**关键词:** 内镜黏膜下剥离术; 早期胃癌; 适应证; 禁忌证; 临床疗效; 并发症

冯倩, 戈之铮. 内镜黏膜下剥离术在早期胃癌治疗中的应用进展. *世界华人消化杂志* 2011; 19(19): 2031-2035  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/2031.asp>

## 0 引言

早期胃癌(early gastric cancer, EGC)指局限于黏膜或黏膜下的胃癌, 不管局部淋巴结有无转移<sup>[1]</sup>, 其手术后5年生存率可达90%<sup>[2,3]</sup>。近年来随着色素放大内镜、窄带成像技术、共聚焦内镜等的出现和应用, 以及人们对恶性肿瘤认识的提高, 越来越多的胃癌在早期阶段即被发现。在日本, 每年可发现10 000余例EGC, EGC的诊断率更是高达40%-50%<sup>[4]</sup>。此外, 由于内镜下黏膜切除术(endoscopic mucosal resection, EMR)、内镜黏膜下剥离术(endoscopic submucosal dissection, ESD)等内镜治疗技术的出现和发展, 使内镜下治疗EGC成为可能。ESD自1994年在日本应用于临床, 因其治疗效果确切、创伤小、安全性高、患者依从性好、治疗成本低、可完整切除早期病灶并对肿瘤进行分期等优点, 而备受广大医务工作者和患者青睐。本文就ESD在EGC中的临床应用进展作一综述。

## 1 ESD的适应证和禁忌证

目前, 对ESD的指征仍存争议, 总体认为只要无固

## ■背景资料

ESD自1994年在日本应用于临床, 其因其治疗效果确切、创伤小、安全性高、患者依从性好、治疗成本低、可完整切除早期病灶并对肿瘤进行分期等优点, 而备受广大医务工作者和患者青睐。

## ■同行评议者

刘海峰, 教授, 武警总医院消化科

## ■相关报道

Park等的长期临床随访研究亦表明病灶不完全切除会明显增加局部复发风险,而病灶范围大( $\geq 15$  mm)时不完全切除的可能性较大。

有肌层浸润,无淋巴和血行转移,不论病灶位置和大小,均能经ESD切除。根据日本国立癌症中心和日本癌症研究会附属医院对5 265例外科手术切除的EGC术后标本进行的病理分析结果,下列情况时肿瘤发生转移的可能性极小<sup>[5]</sup>: (1)分化型腺癌,浸润深度限于黏膜层(m),不合并溃疡,不论病灶大小; (2)分化型腺癌,浸润深度限于黏膜层,虽合并溃疡,但病灶直径应 $< 3$  cm; (3)分化型腺癌,尽管浸润深度已达黏膜下层浅层(sm1,即黏膜下层上1/3),但不合并溃疡,脉管无转移,病灶直径应 $< 3$  cm; (4)低分化腺癌,不合并溃疡,病灶直径应 $< 2$  cm。目前基本将符合以上条件作为ESD的手术适应证。

因此,在术前对胃癌浸润范围及深度进行准确评估,不仅是开展早期胃癌内镜下治疗的基础,也是决定治疗风险以及预后的关键。除了术者的经验,染色内镜有助于评估肿瘤浸润范围,超声内镜和窄带成像技术等可以协助判断肿瘤浸润深度及有无淋巴结、脉管转移。

除不符上述适应证者外,ESD的禁忌证还包括抬举征(non-lifting sign)阴性,即在病灶基底部的黏膜下层注射生理盐水后局部不能形成有效隆起者。抬举征阴性提示肿瘤可能已浸润至黏膜下层甚至肌层组织,此种情况下行ESD治疗手术风险大,发生穿孔、病变残留及复发等并发症的几率也明显增高,此外心脏、大血管手术后服用抗凝剂、血液病凝血功能障碍者,在凝血功能没有得到纠正前,严禁ESD治疗<sup>[6]</sup>。

## 2 ESD的临床疗效

整块切除是指将病灶一次性完整切除,若因种种原因,不能一次性完整切除,则称之为分块切除,此时须将标本重建以评估疗效<sup>[7]</sup>。根据病灶切缘及基底部有无癌细胞浸润,可分为完全切除、不完全切除和无法评估3种情况<sup>[8]</sup>。若病灶水平切缘及基底部均无癌细胞,则称为完全切除,局部复发的可能性很小;病灶水平切缘或基底部如有癌组织残留则称之为不完全切除,此时局部复发的可能性极大,须及时追加手术;若肿瘤在内镜下被切除,但因为灼烧效应、机械损伤或由于分块切除无法重建标本而无法估计是否为完全切除时则称之为无法评估。若切除标本水平切缘和垂直切缘均无癌细胞浸润、黏膜下浸润深度 $< 500$   $\mu$ m且病理证实无脉管和淋巴结转移则称之为治愈性切除<sup>[9]</sup>,若不满足上述条件或病理发现低分化腺癌、印戒细胞癌,则

称为非治愈性切除<sup>[9]</sup>。

Isomoto等<sup>[10]</sup>报道肿瘤大小是影响病灶能否整块切除的唯一因素,病灶越大,分块切除的可能性越大;在单因素分析中,影响病灶能否治愈性切除的因素包括病灶是否整块切除和是否合并溃疡( $P < 0.001$ ,  $P = 0.05$ ),而多因素分析显示,影响病灶治愈性切除的因素为是否整块切除( $P < 0.001$ )。Oka等<sup>[11]</sup>的研究亦支持合并溃疡将影响ESD对病灶的整块切除,尤其是大于21 mm且合并溃疡的病灶。Lee等<sup>[12]</sup>报道ESD的整块切除率为80%(20/25),根据实施ESD的时间将患者分为A组(2004-2005年,共10例)和B组(2005-2006年,共15例),两组的整块切除率分别为60%、93.3%,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),两组的手术时间差异也有统计学意义( $130.5 \text{ min} \pm 49.7 \text{ min}$  vs  $81.5 \text{ min} \pm 51.8 \text{ min}$ ,  $P < 0.05$ ),提示操作者的熟练程度和经验是影响疗效的重要因素。Isomoto等<sup>[10]</sup>对476例EGC患者的510个病灶进行ESD治疗,其中481个病灶为治愈性切除,29个病灶为非治愈性切除,二者的随访时间分别为29、32 mo,共发现4例局部复发患者,其中1例(1/481, 0.2%)为治愈性分块切除,另3例(3/29, 10.2%)为非治愈性切除,治愈性切除组和非治愈性切除组之间的局部复发率差异有统计学意义( $P < 0.001$ )。4例局部复发患者均通过外科手术切除复发灶,术后病理证实均为黏膜内癌,无淋巴结转移,无脉管转移。该研究同时还发现14例异时胃癌,其中13例为治愈性切除,1例为非治愈性切除,提示即使对治愈性切除患者亦需密切内镜随访。在该临床研究中,EGC ESD术后3年和5年生存率均为100%。此外,ODA的大样本临床研究<sup>[7]</sup>显示,ESD的整块切除率为98%(1 008/1 033),切缘阴性的整块切除率为93%,亚组分析发现较大病灶( $\geq 21$  mm)切缘阴性的整块切除率为86%(271/314),而伴溃疡时为89%(216/243),无法评估率为1.8%(19/1 033);该研究发现病灶切缘无肿瘤细胞的整块切除率与病灶位置、大小以及是否合并溃疡均密切相关,病灶 $\geq 31$  mm、位于胃体上1/3或合并溃疡时,切缘无肿瘤细胞的整块切除率明显降低。而德国的一项队列研究则表明ESD整块切除病灶时其完全切除率仅为25%<sup>[13]</sup>。ESD疗效各地报道不一致,可能与手术方式的选择和操作者的技术水平有关。

ESD用于治疗老年人( $\geq 75$ 岁)EGC的疗效亦得到肯定<sup>[14]</sup>,虽然其整块切除率、完全切除

率均低于非老年人(93.9% vs 97.9%; 87.4% vs 96.6%,  $P < 0.01$ ), 且术后肺炎的发生率亦高于非老年人(2.2% vs 0.0%,  $P < 0.01$ ), 但治愈性切除率两组之间无明显差别(91.5% vs 94.5%,  $P > 0.01$ ), 并发症如出血、穿孔的发生率亦无明显差别(2.5% vs 2.5%; 5.0% vs 3.5%,  $P > 0.01$ ), 更主要的是, 老年人组和非老年人组的3年和5年生存率均无明显差别(98.4% vs 98.6%; 98.4% vs 96.6%,  $P > 0.01$ ), 老年组3年和5年胃癌相关的死亡率均为0。

ESD不仅可用于治疗原发EGC, 亦可用以内镜下治疗后复发的EGC患者。据报道EMR后EGC的复发率为2%-35%<sup>[15]</sup>。但是由于EMR术后黏膜下纤维瘢痕的形成影响黏膜下注射后复发病灶的抬起, 重复EMR很难达到治愈性切除复发病灶的目的, 而黏膜下纤维灶的形成并不影响ESD的实施和疗效。Yokoi等<sup>[16]</sup>报道, ESD对EMR术后局部复发的EGC的整块切除率为89%(41/46), 而EMR为0%(0/18), 整块切除的标本和分块切除的标本中无法评估边缘有无肿瘤细胞浸润的比率分别为2.4%、43.4%(1/41 vs 10/23,  $P < 0.001$ ), 而整块切除有助于精确估计肿瘤分期, 防止肿瘤残余和复发; ESD组和EMR组可准确估计病灶是否为治愈性切除的比率分别为97%、44%(45/46 vs 8/18), 两组的治愈性切除率分别为76%、33%(35/46 vs 6/18,  $P < 0.001$ ), 复发率则为0%、17%(0/46 vs 3/18), ESD治愈的35例和EMR治愈的6例局部复发早期胃癌在随访期内(15-63 mo, 中位时间43 mo)均未发现转移。

### 3 并发症

**3.1. 出血** 出血是ESD治疗过程中最常见的并发症, 资料表明约7%的ESD患者会发生出血<sup>[7]</sup>, 包括术中出血和术后出血, 前者指术中需要内镜下进行治疗(如钛夹或喷洒凝血药)的出血, 将后者定义为术后0-30 d需要输血或手术干预的出血以及术后血红蛋白较术前降低2 g/dL者<sup>[17]</sup>, 多表现为呕血或黑便, 即延迟性出血, 绝大多数的延迟性出血发生于ESD术后12 h内<sup>[18]</sup>。研究表明无经验术者、胃窦处病灶以及应用抗凝药、抗血小板药是ESD术后出血的危险因素, ESD术后溃疡边缘的出血与无经验术者的操作密切相关<sup>[19]</sup>。Okada等<sup>[20]</sup>的研究表明单因素和多因素分析均显示切除标本的宽度( $\geq 40$  mm)和延迟性出血密切相关, 其中切除标本宽度和病灶位于下1/3胃是早期延迟性出血(即术后4 d或4 d内)的影响因

素, 而切除标本宽度、病灶位于中1/3胃、高血压和体质指数 $\geq 25$  kg/m<sup>2</sup>与晚期延迟性出血(即术后5 d后)相关, 而病灶位于中上2/3胃的患者平均出血时间迟于病灶位于下1/3的患者(8 d vs 2 d)。

为了减少手术过程中和术后出血, 术前2 wk应停用抗凝药和抗血小板药。由于血凝块的形成、溶解及胃蛋白酶的活性均与胃酸的pH值密切相关, 因此抑酸亦很重要。研究发现内镜下止血后胃酸pH $>6$ 时再出血率明显降低<sup>[21]</sup>, 因此ESD术前应常规使用质子泵抑制剂(proton pump inhibitor, PPI)或H<sub>2</sub>受体拮抗剂以提高胃内pH值。减少出血的另一关键是将收缩压控制在150 mmHg以下, 高血压患者血压控制不佳时其出血较血压控制良好者( $<150$  mmHg)及血压正常者多<sup>[22]</sup>。为防止术后出血, 对ESD术后形成的人工溃疡灶需充分止血, 止血的方法包括钛夹夹闭显露血管、APC、热探头疗法等。

**3.2 穿孔** 据报道ESD术后穿孔率为1%-4%<sup>[18]</sup>, 穿孔的诊断依赖于内镜发现及术后的腹部平片或CT检查。小的穿孔可通过内科保守治疗解决, 如禁食、放置胃管、给予有效抗生素以及内镜下钛夹夹闭等。延迟穿孔常发生于ESD术后1-2 d, 原因尚不明确, 研究表明糖尿病患者血糖控制不佳、妊娠、病灶位于解剖连接处、术中电凝使用过度等均是产生延迟穿孔的危险因素<sup>[23]</sup>。Mannen等<sup>[24]</sup>的大规模临床研究表明, 单因素方差分析显示EGC的位置(病灶位于上1/3胃时穿孔率为8.0%, 中1/3(5.3%), 下1/3(0.5%),  $P = 0.00004$ )、ESD操作时间( $\leq 2$  h: 1.0%, 2-4 h: 15.7%,  $>4$  h: 5.3%,  $P < 0.0001$ )与穿孔密切相关, 而并发缺血性心脏病、脑血管疾病、慢性肝功能不全、慢性肾功能不全、高血压、糖尿病等并不是ESD穿孔的危险因素。多因素回归分析显示, 过长的ESD操作时间( $\geq 2$  h:  $OR = 14.1$ ,  $P < 0.0001$ )是ESD穿孔的独立危险因素, 且病灶位于下1/3时穿孔率相对较低( $OR = 0.15$ ,  $P = 0.069$ )。有研究表明使用透明质酸钠作为注射剂可以减少穿孔率<sup>[25,26]</sup>。

**3.3 肿瘤复发** Takenaka等<sup>[27]</sup>分析了225例ESD治疗的EGC, 177例完全切除病例无1例复发, 而48例不完全切除病例中有7例复发, 统计学分析显示不完全切除和局部复发密切相关, 而与不完全切除密切相关的因素包括肿瘤直径 $>3$  cm、肿瘤位于中上2/3胃以及肿瘤伴溃疡形成, 与局部复发相关的肿瘤因素包括大小( $>30$  mm vs  $<20$

### ■应用要点

本文阐述了ESD治疗EGC的适应证、禁忌证、临床疗效、并发症、术后处理、术后随访以及ESD的优点(与外科手术比较), 有利于系统地了解ESD在EGC治疗中的应用进展。



## ■同行评价

本文内容全面,可读性好,具有一定的科学性,对临床工作具有较好的指导意义。

mm)和病变部位(上1/3 vs 中下1/3)。分析其原因可能与此类病灶更易导致非治愈性切除有关。Park等<sup>[28]</sup>的长期临床随访研究亦表明病灶不完全切除会明显增加局部复发风险,而病灶范围大( $\geq 15$  mm)时不完全切除的可能性较大。然而研究表明多数复发肿瘤为黏膜内癌,可通过ESD或EMR进行再切除<sup>[10]</sup>。

**3.4 狭窄** 狭窄常发生于病变超过幽门或幽门前区的3/4周径的患者,此时需要进行早期干预以防止流出道梗阻。通常在ESD术后1 wk起用球囊或探条对病灶部位进行扩张,扩张需要重复几次直至病变处人工溃疡愈合<sup>[7]</sup>。

## 4 ESD术后处理

如果没有出血、穿孔等并发症,患者术后第2天即可进流食。术后常规应用抑酸药以缓解疼痛、促进溃疡愈合、减少术后出血。一项研究表明PPI在预防出血方面优于 $H_2R$ 拮抗剂<sup>[29]</sup>。ESD后的人造溃疡不论大小和部位8 wk内都能愈合,因此抗溃疡治疗亦可在8 wk内完成,这一时间窗也符合普通消化性溃疡允许的期限<sup>[30]</sup>。除了抑酸治疗外,亦可根据具体情况相应给予预防感染和止血输液处理。

## 5 ESD的术后随访

术后第1、3、6、12 mo分别进行胃镜随访,之后每年随访1次,随访时在ESD术后瘢痕处以及可疑病灶处取活检,以明确有无肿瘤复发和异时胃癌。此外,为明确有无淋巴结以及远处转移,每年均需进行腹部增强CT、B超以及胸片检查<sup>[7]</sup>。资料表明,非治愈性切除患者复发比例较高,对于此类患者至少需密切随访2年。

## 6 ESD的优点

ESD与外科手术比较,EGC外科手术治愈率可达90%-100%<sup>[31]</sup>,2年和5年的存活率分别为100%、100%<sup>[31]</sup>,而ESD术后2年和5年存活率分别为100%、95%<sup>[31]</sup>,但研究表明手术所致的死亡率达1.7%-11.4%<sup>[32,33]</sup>,且手术并发症较多,如住院时间长、伤口感染、麻醉风险和死亡,尤其对高龄患者和伴发严重肾功能不全、心功能不全的患者风险更大。与外科手术相比,ESD安全性高、创伤小、治疗成本低、患者依从性好,且对患者生活质量影响小。对于高龄患者或因合并其他系统疾病无法耐受外科手术的患者,ESD不失为一种较外科手术更好的方法。Forhat等<sup>[34]</sup>报道1例78岁伴手术禁忌证即严重心肌病(包括

心律失常、心梗、心衰)患者,经ESD完整整块切除肿瘤,术后随访30 mo未发现局部复发和远处转移。Tada等<sup>[35]</sup>的研究表明ESD和外科手术治疗早期胃癌后的5年和10年存活率无明显差异。

## 7 结论

随着早期消化系肿瘤诊断水平的不断提高、ESD专用器械的开发和改良、ESD操作培训机制的建立以及医师对ESD操作过程的进一步熟练,ESD在治疗消化系早期肿瘤方面会显示出其更加广阔的前景。

## 8 参考文献

- 1 Sano T, Sasako M, Kinoshita T, Maruyama K. Recurrence of early gastric cancer. Follow-up of 1475 patients and review of the Japanese literature. *Cancer* 1993; 72: 3174-3178
- 2 Okamura T, Tsujitani S, Korenaga D, Haraguchi M, Baba H, Hiramoto Y, Sugimachi K. Lymphadenectomy for cure in patients with early gastric cancer and lymph node metastasis. *Am J Surg* 1988; 155: 476-480
- 3 Sue-Ling HM, Martin I, Griffith J, Ward DC, Quirke P, Dixon MF, Axon AT, McMahon MJ, Johnston D. Early gastric cancer: 46 cases treated in one surgical department. *Gut* 1992; 33: 1318-1322
- 4 Shimizu S, Tada M, Kawai K. Early gastric cancer: its surveillance and natural course. *Endoscopy* 1995; 27: 27-31
- 5 陈洪, 诸葛宇征, 刘顺英. 内镜黏膜下剥离术治疗早期胃癌. *中华消化内镜杂志* 2006; 23: 398-400
- 6 姚礼庆, 周平红. 内镜黏膜下剥离术治疗结肠病变. *中华胃肠外科杂志* 2007; 10: 316-317
- 7 Oda I, Gotoda T, Hamanaka H, Eguchi T, Saito Y, Matsuda T, Bhandari P, Emura F, Saito D, Ono H. Endoscopic submucosal dissection for early gastric cancer: technical feasibility, operation time and complications from a large consecutive series. *Dig Endosc* 2005; 17: 54-58
- 8 Ono H. Early gastric cancer: diagnosis, pathology, treatment techniques and treatment outcomes. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2006; 18: 863-866
- 9 Gotoda T, Yanagisawa A, Sasako M, Ono H, Nakanishi Y, Shimoda T, Kato Y. Incidence of lymph node metastasis from early gastric cancer: estimation with a large number of cases at two large centers. *Gastric Cancer* 2000; 3: 219-225
- 10 Isomoto H, Shikuwa S, Yamaguchi N, Fukuda E, Ikeda K, Nishiyama H, Ohnita K, Mizuta Y, Shiozawa J, Kohno S. Endoscopic submucosal dissection for early gastric cancer: a large-scale feasibility study. *Gut* 2009; 58: 331-336
- 11 Oka S, Tanaka S, Kaneko I, Mourir R, Hirata M, Kanao H, Kawamura T, Yoshida S, Yoshihara M, Chayama K. Endoscopic submucosal dissection for residual/local recurrence of early gastric cancer after endoscopic mucosal resection. *Endoscopy* 2006; 38: 996-1000
- 12 Lee IL, Wu CS, Tung SY, Lin PY, Shen CH, Wei KL, Chang TS. Endoscopic submucosal dissection for early gastric cancers: experience from a new endoscopic center in Taiwan. *J Clin Gastroenterol* 2008; 42: 42-47

- 13 Rösch T, Sarbia M, Schumacher B, Deinert K, Frimberger E, Toerner T, Stolte M, Neuhaus H. Attempted endoscopic en bloc resection of mucosal and submucosal tumors using insulated-tip knives: a pilot series. *Endoscopy* 2004; 36: 788-801
- 14 Isomoto H, Ohnita K, Yamaguchi N, Fukuda E, Ikeda K, Nishiyama H, Akiyama M, Ozawa E, Nakao K, Kohno S, Shikuwa S. Clinical outcomes of endoscopic submucosal dissection in elderly patients with early gastric cancer. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2010; 22: 311-317
- 15 Gotoda T. Endoscopic resection of early gastric cancer: the Japanese perspective. *Curr Opin Gastroenterol* 2006; 22: 561-569
- 16 Yokoi C, Gotoda T, Hamanaka H, Oda I. Endoscopic submucosal dissection allows curative resection of locally recurrent early gastric cancer after prior endoscopic mucosal resection. *Gastrointest Endosc* 2006; 64: 212-218
- 17 Oka S, Tanaka S, Kaneko I, Mouri R, Hirata M, Kawamura T, Yoshihara M, Chayama K. Advantage of endoscopic submucosal dissection compared with EMR for early gastric cancer. *Gastrointest Endosc* 2006; 64: 877-883
- 18 Tanaka M, Ono H, Hasuike N. Endoscopic submucosal dissection of early gastric cancer. *Digestion* 2008; 77 (suppl 1): 23-28
- 19 Tsuji Y, Ohata K, Ito T, Chiba H, Ohya T, Gunji T, Matsuhashi N. Risk factors for bleeding after endoscopic submucosal dissection for gastric lesions. *World J Gastroenterol* 2010; 16: 2913-2917
- 20 Okada K, Yamamoto Y, Kasuga A, Omae M, Kubota M, Hirasawa T, Ishiyama A, Chino A, Tsuchida T, Fujisaki J, Nakajima A, Hoshino E, Igarashi M. Risk factors for delayed bleeding after endoscopic submucosal dissection for gastric neoplasm. *Surg Endosc* 2011; 25: 98-107
- 21 Julapalli VR, Graham DY. Appropriate use of intravenous proton pump inhibitors in the management of bleeding peptic ulcer. *Dig Dis Sci* 2005; 50: 1185-1193
- 22 Fujishiro M, Yahagi N, Kakushima N, Kodashima S, Muraki Y, Tateishi A, Omata M. Management of bleeding concerning endoscopic submucosal dissection with the flex knife for stomach neoplasm. *Dig Endosc* 2006; 18 (Suppl 1): S119-S122
- 23 Kakushima N, Fujishiro M. Endoscopic submucosal dissection for gastrointestinal neoplasms. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 2962-2967
- 24 Mannen K, Tsunada S, Hara M, Yamaguchi K, Sakata Y, Fujise T, Noda T, Shimoda R, Sakata H, Ogata S, Iwakiri R, Fujimoto K. Risk factors for complications of endoscopic submucosal dissection in gastric tumors: analysis of 478 lesions. *J Gastroenterol* 2010; 45: 30-36
- 25 Yamamoto H, Kawata H, Sunada K, Satoh K, Kaneko Y, Ido K, Sugano K. Success rate of curative endoscopic mucosal resection with circumferential mucosal incision assisted by submucosal injection of sodium hyaluronate. *Gastrointest Endosc* 2002; 56: 507-512
- 26 Fujishiro M, Yahagi N, Nakamura M, Kakushima N, Kodashima S, Ono S, Kobayashi K, Hashimoto T, Yamamichi N, Tateishi A, Shimizu Y, Oka M, Ogura K, Kawabe T, Ichinose M, Omata M. Successful outcomes of a novel endoscopic treatment for GI tumors: endoscopic submucosal dissection with a mixture of high-molecular-weight hyaluronic acid, glycerin, and sugar. *Gastrointest Endosc* 2006; 63: 243-249
- 27 Takenaka R, Kawahara Y, Okada H, Hori K, Inoue M, Kawano S, Tanioka D, Tsuzuki T, Yagi S, Kato J, Uemura M, Ohara N, Yoshino T, Imagawa A, Fujiki S, Takata R, Yamamoto K. Risk factors associated with local recurrence of early gastric cancers after endoscopic submucosal dissection. *Gastrointest Endosc* 2008; 68: 887-894
- 28 Park JC, Lee SK, Seo JH, Kim YJ, Chung H, Shin SK, Lee YC. Predictive factors for local recurrence after endoscopic resection for early gastric cancer: long-term clinical outcome in a single-center experience. *Surg Endosc* 2010; 24: 2842-2849
- 29 Uedo N, Takeuchi Y, Yamada T, Ishihara R, Ogiyama H, Yamamoto S, Kato M, Tatsumi K, Masuda E, Tamai C, Yamamoto S, Higashino K, Iishi H, Tatsuta M. Effect of a proton pump inhibitor or an H2-receptor antagonist on prevention of bleeding from ulcer after endoscopic submucosal dissection of early gastric cancer: a prospective randomized controlled trial. *Am J Gastroenterol* 2007; 102: 1610-1616
- 30 邱枫, 金小越. 内镜粘膜下层剥离术后胃壁人造溃疡的愈合过程. *新疆医学* 2006; 36: 16-19
- 31 Kim HS, Lee DK, Baik SK, Kim JM, Kwon SO, Kim DS, Cho MY. Endoscopic mucosal resection with a ligation device for early gastric cancer and precancerous lesions: comparison of its therapeutic efficacy with surgical resection. *Yonsei Med J* 2000; 41: 577-583
- 32 Siewert JR, Böttcher K, Roder JD, Busch R, Hermanek P, Meyer HJ. Prognostic relevance of systematic lymph node dissection in gastric carcinoma. German Gastric Carcinoma Study Group. *Br J Surg* 1993; 80: 1015-1018
- 33 Park DJ, Lee HJ, Kim HH, Yang HK, Lee KU, Choe KJ. Predictors of operative morbidity and mortality in gastric cancer surgery. *Br J Surg* 2005; 92: 1099-1102
- 34 Farhat S, Coriat R, Audard V, Leblanc S, Prat F, Chaussade S. Is Endoscopic Submucosal Dissection the Option for Early Gastric Cancer Patients with Contraindication to Surgery? *Case Rep Gastroenterol* 2010; 4: 307-312
- 35 Tada M, Tanaka Y, Matsuo N, Shimamura T, Yamaguchi K. Mucosectomy for gastric cancer: current status in Japan. *J Gastroenterol Hepatol* 2000; 15 Suppl: D98-D102

编辑 李军亮 电编 何基才

# 脂联素在非酒精性脂肪肝中的作用及机制

张征波, 孙晓琦, 钱斐, 薛博瑜

## ■背景资料

非酒精性脂肪肝的发病机制主要与胰岛素抵抗、氧化应激及炎症等相关。研究发现脂肪组织分泌的脂肪因子参与了非酒精性脂肪肝整个病程。因此目前对脂肪因子及其相互作用的研究是一大热点。而脂肪因子之一的脂联素与NAFLD发病机制关系更为密切。脂联素具有抗脂质沉积、抗炎、抗脂质过氧化的作用。

## ■同行评议者

高泽立, 主任医师, 上海交通大学医学院附属第九人民医院周浦分院消化科

张征波, 孙晓琦, 钱斐, 薛博瑜, 南京中医药大学第一临床医学院 江苏省南京市 210046

江苏省科技计划基金资助项目, No. BS2002036

作者贡献分布: 本文综述由张征波、孙晓琦及钱斐完成; 薛博瑜审校。

通讯作者: 薛博瑜, 教授, 主任中医师, 博士生导师, 210046, 江苏省南京市, 南京中医药大学第一临床医学院。

xueboyu9502@sina.com.cn

收稿日期: 2011-04-30 修回日期: 2011-06-19

接受日期: 2011-06-21 在线出版日期: 2011-07-08

## Role of adiponectin in the pathogenesis and treatment of nonalcoholic fatty liver disease

Zheng-Bo Zhang, Xiao-Qi Sun, Fei Qian, Bo-Yu Xue

Zheng-Bo Zhang, Xiao-Qi Sun, Fei Qian, Bo-Yu Xue, the First Clinical Medical College, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210046, Jiangsu Province, China  
Supported by: the Science and Technology Project of Jiangsu Province, No. BS2002036

Correspondence to: Professor Bo-Yu Xue, the First Clinical Medical College, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210046, Jiangsu Province, China. xueboyu9502@sina.com.cn

Received: 2011-04-30 Revised: 2011-06-19

Accepted: 2011-06-21 Published online: 2011-07-08

## Abstract

Adiponectin is an insulin-sensitizing adipokine possessing multiple beneficial effects on non-alcoholic fatty liver disease. This adipokine is secreted from adipocytes into the circulation as three oligomeric isoforms: trimer, hexamer and the high molecular weight (HMW) oligomeric complex. Adiponectin binds to its receptor to exert its effects on target organs. The hepatoprotective activities of adiponectin have been demonstrated by many clinical and experimental studies. Decreased level of serum adiponectin represents an independent risk factor for (NAFLD and liver dysfunction in humans. In animals, elevation of circulating adiponectin by either pharmacological or genetic approaches leads to a significant alleviation of hepatomegaly, steatosis and necro-inflammation associated with various liver diseases. In adiponectin knockout mice, there is a pre-existing condition of hepatic steatosis and mitochondrial dysfunction, which might contribute to increased

vulnerability of these mice to secondary liver injuries induced by obesity and other conditions. This review aims to summarize the recent advances in research of the structural, molecular and cellular mechanisms underlying the hepatoprotective properties of adiponectin.

**Key Words:** Adiponectin; Nonalcoholic fatty liver disease; Nonalcoholic steatohepatitis; Insulin resistance

Zhang ZB, Sun XQ, Qian F, Xue BY. Role of adiponectin in the pathogenesis and treatment of nonalcoholic fatty liver disease. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(19): 2036-2042

## 摘要

脂联素是由脂肪细胞分泌的胰岛素敏感性脂肪因子, 其对非酒精性脂肪肝病(NAFLD)有多种有益作用。在循环中脂联素有3种低聚亚型, 包括三聚体、六聚体及高分子量低聚复合物。脂联素通过与靶器官上脂联素受体结合来发挥效应, 其保肝作用已经在临床和实验室研究中证明。脂联素的下降是NAFLD及肝脏功能损害的独立危险因素。在动物实验中, 通过药物或基因疗法使循环中的脂联素增高可导致肝肿大、脂肪变、坏死炎症及其相关肝脏疾病。脂联素敲除的小鼠, 会发生肝脂肪变和线粒体功能损害, 这致使小鼠易于遭受脂肪肝病的二次打击。本文旨在综述近年来对于脂联素在NAFLD中的保肝作用及机制的研究成果。

**关键词:** 脂联素; 非酒精性脂肪肝; 非酒精性脂肪性肝炎; 胰岛素抵抗

张征波, 孙晓琦, 钱斐, 薛博瑜. 脂联素在非酒精性脂肪肝中的作用及机制. *世界华人消化杂志* 2011; 19(19): 2036-2042

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/2036.asp>

## 0 引言

在许多国家非酒精性脂肪肝(nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD)是最普遍的慢性肝脏损伤之一<sup>[1,2]</sup>。NAFLD包括了从单纯肝脂肪变性, 非酒精性脂肪性肝炎(nonalcoholic steatohepatitis,

NASH), 到肝纤维化, 肝硬化以及肝细胞癌等一系列的疾病过程<sup>[3]</sup>. 在西方国家其总发病率达15%-40%, 在亚洲达到9%-40%<sup>[4]</sup>, 并且本病的发病率在过去15年里大幅提高, 主要是因为其与肥胖、2型糖尿病这两大世界性流行病密切相关<sup>[5]</sup>. NAFLD患者的死亡率明显高于年龄及性别相关的普通人群<sup>[6]</sup>. 本病进展到NASH及肝硬化的过程很缓慢, 并且只有一小部分患者能发展到致命的肝脏疾病. 多数NAFLD病例中, 代谢性及心血管疾病的发病率增加的危险性要比肝脏疾病大得多<sup>[7,8]</sup>. 事实上, NAFLD是代谢综合征的肝脏表现, 与胰岛素抵抗有关的心血管危险因素, 包括肥胖、高血压、血脂异常及2型糖尿病<sup>[9]</sup>并称为代谢综合征. NAFLD与代谢综合征的关系在很多横向、前瞻性研究中被证实<sup>[8]</sup>. NAFLD显著增加糖尿病的危险性, 并且他比肥胖本身更能预示代谢异常的进展<sup>[10]</sup>. 最近的研究揭示了NAFLD与多数心血管疾病危险因素之间的关系<sup>[7]</sup>. NAFLD能独立于包括代谢综合征组分在内的其他预后因素而预示心血管疾病的发展. 增加对这一疾病的理解以及研究其治疗方法在临床实践中是一个重要问题.

## 1 NAFLD的发病机制

尽管NAFLD的发病机制在很大程度上未被完全了解, 但现在认为胰岛素抵抗、氧化应激及炎症在本病的发展过程中起着重要的作用<sup>[11,12]</sup>. 脂肪肝本身就是一种胰岛素抵抗的状态. 肝脏脂质的积聚能导致肝脏胰岛素抵抗, 而这种肝胰岛素抵抗可能发生在外周胰岛素效应的改变之前, 也可能诱导外周胰岛素抵抗<sup>[13,14]</sup>. 胰岛素通过其敏感器官, 如肝脏、骨骼肌及脂肪组织调节营养物质的摄取、氧化和储存. 外周胰岛素抵抗损害了机体从血液摄取葡萄糖进入骨骼肌和脂肪组织的能力; 血清中的游离脂肪酸也可能因为胰岛素抑制脂肪分解的失败而增高<sup>[15,16]</sup>. 在肝脏, 胰岛素抵抗与肝细胞内的脂肪代谢产物(酯酰辅酶A, 二酰甘油、神经酰胺等)含量增加有关<sup>[17-19]</sup>. 在血液循环中游离脂肪酸增加的前提下, 因胰岛素抵抗而产生的高胰岛素血症增强了肝脏脂肪酸的摄取及脂质的生成<sup>[1,20]</sup>. 另外, 线粒体 $\beta$ 氧化的缺陷, 脂肪酸合成的增强以及富含三酰甘油的极低密度脂蛋白(very low density lipoprotein, VLDL)的分泌缺陷都是肝脏脂质沉积的原因<sup>[21-23]</sup>. 越来越多的动物模型证据证实了二次打击学说是NAFLD进展的机制<sup>[24-26]</sup>. 这一学

说认为, 第1次打击是指脂肪肝(脂肪沉积), 紧接着导致了脂肪性肝炎; 潜在的第2次打击包括内毒素、酒精消耗、病毒感染等, 而这些打击增加了肝脏脂质的沉积, 并导致肝细胞的损伤, 增加肝脏氧化应激和炎症. 脂毒性和细胞因子、促炎因子的释放在这一过程中有重要作用. 此外, 脂肪性肝炎中的炎症发展能进一步妨碍胰岛素信号通路<sup>[27]</sup>. 组织学上, 脂肪性肝炎表现为肝细胞核气球样变性, 肝细胞凋亡, 马洛里玻璃样变和炎症病灶<sup>[28]</sup>. NAFLD患者循环中游离脂肪酸水平很高, 且与肝脏疾病严重程度关联度很高. 游离脂肪酸的超载通过诱导促炎因子如TNF- $\alpha$ 而表现出脂毒性<sup>[29]</sup>.

## 2 脂联素与NAFLD相关性

最近的研究显示, 内脏脂肪组织是与代谢及炎症相关的组织, 能起到传递信息及调节大脑、肝脏、肌肉和心血管系统的功能及代谢的作用<sup>[30,31]</sup>. 脂肪组织分泌的促炎和抗炎脂肪因子间的平衡失调有助于NAFLD的发病<sup>[32]</sup>. 对脂肪组织内分泌、免疫、炎症的相互作用的调控可能为NAFLD的治疗提供新的治疗靶点. 如, 患严重营养不良的患者注射了瘦素后可逆转NAFLD<sup>[33,34]</sup>. 然而, 在NAFLD伴肥胖的情况下, 血清瘦素升高并且肝脏对瘦素的抗脂质沉积作用产生耐受<sup>[35-37]</sup>. 因此瘦素的注射不太可能成为NAFLD患者的有效疗法. 肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor  $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )这一促炎因子干扰胰岛素的信号通路, 促进脂质沉积, 可能在NASH发病过程中有临时性作用<sup>[32]</sup>. 循环中的TNF- $\alpha$ 含量及肝脏表达的1型受体在NASH时增高, 但这不能用来区分脂肪性肝炎和脂肪变性<sup>[38-40]</sup>. 中和TNF- $\alpha$ 的活性能改善动物的脂肪肝<sup>[41]</sup>. 相反的, 在实验性TNF- $\alpha$ 及其1型受体敲除的小鼠中营养性的脂肪性肝炎仍然能产生. 这表明这一脂肪因子可能不是NAFLD必不可少的调节因子<sup>[42,43]</sup>.

与瘦素和TNF- $\alpha$ 相比, 脂联素与NAFLD发病机制关系更为密切. 与其他细胞因子不同, 血清脂联素水平与肥胖及其并发症负相关<sup>[44]</sup>, 且与肝酶水平亦呈负相关<sup>[45]</sup>. 大量的在不同族群间的流行病学调查显示, 脂联素水平降低是NAFLD及肝功能障碍的独立危险因素. 与健康人群相比, NASH患者的脂联素水平至少降低50%以上<sup>[46]</sup>. 从单纯脂质沉积到脂肪性肝炎的发病过程中, 脂联素的表达下降了20%-40%<sup>[46,47]</sup>. 更重要的是, 在NASH患者中较低的脂联素水平

■研究前沿  
脂肪因子脂联素调节非酒精性脂肪肝发病过程中脂质代谢, 炎症及脂质过氧化的机制是目前的研究热点.



## ■相关报道

在脂联素与NAFLD的相关性研究中, Hui发现脂联素水平降低是NAFLD及肝功能障碍的独立危险因素. Xu等通过动物研究发现, 在酒精饮料和非酒精性脂肪性肝炎的动物模型, 外源性脂联素降低肝肿大, 消耗脂肪的积累, 抑制肝脏炎症, 降低肝肿瘤坏死因子的表达及血浆浓度.

预示着更严重的炎症程度, 表明脂联素缺乏是脂肪肝, 脂肪性肝炎和肝损伤等发展的重要危险因素<sup>[46-49]</sup>. 在2型糖尿病患者中, 血浆脂联素浓度与肝脏脂肪含量呈负相关<sup>[50]</sup>. 动物研究表明, 脂联素具有对各种形式的肝损伤, 包括由CCl<sub>4</sub>诱导、LPS/D-半乳糖胺、药物、胆管结扎及蛋氨酸缺乏饮食所引起的肝损有很强的保护能力<sup>[51-55]</sup>. 在酒精饮料和NASH的动物模型, 外源性脂联素降低肝肿大, 消耗脂肪的积累, 抑制肝脏炎症, 降低肝TNF的表达及血浆浓度<sup>[56]</sup>. 脂联素基因敲除小鼠表现出一种增强的CCl<sub>4</sub>所致的肝纤维化. 脂联素的表达缺乏可能会加速肝肿瘤在NASH模型的小鼠体内的形成<sup>[57]</sup>. 在众多的脂肪因子中, 脂联素由于具有胰岛素敏感增敏及抗炎作用, 因此他可能成为治疗NAFLD的新方法.

## 3 脂联素治疗NAFLD的机制

**3.1 脂联素及其受体的结构和功能** 脂联素是脂肪细胞分泌的由244个氨基酸组成的蛋白质, 在血浆中以低分子量和高分子量多聚体形式存在. 脂联素有AdipoR1和AdipoR2两种受体, 他们的结构高度相关, 有66.7%的同源性, 均为包含7个跨膜区域的蛋白质, 两种受体在多种组织器官都有表达<sup>[58]</sup>, 但主要分布于肌细胞和肝组织, AdipoR1主要分布于骨骼肌, AdipoR2主要分布于肝脏<sup>[59]</sup>. 脂联素与其受体结合后, 发挥多种重要的生物学作用. 脂联素具有抗糖尿病、抗肥胖、抗动脉粥样硬化及抗炎效应, 可以减少体脂肪并且改善肝脏和外周的胰岛素敏感性. 最近几个实验室通过AdipoR1/2基因敲除小鼠对AdipoR1和AdipoR2的生理作用进行研究, AdipoR1/2基因敲除小鼠表现出轻微的胰岛素抵抗. 在AdipoR1/R2双敲除小鼠, 脂联素与受体结合能力和活性下降, 从而增加组织中三酰甘油含量, 导致炎症和氧化应激. 这些数据支持在葡萄糖和脂质代谢的调节中脂联素及其受体AdipoR1和AdipoR2的生理作用.

**3.2 脂联素抗肝脂肪沉积功能的受体后信号转导机制** 在骨骼肌、肝脏、心脏、内皮、脂肪细胞、脑等主要靶器官, 脂联素激活AMP激活蛋白激酶(AMP-activated protein kinase, AMPK)<sup>[60-65]</sup>. 值得注意的是, 在这些靶组织脂联素大多数生物效应被AMPK显性负性形态的表达所抑制, 这表明AMPK在调节脂联素活性上决定性的作用. APPL1是一种含有PH结构域衔接

蛋白, 拥有磷酸结合域和亮氨酸拉链基序, 他是一种关键的信号分子, 使脂联素与脂联素受体结合及激活下游的AMPK<sup>[66]</sup>. 脂联素增强APPL1同时结合AdipoR1和AdipoR2的能力, 这些反应能关键性的磷酸化和激活AMPK. 研究还表明, APPL1在代谢综合征的重要作用<sup>[67,68]</sup>, AMPK活化后紧接着磷酸化乙酰辅酶A羧化酶(ACC)并抑制其活性. 抑制ACC活性会抑制脂质合成, 并且通过阻断丙二酰CoA、CPT-1(脂肪酸氧化的限速酶)的生产增强脂肪酸氧化. 此外, 激活的AMPK下调固醇调节元件结合蛋白1c的表达(SREBP1c), 后者调节胆固醇和脂质合成. 下调的SREBP1c使在脂肪生成过程中涉及的基因下调, 这些基因包括ACC, 脂肪酸合成酶(FAS), 以及甘油三磷酸酰基转移酶(GPAT)等<sup>[63,69,70]</sup>.

PPAR $\alpha$ 是一种转录因子控制编码脂肪酸氧化酶的基因的转录, 包括FATP, 酰基辅酶A氧化酶(ACOX)和长链酰基辅酶A合成酶(LCAS). 脂联素通过PPAR $\gamma$ 共激活剂PGC-1刺激PPAR $\alpha$ 的活性<sup>[71]</sup>. 这些信号通路为脂联素所介导而导致脂肪氧化增强, 从而降低脂质合成及防治脂肪肝. 以上这些是脂联素介导对NAFLD脂代谢方面的调节, 从脂肪的氧化及脂肪酸的合成环节脂联素是重要的调控因子, 而上调体内脂联素及肝脏脂联素受体的表达, 从而通过AMPK这一中介调控下游转录因子, 调控所涉及各脂代谢酶, 最终达到调控肝脏脂质代谢平衡的目的.

**3.3 脂联素在NAFLD中的抗炎抗、抗纤维化作用** 炎症细胞因子在肝脏出现大规模或局灶性肝损伤时, 对肝脏炎症, 肝细胞死亡, 纤维化, 以及再生进行调节<sup>[72]</sup>. 脂联素水平与某些炎症介质负相关, 包括IL-6和C-反应蛋白, 与抗炎因子正相关, 如IL-10<sup>[73,74]</sup>. 他通过抑制TNF- $\alpha$ 的表达和抑制其活性, 对抗其在肝脏的功能<sup>[55,56,75,76]</sup>. 在肝脏, 细胞因子如白介素-6(interleukin-6, IL-6)和TNF, 主要产自Kupffer细胞和肝星状细胞(hepatic stellate cells, HSC), 部分来自炎症肝细胞<sup>[77,78]</sup>. 脂联素可通过抑制Kupffer细胞活化HSC, 改善NASH和肝纤维化. 在来源于猪血的巨噬细胞中, 脂联素抑制由LPS诱导的TNF- $\alpha$ 和IL-6的产生, 而诱导IL-10的表达. 脂联素部分通过介导减弱NF- $\kappa$ B的核易位弱化炎症细胞因子的产生, 而这一过程是通过IKK-b/NF- $\kappa$ B通路来实现的<sup>[79]</sup>. 脂联素也可以诱导抗炎细胞因子IL-1受体拮抗剂(interleukin-1-receptor antagonist, IL-1RA)的表达<sup>[80,81]</sup>. 脂联素的抗炎作用也可能涉及巨噬细胞

Toll样受体4(Toll-like receptor-4, TLR-4)信号转导通路<sup>[82]</sup>.

肝脏损伤过程中星状细胞向肌成纤维细胞转化是纤维化的关键步骤. 被激活的星状细胞增加细胞外基质的积聚. 研究发现两种脂联素受体均在星状细胞中表达. 因此脂联素能使星状细胞保持静止状态, 能抑制血小板衍生生长因子刺激的星状细胞的激活和迁移, 并能减少通过AMPK依赖通路介导的单核细胞趋化蛋白的分泌. 另外, 脂联素还能调节一种星状细胞激活后产生的促纤维化因子TGF- $\beta$ 1的表达. 通过抑制AdipoR2的表达能诱导TGF- $\beta$ 1的表达, 而如果使AdipoR2过表达则可降低TGF- $\beta$ 1的mRNA水平.

**3.4 脂联素对于线粒体功能的调节作用** 线粒体功能异常是NAFLD的核心机制之一. NASH患者肝脏线粒体功能呈现超微结构的病变并且线粒体内呼吸链复合物(mitochondrial respiratory chain complex, MRC)的活性也下降<sup>[83,84]</sup>. 在这种情况下, 活性下降的呼吸链能使活性氧(reactive oxygen species, ROS)积聚, 后者能氧化脂肪而产生脂质过氧化物, 脂质过氧化物反过来能引起脂肪性肝炎、坏死、炎症和纤维化. 脂肪性肝炎增加的线粒体ROS能直接破坏线粒体DNA、呼吸链多肽, 能诱导NF- $\kappa$ B的活化及肝脏合成TNF- $\alpha$ <sup>[85]</sup>. MRC调控的氧化磷酸化反应直接调节细胞内ROS活化, 防止脂质沉积及肝脏脂质过氧化物得产生.

研究发现当小鼠缺乏脂联素时甚至用普通饲料喂养也会表现出脂质沉积. 这种脂质沉积现象可能是线粒体功能异常的直接后果<sup>[75]</sup>. 脂联素能恢复线粒体呼吸链活力, 能通过调节线粒体的功能降低线粒体脂质过氧化物的水平. 线粒体内膜上的转运子解偶联蛋白2(UCP2)介导了脂联素对于MRC活性的益处. UCP2的蛋白及mRNA水平在脂联素敲除的小鼠是下降的, 并且脂联素治疗后升高. 过度表达脂联素受体2上调肝UCP2、过氧化氢酶、超氧化物歧化酶1的mRNA水平. 此外, 脂联素对MRC活力的影响戏剧性的在UCP2缺乏小鼠中降低了, 提示了增加UCP2的表达是脂联素作用于线粒体的重要机制. 众所周知UCP2具有通过抑制线粒体产生ROS抗氧化活力的特性. 他还能抑制巨噬细胞、Kupffer细胞产生促炎因子. 大量证据显示UCP2可能在脂肪肝病程中扮演重要角色. 以上这些表明了UCP2与脂联素间的关系. 尽管脂联素促

进UCP2表达的机制尚不清楚, 有待研究.

## 4 结论

脂联素是一种脂肪细胞大量分泌的244个氨基酸组成的蛋白质激素, 通过与靶器官的AdipoR1/2结合发挥生物学效应. 与其他脂肪因子相比脂联素与NAFLD的关系更密切. 脂联素水平降低是NAFLD及肝功能障碍的独立危险因子, 其具有良好的抗脂质沉积、抗炎症、抗纤维化、抗脂质过氧化作用并能增加胰岛素敏感性. 脂联素在治疗NAFLD的作用越来越被重视. 尽管这些知识在这几年不断完善, 但其中具体的分子及细胞机制仍然在很大程度上未知. 目前针对NAFLD总的治疗策略是: (1)生活方式干预; (2)针对代谢综合征的组分进行改善胰岛素抵抗、减肥、降压、降糖、调脂等治疗; (3)针对肝脏损伤进行治疗, 抑制氧应激, 改善肝纤维化; (4)如进展至终末期肝病, 可考虑肝移植. 然而, 来自2009年欧洲肝病年会的2项研究显示, 长期生活方式改变及胰岛素增敏剂治疗能改善生化指标, 但仅有50%的NASH患者组织学得到改善. 同时NAFLD的基础治疗还存在诸多缺陷, 肥胖患者单纯控制糖脂代谢紊乱和改善胰岛素抵抗很少能使脂肪性肝炎逆转; 对于体质量指数正常的NAFLD患者, 减肥无助于脂肪肝的消退; 还有一点非常重要, 治疗代谢综合征的某些药物用于NAFLD患者容易导致肝毒性, 诱发或加剧肝损伤. 因此寻找有效地特异性治疗NAFLD的靶标, 并针对靶标寻找经济、有效且副作用少的药物迫在眉睫. 而利用脂联素及其激动剂治疗NAFLD代表一种全新的治疗方法, Xu等<sup>[86]</sup>研究黄芪提取物黄芪苷可以使脂肪细胞脂联素分泌增加, 减轻NAFLD小鼠胰岛素抵抗, 治疗NAFLD. 由此可见基于脂联素的NAFLD治疗可能成为NAFLD的新疗法, 而其作用机制的研究为临床研发新药提供了理论基础, 拓展了新的策略和思路.

## 5 参考文献

- 1 Angulo P. Nonalcoholic fatty liver disease. *N Engl J Med* 2002; 346: 1221-1231
- 2 Farrell GC. Non-alcoholic steatohepatitis: what is it, and why is it important in the Asia-Pacific region? *J Gastroenterol Hepatol* 2003; 18: 124-138
- 3 Matteoni CA, Younossi ZM, Gramlich T, Boparai N, Liu YC, McCullough AJ. Nonalcoholic fatty liver disease: a spectrum of clinical and pathological severity. *Gastroenterology* 1999; 116: 1413-1419
- 4 Farrell GC, Larter CZ. Nonalcoholic fatty liver disease: from steatosis to cirrhosis. *Hepatology* 2006; 43:

## ■创新盘点

本综述对近几年的研究报道做了概述. 认为脂肪因子脂联素在非酒精性脂肪肝发病过程中的作用机制是研究热点. 围绕脂肪因子尤其是脂联素对非酒精性脂肪肝的胰岛素增敏、调节脂质代谢、抗炎、抗纤维化、抗脂质过氧化、保护肝脏等作用及其分子机制进行总结. 提出脂联素及其激动剂可以成为NAFLD的新型治疗方法, 并且这也可能成为NAFLD的研究新方向.

## ■应用要点

本文对脂联素在NAFLD发病过程中的肝脏保护作用进行综述。对脂联素、胰岛素增敏、调节脂质代谢、抗炎、抗纤维化、抗脂质过氧化、保护肝脏等作用及其分子机制有了较系统的认识,为将来运用脂联素及其激动剂治疗NAFLD及研发新药提供了参考价值。

- 5 S99-S112
- 6 Adams LA, Angulo P. Recent concepts in non-alcoholic fatty liver disease. *Diabet Med* 2005; 22: 1129-1133
- 7 Ong JP, Pitts A, Younossi ZM. Increased overall mortality and liver-related mortality in non-alcoholic fatty liver disease. *J Hepatol* 2008; 49: 608-612
- 8 Targher G, Marra F, Marchesini G. Increased risk of cardiovascular disease in non-alcoholic fatty liver disease: causal effect or epiphenomenon? *Diabetologia* 2008; 51: 1947-1953
- 9 Watanabe S, Yaginuma R, Ikejima K, Miyazaki A. Liver diseases and metabolic syndrome. *J Gastroenterol* 2008; 43: 509-518
- 10 Machado M, Cortez-Pinto H. Non-alcoholic steatohepatitis and metabolic syndrome. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2006; 9: 637-642
- 11 Shibata M, Kihara Y, Taguchi M, Tashiro M, Otsuki M. Nonalcoholic fatty liver disease is a risk factor for type 2 diabetes in middle-aged Japanese men. *Diabetes Care* 2007; 30: 2940-2944
- 12 Machado M, Cortez-Pinto H. Non-alcoholic fatty liver disease and insulin resistance. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2005; 17: 823-826
- 13 Mehta K, Van Thiel DH, Shah N, Mobarhan S. Non-alcoholic fatty liver disease: pathogenesis and the role of antioxidants. *Nutr Rev* 2002; 60: 289-293
- 14 Gastaldelli A, Cusi K, Pettiti M, Hardies J, Miyazaki Y, Berria R, Buzzigoli E, Sironi AM, Cersosimo E, Ferrannini E, DeFronzo RA. Relationship between hepatic/visceral fat and hepatic insulin resistance in nondiabetic and type 2 diabetic subjects. *Gastroenterology* 2007; 133: 496-506
- 15 Vuguin P, Raab E, Liu B, Barzilai N, Simmons R. Hepatic insulin resistance precedes the development of diabetes in a model of intrauterine growth retardation. *Diabetes* 2004; 53: 2617-2622
- 16 Blaak EE. Fatty acid metabolism in obesity and type 2 diabetes mellitus. *Proc Nutr Soc* 2003; 62: 753-760
- 17 DeFronzo RA, Gunnarsson R, Björkman O, Olsson M, Wahren J. Effects of insulin on peripheral and splanchnic glucose metabolism in noninsulin-dependent (type II) diabetes mellitus. *J Clin Invest* 1985; 76: 149-155
- 18 Banerji MA, Buckley MC, Chaiken RL, Gordon D, Lebovitz HE, Kral JG. Liver fat, serum triglycerides and visceral adipose tissue in insulin-sensitive and insulin-resistant black men with NIDDM. *Int J Obes Relat Metab Disord* 1995; 19: 846-850
- 19 Holland WL, Brozinick JT, Wang LP, Hawkins ED, Sargent KM, Liu Y, Narra K, Hoehn KL, Knotts TA, Siesky A, Nelson DH, Karathanasis SK, Fontenot GK, Birnbaum MJ, Summers SA. Inhibition of ceramide synthesis ameliorates glucocorticoid-, saturated-fat-, and obesity-induced insulin resistance. *Cell Metab* 2007; 5: 167-179
- 20 Kelley DE, McKolanis TM, Hegazi RA, Kuller LH, Kalhan SC. Fatty liver in type 2 diabetes mellitus: relation to regional adiposity, fatty acids, and insulin resistance. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2003; 285: E906-E916
- 21 Assimacopoulos-Jeannet F, Brichard S, Rencurel F, Cusin I, Jeanrenaud B. In vivo effects of hyperinsulinemia on lipogenic enzymes and glucose transporter expression in rat liver and adipose tissues. *Metabolism* 1995; 44: 228-233
- 22 Minehira K, Young SG, Villanueva CJ, Yetukuri L, Oresic M, Hellerstein MK, Farese RV, Horton JD, Preitner F, Thorens B, Tappy L. Blocking VLDL secretion causes hepatic steatosis but does not affect peripheral lipid stores or insulin sensitivity in mice. *J Lipid Res* 2008; 49: 2038-2044
- 23 Grefhorst A, Hoekstra J, Derks TG, Ouwens DM, Baller JF, Havinga R, Havekes LM, Romijn JA, Kuipers F. Acute hepatic steatosis in mice by blocking beta-oxidation does not reduce insulin sensitivity of very-low-density lipoprotein production. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2005; 289: G592-G598
- 24 Dentin R, Benhamed F, Hainault I, Fauveau V, Foulfelle F, Dyck JR, Girard J, Postic C. Liver-specific inhibition of ChREBP improves hepatic steatosis and insulin resistance in ob/ob mice. *Diabetes* 2006; 55: 2159-2170
- 25 Day CP, James OF. Steatohepatitis: a tale of two "hits"? *Gastroenterology* 1998; 114: 842-845
- 26 Brunt EM. Nonalcoholic steatohepatitis. *Semin Liver Dis* 2004; 24: 3-20
- 27 Charlton M. Noninvasive indices of fibrosis in NAFLD: starting to think about a three-hit (at least) phenomenon. *Am J Gastroenterol* 2007; 102: 409-411
- 28 de Luca C, Olefsky JM. Inflammation and insulin resistance. *FEBS Lett* 2008; 582: 97-105
- 29 Liou I, Kowdley KV. Natural history of nonalcoholic steatohepatitis. *J Clin Gastroenterol* 2006; 40 Suppl 1: S11-S16
- 30 Feldstein AE, Werneburg NW, Canbay A, Guicciardi ME, Bronk SF, Rydzewski R, Burgart LJ, Gores GJ. Free fatty acids promote hepatic lipotoxicity by stimulating TNF-alpha expression via a lysosomal pathway. *Hepatology* 2004; 40: 185-194
- 31 Antuna-Puente B, Feve B, Fellahi S, Bastard JP. Adipokines: the missing link between insulin resistance and obesity. *Diabetes Metab* 2008; 34: 2-11
- 32 Kamada Y, Takehara T, Hayashi N. Adipocytokines and liver disease. *J Gastroenterol* 2008; 43: 811-822
- 33 Tilg H, Hotamisligil GS. Nonalcoholic fatty liver disease: Cytokine-adipokine interplay and regulation of insulin resistance. *Gastroenterology* 2006; 131: 934-945
- 34 Javor ED, Ghany MG, Cochran EK, Oral EA, DePaoli AM, Premkumar A, Kleiner DE, Gorden P. Leptin reverses nonalcoholic steatohepatitis in patients with severe lipodystrophy. *Hepatology* 2005; 41: 753-760
- 35 Javor ED, Cochran EK, Musso C, Young JR, Depaoli AM, Gorden P. Long-term efficacy of leptin replacement in patients with generalized lipodystrophy. *Diabetes* 2005; 54: 1994-2002
- 36 Huang XD, Fan Y, Zhang H, Wang P, Yuan JP, Li MJ, Zhan XY. Serum leptin and soluble leptin receptor in non-alcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 2888-2893
- 37 Kim IK, Kim J, Kang JH, Song J. Serum leptin as a predictor of fatty liver in 7-year-old Korean children. *Ann Nutr Metab* 2008; 53: 109-116
- 38 Marra F. Leptin and liver tissue repair: do rodent models provide the answers? *J Hepatol* 2007; 46: 12-18
- 39 Crespo J, Cayón A, Fernández-Gil P, Hernández-Guerra M, Mayorga M, Domínguez-Díez A, Fernández-Escalante JC, Pons-Romero F. Gene expression of tumor necrosis factor alpha and TNF-receptors, p55 and p75, in nonalcoholic steatohepatitis patients. *Hepatology* 2001; 34: 1158-1163
- 40 Ribeiro PS, Cortez-Pinto H, Solá S, Castro RE, Ra-

- malho RM, Baptista A, Moura MC, Camilo ME, Rodrigues CM. Hepatocyte apoptosis, expression of death receptors, and activation of NF-kappaB in the liver of nonalcoholic and alcoholic steatohepatitis patients. *Am J Gastroenterol* 2004; 99: 1708-1717
- 40 Younossi ZM, Jarrar M, Nugent C, Randhawa M, Afendy M, Stepanova M, Rafiq N, Goodman Z, Chandhoke V, Baranova A. A novel diagnostic biomarker panel for obesity-related nonalcoholic steatohepatitis (NASH). *Obes Surg* 2008; 18: 1430-1437
- 41 Li Z, Yang S, Lin H, Huang J, Watkins PA, Moser AB, Desimone C, Song XY, Diehl AM. Probiotics and antibodies to TNF inhibit inflammatory activity and improve nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2003; 37: 343-350
- 42 Deng QG, She H, Cheng JH, French SW, Koop DR, Xiong S, Tsukamoto H. Steatohepatitis induced by intragastric overfeeding in mice. *Hepatology* 2005; 42: 905-914
- 43 Schnyder-Candrian S, Czarniecki J, Lerondel S, Corpataux J, Ryffel B, Schnyder B. Hepatic steatosis in the absence of tumor necrosis factor in mice. *Cytokine* 2005; 32: 287-295
- 44 Trujillo ME, Scherer PE. Adiponectin—journey from an adipocyte secretory protein to biomarker of the metabolic syndrome. *J Intern Med* 2005; 257: 167-175
- 45 López-Bermejo A, Botas P, Funahashi T, Delgado E, Kihara S, Ricart W, Fernández-Real JM. Adiponectin, hepatocellular dysfunction and insulin sensitivity. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2004; 60: 256-263
- 46 Hui JM, Hodge A, Farrell GC, Kench JG, Kriketos A, George J. Beyond insulin resistance in NASH: TNF-alpha or adiponectin? *Hepatology* 2004; 40: 46-54
- 47 Shimada M, Kawahara H, Ozaki K, Fukura M, Yano H, Tsuchishima M, Tsutsumi M, Takase S. Usefulness of a combined evaluation of the serum adiponectin level, HOMA-IR, and serum type IV collagen 7S level to predict the early stage of nonalcoholic steatohepatitis. *Am J Gastroenterol* 2007; 102: 1931-1938
- 48 Musso G, Gambino R, Biroli G, Carello M, Fagà E, Pacini G, De Micheli F, Cassader M, Durazzo M, Rizzetto M, Pagano G. Hypoadiponectinemia predicts the severity of hepatic fibrosis and pancreatic Beta-cell dysfunction in nondiabetic nonobese patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Am J Gastroenterol* 2005; 100: 2438-2446
- 49 Aygun C, Senturk O, Hulagu S, Uraz S, Celebi A, Konduk T, Mutlu B, Canturk Z. Serum levels of hepatoprotective peptide adiponectin in non-alcoholic fatty liver disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2006; 18: 175-180
- 50 Bajaj M, Suraamornkul S, Piper P, Hardies LJ, Glass L, Cersosimo E, Pratipanawatr T, Miyazaki Y, DeFronzo RA. Decreased plasma adiponectin concentrations are closely related to hepatic fat content and hepatic insulin resistance in pioglitazone-treated type 2 diabetic patients. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89: 200-206
- 51 Ikejima K, Okumura K, Kon K, Takei Y, Sato N. Role of adipocytokines in hepatic fibrogenesis. *J Gastroenterol Hepatol* 2007; 22 Suppl 1: S87-S92
- 52 Kamada Y, Tamura S, Kiso S, Matsumoto H, Saji Y, Yoshida Y, Fukui K, Maeda N, Nishizawa H, Nagaretani H, Okamoto Y, Kihara S, Miyagawa J, Shinomura Y, Funahashi T, Matsuzawa Y. Enhanced carbon tetrachloride-induced liver fibrosis in mice lacking adiponectin. *Gastroenterology* 2003; 125: 1796-1807
- 53 Masaki T, Chiba S, Tatsukawa H, Yasuda T, Noguchi H, Seike M, Yoshimatsu H. Adiponectin protects LPS-induced liver injury through modulation of TNF-alpha in KK-Ay obese mice. *Hepatology* 2004; 40: 177-184
- 54 Matsumoto H, Tamura S, Kamada Y, Kiso S, Fukushima J, Wada A, Maeda N, Kihara S, Funahashi T, Matsuzawa Y, Shimomura I, Hayashi N. Adiponectin deficiency exacerbates lipopolysaccharide/D-galactosamine-induced liver injury in mice. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 3352-3358
- 55 Thakur V, Pritchard MT, McMullen MR, Nagy LE. Adiponectin normalizes LPS-stimulated TNF-alpha production by rat Kupffer cells after chronic ethanol feeding. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2006; 290: G998-G1007
- 56 Xu A, Wang Y, Keshaw H, Xu LY, Lam KS, Cooper GJ. The fat-derived hormone adiponectin alleviates alcoholic and nonalcoholic fatty liver diseases in mice. *J Clin Invest* 2003; 112: 91-100
- 57 Kamada Y, Matsumoto H, Tamura S, Fukushima J, Kiso S, Fukui K, Igura T, Maeda N, Kihara S, Funahashi T, Matsuzawa Y, Shimomura I, Hayashi N. Hypoadiponectinemia accelerates hepatic tumor formation in a nonalcoholic steatohepatitis mouse model. *J Hepatol* 2007; 47: 556-564
- 58 Kadowaki T, Yamauchi T. Adiponectin and adiponectin receptors. *Endocr Rev* 2005; 26: 439-451
- 59 Kadowaki T, Yamauchi T, Kubota N. The physiological and pathophysiological role of adiponectin and adiponectin receptors in the peripheral tissues and CNS. *FEBS Lett* 2008; 582: 74-80
- 60 Tsao TS, Tomas E, Murrey HE, Hug C, Lee DH, Ruderman NB, Heuser JE, Lodish HF. Role of disulfide bonds in Acrp30/adiponectin structure and signaling specificity. Different oligomers activate different signal transduction pathways. *J Biol Chem* 2003; 278: 50810-50817
- 61 Wang Y, Lam KS, Chan L, Chan KW, Lam JB, Lam MC, Hoo RC, Mak WW, Cooper GJ, Xu A. Post-translational modifications of the four conserved lysine residues within the collagenous domain of adiponectin are required for the formation of its high molecular weight oligomeric complex. *J Biol Chem* 2006; 281: 16391-16400
- 62 Cheng KK, Lam KS, Wang Y, Huang Y, Carling D, Wu D, Wong C, Xu A. Adiponectin-induced endothelial nitric oxide synthase activation and nitric oxide production are mediated by APPL1 in endothelial cells. *Diabetes* 2007; 56: 1387-1394
- 63 Yamauchi T, Kamon J, Minokoshi Y, Ito Y, Waki H, Uchida S, Yamashita S, Noda M, Kita S, Ueki K, Eto K, Akanuma Y, Froguel P, Foufelle F, Ferre P, Carling D, Kimura S, Nagai R, Kahn BB, Kadowaki T. Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nat Med* 2002; 8: 1288-1295
- 64 Shibata R, Ouchi N, Ito M, Kihara S, Shiojima I, Pimentel DR, Kumada M, Sato K, Schiekofer S, Ohashi K, Funahashi T, Colucci WS, Walsh K. Adiponectin-mediated modulation of hypertrophic signals in the heart. *Nat Med* 2004; 10: 1384-1389
- 65 Kubota N, Yano W, Kubota T, Yamauchi T, Itoh S, Kumagai H, Kozono H, Takamoto I, Okamoto S, Shiuchi T, Suzuki R, Satoh H, Tsuchida A, Moroi M, Sugi K, Noda T, Ebinuma H, Ueta Y, Kondo T, Arai E, Ezaki O, Nagai R, Tobe K, Terauchi Y, Ueki K,

#### 同行评价

本文内容新颖, 可读性较好, 具有一定的科学价值。



- Minokoshi Y, Kadowaki T. Adiponectin stimulates AMP-activated protein kinase in the hypothalamus and increases food intake. *Cell Metab* 2007; 6: 55-68
- 66 Mao X, Kikani CK, Riojas RA, Langlais P, Wang L, Ramos FJ, Fang Q, Christ-Roberts CY, Hong JY, Kim RY, Liu F, Dong LQ. APPL1 binds to adiponectin receptors and mediates adiponectin signalling and function. *Nat Cell Biol* 2006; 8: 516-523
- 67 Chandrasekar B, Boylston WH, Venkatachalam K, Webster NJ, Prabhu SD, Valente AJ. Adiponectin blocks interleukin-18-mediated endothelial cell death via APPL1-dependent AMP-activated protein kinase (AMPK) activation and IKK/NF-kappaB/PTEN suppression. *J Biol Chem* 2008; 283: 24889-24898
- 68 Saito T, Jones CC, Huang S, Czech MP, Pilch PF. The interaction of Akt with APPL1 is required for insulin-stimulated Glut4 translocation. *J Biol Chem* 2007; 282: 32280-32287
- 69 Woods A, Azzout-Marniche D, Foretz M, Stein SC, Lemarchand P, Ferré P, Foufelle F, Carling D. Characterization of the role of AMP-activated protein kinase in the regulation of glucose-activated gene expression using constitutively active and dominant negative forms of the kinase. *Mol Cell Biol* 2000; 20: 6704-6711
- 70 Tomita K, Tamiya G, Ando S, Kitamura N, Koizumi H, Kato S, Horie Y, Kaneko T, Azuma T, Nagata H, Ishii H, Hibi T. AICAR, an AMPK activator, has protective effects on alcohol-induced fatty liver in rats. *Alcohol Clin Exp Res* 2005; 29: 240S-245S
- 71 You M, Considine RV, Leone TC, Kelly DP, Crabb DW. Role of adiponectin in the protective action of dietary saturated fat against alcoholic fatty liver in mice. *Hepatology* 2005; 42: 568-577
- 72 Carter-Kent C, Zein NN, Feldstein AE. Cytokines in the pathogenesis of fatty liver and disease progression to steatohepatitis: implications for treatment. *Am J Gastroenterol* 2008; 103: 1036-1042
- 73 Choi KM, Ryu OH, Lee KW, Kim HY, Seo JA, Kim SG, Kim NH, Choi DS, Baik SH. Serum adiponectin, interleukin-10 levels and inflammatory markers in the metabolic syndrome. *Diabetes Res Clin Pract* 2007; 75: 235-240
- 74 Engeli S, Feldpausch M, Gorzelniak K, Hartwig F, Heintze U, Janke J, Möhlig M, Pfeiffer AF, Luft FC, Sharma AM. Association between adiponectin and mediators of inflammation in obese women. *Diabetes* 2003; 52: 942-947
- 75 Park PH, Thakur V, Pritchard MT, McMullen MR, Nagy LE. Regulation of Kupffer cell activity during chronic ethanol exposure: role of adiponectin. *J Gastroenterol Hepatol* 2006; 21 Suppl 3: S30-S33
- 76 Zhou M, Xu A, Tam PK, Lam KS, Chan L, Hoo RL, Liu J, Chow KH, Wang Y. Mitochondrial dysfunction contributes to the increased vulnerabilities of adiponectin knockout mice to liver injury. *Hepatology* 2008; 48: 1087-1096
- 77 Choi S, Diehl AM. Role of inflammation in nonalcoholic steatohepatitis. *Curr Opin Gastroenterol* 2005; 21: 702-707
- 78 Jarrar MH, Baranova A, Collantes R, Ranard B, Stepanova M, Bennett C, Fang Y, Elariny H, Goodman Z, Chandhoke V, Younossi ZM. Adipokines and cytokines in non-alcoholic fatty liver disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2008; 27: 412-421
- 79 Wulster-Radcliffe MC, Ajuwon KM, Wang J, Christian JA, Spurlock ME. Adiponectin differentially regulates cytokines in porcine macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 316: 924-929
- 80 Kumada M, Kihara S, Ouchi N, Kobayashi H, Okamoto Y, Ohashi K, Maeda K, Nagaretani H, Kishida K, Maeda N, Nagasawa A, Funahashi T, Matsuzawa Y. Adiponectin specifically increased tissue inhibitor of metalloproteinase-1 through interleukin-10 expression in human macrophages. *Circulation* 2004; 109: 2046-2049
- 81 Wolf AM, Wolf D, Rumpold H, Enrich B, Tilg H. Adiponectin induces the anti-inflammatory cytokines IL-10 and IL-1RA in human leukocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 323: 630-635
- 82 Yamaguchi N, Argueta JG, Masuhiro Y, Kagishita M, Nonaka K, Saito T, Hanazawa S, Yamashita Y. Adiponectin inhibits Toll-like receptor family-induced signaling. *FEBS Lett* 2005; 579: 6821-6826
- 83 Pérez-Carreras M, Del Hoyo P, Martín MA, Rubio JC, Martín A, Castellano G, Colina F, Arenas J, Solís-Herruzo JA. Defective hepatic mitochondrial respiratory chain in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 2003; 38: 999-1007
- 84 Sanyal AJ, Campbell-Sargent C, Mirshahi F, Rizzo WB, Contos MJ, Sterling RK, Luketic VA, Shiffman ML, Clore JN. Nonalcoholic steatohepatitis: association of insulin resistance and mitochondrial abnormalities. *Gastroenterology* 2001; 120: 1183-1192
- 85 Fromenty B, Robin MA, Igoudjil A, Mansouri A, Pessayre D. The ins and outs of mitochondrial dysfunction in NASH. *Diabetes Metab* 2004; 30: 121-138
- 86 Xu A, Wang H, Hoo RL, Sweeney G, Vanhoutte PM, Wang Y, Wu D, Chu W, Qin G, Lam KS. Selective elevation of adiponectin production by the natural compounds derived from a medicinal herb alleviates insulin resistance and glucose intolerance in obese mice. *Endocrinology* 2009; 150: 625-633

编辑 李军亮 电编 何基才

# 慢性胰腺炎的病因学研究进展

耿琼梅, 张海蓉, 段丽平

耿琼梅, 张海蓉, 段丽平, 昆明医学院第一附属医院消化内科 云南省昆明市 650032

作者贡献分布: 本文综述由耿琼梅完成; 张海蓉与段丽平审阅.  
通讯作者: 段丽平, 教授, 650032, 云南省昆明市西昌路295号, 昆明医学院第一附属医院消化内科. dlp\_0414@yahoo.com.cn  
电话: 0871-5324888-2532

收稿日期: 2011-05-18 修回日期: 2011-06-22

接受日期: 2011-06-28 在线出版日期: 2011-07-08

## Progress in understanding the etiology of chronic pancreatitis

Qiong-Mei Geng, Hai-Rong Zhang, Li-Ping Duan

Qiong-Mei Geng, Hai-Rong Zhang, Li-Ping Duan, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Kunming Medical College, Kunming 650032, Yunnan Province, China

Correspondence to: Professor Li-Ping Duan, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Kunming Medical College, 295 Xichang Road, Kunming 650032, Yunnan Province, China. dlp\_0414@yahoo.com.cn

Received: 2011-05-18 Revised: 2011-06-22

Accepted: 2011-06-28 Published online: 2011-07-08

## Abstract

Chronic pancreatitis (CP) is irregularly distributed around the world, and the pathogenic factors and incidence rates of CP vary greatly among different countries and regions. The main pathogenic factor for CP is alcohol in Western countries and biliary tract disease in China. Changes in the lifestyle also change the main pathogenic factors for CP. In recent years, alcohol has gradually replaced biliary tract disease to become the main etiological factor for CP in China. A deeper understanding of the etiology of CP provides new insights into the treatment of the disease.

Key Words: Chronic pancreatitis; Etiology; Progress

Geng QM, Zhang HR, Duan LP. Progress in understanding the etiology of chronic pancreatitis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(19): 2043-2047

## 摘要

慢性胰腺炎(chronic pancreatitis, CP)无规律地分布于世界各地, 不同的国家和地区, CP的致病因素与发病率均有较大的差异. 在西方国

家, 酒精是其主要致病因素, 而在我国为胆道疾病. 随着人民生活方式的改变, CP的致病因素在不断变更. 近年来我国酒精因素所占比例上升, 逐渐替代胆道疾病成为CP的第一致病因素. 随着检测技术的提高, CP的病因正被不断的发现和完善, 从而进一步指导CP的治疗.

关键词: 慢性胰腺炎; 病因学; 研究进展

耿琼梅, 张海蓉, 段丽平. 慢性胰腺炎的病因学研究进展. *世界华人消化杂志* 2011; 19(19): 2043-2047

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/2043.asp>

## 0 引言

慢性胰腺炎(chronic pancreatitis, CP)是指由于各种原因不同病因引起胰腺组织结构和功能持续性损害、胰腺组织节段性弥漫性的发生慢性进行性炎症, 导致胰腺组织和(或)胰腺功能不可逆的损害. CP病因复杂, 多为环境因素和遗传因素共同致病<sup>[1]</sup>, 具体包括胆道疾病、酒精中毒、吸烟、遗传、自身免疫、急性胰腺炎、营养不良、高钙、高脂等. CP无规律地分布于世界各地, 在不同的国家和地区, 由于受地理环境、经济状况和生活习惯等诸多因素影响, 其致病因素与发病率均有较大的差异. 诸多学者展开对CP的流行病学调查, 研究目前CP病因的变化及地区差异, 进一步指导CP的诊治.

CP在欧美国家发病率较高, 而在我国发病率低, 但近年来有上升趋势, 仍无准确数字. 我国CP病因与西方国家不同, 西方国家以酒精中毒为主要病因, 占60%-90%<sup>[2]</sup>. 我国CP的主要病因是胆道系统疾病, 其次才是酒精中毒<sup>[3]</sup>. 近年来由于社会的发展, 人民生活方式日益改变, CP的致病因素在不断变更. 发展中国家酒精性CP的比例上升<sup>[4]</sup>. 在朝鲜, CP的主要致病因素仍然是酒精(64.3%), 特发性胰腺炎次之(20.8%)<sup>[5]</sup>. Frulloni等<sup>[6]</sup>调查分析意大利2000-2005年确诊为CP的893例患者, 研究显示酒精性CP不足50%. 在博洛尼亚, 酒精因素仍是CP的主要致病因素, 占80.4%<sup>[7]</sup>. 印度一个全国性研究显示特发性CP

## ■背景资料

慢性胰腺炎(CP)病因繁多, 各种病因在其发病过程中的地位众说纷纭, 过去认为国外酒精中毒为主要致病因素, 我国主要为胆道疾病. 近年来诸多报道提示国内外CP病因变化不一, 其致病机制仍不是很清楚.

## ■同行评议者

黄恒青, 主任医师, 福建省第二人民医院 消化内科

## ■研发前沿

随着科学技术水平的提高和研究的不断深入, CP的病因被不断发现和完善的, 遗传性CP和自身免疫性CP越来越受到重视, 其发病机制成为诸多学者的研究热点.

占60.2%, 酒精性CP占38.7%, 而热带性胰腺炎仅占3.8%<sup>[8]</sup>. 近年世界性的CP调查显示酒精因素仍然是CP的主要致病因素<sup>[9]</sup>. 下面对CP的病因学进展分述如下.

## 1 胆道疾病

在我国胆道疾病是最为常见的病因(46.5%), 近年来有下降趋势<sup>[10]</sup>. 各种胆系疾病中胆囊结石最多见, 其他依次为: 胆管结石、胆囊炎、胆道狭窄和胆道蛔虫. 其损伤胰腺机制可能是: 由于正常情况下50%-70%的胆总管和胰管共同开口于十二指肠乳头, 各种炎症感染和结石致胆总管开口或胰胆管交界部狭窄与梗阻, 胰液流出受阻, 胰管内压力增高, 导致胰腺腺泡及小导管破裂, 损伤胰腺组织和胰管系统. Schleicher等<sup>[11]</sup>发现胆道阻塞引起的肝网状内皮系统功能障碍在胰腺病理过程中可能是协同因素. 陈浮等<sup>[12]</sup>从流行病学角度对全国21所综合医院1994-05/2004-05 10年间确诊CP的1 700例患者进行追踪调查研究, 结果显示酒精性CP相对较多, 占35.4%, 胆源性CP次之, 占33.9%. 男性患者中以酒精性CP为主, 占40.9%, 而女性中以胆源性CP为主, 占38%. 曹家月等<sup>[13]</sup>回顾性分析中国人民解放军第451医院近20多年来确诊为CP的400例患者, 结果显示CP患者中合并胆道系统疾病和饮酒史的分别为162例和152例, 占40.05%和38.0%, 其中130例患者同时存在以上2种病因, 占32.50%.

## 2 饮酒史

酒精是CP的一个危险因素, 他通过胰腺星状细胞的作用诱导胰腺纤维化, 但是酒精在CP发病机制上的作用一直存在争议<sup>[9]</sup>. 过去大多数学者认同蛋白质分泌过多导致梗阻与坏死-纤维化学说<sup>[14,15]</sup>. 酒精及其代谢产物直接使胰液中脂质微粒体酶的分泌以及脂肪酶的降解增加, 并使脂质微粒体酶可以和胰液混合, 激活胰蛋白酶原为胰蛋白酶, 导致组织损伤. 乙醇间接通过刺激胰液的分泌, 增加胰腺对缩胆囊素刺激的敏感性, 胰液中胰酶和蛋白质含量增加, 钙离子浓度增加, 易形成胰管内蛋白沉淀, 这些蛋白沉淀又与其他杂质(如脱落的上皮等)形成栓子阻塞小胰管, 使胰管胰液流出受阻, 胰管内压力增高, 导致胰腺腺泡、胰管小导管破裂, 损伤胰腺组织及胰管系统. 有学者认为长期酗酒诱导胰腺炎或肝硬化与遗传因素有关<sup>[16]</sup>. 亦有报道酒精导致CP的发生主要是通过代谢产物的毒性作用、

乙醇致敏作用、遗传易感性和胰腺星状细胞等途径<sup>[17]</sup>. 酒精对胰腺细胞发挥大量的毒性作用, 胰腺星状细胞对胰腺组织纤维化起到关键性作用, 他通过乙醇脱氢酶代谢酒精, 但事实上仅有一小部分酗酒者发展为CP, 乙醇代谢酶类的改变可能是CP的触发因子, 但至今尚未确定<sup>[18]</sup>. 酒精中毒一直是西方国家CP的首位病因和危险因素<sup>[2]</sup>. 酒精摄入量和饮酒时间与发病率密切相关. 152例酒精性CP患者均有长期饮酒史, 超过10年者95例, 占62.5%, 每日酒精摄入量>150 g者88例, 占57.89%<sup>[13]</sup>. 近年来我国酒精性CP所占比例逐渐上升, 分析原因可能与我国生活水平的日益提高, 嗜酒人数明显增多有关. 2007年全国多中心CP流行病学调查提示, 在我国酒精因素已经替代胆道系统疾病, 他已成为CP的第一致病因素<sup>[9]</sup>. 酒精性CP患者的酒精摄入量多在70-80 g/d, 饮酒时间多在15年左右, 每日少量(<50 g)或偶尔饮酒一般不导致酒精性CP<sup>[20]</sup>. 孙钢等<sup>[21]</sup>从病因学角度对北京协和医院近19年的321例CP住院患者进行回顾性分析显示: 以1992-06为界将时间平均分为前后二段(各9年7个月), 分析主要致病相关因素(胆系疾病和酒精)的变化, 1992-06后确诊CP的住院患者数较之前增加近1倍, 主要表现为有饮酒史的患者数和构成比明显增加( $\chi^2 = 13.06, P < 0.005$ ), 患胆系疾病患者数变化不大, 但构成比明显降低( $\chi^2 = 17.37, P < 0.005$ ). Wang等<sup>[22]</sup>探讨中国1994年至2004年2 008例CP患者的病因, 显示酒精性CP占35.11%, 胆源性CP占34.36%, 遗传性CP占7.22%, 特发性CP占12.90%.

## 3 吸烟史

大量饮酒和吸烟是CP的独立危险因素已被公认<sup>[23]</sup>. 吸烟导致胰腺损害或促进胰腺炎症程度进展的机制仍然不清. 与不吸烟者比较, 吸烟与胰腺纤维化有关<sup>[24]</sup>. 实验室研究已经发现由于尼古丁的出现, 多种信号传导途径激活, 胞内大量钙离子释放可能导致细胞损害和细胞毒性的产生<sup>[25]</sup>. 吸烟者发生CP的几率比不吸烟者高7.8-17.3倍<sup>[26]</sup>. 初诊胰腺炎后胰腺钙化的发展程度与吸烟有重要的关系, 少量吸烟与大量吸烟者的危险度相似, 但并发糖尿病的危险性显著增加<sup>[27]</sup>. 正在吸烟者比已戒烟者更危险, 且与吸烟的数量和时间相关<sup>[28]</sup>.

## 4 遗传因素

遗传性CP属于染色体显性遗传病, 具有一定的

## ■相关报道

Felderbauer等人在2003年首次在一个患家族性低尿钙高血钙症(FHH)的家族中发现, 有钙敏感受体(CASR)+SPINK1基因复合突变者易发生CP.

家族集聚性<sup>[29]</sup>. 遗传因素和结构缺陷在儿童的CP病因中占有主导地位<sup>[30]</sup>. 有报道显示遗传性CP的发生与胰酶的变异有关, 变异的胰酶不能被抑制, 从而导致胰腺的自身消化<sup>[31]</sup>. CP的病理机制源于对胰蛋白酶原基因(protease serine 1, PRSSI)和Kazal 1型丝氨酸蛋白酶抑制剂(serine protease inhibitor, Kazal type 1, SPINK1)基因的研究, 结果显示CP是一个多基因疾病, 患该病者可能有多个CP相关基因突变, 胰蛋白酶原激活与胰蛋白酶失活之间的内环境紊乱导致胰腺炎的发生<sup>[32]</sup>. 最近研究表明81%的遗传性CP患者有PRSSI基因突变<sup>[33]</sup>. PRSSI基因和SPINK1基因突变与韩国儿童CP的发生和发展高度相关<sup>[34]</sup>. SPINK1被认为是胰腺炎的候选基因, 糜蛋白酶原C(chymotrypsin C, CTSC)和组织蛋白酶B(cathepsin B, CTSB)被证明与热带钙化性胰腺炎有关<sup>[35]</sup>. 在欧洲和亚洲, CTSC基因突变已被证实增加了CP的危险<sup>[36]</sup>. 囊性纤维化跨膜通道调节因子(cystic fibrosis transmembrane conductance regulator, CFTR)基因突变增加了特发性CP的易感性<sup>[37]</sup>. 正常胰腺组织表达环氧合酶-1(cyclooxygenase 1, COX-1)而不表达COX-2, 前者调节细胞正常的生理功能, 后者则与炎症反应有关. 有研究报道CP患者COX-2表达增加, 尤以胰腺腺泡细胞表达为甚<sup>[38]</sup>. 小鼠胰蛋白酶R122H(密码子122, 外显子3精氨酸-组氨酸)基因突变的转基因表达导致胰腺纤维化及慢性炎症<sup>[39]</sup>.

## 5 自身免疫因素

自身免疫性CP是一个涉及胆管、腹膜后腔、肾脏等不同器官的系统疾病在胰腺的表现<sup>[40]</sup>. 他可以是孤立的, 偶尔也可和其他免疫调节紊乱的疾病如干燥综合征等相伴发生. 在组织学上存在导管破坏、腺泡组织萎缩纤维化、淋巴细胞渗出, 没有钙化. 系统性红斑狼疮、干燥综合征、原发性胆管炎、原发性胆汁性肝硬化均可并发CP. 1 700例CP患者中17例患者发病前患有类风湿关节炎史, 6例患克罗恩病, 10例患溃疡性结肠炎, 10例患系统性红斑狼疮<sup>[12]</sup>. Okazaki<sup>[41]</sup>发现抗核抗体、抗平滑肌抗体、抗乳铁蛋白抗体、抗碳酸酐酶-11等自身抗体在自身免疫性CP和其他的自身免疫性疾病都可同时检测到, 故其他自身免疫性疾病产生的抗体可能作用于胰腺组织, 导致CP的发生. 自身免疫性CP的发展伴随着胰腺细胞自身抗体增加, 比如免疫球蛋白G(immunoglobulin G, IgG)1-4, 特别是IgG4, 他反映自身免疫反应的强度<sup>[42]</sup>. 自身免疫性CP常

常表现为胰头假瘤, 导致梗阻性黄疸, IgG4水平常增高<sup>[43]</sup>.

## 6 急性胰腺炎病史

急性胰腺炎与CP许多病因相同, 比如: 胆石症和酒精等. 大约80%的急性胰腺炎继发于胆石症和酒精中毒, 70%的CP继发于酒精滥用<sup>[44]</sup>. 有证据显示胰腺的慢性损害来源于急性组织炎症和坏死的反复刺激<sup>[18]</sup>. 我国CP患者中存在急性胰腺炎病史的占到了2.3%-30.3%<sup>[20,26]</sup>, 由此可看出两者之间存在着紧密联系. 急性胰腺炎发作史与CP伴行, 他与CP呈正相关<sup>[12]</sup>. 急性胰腺炎转变成CP频繁发生于酒精性胰腺炎患者, 他与起病初期存在的胰腺坏死成负相关<sup>[45]</sup>.

## 7 营养不良、高钙、高脂及其他

过去发现CP患者多为发展中国家贫穷人口, 且多数伴有蛋白质、热卡缺乏等营养不良的表现. 但近期研究显示营养不良可能并不是CP发生的病因而是结果<sup>[46]</sup>. CP由高三酰甘油血症、甲状旁腺功能亢进症及囊性纤维化导致者较少<sup>[47]</sup>. CP与高脂血症和甲状旁腺功能亢进引起的高钙血症有密切关系, 且得到国内外的承认<sup>[48]</sup>. 但这些因素致CP的机制尚不明确. 有部分CP没有明确的病因, 被称为特发性CP, 他是一个与多基因和环境因素相联系的复杂的炎症性疾病<sup>[49]</sup>, 其具体的发病机制目前仍然没有得到很明确的阐明. CFTR变种p.R75Q导致碳酸氢盐选择性缺陷, 增加CP的风险, p.R75Q或者CF导致CFTR和SPINK1变异大大增加了特发性CP的危险<sup>[49]</sup>. 但随着现代检测手段的不断进步, 有部分特发性CP患者能够找到病因, 如胰腺外伤、胰腺分裂、环形胰腺、胰管梗阻、Oddi括约肌病变和壶腹旁十二指肠壁囊肿等<sup>[50]</sup>. 有报道酒精性CP在美国三级转诊中心减少, 而特发性和非酒精性CP的比例增多, 尤其是妇女<sup>[51]</sup>.

## 8 结论

CP病因复杂, 常有多种因素共同参与, 不同国家和地区的主要致病因素和发病率不同. 目前胆道疾病和酒精中毒仍是CP的主要病因. 由于社会的发展, 人民生活方式日益改变, CP的致病因素在不断变更. 报道显示我国酒精中毒已逐渐取代胆道疾病成为CP的第一致病因素, 但仍缺乏全国性较完整的多中心流行病学调查资料. CP的发病机制尚缺乏统一的理论, 各种致病因素在CP发病中的作用正处于不断研究阶段, 遗

## ■创新盘点

本文就近年来国内外对CP病因的相关研究作一总结, 探讨国内外CP各种病因的变化及其发病机制.



# 应用要点

不同病因所致的CP需应用不同的治疗措施,本文总结了近年来CP的病因变化情况及发病机制,有利于进一步指导临床诊断及治疗。

传性CP和自身免疫性CP越来越受到广大研究者的关注,成为CP病因的研究热点。随着CP病因研究的不断深入,我们对CP的了解将更透彻,可望对CP的预防及治疗提供更完善的指导,为改善人们的生活方式和提高人们的生活质量作贡献。

## 参考文献

- Braganza JM, Lee SH, McCloy RF, McMahon MJ. Chronic pancreatitis. *Lancet* 2011; 377: 1184-1197
- Strate T, Knoefel WT, Yekebas E, Izbicki JR. Chronic pancreatitis: etiology, pathogenesis, diagnosis, and treatment. *Int J Colorectal Dis* 2003; 18: 97-106
- 张兆红. 慢性胰腺炎75例病因学分析. *临床医学工程* 2009; 16: 47-49
- Das SK, Balakrishnan V, Vasudevan DM. Alcohol: its health and social impact in India. *Natl Med J India* 2006; 19: 94-99
- Ryu JK, Lee JK, Kim YT, Lee DK, Seo DW, Lee KT, Kim HG, Kim JS, Lee HS, Kim TN, Rho MH, Moon JH, Lee J, Choi HS, Lee WJ, Yoo BM, Yoon YB. Clinical features of chronic pancreatitis in Korea: a multicenter nationwide study. *Digestion* 2005; 72: 207-211
- Frulloni L, Gabbriellini A, Pezzilli R, Zerbi A, Cavestro GM, Marotta F, Falconi M, Gaia E, Uomo G, Maringhini A, Mutignani M, Maisonneuve P, Di Carlo V, Cavallini G. Chronic pancreatitis: report from a multicenter Italian survey (PanCroInfAISP) on 893 patients. *Dig Liver Dis* 2009; 41: 311-317
- Pezzilli R, Morselli-Labate AM, Fantini L, Campana D, Corinaldesi R. Assessment of the quality of life in chronic pancreatitis using Sf-12 and EORTC QLQ-C30 questionnaires. *Dig Liver Dis* 2007; 39: 1077-1086
- Balakrishnan V, Unnikrishnan AG, Thomas V, Choudhuri G, Veeraraju P, Singh SP, Garg P, Pai CG, Devi RN, Bhasin D, Jayanthi V, Premalatha N, Chacko A, Kar P, Rai RR, Rajan R, Subhalal N, Mehta R, Mishra SP, Dwivedi M, Vinayakumar KR, Jain AK, Biswas K, Mathai S, Varghese J, Ramesh H, Alexander T, Philip J, Raj VV, Vinodkumar A, Mukevar S, Sawant P, Nair P, Kumar H, Sudhindran S, Dhar P, Sudheer OV, Sundaram KR, Tantri BV, Singh D, Nath TR. Chronic pancreatitis. A prospective nationwide study of 1,086 subjects from India. *JOP* 2008; 9: 593-600
- Pezzilli R. Etiology of chronic pancreatitis: has it changed in the last decade? *World J Gastroenterol* 2009; 15: 4737-4740
- 钱家鸣, 郭涛. 我国慢性胰腺炎病因分析. 2005年全国慢性胰腺炎学术大会专集 2005: 1-2
- Schleicher C, Baas JC, Elser H, Senninger N. Reticuloendothelial system blockade promotes progression from mild to severe acute pancreatitis in the opossum. *Ann Surg* 2001; 233: 528-536
- 陈浮, 李兆申, 王洛伟, 李淑德. 慢性胰腺炎的相关因素及诊治分析. *中华消化杂志* 2006; 26: 515-518
- 曹家月, 郭梅. 慢性胰腺炎400例病因分析及临床诊治. *陕西医学杂志* 2010; 39: 1094-1095
- Stevens T, Conwell DL, Zuccaro G. Pathogenesis of chronic pancreatitis: an evidence-based review of past theories and recent developments. *Am J Gastroenterol* 2004; 99: 2256-2270
- Teich N, Keim V. [Pathogenetic concepts of chronic pancreatitis]. *Zentralbl Chir* 2001; 126: 884-888
- Purohit V, Russo D, Salin M. Role of iron in alcoholic liver disease: introduction and summary of the symposium. *Alcohol* 2003; 30: 93-97
- 秦仁义. 慢性胰腺炎的病因和发病机理探讨. *临床外科杂志* 2007; 15: 807-809
- Vonlaufen A, Wilson JS, Pirola RC, Apte MV. Role of alcohol metabolism in chronic pancreatitis. *Alcohol Res Health* 2007; 30: 48-54
- 王洛伟, 李兆申, 李淑德, 陈浮. 慢性胰腺炎全国多中心流行病学调查. *胰腺病学* 2007; 7: 1-5
- 钱家鸣, 李景南, 田自力, 吕红, 陶丽萍. 215例慢性胰腺炎病因学分析. *胃肠病学* 2001; 6: 153-155
- 孙钢, 宁晓红, 钱家鸣. 慢性胰腺炎321例致病因素分析. *中国医刊* 2002; 37: 30-32
- Wang LW, Li ZS, Li SD, Jin ZD, Zou DW, Chen F. Prevalence and clinical features of chronic pancreatitis in China: a retrospective multicenter analysis over 10 years. *Pancreas* 2009; 38: 248-254
- Yadav D, Hawes RH, Brand RE, Anderson MA, Money ME, Banks PA, Bishop MD, Baillie J, Sherman S, DiSario J, Burton FR, Gardner TB, Amann ST, Gelrud A, Lawrence C, Elinoff B, Greer JB, O'Connell M, Barmada MM, Slivka A, Whitcomb DC. Alcohol consumption, cigarette smoking, and the risk of recurrent acute and chronic pancreatitis. *Arch Intern Med* 2009; 169: 1035-1045
- van Geenen EJ, Smits MM, Schreuder TC, van der Peet DL, Bloemena E, Mulder CJ. Smoking is related to pancreatic fibrosis in humans. *Am J Gastroenterol* 2011; 106: 1161-1166
- Chowdhury P, MacLeod S, Udupa KB, Rayford PL. Pathophysiological effects of nicotine on the pancreas: an update. *Exp Biol Med* (Maywood) 2002; 227: 445-454
- Talamini G, Bassi C, Falconi M, Sartori N, Salvia R, Rigo L, Castagnini A, Di Francesco V, Frulloni L, Bovo P, Vaona B, Angelini G, Vantini I, Cavallini G, Pederzoli P. Alcohol and smoking as risk factors in chronic pancreatitis and pancreatic cancer. *Dig Dis Sci* 1999; 44: 1303-1311
- Maisonneuve P, Lowenfels AB, Müllhaupt B, Cavallini G, Lankisch PG, Andersen JR, Dimagno EP, Andrén-Sandberg A, Domellöf L, Frulloni L, Ammann RW. Cigarette smoking accelerates progression of alcoholic chronic pancreatitis. *Gut* 2005; 54: 510-514
- Yadav D, Slivka A, Sherman S, Hawes RH, Anderson MA, Burton FR, Brand RE, Lewis MD, Gardner TB, Gelrud A, Disario J, Amann ST, Baillie J, Lawrence C, O'Connell M, Lowenfels AB, Banks PA, Whitcomb DC. Smoking is underrecognized as a risk factor for chronic pancreatitis. *Pancreatology* 2010; 10: 713-719
- Rosendahl J, Bödeker H, Mössner J, Teich N. Hereditary chronic pancreatitis. *Orphanet J Rare Dis* 2007; 2: 1
- Nair RJ, Lawler L, Miller MR. Chronic pancreatitis. *Am Fam Physician* 2007; 76: 1679-1688
- Koc-Kuş J. [Contemporary opinions on the etiology of chronic pancreatitis]. *Wiad Lek* 1999; 52: 289-296
- Kang MH. Genetic causes of chronic pancreatitis: the elucidation of genetic contributions to a disorder once thought to have none. *Clin Genet* 2008; 73: 424-429
- Lal A, Lal DR. Hereditary pancreatitis. *Pediatr Surg Int* 2010; 26: 1193-1199
- Lee YJ, Kim KM, Choi JH, Lee BH, Kim GH, Yoo HW. High incidence of PRSS1 and SPINK1 muta-

- tions in Korean children with acute recurrent and chronic pancreatitis. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2011; 52: 478-481
- 35 Reddy DN, Prasad SS. Genetic basis of chronic pancreatitis in Asia Pacific region. *J Gastroenterol Hepatol* 2011; 26 Suppl 2: 2-5
  - 36 Zhou J, Sahin-Tóth M. Chymotrypsin C (CTRC) mutations in chronic pancreatitis. *J Gastroenterol Hepatol* 2011 Jun 2. [Epub ahead of print]
  - 37 Steiner B, Rosendahl J, Witt H, Teich N, Keim V, Schulz HU, Pfützer R, Lühr M, Gress TM, Nickel R, Landt O, Koudova M, Macek M Jr, Farre A, Casals T, Desax MC, Gallati S, Gomez-Lira M, Audrezet MP, Férec C, des Georges M, Claustres M, Truninger K. Common CFTR haplotypes and susceptibility to chronic pancreatitis and congenital bilateral absence of the vas deferens. *Hum Mutat* 2011 Apr 21. [Epub ahead of print]
  - 38 Milnerowicz H, Chmerek M, Rabczyński J, Milnerowicz S, Nabzdyk S, Knast W. Immunohistochemical localization of metallothionein in chronic pancreatitis. *Pancreas* 2004; 29: 28-32
  - 39 Archer H, Jura N, Keller J, Jacobson M, Bar-Sagi D. A mouse model of hereditary pancreatitis generated by transgenic expression of R122H trypsinogen. *Gastroenterology* 2006; 131: 1844-1855
  - 40 Kallel L, Naija N, Bouabaker J, Filali A. [Autoimmune pancreatitis : A systematic review]. *Tunis Med* 2011; 89: 221-230
  - 41 Okazaki K. Autoimmune pancreatitis: etiology, pathogenesis, clinical findings and treatment. The Japanese experience. *JOP* 2005; 6: 89-96
  - 42 Vinokurova LV, Trubitsyna IE, Zhivaeva NS, Gubina AV, Chikunova BZ, Kniazev OV, Sagynbaeva VE. [Autoimmune reaction component in chronic pancreatitis: clinical and experimental study]. *Eksp Klin Gastroenterol* 2010: 23-26
  - 43 Rerknimitr R. Asian chronic pancreatitis: the common and the unique. *J Gastroenterol Hepatol* 2011; 26 Suppl 2: 6-11
  - 44 Skipworth JR, Shankar A, Pereira SP. Managing acute and chronic pancreatitis. *Practitioner* 2010; 254: 23-27
  - 45 Takeyama Y. Long-term prognosis of acute pancreatitis in Japan. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2009; 7: S15-S17
  - 46 Tandon RK, Garg PK. Tropical pancreatitis. *Dig Dis* 2004; 22: 258-266
  - 47 Botella Romero F, Alfaro Martínez JJ. [Nutritional repercussions and management of chronic pancreatitis]. *Nutr Hosp* 2008; 23 Suppl 2: 59-63
  - 48 Otsuki M. Chronic pancreatitis in Japan: epidemiology, prognosis, diagnostic criteria, and future problems. *J Gastroenterol* 2003; 38: 315-326
  - 49 Schneider A, Larusch J, Sun X, Aloe A, Lamb J, Hawes R, Cotton P, Brand RE, Anderson MA, Money ME, Banks PA, Lewis MD, Baillie J, Sherman S, Disario J, Burton FR, Gardner TB, Amann ST, Gelrud A, George R, Rockacy MJ, Kassabian S, Martinson J, Slivka A, Yadav D, Oruc N, Barmada MM, Frizzell R, Whitcomb DC. Combined bicarbonate conductance-impairing variants in CFTR and SPINK1 variants are associated with chronic pancreatitis in patients without cystic fibrosis. *Gastroenterology* 2011; 140: 162-171
  - 50 昆宁, 徐敏, 王兴鹏. 特发性胰腺炎. *胰腺病学* 2007; 7: 54-55
  - 51 Côté GA, Yadav D, Slivka A, Hawes RH, Anderson MA, Burton FR, Brand RE, Banks PA, Lewis MD, Disario JA, Gardner TB, Gelrud A, Amann ST, Baillie J, Money ME, O'Connell M, Whitcomb DC, Sherman S. Alcohol and smoking as risk factors in an epidemiology study of patients with chronic pancreatitis. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2011; 9: 266-273; quiz e27

#### ■同行评价

本文综述了慢性胰腺炎的致病因素, 对临床诊疗有一定指导作用。

编辑 李薇 电编 何基才

ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) CN 14-1260/R 2011年版权归世界华人消化杂志

#### • 消息 •

### 《世界华人消化杂志》入选北京大学图书馆 2008年版《中文核心期刊要目总览》

**本刊讯** 《中文核心期刊要目总览》(2008年版)采用了被索量、被摘量、被引量、他引量、被摘率、影响因子、获国家奖或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80余种, 统计文献量达32 400余万篇次(2003-2005年), 涉及期刊12 400余种。本版还加大了专家评审力度, 5 500多位学科专家参加了核心期刊评审工作。经过定量评价和定性评审, 从我国正在出版的中文期刊中评选出1 980余种核心期刊, 分属七大编73个学科类目。《世界华人消化杂志》入选本版核心期刊库(见R5内科学类核心期刊表, 第66页)。(编辑部主任: 李军亮 2010-01-08)

# 乳糜泻临床研究进展

李慕然, 刘艳迪, 李文

李慕然, 天津市人民医院消化科 天津中医药大学 天津市 300121

刘艳迪, 天津市人民医院消化科 天津市 300121

李文, 天津市人民医院内镜中心 天津市 300121

作者贡献分布: 本文由李慕然综述; 刘艳迪与李文审校。

通讯作者: 李文, 主任医师, 300121, 天津市红桥区芥园西道190

号, 天津市人民医院内镜中心。drliwen@gmail.com

电话: 022-27559502

收稿日期: 2011-04-05 修回日期: 2011-05-16

接受日期: 2011-05-24 在线出版日期: 2011-07-08

## Advances in clinical research of celiac disease

Mu-Ran Li, Yan-Di Liu, Wen Li

Mu-Ran Li, Department of Gastroenterology, Tianjin People's Hospital, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300120, China

Yan-Di Liu, Department of Gastroenterology, Tianjin People's Hospital, Tianjin 300120, China

Wen Li, Endoscopy Center, Tianjin People's Hospital, Tianjin 300120, China

Correspondence to: Wen Li, Endoscopy Center, Tianjin People's Hospital, 190 West Jieyuan Road, Hongqiao District, Tianjin 300121, China. drliwen@gmail.com

Received: 2011-04-05 Revised: 2011-05-16

Accepted: 2011-05-24 Published online: 2011-07-08

## Abstract

Celiac disease (CD) is a type of primary malabsorption syndrome characterized by gluten intolerance and intestinal mucosal lesions. When genetically susceptible persons eat food containing gluten, their immune system responds by damaging or destroying intestinal villi to result in intestinal malnutrition. Depending on the degree of malabsorption, the symptoms of CD vary among individuals, ranging from no symptoms, few or mild symptoms, to many or severe symptoms. Some common symptoms of CD are diarrhea, abdominal pain and bloating. People with the disease may have other symptoms outside the digestive tract. Blood marker tests and small intestinal biopsy can help make a clear diagnosis. The disease is common in North Europe, North America and Australia, but is rarely reported in China. In this article, we will review the prevalence, pathogenesis, clinical manifestations, diagnosis and treatment of CD.

**Key Words:** Celiac disease; Gluten; Tissue transglutaminase; Small intestinal biopsy

Li MR, Liu YD, Li W. Advances in clinical research of celiac disease. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(19): 2053-2057

## 摘要

乳糜泻(celiac disease, CD)是患者对麸质不耐受引起小肠黏膜病变为特征的一种原发性吸收不良综合征。当遗传易感者食用含有麸质的食物后,引起机体的免疫应答,破坏小肠绒毛,引起小肠吸收不良。依据吸收不良的程度,CD的症状有个体差异,有的无症状或症状轻微,有的症状较重。典型表现为腹泻、腹痛、腹胀等消化系症状,也有的患者出现消化系外症状。血清标志物检测和小肠活检组织病理可明确诊断。此病在北美、北欧、澳大利亚发病率较高,在我国报道少见。本文就CD的流行病学、发病机制、临床表现以及诊断和治疗作一综述。

**关键词:** 乳糜泻; 麸质; 组织转谷氨酰胺转移酶抗体; 小肠活检

李慕然, 刘艳迪, 李文. 乳糜泻临床研究进展. 世界华人消化杂志 2011; 19(19): 2053-2057

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/2053.asp>

## 0 引言

乳糜泻(celiac disease, CD)又称麦胶性肠病(glutenous enteropathy)、非热带口炎性CD(non tropical sprue)、特发性脂肪泻(idiopathic sprue),是患者对麸质不耐受引起小肠黏膜病变为特征的一种原发性吸收不良综合征。本病患者对含麸质的麦粉食物异常敏感,当遗传易感者食用含有麸质的食物后,引起机体的免疫应答,破坏小肠绒毛,引起小肠吸收不良,出现一系列临床表现。典型表现为腹泻、腹痛、腹胀等消化系症状,也有的患者无明显临床症状或症状轻微,有的患者表现为胃肠道以外的症状。所以临床上易出现误诊和漏诊,CD患者往往需要很长时间才

## ■背景资料

过去认为乳糜泻的发病具有明显的地域分布和种族差异,初始认为其仅发生于高加索人,随后认为大多位于欧洲、北美,现研究表明该疾病呈世界性分布。目前该病在中国的发病状况还不明晰,了解这一疾病,提高诊断率,及早治疗,具有重要的临床意义。

## ■同行评议者

邢建峰, 副教授, 西安交通大学医学院

## ■相关报道

对1型糖尿病和腹泻型肠易激综合征患者通过乳糜泻血清标志物的检测,提示中国江苏地区可能存在乳糜泻患者。

能被确诊。目前CD尚未诊断的病例(在水底)远远要多于已诊断的病例(水面上的),流行病学具有“冰山”特征。但随着血清学、基因检测、小肠活检组织检查等手段的发展,对高危患者进行筛查和早期诊断越来越受到重视。此病在北美、北欧、澳大利亚发病率较高,在我国报道少见,目前我国对CD的认识不足,本文就CD的流行病学、发病机制、临床表现以及诊断和治疗作一综述。

## 1 流行病学

过去认为CD的发病具有明显的地域分布和种族差异,初始认为其仅发生于高加索人,随后认为其地理分布大多位于欧洲、北美,大规模的统计表明欧洲和美国人群CD的发病率为0.5%-1.0%<sup>[1,2]</sup>。最新流行病学资料显示瑞典成人CD的发病率为1.6%<sup>[3]</sup>。在世界其他地区如伊朗、印度依然可见,表明该疾病呈世界性分布。最近在北印度的流行病学调查显示确实有CD的存在。一项在卢迪亚纳4 347名3-17岁在校学生中进行的调查显示,CD的发生率为0.32%<sup>[4]</sup>。

在我国小麦为主要谷物之一,为人们主要食物来源之一。我国CD报道的病例较少,且缺乏相关的流行病学资料。江苏学者<sup>[5,6]</sup>搜集78例患者,其中73例腹泻型肠易激综合征患者,5例1型糖尿病患者,取血分别测定CD血清标志物抗麦胶蛋白抗体(IgG-AGA)和抗组织转谷氨酰胺酶抗体(IgA-tTGs),结果发现有6例IgG-AGA阳性(7.7%),2例IgA-tTGs阳性(2.6%),两种抗体均为阳性者1例。6例血清标志物阳性患者均拒绝行十二指肠活检进一步确诊,而选择去麸质饮食治疗。随访发现1例患者腹泻停止、体质量增加,其他患者体质量不再减轻,从而得出结论:对1型糖尿病和腹泻型肠易激综合征患者通过CD血清标志物的检测提示中国江苏地区可能存在CD患者<sup>[5,6]</sup>。李明等<sup>[7]</sup>对长期慢性腹胀腹泻、具有CD症状的147例患者进行7种自身免疫性抗体检测,发现IgG-AGA和IgA及抗肌内膜抗体IgA(EMA-IgA)阳性率分别为64.3%、53.6%、32.1%,在部分抗体检查结果阳性并进行小肠黏膜活检的10例患者中,检测到不同程度的黏膜绒毛萎缩变化。浙江学者对62例患者行胶囊内镜和十二指肠活检以及去麸质饮食报道了4例CD患者,但未进行血清抗体检测<sup>[8]</sup>。同样提示在中国存在CD的患者。

随着对该病认识的逐步深入和诊断技术的

完善,发现CD的患病率比实际想象的高,且分布广泛,因而得到了人们的广泛关注。现在认为世界范围内受累及的人数可达1/300-1/800,与现在所诊断的患者例数相差甚远,这就如同冰山一角。

## 2 发病机制

麸质麦胶蛋白食物是CD的致病因素,个体的遗传易感性、免疫反应和外界环境因素等共同作用导致患者的肠道黏膜损伤。

2.1 遗传因素 研究表明CD很明显与遗传因素有关<sup>[9]</sup>,CD与位于6号染色体的HLAII型D区的HLA-DQ2和HLA-DQ8密切相关。CD患者中含有HLA-DQ2者高达95%(由DQA1 0501, B1 02基因编码),其次是HLA-DQ8分子表达(由DQA1 0301/DQB1 0302基因编码)。这些HLA-DQ2或HLA-DQ8分子表达对于疾病发生虽不是决定性的,但却是必要的。

2.2 免疫因素 CD患者小肠黏膜固有层及表层细胞间主要是TCD8淋巴细胞较正常人增多2-6倍,这些细胞可分泌细胞毒素如干扰素等调控细胞间HLA抗原以损伤细胞。此外免疫球蛋白IgA增高,血浆中抗麦胶蛋白的IgA及IgG抗体增多。肠腔分泌物中有60%可以发现抗脂肪泻抗体。此外麦胶蛋白含有8个氨基酸的序列与人肠道腺病毒的E1B蛋白的序列相同,因而两者有共同抗原性。临床上血清学也证实本病患者在病前有过腺病毒(Ad-12)感染的百分率很高。因此服麦胶蛋白后数小时即出现过敏反应发生腹泻。

2.3 酶缺乏因素 正常小肠黏膜层中有一种特殊的多肽水解酶。可以水解麦胶蛋白使其分解成更小的分子而失去毒性。当发病时此酶减少,但经过治疗病情好转后此酶即恢复正常,再患病时又可减少,因此两者的因果关系尚难肯定,须进一步研究。美国研究者报告,初步动物和体外研究提示,一种酶的结合物能够引起CD患者达到膳食麸质的胃消化。这种酶产品由从大麦发芽的种子提取的谷氨酰胺特异性内切蛋白酶和从鞘氨醇荚膜提取的脯氨酰基内肽酶构成。研究者在体外系统建立了去毒全麦面包麸质制品,两种酶的重量1:1似乎最大化他们的协同作用,研究组发现这种结合对麸质胃消化大鼠模型有效,结果表明这些酶有胃效应,在进入小肠之前能够解毒麸质。研究者认为,通过结合这两种有互补底物活性的酶,可能会增加摄入麦质的安全阈值,从而改善患者的高度限制膳食负担<sup>[10]</sup>。



2.4 环境因素及其他 对于CD的发病,除含麸质饮食的因素外,可能夹杂有其他环境因素.研究发现麸质摄入的量和开始时间会影响CD的发病<sup>[11]</sup>.一项前瞻性研究结果显示,反复轮状病毒的感染可增加遗传易感儿童自身免疫性CD的风险<sup>[12]</sup>.

### 3 临床表现

作为一种多因素疾病,CD的临床表现具有多样性.婴幼儿主要表现为腹胀、腹痛、慢性腹泻、脂肪泻、便秘、呕吐、体质量下降以及易激惹,可出现营养不良、身材矮小、发育迟缓、牙釉质发育不良.在成人活动性或典型性CD常见消化系统症状表现为恶心、呕吐、厌食、腹胀、腹泻.相当一部分患者过去被诊断为肠易激综合征. Ford等<sup>[13]</sup>对纳入全球范围内2 978例受试者(其中1 052例为IBS患者)的7项研究进行的1篇系统综述发现,IBS组中3%的患者和对照组中0.7%的受试者上皮膜抗原(epithelial membrane antigen, EMA)或组织谷氨酰胺酶(tissue turn glutamyl enzyme, tTG)抗体阳性,或二者均为阳性;在对5项研究的独立分析中,IBS患者中的3.6%(952例患者中的34例)和对照组中的0.7%(798例受试者中的12例)检测为EMA、抗麦胶蛋白抗体或tTG阳性,且小肠活检显示CD证据.土耳其一项研究,对符合罗马III标准的IBS患者进行CD筛查,发现100个IBS患者中有2例最后确诊为CD<sup>[14]</sup>.

最近的研究显示,相当多的患者没有明显的消化系症状,或者表现为肠外症状,或者为无明显症状的隐性患者<sup>[15]</sup>.消化外症状可表现为不明原因的缺铁性贫血、乏力、骨关节疼痛、关节炎、骨质疏松、抑郁或焦虑、手足麻木、低钙抽搐、口腔溃疡、疱疹性皮炎.研究显示尽管CD患者和他们的亲属、配偶比较变态反应的反应率没有显著差异,但CD患者中的特应性皮炎似乎更常见<sup>[16]</sup>.女性患者还可表现为月经稀少,过早停经及不孕.瑞典一项基于人群的流行病学研究显示,虽然患有CD的妇女可以正常生育,但其在诊断CD后的2年后其生育能力下降<sup>[17]</sup>.

患有CD的患者可能同时患有其他免疫系统疾病,包括:1型糖尿病、自身免疫性甲状腺疾病、自身免疫性肝炎、风湿性关节炎、Addison病.瑞典专家大规模队列研究表明CD患者患肺结核、肝病、Addison's病、缺血性心脏病的风险增高<sup>[18-21]</sup>.研究还发现,在儿童时期患CD,成年以后患1型糖尿病的几率明显增加<sup>[22]</sup>.患CD的

患者住院期间流行性感动的几率增加<sup>[23]</sup>.

### 4 血清学抗体测定

4.1 EMA IgA EMA IgA是一种针对人和猴组织中平滑肌细胞外基质的抗体,其靶抗原是一种tTG.近来证实此酶为CD的自身抗原.过去常以抗麦胶蛋白(或谷蛋白)抗体和抗网硬蛋白抗体作为麦胶蛋白敏感性肠病试验诊断指标,而近来发现EMA IgA对CD的诊断特异性更高.具有CD遗传倾向的患者摄入谷蛋白,可产生EMA IgA.新近资料研究表明EMA IgA对诊断CD疾病有着较高的特异性和敏感性<sup>[24]</sup>.

4.2 tTG tTG广泛存在于多种细胞和组织中,参与细胞生长、分化、受体介导的胞吞作用、细胞粘连及伸展、损伤修复和凋亡,在结构和功能上属于与钙依赖性酶相关家庭,是CD患者主要的自身抗原,为抗肌内膜抗体所识别. tTG抗体有IgA和IgG两种亚型, IgA ELISA可定量检测tTG抗体水平. IgA tTG抗体检测已广泛应用于CD患者的筛选,具有较高的敏感性和特异性.避免了EMA IgA检测费时、费力、费用偏高以及结果需主观判断的缺点,现已广泛应用于临床. Parizade等<sup>[25]</sup>对116例1-17岁的儿童进行CD的5种抗体进行比较, tTG IgA Celikey(Phadia公司)的敏感性为94.1, 特异性为87.1, 显示tTG IgA Celikey试剂盒为检测CD最有效的血清学检测方法. Hill等<sup>[26]</sup>研究用Celikey试剂盒检测CD患者tTG抗体水平均>30 U/L, 其阳性率为100%, 提示血清tTG抗体的测定可以用来诊断CD, 而不必一定行小肠活检来确诊. 新近资料研究表明tTG IgA抗体对诊断CD疾病有着较高的特异性和敏感性<sup>[24]</sup>. Bazzigaluppi等<sup>[27]</sup>研究表明tTG抗体的血清浓度和严重的肠黏膜损伤有关.

4.3 抗麦胶蛋白 抗麦胶蛋白(AGA)是针对麸蛋白产生的抗体,麸蛋白是麸质的主要蛋白成分. AGA有IgA和IgG两种亚型,曾是诊断CD的指标之一. AGA的敏感性和特异性中等, IgA的特异性较IgG稍高. 高滴度AGA较低滴度诊断CD更可靠. 连续检测血清AGA可观察患者的治疗效果和顺应性. 经去麸质饮食治疗后AGA滴度降低,受麸质激发后则升高. 许多正常人和患有其他原因所致胃肠道炎症的患者也可能阳性,故其应用相对于前二者较少.

4.4 抗肌动蛋白抗体 IgA AAA ELISA测定对伴绒毛萎缩的CD的诊断敏感性和特异性分别为80%和85%,显示IgA AAA是CD患者肠道黏膜

#### ■应用要点

血清学、基因检测、小肠活检组织检查等手段的发展可帮助临床对乳糜泻的早期诊断.

## ■同行评价

本文选题新颖,对乳糜泻诊断与治疗有重要意义。

损伤的可靠标志物<sup>[28]</sup>。Bazzigaluppi等<sup>[27]</sup>研究表明当CD患者黏膜损伤较重时,可能检测不到IgA AAA, 和tTb-Ab相比,不能用于CD的筛查,如果当患者因某种原因不能行小肠活检时, IgA AAA阳性可以作为对CD的支持诊断。

## 5 HLA基因检测

含有HLA等位基因DQ2或DQ8者, CD患病风险增高,对新生儿和高危人群进行基因检测可能有助于CD的筛选。

## 6 小肠活检

小肠活组织标本病理检查是诊断CD的金标准。内镜检查是获得小肠黏膜最简便的方法。内镜的特征性发现包括:圆齿状皱襞,裂沟或镶嵌样图像;皱襞平坦;大量充气时,皱襞变小和/或消失。活检可取自十二指肠的第二或第三部分。CD多累及近端小肠的黏膜,随着向远端小肠延伸病变逐渐减轻,尽管在严重病例,病变会累及回肠。近端肠道的病变程度主要依赖于疾病的严重程度。因此可以常规内镜活检结果代替小肠镜空肠黏膜活检。在静止期病例,近端损伤可能很轻微,在空肠中段组织学检查轻度异常或基本正常。在一些病例中可以观察到胃和直肠黏膜的异常。偶尔地,十二指肠/空肠上段的病变会呈灶性分布,因此,对于那些在第1次活检时所有3个标本组织学检查都正常,而血清学检测阳性的患者应立即进行第2次活检。赵琴玥等<sup>[29]</sup>综述目前对于不愿意接受传统胃镜及活组织检查的CD患者来说,胶囊内镜可能成为一种重要的检查手段。

CD的小肠活检特征包括:绒毛部分或完全萎缩;隐窝增生;上皮内淋巴细胞或浆细胞浸润。按Marsh分类,小肠损害分4期:0期,病变侵及黏膜层;1期,上皮内淋巴细胞数目增加,固有层出现淋巴细胞;2期,隐窝增生伴绒毛萎缩;3期,全部绒毛萎缩。患者经去麸质饮食治疗几周后,小肠黏膜表现开始改善,特征性损害完全缓解并恢复正常结构可能需要1年。单纯绒毛萎缩也可见于一些其他胃肠道疾病,但EMA和tTG抗体很少见于这些疾病。牛奶不耐受、热带口炎性腹泻、放射损伤、化疗药物导致的腹泻、移植抗宿主疾病、慢性缺血、贾第鞭毛虫病、克罗恩病、自身免疫性肠病、肠病相关T淋巴细胞淋巴瘤、胃肠炎、嗜酸性细胞性胃肠炎、重度营养不良、佐-埃综合征、难治性口炎性腹泻、胶

原性结肠炎等疾病的黏膜变化与CD类似。

## 7 治疗

7.1 饮食疗法 最关键的问题是CD患者需终生无麸质饮食(gluten-free diet, GFD)。食物应去除小麦、大麦、黑麦。虽然燕麦对CD患者无害,但市售燕麦中可能会有其他谷类,因而在许多国家都不提倡食用。麸质除了存在于这些食物中,也存在于某些药物、维生素及润唇膏中,应特别注意其隐匿来源。如将面粉中的麸质去掉,剩余的淀粉并无“毒性”,患者可以食用。玉米、大米、豆类、肉类、鱼、牛奶、蔬菜、水果、土豆、红薯等制品不含有麸质,可以食用。经过饮食治疗,一般3-6 wk症状开始明显好转,腹泻减少体重增加。研究表明,严格的GFD可明显降低临床症状及并发症的发生,使该病高危人群的发病率及病死率接近一般人群。

7.2 对症治疗及支持疗法 除饮食治疗以外,支持疗法亦很重要,注意高营养高蛋白饮食,补充各种维生素(B1、B12、A、D及叶酸)纠正水电解质失衡,必要时输血。

7.3 激素治疗 对少数难治性CD患者饮食治疗无效,极度衰弱以及不耐受GFD的患者,可以考虑用肾上腺皮质激素治疗。开始剂量每天泼尼松(强的松)30-40 mg清晨顿服,以后逐渐减量直至少量维持。

## 8 结论

传统观念认为,CD是一种主要累及胃肠道的少见病,但随着对CD的深入了解,显示CD是一种由免疫机制介导的多系统疾病。CD在成人中,常持续数年甚至数十年得不到确诊,其主要原因是一方面患者症状不明显,不急于求医,有时腹部症状轻微常被诊断为功能性胃肠道疾病,许多患者可能表现为胃肠道外症状,另一方面我们医务人员对此病缺乏足够的认识和研究,欧美以外的其他国家如亚洲国家的CD患病率比实际想象的更高。目前可用于CD诊断的血清学方法也越来越成熟,为CD高危人群筛查提供了基础。相信通过我们的努力,该病在中国的发病状况必定能够日渐明晰。了解这一疾病,增加对本病的警惕性,提高诊断率,及早治疗,减少并发症,以及提高患者的生活质量将具有重要的临床意义。

## 9 参考文献

- 1 Sanders DS, Patel D, Stephenson TJ, Ward AM, Mc-

- Closkey EV, Hadjivassiliou M, Lobo AJ. A primary care cross-sectional study of undiagnosed adult coeliac disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2003; 15: 407-413
- 2 Dubé C, Rostom A, Sy R, Cranney A, Saloojee N, Garritty C, Sampson M, Zhang L, Yazdi F, Marmaladze V, Pan I, Macneil J, Mack D, Patel D, Moher D. The prevalence of celiac disease in average-risk and at-risk Western European populations: a systematic review. *Gastroenterology* 2005; 128: S57-S67
- 3 Walker MM, Murray JA, Ronkainen J, Aro P, Storskrubb T, D'Amato M, Lahr B, Talley NJ, Agreus L. Detection of celiac disease and lymphocytic enteropathy by parallel serology and histopathology in a population-based study. *Gastroenterology* 2010; 139: 112-119
- 4 Sood A, Midha V, Sood N, Avasthi G, Sehgal A. Prevalence of celiac disease among school children in Punjab, North India. *J Gastroenterol Hepatol* 2006; 21: 1622-1625
- 5 Wu J, Xia B, von Blomberg BM, Zhao C, Yang XW, Crusius JB, Peña AS. Coeliac disease: emerging in China? *Gut* 2010; 59: 418-419
- 6 Wu J, Xia B, von Blomberg BM, Zhao C, Yang XW, Crusius JB, Peña AS. Coeliac disease in China, a field waiting for exploration. *Rev Esp Enferm Dig* 2010; 102: 472-477
- 7 李明, 孙芾, 纪开宇, 崔玉涛, 李永哲. 自身免疫抗体检查对乳糜泻诊断的价值和意义. *实验与检验医学* 2010; 28: 29-36
- 8 Jiang LL, Zhang BL, Liu YS. Is adult celiac disease really uncommon in Chinese? *J Zhejiang Univ Sci B* 2009; 10: 168-171
- 9 Kaukinen K, Partanen J, Mäki M, Collin P. HLA-DQ typing in the diagnosis of celiac disease. *Am J Gastroenterol* 2002; 97: 695-699
- 10 Gianfrani C, Siciliano RA, Facchiano AM, Camarca A, Mazzeo MF, Costantini S, Salvati VM, Maurano F, Mazzarella G, Iaquinio G, Bergamo P, Rossi M. Transamidation of wheat flour inhibits the response to gliadin of intestinal T cells in celiac disease. *Gastroenterology* 2007; 133: 780-789
- 11 Tye-Din J, Anderson R. Immunopathogenesis of celiac disease. *Curr Gastroenterol Rep* 2008; 10: 458-465
- 12 Stene LC, Honeyman MC, Hoffenberg EJ, Haas JE, Sokol RJ, Emery L, Taki I, Norris JM, Erlich HA, Eisenbarth GS, Rewers M. Rotavirus infection frequency and risk of celiac disease autoimmunity in early childhood: a longitudinal study. *Am J Gastroenterol* 2006; 101: 2333-2340
- 13 Ford AC, Chey WD, Talley NJ, Malhotra A, Spiegel BM, Moayyedi P. Yield of diagnostic tests for celiac disease in individuals with symptoms suggestive of irritable bowel syndrome: systematic review and meta-analysis. *Arch Intern Med* 2009; 169: 651-658
- 14 Korkut E, Bektas M, Oztas E, Kurt M, Cetinkaya H, Ozden A. The prevalence of celiac disease in patients fulfilling Rome III criteria for irritable bowel syndrome. *Eur J Intern Med* 2010; 21: 389-392
- 15 Yachha SK, Poddar U. Celiac disease in India. *Indian J Gastroenterol* 2007; 26: 230-237
- 16 Ciacci C, Cavallaro R, Iovino P, Sabbatini F, Palumbo A, Amoroso D, Tortora R, Mazzacca G. Allergy prevalence in adult celiac disease. *J Allergy Clin Immunol* 2004; 113: 1199-1203
- 17 Zugna D, Richiardi L, Akre O, Stephansson O, Ludvigsson JF. A nationwide population-based study to determine whether coeliac disease is associated with infertility. *Gut* 2010; 59: 1471-1475
- 18 Ludvigsson JF, Sanders DS, Maeurer M, Jonsson J, Grunewald J, Wahlström J. Risk of tuberculosis in a large sample of patients with coeliac disease—a nationwide cohort study. *Aliment Pharmacol Ther* 2011; 33: 689-696
- 19 Ludvigsson JF, Elfström P, Broomé U, Ekblom A, Montgomery SM. Celiac disease and risk of liver disease: a general population-based study. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2007; 5: 63-69.e1
- 20 Elfström P, Montgomery SM, Kämpe O, Ekblom A, Ludvigsson JF. Risk of primary adrenal insufficiency in patients with celiac disease. *J Clin Endocrinol Metab* 2007; 92: 3595-3598
- 21 Ludvigsson JF, James S, Askling J, Stenstrand U, Ingelsson E. Nationwide cohort study of risk of ischemic heart disease in patients with celiac disease. *Circulation* 2011; 123: 483-490
- 22 Ludvigsson JF, Ludvigsson J, Ekblom A, Montgomery SM. Celiac disease and risk of subsequent type 1 diabetes: a general population cohort study of children and adolescents. *Diabetes Care* 2006; 29: 2483-2488
- 23 Mårild K, Fredlund H, Ludvigsson JF. Increased risk of hospital admission for influenza in patients with celiac disease: a nationwide cohort study in Sweden. *Am J Gastroenterol* 2010; 105: 2465-2473
- 24 van der Windt DA, Jellema P, Mulder CJ, Kneepkens CM, van der Horst HE. Diagnostic testing for celiac disease among patients with abdominal symptoms: a systematic review. *JAMA* 2010; 303: 1738-1746
- 25 Parizade M, Bujanover Y, Weiss B, Nachmias V, Shainberg B. Performance of serology assays for diagnosing celiac disease in a clinical setting. *Clin Vaccine Immunol* 2009; 16: 1576-1582
- 26 Hill PG, Holmes GK. Coeliac disease: a biopsy is not always necessary for diagnosis. *Aliment Pharmacol Ther* 2008; 27: 572-577
- 27 Bazzigaluppi E, Parma B, Tronconi GM, Corsin P, Albarello L, Mora S, Barera G. IgA anti-actin antibodies in children with celiac disease: comparison of immunofluorescence with Elisa assay in predicting severe intestinal damage. *Ital J Pediatr* 2010; 36: 25
- 28 Carroccio A, Brusca I, Iacono G, Alessio MG, Sonzogni A, Di Prima L, Barrale M, Ottomano C, Ambrosiano G, Teresi S, D'Angelo A, Pirrone G, Cefalù B, Scalici C, La Chiusa SM. IgA anti-actin antibodies ELISA in coeliac disease: a multicentre study. *Dig Liver Dis* 2007; 39: 818-823
- 29 赵琴玥, 黄梅芳, 王红玲, 夏冰. 胶囊内镜在乳糜泻诊断中的应用. *世界华人消化杂志* 2009; 17: 2705-2708

编辑 李薇 电编 何基才

# 快速康复在结直肠手术中的应用

赵银泉, 佟伟华, 王 权

## ■背景资料

快速康复外科的概念提出后, 广泛的应用于众多外科系统, 缩短了住院时间, 提高了患者恢复质量。

赵银泉, 佟伟华, 王权, 吉林大学白求恩第一医院胃肠结直肠外科 吉林省长春市 130021

作者贡献分布: 本文综述由赵银泉与佟伟华完成; 王权审校。

通讯作者: 王权, 副教授, 130021, 吉林省长春市, 吉林大学白求恩第一医院胃肠结直肠外科. wangquan-jlcc@hotmail.com

电话: 0431-88782737

收稿日期: 2011-02-22 修回日期: 2011-06-18

接受日期: 2011-06-21 在线出版日期: 2011-07-08

## Fast-track colorectal surgery

Yin-Quan Zhao, Wei-Hua Tong, Quan Wang

Yin-Quan Zhao, Wei-Hua Tong, Quan Wang, Department of Gastric and Colorectal Surgery, the First Hospital of Jilin University, Changchun 130021, Jilin Province, China

Correspondence to: Associate Professor Quan Wang, Department of Gastric and Colorectal Surgery, the First Hospital of Jilin University, Changchun 130021, Jilin Province, China. wangquan-jlcc@hotmail.com

Received: 2011-02-22 Revised: 2011-06-18

Accepted: 2011-06-21 Published online: 2011-07-08

## Abstract

In recent years, fast-track surgery has been attracting more and more attention; however, many people remain concerned about the safety and effectiveness of fast-track colorectal surgery. In this paper we discuss how the main components of fast-track colorectal surgery (no routine mechanical bowel preparation, epidural anaesthesia or analgesia, laparoscopic operation, early removal of nasogastric tube and drainage tube, early postoperative oral feeding) affect the incidence of postoperative complications. Meanwhile, we evaluate the effectiveness of fast-track colorectal surgery in terms of shortened length of hospital stay, facilitated recovery, reduced insulin resistance, and better preserved immune function. Besides, we summarize the difficulties confronted during the implementation of fast-track colorectal surgery. We conclude that fast-track colorectal surgery is a safe and effective approach that deserves to be popularized in clinical practice.

Key Words: Fast-track surgery; Laparoscopy; Colorectal surgery; Perioperation; Mechanical bowel preparation

Zhao YQ, Tong WH, Wang Q. Fast-track colorectal surgery. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(19): 2048-2052

## 摘要

近年来, 快速康复外科(fast-track surgery, FTS)引起了越来越多人的重视. 然而多数人对其应用于结直肠手术的安全性及有效性心存顾虑. 本文综述了FTS主要组成部分(不常规行机械肠道准备, 硬膜外麻醉及镇痛, 腹腔镜手术, 早期移除鼻胃减压管、引流管, 术后早期进食)对择期行结直肠手术的患者的术后并发症发生率的影响. 同时对FTS的有效性(缩短住院日, 加速康复, 降低胰岛素抵抗, 保护机体免疫功能)也进行了详细的论述. 另外, 我们还总结了FTS实施过程中遇到的困难. 最后, 我们得出这样的结论: FTS应用于结直肠手术是安全有效的, 并且应该被广泛推广。

关键词: 快速康复外科; 腹腔镜; 结直肠外科; 围手术期; 机械肠道准备

赵银泉, 佟伟华, 王权. 快速康复在结直肠手术中的应用. 世界华人消化杂志 2011; 19(19): 2048-2052

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/2048.asp>

## 0 引言

快速康复外科(fast-track surgery, FTS)是一个相对较新的理念, 他的核心是尽可能减少手术应激对机体的损伤. 应激可以理解成机体对威胁内环境稳态维持的内外因素的反应<sup>[1]</sup>. 术后患者由于手术的打击, 诸如神经内分泌、血流动力学、代谢、免疫等一系列的生理过程会受到影响<sup>[2]</sup>. FTS就是据此采用多模式化的围手术期护理, 期待最小程度的应激损伤, 改善患者体验. 这一理念正逐渐得到大家的认可<sup>[3]</sup>. 然而在结直肠手术的临床实践中, 一方面由于上百年来肠道手术的传统, 一方面由于对新鲜事物的质疑心理, FTS并没有广泛的开展起来. 现就快速康复理论在结直肠手术中应用的安全性、有效性及可行性进行初步探讨。

## 1 FTS概述

FTS理念最早是由丹麦外科医生Kehlet等提出的, 他着重于利用各种已证实有效的措施, 控制

## ■同行评议者

杨柏霖, 副主任医师, 南京中医药大学附属医院结直肠外科



患者围手术期病理生理学反应, 减少手术应激及并发症, 加速患者术后康复, 改善预后, 被广泛应用于多种手术<sup>[4,5]</sup>. FTS主要包括(1)术前患者教育; (2)有效的麻醉、止痛及精确的外科技术以减少手术应激、疼痛及不适反应; (3)强化术后康复治疗<sup>[6]</sup>. 具体的措施有术前宣教, 减少术前饥饿, 保证富含碳水化合物饮水直至术前2 h, 不常规行肠道准备等; 术中保温, 采用胸段硬膜外麻醉, 阿片类药物的局部外周麻醉, 微创手术操作等; 术后使用硬膜外镇痛泵, 控制液体摄入量, 镇吐, 早期恢复口服饮食, 早期术后活动, 减少鼻胃减压管、引流管的留置时间等<sup>[7-9]</sup>. 近年来, FTS的理念在欧美逐渐得到认同, 并形成了新的围手术期临床管理模式.

## 2 FTS应用于结直肠手术的安全性

**2.1 不常规行机械肠道准备** 最初外科医生们在结直肠前行机械肠道准备(*mechanical bowel preparation*, MBP)是为了降低细菌负荷, 以期待感染和吻合口瘘的风险最小化<sup>[10]</sup>. 然而, 抗生素的单独应用已被证明能够显著减少感染并发症的发生<sup>[11]</sup>. 在预防吻合口瘘方面, MBP也没有显示出突出的作用. 4个高质量荟萃分析及5个随机对照实验的数据显示: 无论是吻合口瘘的发生率, 还是切口感染、腹部、盆腔脓肿的发生率, 在接受MBP与不采用MBP的两组患者之间没有显著差异<sup>[12-15]</sup>. 更有研究表明, 接受MBP的患者更易切口感染(9.6% vs 8.3%), 有着稍高的吻合口瘘发生率(4.2% vs 3.4%)<sup>[16]</sup>.

虽然大多数的研究缺乏统一的MBP标准及抗生素预防应用方案, 但得出的结论却出乎意料的一致. MBP不增加并发症的发生, 不推荐常规施行. 总结起来, 不行MBP是安全可行的, 效果如果不优于, 至少等同于MBP.

**2.2 硬膜外麻醉及镇痛** 术后肠梗阻(*postoperative ileus*, POI)是腹部手术的常见并发症, 也是导致住院日延长的主要原因. 有报道表明, 术中硬膜外麻醉加上术后胸段硬膜外镇痛(*thoracic epidural analgesia*, TEA)能在保留副交感神经纤维对胃肠道兴奋作用的同时阻断导致POI的交感神经纤维的抑制作用, 从而有效的预防POI的发生<sup>[17,18]</sup>. 同时, 一些随机对照研究表明, 与全身麻醉合并术后阿片类药物镇痛相比, 术中及术后TEA可使胃肠道功能提前2-3 d恢复正常<sup>[19]</sup>. 这可能与阿片类镇痛药抑制胃肠蠕动有关<sup>[20]</sup>. 而且硬膜外麻醉可降低术后病死率, 显著减少诸如深静脉血栓

形成、肺栓塞和感染等术后并发症的发生<sup>[21]</sup>. 尽管硬膜外麻醉与镇痛有着潜在的风险性, 但其诸如神经血管损伤、脑膜炎、硬膜外脓肿等并发症的发生率是微乎其微的<sup>[20]</sup>. 可见, 硬膜外麻醉及镇痛是安全的, 并且有助于患者胃肠道功能的早日恢复.

### 2.3 鼻胃减压管、引流管留置

**2.3.1 不常规留置鼻胃管:** 早在1995年, Cheatham等<sup>[22]</sup>就质疑择期剖腹手术后应用鼻胃减压管的合理性, 并通过荟萃分析得出结论: 结直肠手术患者不留置胃肠减压管可减少术后发热、肺不张、肺炎的发病率. 2007年, Cochrane Database的最新系统回顾同样指出不常规留置鼻胃管能使患者更早的恢复肠道功能, 减少肺部并发症, 并且在吻合口瘘的风险上与留置鼻胃管的患者组没有差别<sup>[23]</sup>. 对于结直肠手术的患者没有理由留置鼻胃管<sup>[24]</sup>. 而且胃肠减压并不能使结肠空虚, 反而增加了肺炎、胃食管反流的发生率<sup>[7,25,26]</sup>. 可见, 在结直肠术后不常规留置鼻胃管不仅安全, 而且是被推荐的做法.

**2.3.2 早期拔除腹腔引流管:** 多个随机对照试验结果显示: 结直肠术后引流管的应用没有减少吻合口瘘的发生率, 也不能降低吻合口瘘的严重程度<sup>[27,28]</sup>. 虽然有研究支持低位切除术后应该放置盆腔引流管24 h<sup>[29]</sup>, 但缺乏专门的随机对照试验证明. 然而依据文献[30]中1A级别的证据, 减少术后引流管留置时间至少是安全可行的.

**2.4 术后早期进食** 传统上, 结直肠术后的患者是禁食水的, 直至肠道活动恢复. 如今, FTS提倡早期(多指术后24 h内)恢复口服饮食. 13个随机对照试验的数据被拿来来进行系统回顾及荟萃分析, 结果显示, 结直肠患者术后禁食水并没有优势, 反而早期进食有降低术后并发症发生率的趋势<sup>[31]</sup>. 另外, 早期经口饮食或肠内营养在降低感染风险、缩短住院日的同时并不会增加吻合口瘘的发生率<sup>[32,33]</sup>, 也不会加重肠麻痹, 反能促进肠功能的恢复并改善患者的营养状况<sup>[34]</sup>. 在有效止吐、多模式预防POI的前提下<sup>[35]</sup>, 术后早期进食是安全可行的.

**2.5 腹腔镜手术** 毫无疑问, 腹腔镜技术的引入被认为是结直肠疾病治疗的重大改革. 自90年代腹腔镜出现至今, 他的可行性及有效性已被众多的荟萃分析所充分证明<sup>[36,37]</sup>, 而且其微创理念与FTS不谋而合. 现如今腹腔镜手术正逐渐成为治疗结肠疾病的“金标准”<sup>[38]</sup>, 其安全性自不必赘述.

### ■ 相关报道

Basse等的双盲试验中, 就住院时间、胃肠道功能恢复方面, 腹腔镜手术组和传统开腹手术组(两组均应用FTS模式)之间没用显著差别. 然而King等的非双盲试验中则显示出了腹腔镜手术联合应用FTS组的优越性.

## ■应用要点

本文旨在综述现有的研究资料,得出了快速康复应用于结直肠手术安全、有效、可行的结论,打消同行对FTS的顾虑,从而使FTS得以推广。

## 3 FTS应用于结直肠手术的有效性

3.1 缩短住院日,减少并发症,加速术后肠道功能恢复 一些随机试验及4项随机对照试验的荟萃分析结果显示,与传统的围手术期护理措施相比,FTS能够有效地缩短住院时间,降低并发症的发病率<sup>[39-42]</sup>。最新的随机试验报道FTS组能平均减少2.5 d住院日,显著降低并发症发生率 $[OR = 0.54(0.45-0.69)]$ ,与对照组之间再入院率无差别<sup>[39]</sup>。更有文章报道,FTS最高可降低结直肠手术并发症发病率的50%<sup>[42]</sup>。另外,FTS中诸如术前糖负荷、术中TEA、术后非阿片类镇痛药应用、早期进食及下地活动等措施可以加速术后肠道功能恢复<sup>[34]</sup>。

腹腔镜手术是微创外科理念的代表。他对机体免疫干扰小,手术创伤打击小,最大限度的减少了对机体正常生理环境的破坏。而且腹腔镜手术作为单一因素本身就能够显著改善结肠手术的短期结果<sup>[43]</sup>,缩短住院日,减轻术后疼痛,减少康复所需时间,加快肠道功能恢复<sup>[44-46]</sup>。

然而鲜有研究评价两者联合应用的效果。两个小的随机试验得出了相反的结论。Basse等<sup>[47]</sup>的双盲试验中,就住院时间、胃肠道功能恢复方面,腹腔镜手术组和传统开腹手术组(两组均应用FTS模式)之间没用显著差别。然而King等<sup>[48]</sup>的非双盲试验中则显示出了腹腔镜手术联合应用FTS组的优越性。具体的结论还有待于精心设计的多中心随机双盲对照试验的结果。

3.2 降低胰岛素抵抗 手术应激产生的代谢变化可导致术后高血糖及胰岛素抵抗。而高血糖是公认的导致术后并发症发生的危险因素之一。有效地控制血糖对预后至关重要。术前至少2 h进行富碳水化合物饮水负荷,不仅降低术中胃内容物量,最重要的是可改善胰岛素敏感度<sup>[49]</sup>,增加外周葡萄糖摄取利用率及糖原合成,维持血糖值于正常水平。

3.3 保护机体免疫功能 手术打击引起的应激反应对机体的免疫功能起抑制作用。一项前瞻性的单中心研究显示,FTS应用于结直肠手术能够更好的保护细胞介导的免疫功能<sup>[50]</sup>。术后T淋巴细胞、Th细胞、NK细胞在FTS组及传统组均受到抑制。然而FTS组的T淋巴细胞和Th细胞含量显著降低的少,NK细胞也更早的恢复至术前水平<sup>[50]</sup>。尚无FTS对体液免疫影响的报道。

3.4 改善患者体验结果 入院前的宣教减轻了患者的心理负担。术前不禁食水,减轻了患者的饥饿感。不常规行机械肠道准备,可减轻患者的不

适,脱水及疲劳感。有效的止吐,鼻胃减压管早期拔除,使患者恶心、呕吐的发生大大减少。术后持续有效的镇痛使早期活动成为可能。FTS大大提高了患者的满意度<sup>[39-42]</sup>。

## 4 FTS应用于结直肠手术的可行性

4.1 临床工作 尽管有充足的证据支持FTS的实施能够改善结直肠手术患者的恢复,降低病死率,但在欧美多个中心FTS并没有得到广泛应用和充分的实施。遇到的困难主要有:(1)临床工作者对FTS方案的接受缓慢。虽然有强有力的证据表明一些围手术期措施能够加强患者的术后恢复,但是有些根深蒂固的理解很难在一时间改变,例如在北欧70%的外科中心仍把MBP列为常规操作<sup>[51]</sup>;(2)医院的管理制度使得临床实践很难完全符合FTS方案。由于入院前宣教力度不够以及出院程序问题,患者往往在功能恢复2 d后才出院(术后平均3 d可恢复功能,而平均住院日则达到5 d<sup>[52]</sup>);(3)缺乏专职负责人员。FTS方案的实施有赖于工作人员的参与和监督。然而目前各个医院尚没有配置专职人员负责协调、监督和推广FTS方案的实行。而且科室人员的轮转、换班制度不仅使FTS方案的实施质量大打折扣,也为FTS的普及教育带来了困难。

可见,加大门诊对FTS的宣传力度;加深结直肠外科医生、麻醉师、护理人员、康复师、患者等对FTS的认识、理解;优化患者周转流程;相关科室成立FTS小组,专职负责FTS方案的实施;常进行阶段性总结,及时协调、解决出现的问题等一系列措施对FTS的顺利进行定会起到一定的作用。

4.2 确立及完善出院标准 现较公认的出院标准包括:无并发症出现;口服止痛药能达到理想的镇痛效果;无需静脉输液,且能耐受固体食物;能达到术前活动水平;恢复排便<sup>[9,12]</sup>。明确、完善的出院标准不仅利于科研数据的收集,而且能够增加患者满意度、缩短住院时间、减少再入院率。需要指出的是,标准不是一成不变的。在保证核心内容的前提下,完全可根据各自医院及患者质量作出细微调整,制定出“个体化”的出院标准。

4.3 基础研究 FTS方案可以说是实践的指南,但关于其的基础研究尚不多。尤其在MBP对肠道屏障功能的影响方面,相关基础研究甚少。仅有少数文章报道MBP不影响肠黏膜定植细菌量<sup>[53]</sup>。我们就肠道黏膜形态学及细菌内毒素与MBP的

关系的研究将在另外一篇文章中阐述. 基础研究的跟进不仅可为FTS提供坚实的理论依据, 也可使FTS的理念更易普及, 更易被接受.

## 5 结论

FTS应用于腹腔镜结直肠手术是安全的, 不会增加感染、吻合口瘘、POI的发生率, 并能有效地缩短住院时间, 加速患者术后康复. 多个部门的协调合作及专职的FTS负责人员使FTS的实施更为可行. 在我国, 医疗资源极其有限. FTS可大大提高医疗资源的利用率, 节省医疗费用, 他的广泛推广、普及不仅有着广阔的前景, 而且对我国的医疗事业也有着深远意义.

## 6 参考文献

- 1 Wilmore DW. From Cuthbertson to fast-track surgery: 70 years of progress in reducing stress in surgical patients. *Ann Surg* 2002; 236: 643-648
- 2 Holte K, Kehlet H. Epidural anaesthesia and analgesia - effects on surgical stress responses and implications for postoperative nutrition. *Clin Nutr* 2002; 21: 199-206
- 3 Kehlet H. Fast-track colorectal surgery. *Lancet* 2008; 371: 791-793
- 4 Wilmore DW, Kehlet H. Management of patients in fast track surgery. *BMJ* 2001; 322: 473-476
- 5 Kehlet H, Wilmore DW. Multimodal strategies to improve surgical outcome. *Am J Surg* 2002; 183: 630-641
- 6 江志伟, 李宁, 黎介寿. 快速康复外科的概念及临床意义. *中国实用外科杂志* 2007; 27: 131-133
- 7 刘展, 汪晓东, 李立. 结直肠外科快速康复模式加速直肠癌术后康复的临床研究. *中华胃肠外科杂志* 2008; 11: 551-553
- 8 Raue W, Haase O, Junghans T, Scharfenberg M, Müller JM, Schwenk W. 'Fast-track' multimodal rehabilitation program improves outcome after laparoscopic sigmoidectomy: a controlled prospective evaluation. *Surg Endosc* 2004; 18: 1463-1468
- 9 Scatizzi M, Kröning KC, Boddi V, De Prizio M, Feroci F. Fast-track surgery after laparoscopic colorectal surgery: is it feasible in a general surgery unit? *Surgery* 2010; 147: 219-226
- 10 Pineda CE, Shelton AA, Hernandez-Boussard T, Morton JM, Welton ML. Mechanical bowel preparation in intestinal surgery: a meta-analysis and review of the literature. *J Gastrointest Surg* 2008; 12: 2037-2044
- 11 Song F, Glenny AM. Antimicrobial prophylaxis in colorectal surgery: a systematic review of randomized controlled trials. *Br J Surg* 1998; 85: 1232-1241
- 12 Donohoe CL, Nguyen M, Cook J, Murray SG, Chen N, Zaki F, Mehigan BJ, McCormick PH, Reynolds JV. Fast-track protocols in colorectal surgery. *Surgeon* 2011; 9: 95-103
- 13 Ram E, Sherman Y, Weil R, Vishne T, Kravarusic D, Dreznik Z. Is mechanical bowel preparation mandatory for elective colon surgery? A prospective randomized study. *Arch Surg* 2005; 140: 285-288
- 14 Fa-Si-Oen P, Roumen R, Buitengeweg J, van de Velde C, van Geldere D, Putter H, Verwaest C, Verhoef L, de Waard JW, Swank D, D'Hoore A, Croiset van Uchelen F. Mechanical bowel preparation or not? Outcome of a multicenter, randomized trial in elective open colon surgery. *Dis Colon Rectum* 2005; 48: 1509-1516
- 15 Contant CM, Hop WC, van't Sant HP, Oostvogel HJ, Smeets HJ, Stassen LP, Neijenhuis PA, Idenburg FJ, Dijkhuis CM, Heres P, van Tets WF, Gerritsen JJ, Weidema WF. Mechanical bowel preparation for elective colorectal surgery: a multicentre randomised trial. *Lancet* 2007; 370: 2112-2117
- 16 Guenaga KK, Matos D, Wille-Jørgensen P. Mechanical bowel preparation for elective colorectal surgery. *Cochrane Database Syst Rev* 2009: CD001544
- 17 Miedema BW, Johnson JO. Methods for decreasing postoperative gut dysmotility. *Lancet Oncol* 2003; 4: 365-372
- 18 Marret E, Remy C, Bonnet F. Meta-analysis of epidural analgesia versus parenteral opioid analgesia after colorectal surgery. *Br J Surg* 2007; 94: 665-673
- 19 Liu S, Carpenter RL, Neal JM. Epidural anesthesia and analgesia. Their role in postoperative outcome. *Anesthesiology* 1995; 82: 1474-1506
- 20 Holte K, Kehlet H. Prevention of postoperative ileus. *Minerva Anesthesiol* 2002; 68: 152-156
- 21 Rodgers A, Walker N, Schug S, McKee A, Kehlet H, van Zundert A, Sage D, Futter M, Saville G, Clark T, MacMahon S. Reduction of postoperative mortality and morbidity with epidural or spinal anaesthesia: results from overview of randomised trials. *BMJ* 2000; 321: 1493
- 22 Cheatham ML, Chapman WC, Key SP, Sawyers JL. A meta-analysis of selective versus routine nasogastric decompression after elective laparotomy. *Ann Surg* 1995; 221: 469-476; discussion 476-478
- 23 Nelson R, Edwards S, Tse B. Prophylactic nasogastric decompression after abdominal surgery. *Cochrane Database Syst Rev* 2005: CD004929
- 24 Lassen K, Soop M, Nygren J, Cox PB, Hendry PO, Spies C, von Meyenfeldt MF, Fearon KC, Revhaug A, Norderval S, Ljungqvist O, Lobo DN, Dejong CH. Consensus review of optimal perioperative care in colorectal surgery: Enhanced Recovery After Surgery (ERAS) Group recommendations. *Arch Surg* 2009; 144: 961-969
- 25 Manning BJ, Winter DC, McGreal G, Kirwan WO, Redmond HP. Nasogastric intubation causes gastroesophageal reflux in patients undergoing elective laparotomy. *Surgery* 2001; 130: 788-791
- 26 Jottard K, Hoff C, Maessen J, van Ramshorst B, van Berlo CL, Logeman F, Dejong CH. Life and death of the nasogastric tube in elective colonic surgery in the Netherlands. *Clin Nutr* 2009; 28: 26-28
- 27 Karliczek A, Jesus EC, Matos D, Castro AA, Atallah AN, Wiggers T. Drainage or nondrainage in elective colorectal anastomosis: a systematic review and meta-analysis. *Colorectal Dis* 2006; 8: 259-265
- 28 Jesus EC, Karliczek A, Matos D, Castro AA, Atallah AN. Prophylactic anastomotic drainage for colorectal surgery. *Cochrane Database Syst Rev* 2004: CD002100
- 29 Peeters KC, Tollenaar RA, Marijnen CA, Klein Kranenbarg E, Steup WH, Wiggers T, Rutten HJ, van de Velde CJ. Risk factors for anastomotic failure after total mesorectal excision of rectal cancer. *Br J Surg* 2005; 92: 211-216
- 30 Petrowsky H, Demartines N, Rousson V, Clavien PA. Evidence-based value of prophylactic drainage in gastrointestinal surgery: a systematic review and

## ■同行评价

本文选题恰当, 具有一定的创新性和可读性.

- meta-analyses. *Ann Surg* 2004; 240: 1074-1084; discussion 1074-1084
- 31 Andersen HK, Lewis SJ, Thomas S. Early enteral nutrition within 24h of colorectal surgery versus later commencement of feeding for postoperative complications. *Cochrane Database Syst Rev* 2006; CD004080
- 32 Lewis SJ, Egger M, Sylvester PA, Thomas S. Early enteral feeding versus "nil by mouth" after gastrointestinal surgery: systematic review and meta-analysis of controlled trials. *BMJ* 2001; 323: 773-776
- 33 Han-Geurts IJ, Hop WC, Kok NF, Lim A, Brouwer KJ, Jeekel J. Randomized clinical trial of the impact of early enteral feeding on postoperative ileus and recovery. *Br J Surg* 2007; 94: 555-561
- 34 Kehlet H, Büchler MW, Beart RW, Billingham RP, Williamson R. Care after colonic operation--is it evidence-based? Results from a multinational survey in Europe and the United States. *J Am Coll Surg* 2006; 202: 45-54
- 35 Charoenkwan K, Phillipson G, Vutyavanich T. Early versus delayed (traditional) oral fluids and food for reducing complications after major abdominal gynaecologic surgery. *Cochrane Database Syst Rev* 2007; CD004508
- 36 Schwenk W, Haase O, Neudecker J, Müller JM. Short term benefits for laparoscopic colorectal resection. *Cochrane Database Syst Rev* 2005; CD003145
- 37 Bonjer HJ, Hop WC, Nelson H, Sargent DJ, Lacy AM, Castells A, Guillaou PJ, Thorpe H, Brown J, Delgado S, Kuhrij E, Haglind E, Pahlman L. Laparoscopically assisted vs open colectomy for colon cancer: a meta-analysis. *Arch Surg* 2007; 142: 298-303
- 38 Slim K, Chipponi J. Laparoscopic surgery today. *Br J Surg* 2006; 93: 779-780
- 39 Gouvas N, Tan E, Windsor A, Xynos E, Tekkis PP. Fast-track vs standard care in colorectal surgery: a meta-analysis update. *Int J Colorectal Dis* 2009; 24: 1119-1131
- 40 Wind J, Polle SW, Fung Kon Jin PH, Dejong CH, von Meyenfeldt MF, Ubbink DT, Gouma DJ, Bemelman WA. Systematic review of enhanced recovery programmes in colonic surgery. *Br J Surg* 2006; 93: 800-809
- 41 Walter CJ, Collin J, Dumville JC, Drew PJ, Monson JR. Enhanced recovery in colorectal resections: a systematic review and meta-analysis. *Colorectal Dis* 2009; 11: 344-353
- 42 Varadhan KK, Neal KR, Dejong CH, Fearon KC, Ljungqvist O, Lobo DN. The enhanced recovery after surgery (ERAS) pathway for patients undergoing major elective open colorectal surgery: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Clin Nutr* 2010; 29: 434-440
- 43 Tjandra JJ, Chan MK. Systematic review on the short-term outcome of laparoscopic resection for colon and rectosigmoid cancer. *Colorectal Dis* 2006; 8: 375-388
- 44 Reza MM, Blasco JA, Andradas E, Cantero R, Mayol J. Systematic review of laparoscopic versus open surgery for colorectal cancer. *Br J Surg* 2006; 93: 921-928
- 45 Lacy AM, García-Valdecasas JC, Delgado S, Castells A, Taurá P, Piqué JM, Visa J. Laparoscopy-assisted colectomy versus open colectomy for treatment of non-metastatic colon cancer: a randomised trial. *Lancet* 2002; 359: 2224-2229
- 46 Law WL, Poon JT, Fan JK, Lo SH. Comparison of outcome of open and laparoscopic resection for stage II and stage III rectal cancer. *Ann Surg Oncol* 2009; 16: 1488-1493
- 47 Basse L, Jakobsen DH, Bardram L, Billesbølle P, Lund C, Mogensen T, Rosenberg J, Kehlet H. Functional recovery after open versus laparoscopic colonic resection: a randomized, blinded study. *Ann Surg* 2005; 241: 416-423
- 48 King PM, Blazeby JM, Ewings P, Franks PJ, Longman RJ, Kendrick AH, Kipling RM, Kennedy RH. Randomized clinical trial comparing laparoscopic and open surgery for colorectal cancer within an enhanced recovery programme. *Br J Surg* 2006; 93: 300-308
- 49 Nygren J, Soop M, Thorell A, Efendic S, Nair KS, Ljungqvist O. Preoperative oral carbohydrate administration reduces postoperative insulin resistance. *Clin Nutr* 1998; 17: 65-71
- 50 Wichmann MW, Eben R, Angele MK, Brandenburg F, Goetz AE, Jauch KW. Fast-track rehabilitation in elective colorectal surgery patients: a prospective clinical and immunological single-centre study. *ANZ J Surg* 2007; 77: 502-507
- 51 Hasenberg T, Keese M, Längle F, Reibenwein B, Schindler K, Herold A, Beck G, Post S, Jauch KW, Spies C, Schwenk W, Shang E. 'Fast-track' colonic surgery in Austria and Germany--results from the survey on patterns in current perioperative practice. *Colorectal Dis* 2009; 11: 162-167
- 52 Maessen J, Dejong CH, Hausel J, Nygren J, Lassen K, Andersen J, Kessels AG, Revhaug A, Kehlet H, Ljungqvist O, Fearon KC, von Meyenfeldt MF. A protocol is not enough to implement an enhanced recovery programme for colorectal resection. *Br J Surg* 2007; 94: 224-231
- 53 Jung B, Matthiessen P, Smedh K, Nilsson E, Ransjö U, Pahlman L. Mechanical bowel preparation does not affect the intramucosal bacterial colony count. *Int J Colorectal Dis* 2010; 25: 439-442

编辑 李薇 电编 何基才



# 麦冬多糖MDG-1对糖尿病小鼠糖耐量及肠道菌群的影响

王令仪, 王硕, 王源, 阮克锋, 冯怡

## ■背景资料

随着世界各国社会经济的发展和生活水平的提高, 糖尿病患病率逐年升高, 已成为威胁人们健康的重大社会问题。大量研究表明, 糖尿病患者肠道内的菌群结构、菌群比例以及菌群的数量均与正常人有异, 肠道内的益生菌数量明显减少, 腐败菌数量显著增加。

王令仪, 上海中医药大学中药学专业 上海市 201203  
王硕, 王源, 阮克锋, 冯怡, 上海中医药大学中药现代制剂技术教育部工程中心 上海市 201203  
国家自然科学基金资助项目, No. 81073065  
上海市教委重点学科基金资助项目, No. J50302  
上海市教委预算内科研基金资助项目, No. 09JW20  
上海市科委科技基金资助项目, No. 11ZR1434400  
高等学校博士学科点专项科研基金资助项目, No. 2010310, No. 7120011  
上海市科委基金资助项目, No. 09DZ2292000; No. 09DZ1973000  
作者贡献分布: 此课题由冯怡、王硕及阮克锋设计; 实验操作由王令仪与王源共同完成; 数据整理与文章撰写由王令仪完成。  
通讯作者: 冯怡, 教授, 201203, 上海市, 上海中医药大学中药现代制剂技术教育部工程中心。fyi@vip.sina.com  
电话: 021-51322491  
收稿日期: 2011-05-11 修回日期: 2011-06-13  
接受日期: 2011-06-21 在线出版日期: 2011-07-08

## Effect of MDG-1 on oral glucose tolerance and intestinal microecological balance in diabetic mice

Ling-Yi Wang, Shuo Wang, Yuan Wang, Ke-Feng Ruan, Yi Feng

Ling-Yi Wang, Department of Traditional Chinese Medicine, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China  
Shuo Wang, Yuan Wang, Ke-Feng Ruan, Yi Feng, Engineering Research Center of Modern Preparation Technology of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China  
Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 81073065; the Foundation of Municipal education committee key discipline in Shanghai City, No. J50302; Education scientific research fundation budget in Shanghai City, No. 09JW20; Committee of science and technology fundation in Shanghai City, No. 11ZR1434400; Higher school the special research fundation for the doctoral program in Shanghai City, Nos. 20103107120011  
Correspondence to: Professor Yi Feng, Engineering Research Center of Modern Preparation Technology of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China. fyi@vip.sina.com  
Received: 2011-05-11 Revised: 2011-06-13  
Accepted: 2011-06-21 Published online: 2011-07-08

## Abstract

**AIM:** To investigate the effect of different concentrations of MDG-1, a polysaccharide extracted from *Ophiopogon japonicus*, on oral glucose tolerance and intestinal microecological balance in KKay mice.

**METHODS:** Twenty-six KKay diabetic mice

and ten 9-10-week-old C57bl/6J mice were used in this study. KKay diabetic mice were given a normal diet from week 9 to week 12 and then fed a high-fat diet for 8 weeks. Diabetes was diagnosed when random blood glucose level was more than 13.9 mmol/L at week 12. Mice were randomly divided into five groups: normal control group, blank control group, low-dose MDG-1 group (75 mg/kg), high-dose MDG-1 group (300 mg/kg), and rosiglitazone group. The normal control and blank control groups were treated with distilled water (10 mL/kg), while the rosiglitazone group was treated with rosiglitazone (2 mg/kg). All the drugs were administered by gavage. After 8 weeks of treatment, the general conditions of mice were observed, oral glucose tolerance test (OGTT) was performed, and intestinal flora was cultured and identified.

**RESULTS:** Both high- and low-dose MDG-1 could improve symptoms, such as over-drinking and over-eating, in KKay mice. High-dose MDG-1 was superior to low-dose MDG-1 in improving symptoms in KKay mice. After 8 weeks of treatment, a significant decrease in blood glucose levels was observed in both the high-dose MDG-1 group and rosiglitazone group (both  $P < 0.05$ ). Glucose tolerance was decreased in all KKay mice, especially significantly in the high-dose MDG-1 group and rosiglitazone group (all  $P < 0.05$ ). In KKay mice, the numbers of pathogenic *E. coli* and *Streptococcus* increased while those of *Lactobacilli* and *Bacillus bifidus* decreased. However, treatment with MDG-1 decreased the numbers of pathogenic *E. coli* and *Streptococcus* and increased those of *Lactobacilli* (all  $P < 0.05$ ).

**CONCLUSION:** MDG-1 can improve clinical symptoms and glucose tolerance and modulate intestinal microecological imbalance in KKay mice.

**Key Words:** MDG-1; Diabetes; KKay mice; Oral glucose tolerance test; Intestinal flora

Wang LY, Wang S, Wang Y, Ruan KF, Feng Y. Effect of MDG-1 on oral glucose tolerance and intestinal microeco-

## ■同行评议者

王学美, 研究员,  
北京大学第一医院  
中西医结合研究  
室

logical balance in diabetic mice. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(19): 2058-2062

## 摘要

**目的:** 研究不同剂量麦冬多糖(MDG-1)对自发性肥胖型二型糖尿病KKay小鼠糖耐量及肠道菌群的影响。

**方法:** 正常对照组为周龄9-10 wk C57bl/6J小鼠10只, 实验组为KKay糖尿病小鼠26只; 小鼠9 wk开始普通饲料喂养至12 wk, 随后高脂饲料喂养8 wk。12 wk时测定随机血糖 $>13.9$  mmol/L诊断为糖尿病。小鼠随机分为正常对照组、空白对照组、MDG-1 75、300 mg/kg及罗格列酮组。正常对照组与空白对照组每天灌胃蒸馏水(10 mL/kg), 罗格列酮组每天灌胃2 mg/kg。连续治疗8 wk后, 观察各组动物的一般情况, 测定小鼠0、15、30、60、120 min耐糖血糖值, 并对各组小鼠肠道菌群进行培养, 统计菌群数量。

**结果:** 不同剂量的麦冬多糖MDG-1均可在不同程度上改善KKay小鼠的多饮、多食等症状, 高剂量组的效果优于低剂量组。给药8 wk后, MDG-1低、高剂量均可显著降低糖尿病小鼠的空腹血糖值( $P<0.05$ ); 各模型组的葡萄糖耐量均不同程度受损, MDG-1 300 mg/kg和阳性药罗格列酮组糖耐量均有不同程度的改善( $P<0.05$ ); 糖尿病小鼠肠道内大肠杆菌和链球菌数量显著升高, 而乳酸杆菌和双歧杆菌的数量明显下降, MDG-1 300 mg/kg组可显著降低大肠杆菌和链球菌的数量( $P<0.05$ ), 对双歧杆菌的增殖也有显著作用( $P<0.05$ )。

**结论:** 不同剂量的MDG-1可以在不同程度上缓解糖尿病小鼠的糖尿病症状, 改善糖耐量, 调节肠道菌群平衡。

**关键词:** 麦冬多糖; 糖尿病; KKay小鼠; 口服糖耐量实验; 肠道菌群

王令仪, 王硕, 王源, 阮克锋, 冯怡. 麦冬多糖MDG-1对糖尿病小鼠糖耐量及肠道菌群的影响. *世界华人消化杂志* 2011; 19(19): 2058-2062  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/2058.asp>

## 0 引言

糖尿病是一种与遗传因素有关又与多种环境因素相关的慢性全身性疾病, 是由于体内胰岛素绝对或相对分泌不足而引起的糖、脂肪、蛋白质、水和电解质等一系列代谢紊乱综合征。

临床上以高血糖为主要特点, 典型病例可出现多尿、多饮、多食、消瘦等表现, 即“三多一少”症状<sup>[1]</sup>。随着世界各国社会经济的发展和人民生活水平的提高, 糖尿病患病率逐年升高, 已成为威胁人们健康的重大社会问题。世界卫生组织和国际糖尿病联盟对全球发出警告, 目前全世界至少有1.71亿人罹患糖尿病, 到2030年人数可能倍增, 达3.66亿人。大量研究表明, 糖尿病患者肠道内的菌群结构、菌群比例以及菌群的数量均与正常人有异, 肠道内的益生菌数量明显减少, 腐败菌数量显著增加<sup>[2,3]</sup>。麦冬为百合科沿阶草属植物麦冬*Ophiopogon japonicus*(Thunb.)Ker-Gawl. 的干燥块茎。味甘、微苦, 具有生津润肺、养阴清热的功能, 临床主要用于热病伤津、心烦口渴等症<sup>[4]</sup>。麦冬多糖(MDG-1)是从麦冬中分离纯化得到的均一分子量 $\beta$ -D-果聚糖, 平均分子量为3 400, 化学结构为 $\beta$ -D-果聚糖, 以2 $\rightarrow$ 1连接的呋喃型果糖为主, 平均每2.8个主链残基上有一个Fruf(2 $\rightarrow$ 6)Fruf(2 $\rightarrow$ 分支)<sup>[5]</sup>。前期药理学研究表明, MDG-1具有一定的降糖和改善胰岛素抵抗的作用, 有文献报道其可抑制瘦素mRNA及其蛋白表达<sup>[6]</sup>, 同时对正常小鼠糖耐量及肠道菌群有改善调节的作用<sup>[7]</sup>, 但其作用机制目前仍不明确。本文旨在通过考察MDG-1对糖尿病KKay小鼠糖耐量的影响及对肠道菌群的调节情况, 分析探索MDG-1可能的降血糖作用机制, 为该药的进一步研究开发提供依据。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** ♀KKay小鼠, 26只, 9周龄开始喂饲普通饲料至12周龄, 后高脂饲料喂养8 wk, 于12 wk测定小鼠随机血糖 $>13.9$  mmol/L纳入糖尿病标准, 该32只小鼠均符合纳入标准。对照组选择9-10周龄C57bl/6J小鼠10只, 上述两种品系小鼠均购自中国医学科学院动物研究所, 质量合格证号: SCXK(京)2009-0008。MDG-1, 本实验室制备, 平均分子量为3 400, 纯度 $>98\%$ , 化学结构为 $\beta$ -D-果聚糖。罗格列酮(葛兰素史克), 血糖试纸(强生)。

### 1.2 方法

**1.2.1 动物分组及受试药物剂量:** 小鼠随机分为5组: 正常对照组( $n=10$ ); 空白对照组( $n=6$ ); 罗格列酮组( $n=7$ ); MDG-1低( $n=7$ )、高剂量组( $n=6$ )。正常对照组与空白对照组每天灌胃蒸馏水(0.1 mL/10 g); 罗格列酮每天灌胃2 mg/kg, MDG-1组分别按75、300 mg/kg灌胃, 连续给药

## ■ 相关报道

肖党生等对糖尿病患者肠道菌群进行研究, 实验结果表明糖尿病患者空腹血糖和糖化血红蛋白升高的同时肠道菌群则出现有害菌、肠杆菌科细菌升高, 而双歧杆菌数量下降。

## ■应用要点

不同剂量的MDG-1可以在不同程度上缓解糖尿病小鼠的糖尿病症状,改善糖耐量,调节肠道菌群平衡。

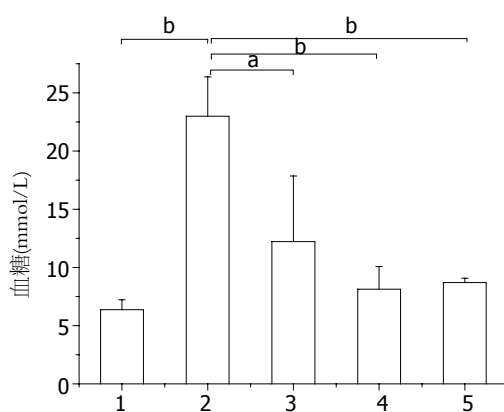


图1 给药8 wk后, MDG-1对各组小鼠空腹血糖的影响。1: 正常对照组; 2: 空白对照组; 3: MDG-1低剂量组; 4: MDG-1高剂量组; 5: 罗格列酮组。<sup>a</sup> $P<0.05$ , <sup>b</sup> $P<0.01$ 。

8 wk.

1.2.2 观察指标: (1)一般状态观察: 观察各组小鼠一般状况, 体质量及饮食情况, 每周测定随机与空腹血糖; (2)糖耐量测定: 实验最后1 wk, 禁食12 h, 于给药后2 h测定各组小鼠空腹血糖值, 随后, 各组小鼠灌服葡萄糖水溶液(1.5 g/kg), 进行口服糖耐量实验, 分别于给药后15、30、60、120 min测定小鼠血糖值, 计算糖耐量曲线下面积<sup>[8]</sup>; (3)肠道菌群检测: 以无菌方法取各组小鼠直肠内容物0.05 g, 有氧菌培养稀释10倍, 厌氧菌培养稀释1 000倍。取菌液20  $\mu$ L接种于各种培养基上。37  $^{\circ}$ C培养24-48 h后观察实验结果, 计算各组小鼠大肠杆菌、链球菌、乳酸杆菌、双歧杆菌的数量<sup>[9]</sup>。进行上述4种细菌的种属鉴定。

**统计学处理** 所有数据用mean $\pm$ SD表示, 采用SPSS17.0软件进行分析。多组间比较采用One-way ANOVA处理, 方差齐使用LSD法, 方差不齐使用Dunnett'T3法。

## 2 结果

2.1 一般状态观察 正常对照组C57bl/6J小鼠精神状态良好, 反应灵敏, 皮毛有光泽, 体质量较稳定。空白对照组KKay小鼠随着周龄的增长逐渐出现精神萎靡, 反应迟钝, 皮毛无光泽, 摄食量、尿量增加, MDG-1治疗组和罗格列酮组、空白对照组有类似情况, 但程度较轻。同时, MDG-1 300 mg/kg可显著降低糖尿病小鼠的空腹血糖值( $P<0.05$ , 图1)。但对其体质量的影响不甚明显。

2.2 MDG-1对糖尿病小鼠口服葡萄糖耐量的影响 空白对照组与正常对照组比较, 其糖耐量受损较为严重, 各给药剂量组均有不同程度的修

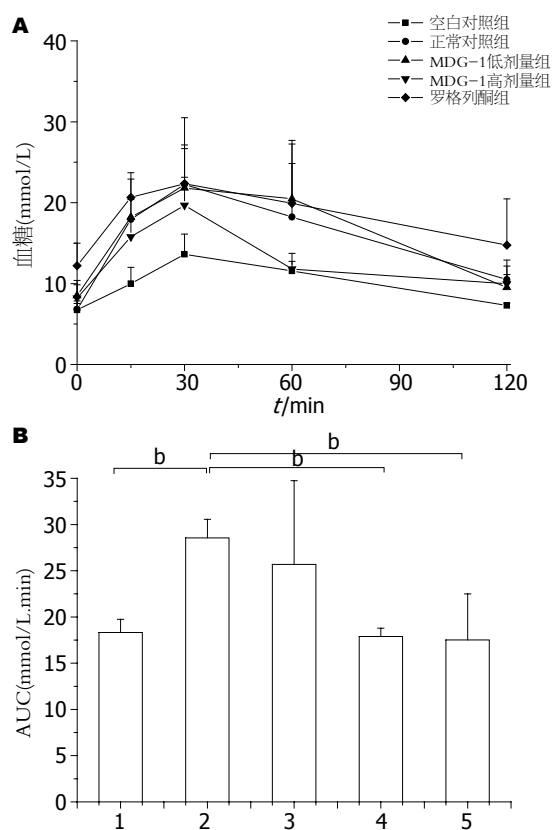


图2 给药8 wk后, MDG-1对各组小鼠口服葡萄糖耐量影响及AUC曲线下面积。1: 正常对照组; 2: 空白对照组; 3: MDG-1低剂量组; 4: MDG-1高剂量组; 5: 罗格列酮组。<sup>b</sup> $P<0.01$ 。

复作用, 在30、60 min时, MDG-1 300 mg/kg的血糖下降率分别达到44.07%、50.22%(图2A)。MDG-1高剂量组、罗格列酮组与空白对照组比较, 其葡萄糖耐量0-120 min曲线下面积明显减小( $P<0.05$ , 图2B), 基本与正常对照组达到同一水平。

2.3 MDG-1对糖尿病小鼠肠道菌群的影响 末次给药后, 处死小鼠, 取其直肠段内容物进行细菌培养, 结果显示, 糖尿病小鼠肠道内大肠杆菌与链球菌的数量明显升高, 而乳酸菌和双歧杆菌的数量明显降低, 与正常对照组相比有统计学差异。给予MDG-1治疗后, 各剂量组对大肠杆菌、链球菌均有一定抑制作用, 同时可以促进双歧杆菌和乳酸菌的增殖(图3)。

## 3 讨论

通常在评价药物降血糖疗效时, 我们会采用空腹血糖或者是随机血糖这样的评价指标用以判断药物的效果。但有文献报道, 这两者均不能全面的、真正的反应患者的血糖水平<sup>[10,11]</sup>。糖耐量减低是2型糖尿病发展过程中的一个中间环节, 其

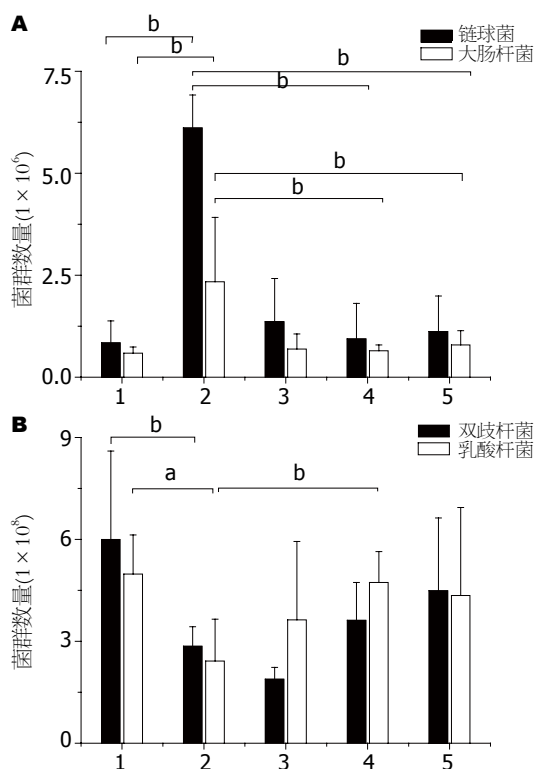


图3 MDG-1对各组小鼠肠道大肠杆菌、链球菌、乳酸杆菌、双歧杆菌的影响。1: 正常对照组; 2: 空白对照组; 3: MDG-1低剂量组; 4: MDG-1高剂量组; 5: 罗格列酮组。<sup>a</sup> $P<0.05$ , <sup>b</sup> $P<0.01$ 。

中的大部分人群随后都会发展成糖尿病<sup>[12]</sup>。所以防治糖耐量减低也是糖尿病治疗中的一个重要的方面。口服葡萄糖耐量实验正是一种葡萄糖负荷实验, 用以了解机体对葡萄糖的调节能力, 同时也是监测糖耐量减低的一种方法和手段。本实验结果显示, 给药8 wk后, MDG-1低、高剂量组和阳性药罗格列酮可显著降低糖尿病小鼠的空腹血糖值; 在口服糖耐量实验中, 给糖2 h后, 各组血糖值均有不同程度的下降, MDG-1 300 mg/kg在给药后30、60 min时, 血糖下降率分别达到44.07%、50.22%, 其曲线下面积也显著降低, 基本接近正常小鼠的水平。

糖尿病患者由于疾病本身的原因, 其饮食受到严格的限制。尤其是对碳水化合物的摄取更为严格。由于饮食结构的变化, 往往会导致其肠道内菌群紊乱, 腐败菌大肠杆菌、链球菌的数量明显上升, 益生菌的数量明显减少。从而促使疾病发生发展。动物实验表明, 无菌动物接种正常菌群后可以增加葡萄糖的摄入, 提高血中葡萄糖和胰岛素水平<sup>[13]</sup>。肖党生等<sup>[14]</sup>对糖尿病患者肠道菌群进行研究, 实验结果表明糖尿病患者空腹血糖和糖化血红蛋白升高的同时肠道

菌群则出现有害菌、肠杆菌科细菌升高, 而双歧杆菌数量下降。有实验研究表明, 肠道内存在一种称之为大肠埃希菌的菌群, 其可以产生类胰岛素物质, 可与胰岛素靶细胞结合, 进而封闭胰岛素受体, 使真正的胰岛素不能够与靶细胞接触, 从而导致糖尿病的发生<sup>[15]</sup>。如果可以增加益生菌的数量, 使其发生拮抗作用, 可以产生胰岛素样物质的大肠埃希菌减少, 从而可以使糖尿病得到缓解。本研究结果表明, 给予MDG-1治疗8 wk后, 其腐败菌大肠杆菌、链球菌的数量明显减少, 益生菌中乳酸菌的数量显著增加, 双歧杆菌的数量也呈增长态势。MDG-1可能通过调节机体整体功能, 改善糖耐量减低及菌群失调状况, 进而改善糖尿病小鼠糖代谢及糖尿病症状。关于MDG-1改善糖尿病的实验证据, 更深层次的作用机制仍需进一步完善。

#### 4 参考文献

- 1 李端, 殷明. 药理学. 第5版. 北京: 人民卫生出版社, 2005: 314
- 2 姚君厘, 杨永年, 付华, 付东波. 糖尿病并发感染及其危险因素分析. 中华医院感染杂志 1998; 8: 216-218
- 3 Hansen AK, Ling F, Kaas A, Funda DP, Farlov H, Buschard K. Diabetes preventive gluten-free diet decreases the number of caecal bacteria in non-obese diabetic mice. *Diabetes Metab Res Rev* 2006; 22: 220-225
- 4 齐建红, 陶贵荣, 郭新军, 冯航, 张九东. 麦冬多糖的生物活性研究进展. 西安文理学院学报(自然科学版) 2008; 11: 44-46
- 5 徐德生, 冯怡, 林晓, 邓海林, 方积年, 董群. 麦冬多糖MDG-1的分离纯化和结构分析. 药学学报 2005; 40: 636-639
- 6 王硕, 冯怡, 徐德生, 章漳, 丁侃. 麦冬多糖MDG-1对内皮细胞瘦素表达的影响. 中国应用生理学杂志 2009; 25: 160-161
- 7 王令仪, 王源, 阮克锋, 王硕, 冯怡. 麦冬多糖MDG-1对非糖尿病小鼠糖耐量及肠道菌群的影响. 中国新药与临床杂志 2011; 30: 453-457
- 8 王雪云, 张爽, 李红, 杨世杰. Exenatide类似物对2型糖尿病大鼠降糖作用研究. 中国新药杂志 2010; 19: 1347-1350
- 9 王小莉, 张汝学, 贾正平. 地黄寡糖灌胃对糖尿病大鼠的降糖作用及对肠道菌群的影响. 西北国防医学杂志 2003; 24: 121-123
- 10 Sorkin JD, Muller DC, Fleg JL, Andres R. The relation of fasting and 2-h postchallenge plasma glucose concentrations to mortality: data from the Baltimore Longitudinal Study of Aging with a critical review of the literature. *Diabetes Care* 2005; 28: 2626-2632
- 11 Anand SS, Razak F, Vuksan V, Gerstein HC, Malmberg K, Yi Q, Teo KK, Yusuf S. Diagnostic strategies to detect glucose intolerance in a multiethnic population. *Diabetes Care* 2003; 26: 290-296
- 12 詹志伟, 李晓光, 甘利虹, 俞兆凤, 裴育, 王宝玲. 肥胖者胰岛素分泌功能对糖耐量减低及糖尿病发生的影响. 中国糖尿病学杂志 2002; 10: 145-157
- 13 Bäckhed F, Ding H, Wang T, Hooper LV, Koh GY,

#### ■同行评价

本文选题新颖, 具有一定的临床研究意义和实用价值。



Nagy A, Semenkovich CF, Gordon JL. The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101: 15718-15723

14 肖党生, 王招娣, 杨云梅, 陈春雷, 洪鸣鸣. 糖尿病患者肠道菌群研究. *中国微生态学杂志* 2006; 18: 275-276  
15 康白. *微生态学原理*. 第1版. 大连: 大连出版社, 1996: 42

编辑 李薇 电编 何基才

ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) CN 14-1260/R 2011年版权归世界华人消化杂志

## • 消息 •

# 百世登出版集团推出 12 种开放获取生物医学期刊全部被 PubMed 和 PMC 收录

**本刊讯** 由美国国立医学图书馆(U.S. National Library of Medicine, 简称NLM), 美国国立生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information, 简称NCBI)和美国国立卫生研究院(National Institutes of Health, 简称NIH), 共同于2010-2011年, 收录了百世登出版集团有限公司(Baishideng Publishing Group Co., Limited, 简称BPG)出版的12种开放获取生物医学期刊. 12种期刊被NLM, NCBI和NIH共同主办的PubMed Central和PubMed平台, 公开面向全球发布, 读者免费阅读和下载全文. 12种期刊被收录的名称及网址如下:

- 1 World Journal of Biological Chemistry (世界生物化学杂志)  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/journals/1495/>
- 2 World Journal of Cardiology (世界心脏病学杂志)  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/journals/1320/>
- 3 World Journal of Clinical Oncology (世界临床肿瘤学杂志)  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/journals/1494/>
- 4 World Journal of Diabetes (世界糖尿病杂志)  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/journals/1498/>
- 5 World Journal of Gastrointestinal Endoscopy (世界胃肠内镜杂志)  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/journals/1323/>
- 6 World Journal of Gastrointestinal Oncology (世界胃肠肿瘤学杂志)  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/journals/1324/>
- 7 World Journal of Gastrointestinal Pathophysiology (世界胃肠病理生理学杂志)  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/journals/1496/>
- 8 World Journal of Gastrointestinal Pharmacology and Therapeutics (世界胃肠药理学与治疗杂志)  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/journals/1497/>
- 9 World Journal of Gastrointestinal Surgery (世界胃肠外科杂志)  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/journals/1325/>
- 10 World Journal of Hepatology (世界肝病学杂志)  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/journals/1321/>
- 11 World Journal of Radiology (世界放射学杂志)  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/journals/1322/>
- 12 World Journal of Stem Cells (世界干细胞杂志)  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/journals/1470/>

(总编辑: 马连生2011-05-30)

# TRAIL在重型肝炎患者PBMC和血清中的表达及血浆置换治疗前后的变化

魏屏, 张景辉, 刘薇, 朱祥珍

魏屏, 朱祥珍, 华中科技大学同济医学院附属协和医院感染科 湖北省武汉市 430022

张景辉, 华中科技大学同济医学院附属协和医院外科实验室 湖北省武汉市 430022

刘薇, 华中科技大学同济医学院附属协和医院感染科实验室 湖北省武汉市 430022

作者贡献分布: 此课题由魏屏设计; 研究过程由张景辉、刘薇及朱祥珍操作完成; 数据分析由魏屏与张景辉完成; 本论文写作由魏屏完成。

通讯作者: 魏屏, 副教授, 430022, 湖北省武汉市, 华中科技大学同济医学院附属协和医院感染科。pingw\_2006@yahoo.com.cn  
收稿日期: 2011-05-12 修回日期: 2011-06-20

接受日期: 2011-06-28 在线出版日期: 2011-07-08

## Changes in levels of TRAIL mRNA in PBMCs and sTRAIL in serum in patients with severe hepatitis between before and after plasma exchange therapy

Ping Wei, Jing-Hui Zhang, Wei Liu, Xiang-Zhen Zhu

Ping Wei, Xiang-Zhen Zhu, Department of Infectious Diseases, Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, Hubei Province, China

Jing-Hui Zhang, Surgical Laboratory, Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, Hubei Province, China

Wei Liu, Laboratory for Infectious Diseases, Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, Hubei Province, China

Correspondence to: Associate Professor Ping Wei, Department of Infectious Diseases, Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, Hubei Province, China. pingw\_2006@yahoo.com.cn

Received: 2011-05-12 Revised: 2011-06-20

Accepted: 2011-06-28 Published online: 2011-07-08

## Abstract

**AIM:** To investigate the role of TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) in the pathogenesis of severe hepatitis and to detect the impact of plasma exchange therapy on the levels of TRAIL.

**METHODS:** The expression of membrane-bound TRAIL in peripheral blood mononuclear cells

(PBMCs) was examined by real-time fluorescence quantitative PCR, while serum levels of soluble TRAIL (sTRAIL) were measured by ELISA. Correlation analysis was performed among serum TBIL, ALB and PT. Furthermore, the levels of TRAIL in patients after plasma exchange (PE) therapy were determined.

**RESULTS:** The levels of TRAIL mRNA in PBMCs and sTRAIL in serum were significantly higher in patients with severe hepatitis than in normal controls ( $P < 0.05, 0.01$ ). The levels of TRAIL mRNA in PBMCs and sTRAIL in serum had no significant association with serum TBIL, ALB and PT, and the levels of TRAIL mRNA in PBMCs had no significant association with serum sTRAIL. The levels of TRAIL in PBMCs were significantly lower in patients with severe hepatitis after PE therapy than before PE therapy ( $P < 0.001$ ), while serum sTRAIL levels showed no significant changes between before and after therapy. The levels of TRAIL mRNA in PBMCs and sTRAIL in serum were significantly lower in patients with a positive treatment response than in those with a negative treatment response ( $P < 0.01, 0.05$ ).

**CONCLUSION:** TRAIL-mediated apoptosis probably plays a key role in the pathogenesis of severe hepatitis. TRAIL level can be used as a marker for evaluation of the degree of liver damage in patients with severe hepatitis.

**Key Words:** Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand; Peripheral blood mononuclear cells; Severe hepatitis; Plasma exchange

Wei P, Zhang JH, Liu W, Zhu XZ. Changes in levels of TRAIL mRNA in PBMCs and sTRAIL in serum in patients with severe hepatitis between before and after plasma exchange therapy. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(19): 2063-2067

## 摘要

**目的:** 探讨肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体 (TRAIL) 在重型肝炎发病机制中的作用以及

## ■背景资料

目前国内外学者研究发现TRAIL及相关受体通过介导细胞凋亡, 参与了病毒性肝炎、酒精性肝病、胆源性肝损伤等多种病因导致的肝脏病理损伤。但TRAIL在重型肝炎发病机制中的作用、血浆置换治疗对TRAIL的影响等方面的研究尚不多见。

## ■同行评议者

郑素军, 副主任医师, 首都医科大学附属北京佑安医院人工肝中心

## ■相关报道

2003年Mundt等在腺病毒感染鼠肝炎模型中发现,病毒感染可激活TRAIL并诱导细胞凋亡,其推测TRAIL诱导细胞凋亡可能在病毒性肝炎中发挥重要作用。

血浆置换治疗前后变化的意义。

**方法:**采用实时荧光定量PCR反应检测30例重型肝炎患者外周血单个核细胞(PBMC)TRAIL mRNA的水平,采用ELISA法检测其血清可溶性TRAIL(sTRAIL)的水平,并与肝功能相关指标进行相关性分析。观察血浆置换(PE)治疗前后TRAIL的变化,比较治疗有效组和治疗无效组之间TRAIL水平差异。

**结果:**重型肝炎患者PBMC TRAIL mRNA的水平及血清sTRAIL的水平均明显高于健康对照组( $0.0622 \pm 0.0227$  vs  $0.0059 \pm 0.0023$ ,  $P < 0.05$ ;  $9.1058 \pm 3.2260$  vs  $2.4552 \pm 1.7485$ ,  $P < 0.01$ )。mTRAIL和sTRAIL与肝功能相关指标总胆红素(TB)、白蛋白(ALB)以及凝血酶原时间(PT)均无直线相关性,膜型TRAIL(mTRAIL)和sTRAIL之间也无直线相关性。PE治疗后,肝功能相关指标改善;PBMC TRAIL mRNA水平下降,治疗前后有显著性差异( $0.0622 \pm 0.0227$  vs  $0.0214 \pm 0.0140$ ,  $P < 0.001$ );而血清sTRAIL水平在PE治疗前后无明显变化。治疗有效组PBMC TRAIL mRNA水平、血清sTRAIL水平均低于治疗无效组,差异显著( $0.0154 \pm 0.0076$  vs  $0.0320 \pm 0.0178$ ,  $P < 0.01$ ;  $8.0476 \pm 3.5599$  vs  $11.0479 \pm 2.6694$ ,  $P < 0.05$ )。

**结论:**TRAIL介导的细胞凋亡在重型肝炎病理损害过程中起着重要的作用,TRAIL的水平在一定程度上能反映患者的肝脏损伤程度。从近期观察,PE治疗能降低患者PBMC TRAIL mRNA水平,但不能降低血清sTRAIL水平。

**关键词:**肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体;外周血单个核细胞;重型肝炎;血浆置换

魏屏, 张景辉, 刘薇, 朱祥珍. TRAIL在重型肝炎患者PBMC和血清中的表达及血浆置换治疗前后的变化. 世界华人消化杂志 2011; 19(19): 2063-2067  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/2063.asp>

## 0 引言

在重型肝炎发病机制的研究中,发现许多凋亡分子参与了重型肝炎肝脏病理损伤过程,如Fas/FasL配体系统、TNF- $\alpha$ /TNF-R1系统、肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体(TNF-related apoptosis inducing ligand, TRAIL)受体/配体系统等,而TRAIL受体/配体系统的作用日益引起关注<sup>[1]</sup>。本研究采用实时荧光定量PCR反应检测重型肝炎患者外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cells, PBMC)TRAIL mRNA的水平,采用

ELISA法检测其血清中可溶性TRAIL(sTRAIL)的水平,并与肝功能相关指标进行相关性分析。同时观察血浆置换(plasma exchange, PE)治疗前后TRAIL的变化,并进一步比较治疗有效组和治疗无效组之间TRAIL水平差异,旨在探讨TRAIL在重型肝炎发病机制中的作用和PE治疗前后变化的意义。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 2008-03/2009-03住华中科技大学同济医学院附属协和医院感染科的重型肝炎患者30例(患者均知情同意,并通过医院伦理会批准),男27例,女3例,年龄19-75(平均年龄43)岁,诊断分型按2000年第十届全国传染病与寄生虫病学术会议修订的标准<sup>[2]</sup>。其中慢性重型肝炎25例,亚急性重型肝炎4例,急性重型肝炎1例。血清病毒学检测:乙型肝炎病毒感染14例,乙型肝炎病毒和丙型肝炎病毒混合感染1例,乙型肝炎病毒和戊型肝炎病毒重叠感染13例,中毒性肝炎1例,原因不明者1例。10例健康献血者作为健康对照组。应用日本旭化成医疗株式会社ACH-10型持续徐缓式血液净化装置及一次性耗材。TRIzol提取液、Oligo(dT)18、RNasin、RTase均购自美国Invitrogen公司。引物购自上海Invitrogen生物技术有限公司。SYBR Green I 荧光染料购自美国Biotium公司。采用美国ABI公司ABI7700荧光定量PCR仪。ELISA法试剂盒购自奥地利维也纳Bender公司。肝功能检测采用日本Olympus AU600全自动生化分析仪。凝血酶原时间(PT)检测采用日本Sysmex公司CA7000全自动血凝分析系统。

## 1.2 方法

**1.2.1 方法:**30例重型肝炎患者在内科治疗基础上加PE治疗。患者行股静脉置管术,建立静脉通道,使用血液净化装置,以1 100 mL/h速度分离血浆,弃之,分离血浆总量3 000 mL,置换异体同型等量新鲜血浆,与血细胞混合后同步回输。每例患者连续行2次PE治疗,2次间隔时间为36-72 h。分别于第1次PE治疗前、第2次PE治疗后72 h采集静脉血5 mL,3 mL置EDTA-K2抗凝管内,用Ficoll淋巴细胞分离液分离单个核细胞,-70℃冻存备检,另2 mL分离血清,冻存于-70℃备检。观察健康对照组及重型肝炎患者PBMC TRAIL mRNA水平、血清sTRAIL水平,并与肝功能相关指标做相关性分析;观察患者PE治疗前后PBMC TRAIL mRNA水平、血清sTRAIL水

平及肝功能相关指标的变化;观察PE治疗有效组和无效组间TRAIL水平的差异,即根据公式推算PT 25 s等于凝血酶原活动度(PTA)37%<sup>[3]</sup>,将PT<25 s者为PE治疗有效组,PT≥25 s者为PE治疗无效组。

**1.2.2 实时荧光定量PCR反应检测PBMC TRAIL mRNA的水平:**按照TRIzol说明书操作,提取患者的外周血单个核细胞的总RNA,然后将mRNA逆转录成cDNA分子。应用SYBR Green I 荧光染料技术行实时定量PCR反应,以适量cDNA为模板,以磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH)为内参照,PCR扩增TRAIL基因片断。TRAIL引物,上游: 5'-AGTCAAGTGGCAACTCCGT-CAG-3', 下游: 5'-CTTCCTCTGGTCCCAGT-TATGTG-3'。GAPDH引物,上游: 5'-GTCAC-CAGGGCTGCTTTTAACTC-3', 下游: 5'-CAG-CATCGCCCCACTTGATTTTG-3'。PCR反应参数: 预变性94 ℃ 5 min, 然后94 ℃变性30 s, 53 ℃退火30 s, 72 ℃延伸30 s, 共45个循环。最后72 ℃延伸10 min。在延伸的过程中搜集荧光信号。于每次扩增的同时设置无cDNA的阴性对照,将PCR产物做熔解曲线,验证产物特异性,证实以上PCR反应产物特异性良好。计算方法: 用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算TRAIL mRNA的表达量。

**1.2.3 血清中sTRAIL检测:**严格按试剂盒说明书操作。

**1.2.4 肝功能相关指标检测:**用全自动生化分析仪检测总胆红素(TB)、白蛋白(ALB),用全自动血凝分析系统检测PT。

**统计学处理** 各检测指标以mean±SD表示,组内PE治疗前后均数比较采用配对 $t$ 检验,组间均数比较采用成组 $t$ 检验, $P<0.05$ 为统计学上有显著性差异。相关性分析采用直线相关分析。

## 2 结果

**2.1 健康对照组及重型肝炎患者TRAIL水平** 健康对照组PBMC TRAIL mRNA水平为 $0.0059 \pm 0.0023$ ,患者为 $0.0622 \pm 0.0227$ ,患者明显高于健康对照组( $t' = 13.38, P<0.05$ )。健康对照组血清sTRAIL水平为 $2.4552 \pm 1.7485$ ,患者为 $9.1058 \pm 3.2260$ ,患者明显高于健康对照组( $t = 6.19, P<0.01$ )。

**2.2 患者TRAIL水平与肝功能相关指标相关性分析** 膜型TRAIL(mTRAIL)和sTRAIL与TB、ALB、PT均无直线相关性,mTRAIL和sTRAIL之间也无相关性。

**2.3 患者PE治疗前后TRAIL水平及肝功能相关指标的变化** PE治疗前后PBMC TRAIL mRNA水平分别为 $0.0622 \pm 0.0227$ 、 $0.0214 \pm 0.0140$ ,治疗后较治疗前下降,差异有显著性( $t = 8.99, P<0.001$ )。PE治疗前后血清sTRAIL水平分别为 $9.1058 \pm 3.2260$ 、 $9.0584 \pm 3.5468$ ,PE治疗前后无显著性差异。PE治疗前后TB水平分别为 $556.56 \pm 142.50$ 、 $374.81 \pm 152.84$ ,治疗后较治疗前下降,差异有显著性( $t = 4.79, P<0.001$ )。PE治疗前后ALB水平分别为 $32.67 \pm 4.77$ 、 $32.75 \pm 4.01$ ,治疗前后无显著性差异。PE治疗前后PT水平分别为 $29.85 \pm 19.53$ 、 $21.59 \pm 9.03$ ,治疗后较治疗前下降,差异有显著性( $t = 3.23, P<0.005$ )。

**2.4 治疗有效组和无效组TRAIL水平比较** 治疗有效组PBMC TRAIL mRNA的水平为 $0.0154 \pm 0.0076$ ,治疗无效组为 $0.0320 \pm 0.0178$ ;治疗有效组血清sTRAIL的水平为 $8.0476 \pm 3.5599$ ,治疗无效组为 $11.0479 \pm 2.6694$ ;即治疗有效组PBMC TRAIL mRNA水平、血清sTRAIL水平均低于治疗无效组,差异显著( $t = 3.60, P<0.01, t = 2.33, P<0.05$ )。

## 3 讨论

TRAIL是继TNF、FasL之后发现的第3个TNF超家族的凋亡分子,广泛表达于多种组织和细胞,TRAIL可被金属蛋白酶从膜上切下而产生114-281位可溶的活性肽段称为sTRAIL。TRAIL对正常生理状态下的机体组织没有毒性,而在病理状态下被激活参与机体的免疫反应,TRAIL被认为是机体的一个典型的免疫监视分子<sup>[4,5]</sup>,在机体的免疫调节和肿瘤凋亡中起着重要的作用,TRAIL诱导细胞凋亡的调控主要是通过严格的受体表达来实现的<sup>[6,7]</sup>。2003年Mundt等<sup>[8]</sup>在腺病毒感染鼠肝炎模型中发现,病毒感染可激活TRAIL并诱导细胞凋亡,其推测TRAIL诱导细胞凋亡可能在病毒性肝炎中发挥重要作用。近年国内外学者研究发现TRAIL及相关受体通过介导细胞凋亡,参与了病毒性肝炎的免疫损伤<sup>[9,10]</sup>,同时还发现在酒精性肝病、胆源性肝损伤等肝脏病理损伤中也起着重要的作用<sup>[11-13]</sup>。本研究发现重型肝炎患者PBMC TRAIL mRNA水平以及血清sTRAIL水平明显高于健康对照组,还发现通过PE治疗后,治疗有效组(PT<25 s)PBMC TRAIL mRNA水平、血清sTRAIL水平均低于治疗无效组(PT≥25 s),PT和凝血酶原活动度(prothrombin time activity, PTA)是反映肝损害

### ■应用要点

本研究发现TRAIL介导的细胞凋亡在重型肝炎病理损害过程中起着重要的作用,TRAIL能敏感地反映患者的肝功能损伤程度。从近期观察,血浆置换治疗能降低患者PBMC TRAIL mRNA水平,但不能降低血清sTRAIL水平,而降低TRAIL水平可能是治疗重型肝炎的一个重要目标,值得进一步深入探讨。

## ■同行评价

本文数据处理方法得当,结果可信,有一定的临床价值。

严重的敏感指标,PT越长、PTA越低,肝损害越重,预后越差,提示在重型肝炎病理损害过程中同样存在TRAIL介导的细胞凋亡,TRAIL的水平能敏感地反映患者的肝脏损伤程度。我国大部分重型肝炎是由于病毒感染所致,故认为在疾病的初期TRAIL受体/配体系统及其他众多的免疫分子在病理状态下被激活参与机体的免疫反应,特异地杀伤病毒感染的肝细胞,导致肝脏的免疫损伤,继而因肝脏受损,肝脏的解毒功能下降,肠源性内毒素进入体循环,又刺激外周血免疫细胞如单个核细胞、淋巴细胞等,使其表达TRAIL增多,PBMC TRAIL mRNA表达增加,其脱落也相应增加,即sTRAIL水平也增高,膜性TRAIL和sTRAIL均具有相同的生物学活性<sup>[14]</sup>,均能与肝细胞上受体结合后引起肝细胞凋亡,进一步加重肝脏损伤,使病情严重。

本研究显示连续2次PE治疗,近期能明显改善患者的肝功能指标,即TBIL、PT下降。同时PBMC TRAIL mRNA水平也较治疗前明显下降,提示可能随着各种代谢毒素和致病因子的清除,PBMC TRAIL mRNA表达减弱,这也可能减轻TRAIL介导的细胞凋亡,有助于病情好转。本研究还显示血清sTRAIL水平在PE治疗前后均无明显变化,这可能提示PE治疗近期并不能有效清除sTRAIL,或者是PE在清除细胞因子的同时又有类似于血液透析时因血细胞与PE装置中的膜接触活化而释放细胞因子。非生物型人工肝支持系统是治疗重型肝炎有效方法之一,而PE治疗是目前最常用的人工肝方法,PE治疗是将患者的血液引出体外,经过膜式血浆分离方法将患者的血浆从全血中分离出来弃去,然后补充等量的新鲜冷冻血浆或人血白蛋白等置换液,这样便可以清除患者体内的各种代谢毒素和致病因子,从而达到治疗目的<sup>[15]</sup>。在重型肝炎的发生发展中,大量细胞因子是关键的促炎介质<sup>[16]</sup>,如果通过PE治疗,能清除患者身体过量的细胞因子,即能阻断重型肝炎的炎症级联反应。关于PE能否有效清除炎性细胞因子,分歧较大,有研究认为PE治疗可以清除循环中的多种细胞因子<sup>[17-19]</sup>,也有研究认为PE并不能有效清除炎性细胞因子<sup>[20,21]</sup>。然而关于PE治疗能否降低血清sTRAIL水平,目前鲜见报道。

总之,本研究提示TRAIL介导的细胞凋亡在重型肝炎病理损害过程中起着重要的作用,TRAIL能敏感地反映患者的肝功能损伤程度。通过PE治疗,PBMC TRAIL mRNA水平明显下降,

而降低TRAIL水平可能是治疗重型肝炎的一个重要目标,值得进一步深入探讨。

## 4 参考文献

- 1 Velthuis JH, Rouschop KM, De Bont HJ, Mulder GJ, Nagelkerke JF. Distinct intracellular signaling in tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand- and CD95 ligand-mediated apoptosis. *J Biol Chem* 2002; 277: 24631-24637
- 2 中华医学会传染病与寄生虫病学分会, 肝病学会. 病毒性肝炎防治方案. 中华肝病杂志 2000; 8: 324-329
- 3 吴友根. 凝血酶原时间的检测及意义. 实用肝脏病杂志 2007; 10: 147
- 4 Sträter J, Möller P. TRAIL and viral infection. *Vitam Horm* 2004; 67: 257-274
- 5 Kamohara H, Matsuyama W, Shimozaoto O, Abe K, Galligan C, Hashimoto S, Matsushima K, Yoshimura T. Regulation of tumour necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) and TRAIL receptor expression in human neutrophils. *Immunology* 2004; 111: 186-194
- 6 Thorburn A. Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) pathway signaling. *J Thorac Oncol* 2007; 2: 461-465
- 7 Falschlehner C, Emmerich CH, Gerlach B, Walczak H. TRAIL signalling: decisions between life and death. *Int J Biochem Cell Biol* 2007; 39: 1462-1475
- 8 Mundt B, Kühnel F, Zender L, Paul Y, Tillmann H, Trautwein C, Manns MP, Kubicka S. Involvement of TRAIL and its receptors in viral hepatitis. *FASEB J* 2003; 17: 94-96
- 9 Chen GY, He JQ, Lu GC, Li MW, Xu CH, Fan WW, Zhou C, Chen Z. Association between TRAIL expression on peripheral blood lymphocytes and liver damage in chronic hepatitis B. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 4090-4093
- 10 毛丽萍, 王惠民, 张子玉, 吴月平, 章幼奕, 鞠少卿, 王陆军, 陈育凤. 外周血单个核细胞TRAIL mRNA和血清sTRAIL水平与HBV感染肝损伤的相关性. 世界华人消化杂志 2007; 15: 641-645
- 11 Pelli N, Floreani A, Torre F, Delfino A, Baragiotta A, Contini P, Basso M, Picciotto A. Soluble apoptosis molecules in primary biliary cirrhosis: analysis and commitment of the Fas and tumour necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand systems in comparison with chronic hepatitis C. *Clin Exp Immunol* 2007; 148: 85-89
- 12 Kahraman A, Barreyro FJ, Bronk SF, Werneburg NW, Mott JL, Akazawa Y, Masuoka HC, Howe CL, Gores GJ. TRAIL mediates liver injury by the innate immune system in the bile duct-ligated mouse. *Hepatology* 2008; 47: 1317-1330
- 13 Mundt B, Wirth T, Zender L, Waltemathe M, Trautwein C, Manns MP, Kühnel F, Kubicka S. Tumour necrosis factor related apoptosis inducing ligand (TRAIL) induces hepatic steatosis in viral hepatitis and after alcohol intake. *Gut* 2005; 54: 1590-1596
- 14 Trabzuni D, Famulski KS, Ahmad M. Functional analysis of tumour necrosis factor-alpha-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL): cysteine-230 plays a critical role in the homotrimerization and biological activity of this novel tumoricidal cytokine. *Biochem J* 2000; 350 Pt 2: 505-510
- 15 中华医学会感染病学分会肝衰竭与人工肝学组. 非生物型人工肝支持系统治疗肝衰竭指南(2009年版). 中



- 华临床感染病杂志 2009; 2: 321-325
- 16 Isoniemi H, Koivusalo AM, Repo H, Ilonen I, Höckerstedt K. The effect of albumin dialysis on cytokine levels in acute liver failure and need for liver transplantation. *Transplant Proc* 2005; 37: 1088-1090
- 17 Mao WL, Chen Y, Chen YM, Li LJ. Changes of serum cytokine levels in patients with acute on chronic liver failure treated by plasma exchange. *J Clin Gastroenterol* 2011; 45: 551-555
- 18 罗光汉, 吴健林, 刘志红, 邓一鸣. 血浆置换治疗对急性肝衰竭患者血清炎症细胞因子水平的影响. *中华肝病杂志* 2007; 15: 625-626
- 19 Nakae H, Asanuma Y, Tajimi K. Cytokine removal by plasma exchange with continuous hemodiafiltration in critically ill patients. *Ther Apher* 2002; 6: 419-424
- 20 Stadlbauer V, Krisper P, Aigner R, Haditsch B, Jung A, Lackner C, Stauber RE. Effect of extracorporeal liver support by MARS and Prometheus on serum cytokines in acute-on-chronic liver failure. *Crit Care* 2006; 10: R169
- 21 Rifai K, Ernst T, Kretschmer U, Haller H, Manns MP, Fliser D. Removal selectivity of Prometheus: a new extracorporeal liver support device. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 940-944

编辑 李薇 电编 何基才

ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) CN 14-1260/R 2011年版权归世界华人消化杂志

## • 消息 •

### 《世界华人消化杂志》出版流程

**本刊讯** 《世界华人消化杂志》[ISSN 1009-3079 (print), ISSN 2219-2859 (online), CN 14-1260/R]是一份同行评议性和开放获取(open access, OA)的旬刊, 每月8、18、28号按时出版. 具体出版流程介绍如下:

**第一步 作者提交稿件:** 作者在线提交稿件(<http://www.baishideng.com/wcjd/ch/index.aspx>), 提交稿件中出现问题可以发送E-mail至[submission@wjgnet.com](mailto:submission@wjgnet.com)咨询, 编务将在1个工作日内回复.

**第二步 审稿:** 送审编辑对所有来稿进行课题查新, 并进行学术不端检测, 对不能通过预审的稿件直接退稿, 通过预审的稿件送交同行评议专家进行评议. 编辑部主任每周组织定稿会, 评估审稿人意见, 对评审意见较高, 文章达到本刊发表要求的稿件送交总编辑签发拟接受, 对不能达到本刊发表要求的稿件退稿.

**第三步 编辑、修改稿件:** 科学编辑严格根据编辑规范要求编辑文章, 包括全文格式、题目、摘要、图表科学性和参考文献; 同时给出退修意见送作者修改. 作者修改稿件中遇到问题可以发送E-mail至责任科学编辑, 责任科学编辑在1个工作日内回复. 为保证文章审稿意见公平公正, 本刊对每一篇文章均增加该文章的同行评议者和同行评论, 同时配有背景资料、研发前沿、相关报道、创新盘点、应用要点和名词解释, 供非专业人士阅读了解该领域的最新科研成果.

**第四步 录用稿件:** 作者将稿件修回后, 编辑部主任组织第2次定稿会, 评估作者修回稿件质量. 对修改不合格的稿件通知作者重修或退稿, 对修改合格的稿件送总编辑终审, 合格后发正式录用通知. 稿件正式录用后, 编务通知作者缴纳出版费, 出版费缴纳后编辑部安排生产, 并挂号将缴费发票寄出.

**第五步 排版制作:** 电子编辑对稿件基本情况进行审核, 核对无误后, 进行稿件排版及校对、图片制作及参考文献核对. 彩色图片保证放大400%依然清晰; 中文参考文献查找全文, 核对作者、题目、期刊名、卷期及页码, 英文参考文献根据本杂志社自主研发的“参考文献检测系统”进行检测, 确保作者、题目、期刊名、卷期及页码准确无误. 排版完成后, 电子编辑进行黑马校对, 消灭错别字及语句错误.

**第六步 组版:** 本期责任电子编辑负责组版, 对每篇稿件图片校对及进行质量控制, 校对封面、目次、正文页码和书眉, 修改作者的意见, 电子编辑进行三校. 责任科学编辑制作整期中英文摘要, 并将英文摘要送交英文编辑进一步润色. 责任电子编辑再将整期进行二次黑马校对. 责任科学编辑审读本期的内容包括封面、目次、正文、表格和图片, 并负责核对作者、语言编辑和语言审校编辑的清样, 负责本期科学新闻稿的编辑.

**第七步 印刷、发行:** 编辑部主任和主编审核清样, 责任电子编辑通知胶片厂制作胶片, 责任科学编辑、电子编辑核对胶片无误送交印刷厂进行印刷. 责任电子编辑制作ASP、PDF、XML等文件. 编务配合档案管理员邮寄杂志.

**第八步 入库:** 责任电子编辑入库, 责任科学编辑审核, 包括原创文章、原始清样、制作文件等.

《世界华人消化杂志》从收稿到发行每一步都经过严格审查, 保证每篇文章高质量出版, 是消化病学专业人士发表学术论文首选的学术期刊之一. 为保证作者研究成果及时公布, 《世界华人消化杂志》保证每篇文章16 wk内完成. (编辑部主任: 李军亮 2010-01-18)

# 重型肝炎预后因素分析与护理对策

罗玲, 袁春兰, 赖宁, 蒋祖利, 林年芬, 汪景香

## ■背景资料

重型肝炎是乙型肝炎病毒性肝炎中最严重的临床类型, 包括急性、亚急性、慢性重型肝炎, 易出现多种并发症, 并发症的出现是重型肝炎病情加重的主要标志, 也是导致死亡的主要原因。

罗玲, 袁春兰, 赖宁, 蒋祖利, 林年芬, 汪景香, 重庆医科大学第二临床学院感染病科 重庆市 400010

重庆医科大学校办课题基金资助项目, No. Xbyb2008030

作者贡献分布: 本文设计由罗玲完成; 资料收集由罗玲、袁春兰、赖宁、蒋祖利、林年芬及汪景香完成; 数据分析由罗玲与赖宁完成; 本论文书写由罗玲与袁春兰完成。

通讯作者: 袁春兰, 400010, 重庆市, 重庆医科大学第二临床学院感染病科. yuanchunlan@163.com

收稿日期: 2011-03-28 修回日期: 2011-05-26

接受日期: 2011-06-15 在线出版日期: 2011-07-08

## Severe hepatitis: prognostic factors and nursing interventions

Ling Luo, Chun-Lan Yuan, Ning Lai, Zu-Li Jiang, Nian-Fen Lin, Jing-Xiang Wang

Ling Luo, Chun-Lan Yuan, Ning Lai, Zu-Li Jiang, Nian-Fen Lin, Jing-Xiang Wang, Department of Infectious Diseases, the Second Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400010, China

Supported by: the Chongqing Medical University School-run Project, No. Xbyb2008030

Correspondence to: Chun-Lan Yuan, Department of Infectious Diseases, the Second Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400010, China. yuanchunlan@163.com

Received: 2011-03-28 Revised: 2011-05-26

Accepted: 2011-06-15 Published online: 2011-07-08

## Abstract

**AIM:** To determine factors that can significantly influence the prognosis of severe hepatitis and to establish an prognostic assessment system to provide a basis for nursing interventions.

**METHODS:** Two hundred and one patients with severe hepatitis who were treated from January 2007 to June 2010 at our hospital were included in this study. These patients were divided into two groups: patients with a positive treatment response and those with a negative response. Factors including age, sex, clinical type, pathogen type, complications, past history, and biochemical indexes were analyzed retrospectively. The correlation between these factors and prognosis of severe hepatitis was estimated by logistic regression analysis.

**RESULTS:** Factors that could significantly influ-

ence the prognosis of severe hepatitis include age, clinical type, hepatic coma and TB (all  $P < 0.01$ ). Logistic regression analysis demonstrated that PTA, urea, blood sodium and hepatic coma were independent prognostic factors for severe hepatitis. We used these factors to develop a prognostic scoring system: prognosis score =  $10 \times (1.082 \times \text{hepatic encephalopathy score} + 0.944 \times \text{BUN score} + 0.915 \times \text{blood sodium score} + 0.593 \times \text{PTA score})$ .

**CONCLUSION:** PTA, urea, blood sodium and hepatic coma are independent prognostic factors for severe hepatitis and can be used to evaluate the prognosis of the disease. The scoring system we developed is very effective to evaluate prognosis of severe hepatitis.

**Key Words:** Severe hepatitis; Prognosis; Factor analysis; Nursing

Luo L, Yuan CL, Lai N, Jiang ZL, Lin NF, Wang JX. Severe hepatitis: prognostic factors and nursing interventions. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(19): 2068-2071

## 摘要

**目的:** 研究重型肝炎预后的影响因素, 从中筛选出对预后有明显影响的因素, 并探讨其与预后的相关程度, 为护理干预提供依据。

**方法:** 将重庆医科大学附属第二医院感染病科2007-01/2010-06所收治201例重型肝炎患者分为治疗有效组和治疗无效组, 分别从年龄、性别、临床分型、病原分型、并发症、既往病史、生化指标等方面进行回顾性研究, 借助SPSS软件进行Logistic回归分析, 确定这些因素与重型肝炎预后的相关程度。

**结果:** 年龄、临床分型、肝性脑病、电解质紊乱、原发性腹膜炎、酸碱失衡、肝肾综合征、胃肠道出血、既往肝硬化基础、PTA、总胆红素、尿素氮、肌酐、血钠等指标与预后有明显的关系(均 $P < 0.01$ )。PTA、尿素氮、血钠、肝性脑病为影响预后的独立危险因素, 构成预后评分系统, 预后评分 =  $10 \times (1.082 \times \text{肝性脑病分值} + 0.944 \times \text{尿素氮分值} + 0.915 \times$

## ■同行评议者

胡国信, 副教授, 南昌大学第一附属医院感染内科

血钠分值+0.593×PTA分值)。

**结论:** PTA、尿素氮、血钠、肝性脑病作为独立的危险因素可用于判断患者的预后,使临床护理更有针对性和目的性。

**关键词:** 重型肝炎; 预后; 因素分析; 护理

罗玲,袁春兰,赖宁,蒋祖利,林年芬,汪景香. 重型肝炎预后因素分析与护理对策. 世界华人消化杂志 2011; 19(19): 2068-2071

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/2068.asp>

## 0 引言

重型肝炎是乙型病毒性肝炎中最严重的临床类型,包括急性、亚急性、慢性重型肝炎,易出现多种并发症,并发症的出现是重型肝炎病情加重的主要标志,也是导致死亡的主要原因<sup>[1]</sup>,且重型肝炎预后差,死亡率高达50%-70%<sup>[2]</sup>。探讨影响其预后的相关因素对指导临床治疗、护理有重要的意义。重庆医科大学附属第二临床医院感染病科2007-01/2010-06收治重型肝炎患者201例,现对其临床观察结果及预后作回顾性分析。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 重庆医科大学附属第二医院感染病科2007-01/2010-06收治重型肝炎患者201例,男170例(84.57%),女31例(15.43%);治疗有效组82例(40.79%),治疗失败组119例(59.21%);年龄10-89(40.11±12.45)岁。其中,治疗失败组包括死亡患者和自动出院时病情较入院时恶化的患者。

**1.2 方法** 采用回顾性分析,调阅患者的病历及化验检查资料。并发症诊断标准:(1)重型肝炎诊断标准:按2000年西安会议修订的《病毒性肝炎防治方案》的规定进行临床分型<sup>[3]</sup>;(2)肝性脑病分级:根据神经精神症状及体格检查分0-4级<sup>[4]</sup>;(3)自发性腹膜炎:按Conn的诊断标准(腹水白细胞数≥300,中性粒细胞比例≥20%)。但如患者有发热及腹部体征、尿量减少,腹水培养阳性发现,抗炎治疗有效,即使腹水细胞数未达到以上标准,也诊断自发性腹膜炎<sup>[4]</sup>;(4)肝肾综合征:按2007年,国际腹水俱乐部修改后的HRS诊断标准<sup>[5]</sup>;(5)电解质紊乱:患者出现血生化指标异常(K<sup>+</sup>、Na<sup>+</sup>、Cl<sup>-</sup>出现增高或者降低);(6)酸碱失衡:患者出现各种类型的酸中毒、碱中毒或者混合性的酸碱失衡。

**统计学处理** 数使用SPSS for windows 11.0软件分析。

表1 慢性健康状况及一般情况指标(n)

指标	治疗有效组	治疗无效组	$\chi^2$ 值	P值
性别				
男	68	99	0.069	0.793
女	22	20		
肝硬化基础				
有	39	42	4.771	0.029
无	43	77		
糖尿病基础 <sup>1</sup>				
有	3	6	0.370	0.543
无	79	113		
既往饮酒史 <sup>2</sup>				
有	16	40	2.344	0.126
无	66	79		
临床分型				
急重肝	1	4	9.242	0.010
亚重肝	2	21		
慢重肝	79	94		
年龄(岁)				
<40	52	58		
>40	30	61		

<sup>1</sup>: 糖尿病基础是指既往原发性糖尿病患者,对继发性糖尿病如肝性糖尿病则未纳入其中;<sup>2</sup>: 既往饮酒史指符合2002-10南京会议制定《酒精性肝病诊断标准》关于大量饮酒史的定义。

## 2 结果

对重型肝炎患者的26种可能影响预后的单因素进行分组统计分析,确定对预后有显著性影响的单因素。

**2.1 慢性健康状况及一般情况指标** 在慢性健康状况及一般情况的指标中,肝硬化基础、临床分型和年龄大于40岁对预后有明显的影响。而饮酒史、糖尿病基础和性别对预后影响较小(表1)。

**2.2 急性生理生化指标** 在急性生理生化指标中,PTA、TB、Urea、Cr和血钠对预后有明显的影响。而ALB、A/G、前白蛋白、DB/TB、病毒定量、AST/ALT和AFP对预后影响较小(表2)。

**2.3 并发症指标** 在并发症指标中,电解质紊乱、肝肾综合征、原发性腹膜炎、酸碱失衡和消化道出血对预后有明显的影响。其他感染因是混合总计,结果无统计学差异,可能与样本量太少有关(表3)。

**2.4 影响预后的独立的危险因素** 将以上分析得到的与预后明显相关的单因素用SPSS软件进行二元Logistic回归分析(计量的数据用参考国外著名危重病预后评估系统APACHE和MPM制定的转化表转化为等级变量),得出影响预后的独

## ■ 相关报道

丁惠国等在影响重型病毒性肝炎患者预后的危险因素研究一文中拟建立一个判断其预后的多因素评分系统,但没有阐明对护理工作的指导情况。

## ■ 创新盘点

本文通过Logistic回归分析,得出影响预后的独立危险因素,形成了科学的评分系统,并提出了相应的护理对策。

## ■应用要点

本研究得出了影响预后的独立危险因素,对护理工作有很好的指导与警示作用,体现在护士的病情观察重点、休息及饮食指导等方面。

表 2 急性生理生化指标

指标	治疗有效组	治疗无效组	<i>t</i> 值	<i>P</i> 值
PTA	0.30 ± 0.008	0.22 ± 0.007	6.840	<0.001
TB(μmol/L)	441.24 ± 14.14	559.84 ± 15.47	-5.405	<0.001
ALB(g/L)	28.96 ± 0.30	29.11 ± 0.29	-0.358	>0.05
A/G	0.84 ± 0.02	0.80 ± 0.01	1.671	>0.05
Urea(mmol/L)	4.75 ± 0.27	10.12 ± 0.61	-6.821	<0.001
Cr(μmol/L)	74.38 ± 3.32	135.05 ± 9.16	-5.322	<0.001
前白蛋白(mg/L)	246.90 ± 9.66	259.25 ± 8.21	-0.977	>0.05
DB/TB	0.59 ± 0.008	0.56 ± 0.007	2.542	>0.05
血钠(mmol/L)	133.02 ± 0.59	125.49 ± 0.78	7.033	<0.001
病毒定量 <sup>1</sup>	5.47 ± 0.24	5.78 ± 0.24	-0.912	>0.05
AST/ALT	1.54 ± 0.09	1.53 ± 0.08	0.090	>0.05
AFP(μg/L) <sup>2</sup>	4.17 ± 0.17	4.23 ± 0.17	-0.248	>0.05

<sup>1</sup>: 因数据非正态分布, 因此预做对数转换; <sup>2</sup>: 因数据非正态分布, 因此预做对数转换。

表 3 并发症指标

指标	治疗有效组	治疗无效组	$\chi^2$ 值	<i>P</i> 值
肝性脑病				
0度	70	35	105.261	<0.001
1度	3	0		
2度	9	23		
3度	0	18		
4度	0	43		
电解质紊乱				
有	42	95	26.099	<0.001
无	40	24		
肝肾综合征				
有	1	31	35.540	<0.001
无	81	88		
原发性腹膜炎				
有	41	86	15.505	<0.001
无	41	33		
酸碱失衡				
有	2	24	15.358	<0.001
无	80	95		
其他感染 <sup>1</sup>				
有	13	28	2.741	>0.05
无	69	91		
消化道出血				
有	3	38	29.139	<0.001
无	79	81		

<sup>1</sup>: 重型肝炎患者由于免疫功能低下, 常常合并各种感染, 常见有肺部感染、感染性腹泻、尿路感染、急性胰腺炎等, 但由于每种感染的病例样本较小, 故本次研究没有分类进行计数, 总计为其他感染。

立的危险因素为: PTA、尿素氮、血钠、肝性

表 4 重型肝炎预后评分系统数据转化表

分值	肝性脑病	PTA	血钠	尿素氮
0	无肝性脑病	>40%	≥135	<7.5
1	I度	30%~40%	126~135	7.5~10
2	II度		<126	10~19.9
3	III度	20%~30%		20~29.9
4	IV度			
5		<20%		>30

脑病。并确定这四个因素各自的相关系数, 构建出重型肝炎预后评分公式如下: 预后评分 =  $10 \times (1.082 \times \text{肝性脑病分值} + 0.944 \times \text{尿素氮分值} + 0.915 \times \text{血钠分值} + 0.593 \times \text{PTA分值})$  (表4)。

**2.5 评分系统效能检测** 将本次研究的201例患者按以上的系统进行评分, 对其评估效能进行检验。经过统计分析按治疗有效组和治疗无效组进行独立样本的*t*检验。结果: 治疗有效组82例  $21.34 \pm 14.03$ , 治疗无效组119例  $63.19 \pm 22.38$ , 两组评分有明显的差异( $P < 0.001$ ), 治疗无效组评分比有效组增高近2倍, 证明评分系统与临床治疗效果较吻合。

## 3 讨论

对重型肝炎的预后影响因素的探讨一直是肝病治疗中关注的热点之一, 长期以来, 已经有很多的研究和报导。在这些相关研究中大家从不同角度发现了很多影响因素, 比如PTA、总胆红素、血钠、年龄、肝硬化Child-Pugh分级、重肝分期以及多种严重并发症的作用(肝性脑病、

出血、肝肾综合征等)<sup>[6-9]</sup>,有资料显示重型肝炎患者出现并发症后会导致病死率提高<sup>[10]</sup>,在国内的文献中也有些谈到难以纠正的低钠血症提示预后较差<sup>[11,12]</sup>,对我们今天的研究有良好的启迪和印证作用。同时,对我们的护理工作有很好的指导与警示作用。

重症肝炎患者病情重,病程长,经济及心理负担重,护理患者时除心理护理、一般的生活护理、基础护理外,在护理工作中应重点注意以下几个方面。

密切观察患者皮肤黏膜有无瘀点、瘀斑,牙龈、口腔黏膜有无出血,观察排泄物、呕吐物的颜色、性状;以及早发现出血倾向及出血;进行各项操作时动作轻柔,各种穿刺尽可能一次成功,拔除穿刺针时适当延长局部压迫时间;饮食应清淡、软烂,避免硬、带刺、辛辣食物。根据医嘱补充新鲜血浆、凝血酶原复合物等,密切监测患者的PTA。

密切观察患者24 h尿量,监测尿比重,观察患者有无厌食、口腔尿臭味、精神萎靡、嗜睡、抽搐等尿毒症的临床表现,配合医生及时留取化验标本作肾功检测。根据患者情况给予对症护理。

密切观察患者血钠情况:因慢性重型肝炎患者低钠血症的发生率与病死率及并发症的发生率有非常明显的关系<sup>[13]</sup>;低钠血症在很大程度上促进了病情的发展和恶化<sup>[11]</sup>,而重中度低钠血症患者预后极差,病死率明显高于正常钠患者及轻度低钠血症患者<sup>[14]</sup>。注意观察患者每天的进食量;根据患者进食量、腹水及电解质结果调整食盐的摄入量,以预防电解质紊乱,尤其是低钠血症。密切观察患者有无疲乏、头晕、直立时晕倒、皮肤弹性减退、食欲不振、恶心呕吐、表情淡漠甚至休克、昏迷、少尿等缺钠表现。血钠偏低腹水少者可适当增加饮食中氯化钠的含量,饮食做到色、香、味俱全以增进患者食欲;血钠过低时可适当静脉补充10%氯化钠。密切随访电解质情况,在留取电解质标本时,

一定不能在输液处或输液侧肢体采血,以免影响检测结果。

密切关注患者饮食,除了关心其进食量以外,还须关心饮食种类。如低蛋白饮食的患者,每天进食蛋白质量一定不能超标(40 g),以植物蛋白为好<sup>[15]</sup>,以预防肝性脑病的发生。

密切观察患者有无欣快激动或淡漠少言、衣冠不整或随地便溺等性格及行为异常,有无定向力、计算力、记忆力下降、反应迟钝等肝性脑病的早期表现,因在我们的研究中发现,治疗有效组患者的肝性脑病发生程度均未达到3度,而达到3度及以上的患者几乎都在治疗无效组,说明及早发现病情变化对患者的治疗有至关重要的作用。

#### 4 参考文献

- 1 张南,王宇明,邓国宏,易东.慢性重型肝炎患者的预后因素分级及预后模型的建立.中华肝病杂志 2005; 13: 730-733
- 2 杨绍基,任红,李兰娟,高志良.传染病学.第7版.北京:人民卫生出版社,2009: 43
- 3 中华医学会传染病与寄生虫病学分会、肝病学分会.病毒性肝炎防治方案.中华传染病杂志 2001; 19: 56
- 4 邱德凯.慢性肝病临床并发症:现代诊治概念.第1版.上海:上海科学技术出版社,2001: 88, 91
- 5 Salerno F, Gerbes A, Ginès P, Wong F, Arroyo V. Diagnosis, prevention and treatment of hepatorenal syndrome in cirrhosis. Gut 2007; 56: 1310-1318
- 6 金洁,邹正升,邢汉前.520例慢性重型肝炎生化指标单因素与预后的分析.中国医师杂志 2002; 4: 371-373
- 7 王怡.慢性重型肝炎预后因素相关性分析.肝脏 2002; 7: 34-35
- 8 李玉芳,焦运,刘娅.重型肝炎预后影响因素分析及评分评估.中西医结合肝病杂志 2004; 14: 303-304
- 9 王立福,李筠,周双男.慢性乙型重型肝炎的预后因素研究.临床肝胆病杂志 2007; 23: 351-352
- 10 周文红,应豪.慢性重型病毒性肝炎预后因素分析.临床肝胆病杂志 2007; 23: 26
- 11 丁惠国,邵桂菊,陈涛,金瑞.影响重型病毒性肝炎患者预后的危险因素研究.临床肝胆病杂志 2002; 18: 297-299
- 12 刘惠敏,胡永珍,张导文.慢性重症肝炎预后与低钠血症的关系.临床医学 2002; 22: 1-2
- 13 陆传统,张雯.慢性重型乙型肝炎低钠血症的临床意义.浙江中西医结合杂志 2010; 20: 352-353
- 14 江宇,刘刚,陈永平.重型肝炎患者低钠血症的发生及对预后影响分析.浙江临床医学 2006; 8: 251
- 15 李小寒,尚少梅.基础护理学.第4版.北京:人民卫生出版社,2007; 11: 201

#### ■同行评价

本文研究结果数据可信、详实,其科学性、创新性和可读性基本能反映我国胃肠病学临床和基础研究的先进水平。

编辑 李薇 电编 李薇



# 原发性肝癌肝移植135例

肖朝辉, 张培瑞, 余灵祥, 常伟华, 胡雄伟, 孙颖哲, 李志伟

## ■背景资料

肝移植手术首例自1963年获得成功以来, 取得了飞快的发展, 尤其是2003年以后, 随着医疗技术的发展, 新药物的推出以及医学知识的普及, 肝移植技术日臻成熟, 已经成为了治疗晚期肝病的有效手段, 也是目前治疗原发性肝癌的有效手段之一。

肖朝辉, 张培瑞, 余灵祥, 常伟华, 胡雄伟, 孙颖哲, 李志伟, 中国人民解放军第302医院肝胆外科 北京市 100039

作者贡献分布: 肖朝辉与李志伟对此文所作贡献均等; 此课题由肖朝辉、李志伟及张培瑞设计; 研究过程由李志伟、张培瑞、肖朝辉、余灵祥、常伟华、胡雄伟及孙颖哲操作完成; 数据分析由肖朝辉完成; 本论文写作由肖朝辉与李志伟完成。

通讯作者: 李志伟, 副主任医师, 100039, 北京市, 中国人民解放军302医院, lzw302@126.com

收稿日期: 2011-03-11 修回日期: 2011-06-15

接受日期: 2011-06-21 在线出版日期: 2011-07-08

## Liver transplantation for hepatocellular carcinoma: an analysis of 135 cases

Chao-Hui Xiao, Pei-Rui Zhang, Ling-Xiang Yu, Wei-Hua Chang, Xiong-Wei Hu, Ying-Zhe Sun, Zhi-Wei Li

Chao-Hui Xiao, Pei-Rui Zhang, Ling-Xiang Yu, Wei-Hua Chang, Xiong-Wei Hu, Ying-Zhe Sun, Zhi-Wei Li, Department of Hepatobiliary Surgery, 302 Hospital of Chinese PLA, Beijing 100039, China

Correspondence to: Zhi-Wei Li, Department of Hepatobiliary Surgery, 302 Hospital of Chinese PLA, Beijing 100039, China. lzw302@126.com

Received: 2011-03-11 Revised: 2011-06-15

Accepted: 2011-06-21 Published online: 2011-07-08

## Abstract

**AIM:** To investigate the indications, contraindications, operative timing, and prevention and management of recurrence for liver transplantation in patient with hepatocellular carcinoma (HCC).

**METHODS:** A retrospective analysis was performed of 135 consecutive HCC patients who underwent liver transplantation (LT) from April 2005 to April 2010 at our center. The outcome of patients meeting Milan or UCSF criteria and those beyond UCSF criteria was compared.

**RESULTS:** There were no significant differences in 1- and 2-year survival rates and recurrence-free survival rate between patients meeting Milan criteria and those meeting UCSF criteria (97.0% vs 95.1%, 89.5% vs 78.6%, 91.0% vs 90.2%, 71.6% vs 65.6%; all  $P > 0.05$ ). The 1-year survival rate and recurrence-free survival rate for patients beyond -UCSF criteria were 71.4% and

57.1%, respectively.

**CONCLUSION:** Liver transplantation is an effective means of treating HCC. Attention should be paid to postoperative adjustment of immunosuppressants to prevent tumor recurrence.

**Key Words:** Hepatocellular carcinoma; Liver transplantation; Recurrence; Survival rate

Xiao CH, Zhang PR, Yu LX, Chang WH, Hu XW, Sun YZ, Li ZW. Liver transplantation for hepatocellular carcinoma: an analysis of 135 cases. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(19): 2072-2075

## 摘要

**目的:** 探讨肝癌肝移植适应证、禁忌证、手术时机及术后肿瘤复发的防治。

**方法:** 对2005-04/2010-04连续实施的135例原发性肝癌患者进行随访和回顾性分析。

**结果:** Milan标准组患者术后1、2年总体生存率分别为97.0%、89.5%, 无瘤患者生存率分别为91.0%、71.6%; UCSF标准组患者术后1、2年总体生存率分别为95.1%、78.6%, 无瘤患者生存率分别为90.2%、65.6%; 超过UCSF标准组患者术后1年总体生存率为71.4%, 无瘤患者1年总体生存率为57.1%。Milan、UCSF标准组生存率和无瘤生存率与超过UCSF标准组比较, 差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ )。

**结论:** 肝移植是治疗肝癌的一个有效手段, 术后应重视免疫抑制剂的应用调整, 这对于防止肝癌术后复发有一定的意义。

**关键词:** 肝细胞癌; 肝移植; 复发; 生存率

肖朝辉, 张培瑞, 余灵祥, 常伟华, 胡雄伟, 孙颖哲, 李志伟. 原发性肝癌肝移植135例. *世界华人消化杂志* 2011; 19(19): 2072-2075

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/2072.asp>

## 0 引言

肝癌是我国肝移植的主要病因之一。目前, 我国

## ■同行评议者

严律南, 教授, 四川大学华西医院普外科

每年开展肝移植3 000-4 000例左右, 其中肝癌肝移植约占30%-40%, 比例较国外明显偏高。如何提高我国肝癌肝移植的整体疗效已成为我们必须面对的重要课题之一。我国的肝癌肝移植从开展至今, 一直存在着指征过宽的问题, 制约了患者术后生存率的提高, 不仅浪费了宝贵的供肝资源, 也给公众造成了一定的负面影响。那么原发性肝癌患者何时选择肝移植, 手术中以及手术后又如何降低肿瘤复发率是目前各中心争议的焦点。中国人民解放军第302医院外科自2005-04/2010-04共行肝脏移植310例, 其中原发性肝癌肝移植135例全部获得随访, 现将有关结果报道如下。

## 1 材料和方法

1.1 材料 男122例, 女13例, 年龄31-69(平均52.5)岁。随访时间1-36 mo, 随访率100%。其中合并乙型肝炎后肝硬化127例, 乙型肝炎合并丙型肝炎5例, 另3例分别为合并原发性胆汁性肝硬化及酒精性肝硬化患者; 肝脏功能: Child A、B、C级肝功能分别为26、65、43例; 肿瘤: 根据术前影像学资料结合术后病肝标本统计。单个肿瘤65例, 2个39例, 3个以上31例; 单个肿瘤最大直径12 cm; 甲胎球蛋白: 阳性97例, 阴性48例; 手术史: 术前有肝切除、脾切除断流术病史9例, 介入治疗36例, 经皮肝穿刺局部消融治疗5例; 术前TIPSS术1例。

### 1.2 方法

1.2.1 病情判定: 术前全部病例均行AFP测定、彩超、胸腹部CT、磁共振血门静脉管成像(portal vein blood tube magnetic resonance imaging, MRPV)等检查。符合Milan标准67例, UCSF标准61例, 超过UCSF标准7例。

1.2.2 手术方式: 135例均行经典原位同种异体肝脏移植。

1.2.3 疗效判定标准: 术后每3 mo行彩超、胸片、AFP检查, 发现问题者进一步行CT、MRI、PET或DSA检查。所有复发病例均以影像学资料为依据。

**统计学处理** 采用SPSS13.0软件进行统计分析。

## 2 结果

2.1 疗效 随访1-36 mo, Milan标准组和UCSF标准组入组病例相当, 1年以及2年的生存率、无瘤生存率Milan标准组均比UCSF标准组高, 虽无统

表 1 不同供体选择标准术后生存率及无瘤生存率 (%)

分组	n	生存率		无瘤率	
		1年	2年	1年	2年
Milan标准组	67	97.0	89.5	91.0	71.6
UCSF标准组	61	95.1	78.6	90.2	65.6
超UCSF标准组	7	71.4	0.00	57.1	0.00

超UCSF组因病例均于2年内死亡, 无法进行2年生存率统计。

表 2 不同标准的病例生存时间

	生存时间(mo)	95%CI
Milan标准组	34.346 ± 1.134	33.212-35.480
UCSF标准组	33.336 ± 2.127	30.135-35.550
超UCSF标准组	22.547 ± 4.753	16.364-28.547
合计	32.136 ± 1.573	29.986-34.017

计学差异, 但可能为本组样本量小所致, 而与超UCSF标准组相比, 1年的生存率以及无瘤生存率均有明显统计学差异, 而2年的因超UCSF组病例均死亡, 故无法进行比较。故超UCSF病例不建议为肝癌行肝移植的适应证(表1)。在平均生存时间上, Milan标准组虽较UCSF标准组时间长, 但无明显统计学差异, 与超UCSF标准组相比较有明显差异(表2)。

2.2 肿瘤复发防治 术后预防化疗36例, 治疗性化疗25例; 术后4-36 mo肿瘤复发或转移24例, 其中肝脏19例, 肝肿瘤复发合并肺转移5例, 骨转移4例, 脑转移1例, 广泛转移3例。

## 3 讨论

肝移植手术首例自1963年获得成功以来<sup>[1]</sup>, 取得了飞快的发展, 尤其是2003年以后, 随着医疗技术的发展, 新药物的推出以及医学知识的普及, 肝移植技术日臻成熟, 已经成为了治疗晚期肝病的有效手段, 也是目前治疗原发性肝癌的有效手段之一<sup>[2,3]</sup>。但是由于原发性肝癌固有的侵袭、转移、复发、多中心起源等特性<sup>[4]</sup>, 加上病例选择标准不同, 各医疗中心肝癌肝移植临床效果差别很大, 促使一些大的医疗中心根据以往的经验, 总结及制定出某些相对合理的建议。其中, 1996年意大利学者Mazzaferro提出的Milan标准<sup>[5]</sup>、2000年Pittsburgh改良TNM标准<sup>[6]</sup>、2001年美国加州大学旧金山分校Yao等<sup>[7]</sup>提出UCSF标准应用较广, 国内复旦大学肝癌研究所提出上海复旦标准<sup>[8]</sup>、浙江大学提出杭州标准<sup>[9]</sup>、华

## ■ 研发前沿

我国的肝癌肝移植从开展至今, 一直存在着指征过宽的问题, 那么何时选择肝移植, 手术中以及手术后又如何降低肿瘤复发率是目前各中心争议的焦点。

# ■相关报道

Alba等报道移植前接受TACE的病例中有90%肿瘤坏死者占38%, 50%-90%肿瘤坏死者占15%, 低于50%肿瘤坏死者占48%, 术前未检测出的直径在2 cm以下的肿瘤, 坏死仅1.57%。

西医科大学提出华西标准等各有千秋<sup>[10]</sup>。那么原发性肝癌患者何时选择肝移植, 手术中以及手术后又如何降低肿瘤复发率是目前各中心争议的焦点。

我国85%以上的肝癌合并有肝炎肝硬化, 即合并有门静脉高压症及肝功能损害。前者可引起急性上消化道出血、脾大脾脏功能亢进、腹水等, 后者可引起肝衰竭, 均可危及生命。因此, 晚期肝硬化合并小肝癌、肝癌肝功能失代偿者是肝癌肝移植最佳适应证<sup>[11-13]</sup>。常规手术切除术后肝脏局部复发的病例, 只要没有淋巴结和远处转移即应积极考虑行肝移植。一般患者在移植前有一段等待供肝的时间, 可酌情考虑行经皮穿刺无水酒精注射、经皮肝动脉栓塞化疗(transcatheter arterial chemoembolization, TACE)、局部肿瘤毁损术及肿瘤切除术等, 现有资料表明这些措施有可能暂时控制移植前肿瘤的增长和转移扩散, 但对移植术后生存期的影响还不能确定<sup>[14]</sup>。虽然近几年化疗药物发展较快, 但总体来讲全身化疗对肝癌肝移植术后预防肿瘤复发的疗效差; 对可切除肝癌是否先行肝切除待复发后再行肝移植有不同意见<sup>[15,16]</sup>, 目前倾向于肝癌患者条件适合者可直接行肝脏移植。

术前行TACE, 一般腹腔有不同程度粘连, 略增加手术难度及风险, 但不影响肝脏功能及受体动脉; 肿瘤靠近肝脏表面及多次反复介入的病例可造成肝脏与周围广泛粘连, 大大增加手术的风险和难度。如中国人民解放军第302医院肝胆外科1例患者介入术后造成肝内胆道坏死、肝动脉闭塞、肝脏多发脓肿形成等严重并发症, 给移植手术造成极大困难; 1例肝癌切除术后复发病例行9次介入、2次经过皮穿刺微波治疗, 造成腹腔广泛粘连。

我们的体会是, 肝癌或肝癌术后复发病例有条件行肝移植的患者, 等待供肝期间尽可能选择简单有效的治疗, 如介入、经皮肝穿刺无水酒精注射、局部射频消融等治疗; 晚期肝癌, 只要不影响所需吻合的大血管及胆道、没有发现影像学上可见的淋巴结及远处转移, 在供肝来源充分的情况下, 仍然可积极行肝移植, 以延长患者生命, 提高患者生活质量。

肝癌的复发与转移是导致肝癌肝移植术后长期存活率低的最重要的因素。影响肝癌肝移植术后肝癌复发的主要原因是肿瘤的大小、血管侵犯及肿瘤的分化程度<sup>[18]</sup>。另外术前治疗、术中挤压肿瘤、术后激素及免疫抑制剂应用等也可能影响肿瘤的转移和扩散<sup>[19,20]</sup>。

介入治疗对肝癌有肯定的疗效, 能使肿瘤病灶大部分发生凝固性坏死, 但发生完全坏死者少见, 多数病灶内仍可见残存的肿瘤细胞, 从而成为肿瘤复发转移的根源<sup>[19,21]</sup>。这一点在我院肝癌肝移植病肝切除标本也可看出。中国人民解放军第302医院59例肝癌介入术后行肝移植的病理检查中, 肿瘤完全坏死者仅占20%, 且大部为直径3 cm以下小肝癌, 全部病例肿瘤均有不同程度坏死; 影像学方面, 介入术后80%的肿瘤明显缩小; 病肝腐蚀标本显示, 部分肿瘤经栓塞肿瘤动脉血供中断, 但部分肿瘤门静脉血供丰富, 肿瘤不能完全坏死, 尤其在肿瘤边缘。Alba等<sup>[22]</sup>报道移植前接受TACE的病例中有90%肿瘤坏死者占38%, 50%-90%肿瘤坏死者占15%, 低于50%肿瘤坏死者占48%, 术前未检测出的直径在2 cm以下的肿瘤, 坏死仅1.57%。肝癌肝移植术前是否需要介入治疗有争议, 有报道<sup>[14]</sup>称移植前接受TACE者较未经TACE者具有更佳的长期生存率, 也有报道<sup>[19]</sup>提出移植前的TACE对于提高生存率和无瘤生存率并无影响。尤其值得一提的是, Chapman等<sup>[23]</sup>对III/IV期肝癌先行TACE治疗, 35.5%的患者有效, 29%的病情稳定, 35.5%的患者病情进一步发展, 总的效果可使22.4%的晚期肝癌患者肿瘤降期达到肝脏移植标准, 中位生存期可达19.6 mo, 无瘤生存期及总的生存期与II期肝癌类似。

我们的建议是, 等待供肝时间在2 wk之内者, 不做任何有创治疗; 估计等待供肝时间在4 wk以上者, 可先行介入治疗, 必要时再行经皮肝穿刺局部消融治疗; 位于尾状叶单发小肝癌等待时间长者可先行伽马刀局部治疗; 位于肝脏边缘单发病灶介入及消融效果差, 肝脏功能允许的情况下可先行肝癌切除术, 切肝时避免广泛游离肝脏及大网膜填塞及包裹创面, 术后充分引流, 避免腹腔积血引起粘连后增加肝脏移植手术困难。

肝内血管侵犯或门静脉主干癌栓形成时间短估计可完整取出者, 移植术后近期效果好, 生活质量明显改善, 可在一定程度上延长患者生命, 可作为肿瘤“姑息治疗”的有效手段, 不是肝脏移植绝对禁忌证<sup>[24]</sup>; 肝外门静脉、肝静脉、下腔静脉主干癌栓形成时间长估计取出困难, 或淋巴结及远处脏器转移者, 是肝脏移植的绝对禁忌证<sup>[25]</sup>。

肝癌肝移植术中要遵守术中无瘤操作技术, 尽可能先阻断肿瘤血管出入路、避免反复挤压肿瘤、术后蒸馏水及5-氟尿嘧啶反复冲洗腹腔及

创面、肿瘤与腹腔粘连之处尽可能局部切除或氩气刀喷烧, 尽可能杀灭可能残存的癌细胞<sup>[19,20]</sup>. 为减少肝癌移植术后复发的机率, 肝移植术后免疫抑制剂的调整也显得至关重要<sup>[20]</sup>. 目前肝移植术后常规免疫抑制治疗方案是FK506或CsA+MMF+Pred三联用药, 有些中心尝试用雷帕霉素替代FK506或CsA, 尽管有文献<sup>[19]</sup>报道雷帕霉素和MMF有一定的抗肿瘤作用, 但免疫抑制剂的长期使用使得机体免疫力整体下降, 对肿瘤的监视和抑制作用的减弱, 使得肿瘤易于复发与增长, 其在肝癌肝移植临床上的疗效还需进一步证实. 考虑到肝癌患者自身的免疫功能较为低下, 肝移植术后发生急性排斥的机率并不大, 因此, 免疫抑制剂应用时应维持在较低水准. 有资料显示, 肝癌肝移植术后如3-6 mo内停用激素, 肝癌复发率最低, 相反如果术后长期应用类固醇激素, 肝癌复发率则几乎增加4倍, 因而在肝癌肝移植术中和术后停用或缩短类固醇激素应用时间是当前的一种趋势.

总之, 肝移植是治疗肝癌的一个有效手段, 尤其适合于伴有肝功能障碍的早期肝癌, 对于大肝癌伴或不伴有门静脉癌栓的肝癌患者, 在无远处转移情况下, 肝移植也是一个较好的选择, 但对于有肝外转移的患者, 肝移植应列为禁忌. 此外术后应重视免疫抑制剂的应用调整, 这对于防止肝癌术后复发有一定的意义. 通过定期AFP检测、肝脏彩超、胸片, 必要时胸腹部CT、MRI等检查, 可以及时发现肝脏及肝外肿瘤复发及转移灶. 一旦发现肿瘤复发或转移, 其处理基本上同原发性肝癌的治疗原则.

#### 4 参考文献

- Lau WY, Lai EC. Hepatocellular carcinoma: current management and recent advances. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2008; 7: 237-257
- 千年松, 窦科峰. 肝移植治疗原发性肝细胞癌的临床研究进展. 第四军医大学学报 2007; 28: 567-569
- 徐洪, 樊嘉. 肝癌肝移植适应证的发展和选择. 新医学 2008; 38: 775-777
- 吴阶平, 裘法祖. 黄家驷外科学. 第6版. 北京: 人民卫生出版社, 2002: 1223-1233
- Mazzaferro V, Regalia E, Doci R, Andreola S, Pulvirenti A, Bozzetti F, Montalto F, Ammatuna M, Morabito A, Gennari L. Liver transplantation for the treatment of small hepatocellular carcinomas in patients with cirrhosis. *N Engl J Med* 1996; 334: 693-699
- Marsh JW, Dvorchik I, Bonham CA, Iwatsuki S. Is the pathologic TNM staging system for patients with hepatoma predictive of outcome? *Cancer* 2000; 88: 538-543
- Yao FY, Ferrell L, Bass NM, Watson JJ, Bacchetti P, Venook A, Ascher NL, Roberts JP. Liver transplantation for hepatocellular carcinoma: expansion of the tumor size limits does not adversely impact survival. *Hepatology* 2001; 33: 1394-1403
- 冷希圣. 现代临床医学外科进展(普通外科分册). 北京: 科学技术文献出版社, 2006: 40-42
- 郑树森. 我国肝移植几个热点问题的思考. 中华移植杂志(电子版) 2007; 1: 1-3
- 严律南. 肝癌肝移植的现状与展望. 中国医学科学院学报 2005; 27: 427-430
- 王琳, 周光文, 申川, 严估祺, 杨卫平, 陈拥军, 李勤裕, 陈皓, 沈柏用, 万亮, 彭承宏, 李宏为. 肝细胞癌肝移植适应证选择的疗效评估. 外科理论与实践 2008; 13: 57-60
- 蒋斌, 宋世兵, 张同琳, 修典荣, 王昌明, 杨晓霞. 晚期肝细胞癌肝移植术后的远期疗效和匹兹堡分级的预测价值. 解放军医学杂志 2006; 31: 145-146
- 严律南, 王震侠. 肝癌肝移植的适应证及应用前景. 中国普外基础与临床杂志 2006; 13: 132-134
- Belghiti J, Carr BI, Greig PD, Lencioni R, Poon RT. Treatment before liver transplantation for HCC. *Ann Surg Oncol* 2008; 15: 993-1000
- Mazzaferro V, Chun YS, Poon RT, Schwartz ME, Yao FY, Marsh JW, Bhoori S, Lee SG. Liver transplantation for hepatocellular carcinoma. *Ann Surg Oncol* 2008; 15: 1001-1007
- Wong LL. Current status of liver transplantation for hepatocellular cancer. *Am J Surg* 2002; 183: 309-316
- Ghobrial RM, Shimoda M, Farmer DG, Yersiz H, Chen P, Dawson S, Amersi F, Han S, Goldstein LI, Martin P, Busuttil RW. Factors determining outcome of liver transplantation for hepatocellular carcinoma associated with hepatitis C cirrhosis. *Transplant Proc* 2001; 33: 1358
- 陈规划, 扬扬, 陆敏强, 蔡常洁, 何晓顺, 朱晓峰, 许赤, 李华, 黄洁夫. 肝移植治疗原发性肝癌60例. 中华外科杂志 2004; 42: 413-416
- Decaens T, Roudot-Thoraval F, Bresson-Hadni S, Meyer C, Gugenheim J, Durand F, Bernard PH, Boillot O, Boudjema K, Calmus Y, Hardwigsen J, Ducerf C, Pageaux GP, Dharancy S, Chazouilleres O, Dhumeaux D, Cherqui D, Duvoux C. Impact of pre-transplantation transarterial chemoembolization on survival and recurrence after liver transplantation for hepatocellular carcinoma. *Liver Transpl* 2005; 11: 767-775
- Rubio-Viqueira B, Hidalgo M. Targeting mTOR for cancer treatment. *Curr Opin Investig Drugs* 2006; 7: 501-512
- Song GW, Hwang S, Lee SG. [Liver transplantation in patients with hepatocellular carcinoma]. *Korean J Gastroenterol* 2010; 55: 350-360
- Alba E, Valls C, Dominguez J, Martinez L, Escalante E, Lladó L, Serrano T. Transcatheter arterial chemoembolization in patients with hepatocellular carcinoma on the waiting list for orthotopic liver transplantation. *AJR Am J Roentgenol* 2008; 190: 1341-1348
- Chapman WC, Majella Doyle MB, Stuart JE, Vachharajani N, Crippin JS, Anderson CD, Lowell JA, Shenoy S, Darcy MD, Brown DB. Outcomes of neoadjuvant transarterial chemoembolization to downstage hepatocellular carcinoma before liver transplantation. *Ann Surg* 2008; 248: 617-625
- 王轩, 陆雷, 华长江, 江涛, 李增才, 张斌, 刘现忠, 许正昌. 原位肝移植治疗原发性肝癌68例报告. 临床肿瘤学杂志 2009; 14: 147-149
- 黄明文, 王刚, 王恺, 傅华群, 邹书兵, 邵江华. 65例原发性肝癌的外科治疗分析. 实用临床医学 2006; 7: 76-78

#### ■同行评价

本文临床资料可靠, 证据充足, 统计学处理方法使用恰当, 有一定的特色和可读性, 对肝癌肝移植适应证的掌握和讨论有一定的借鉴意义.



# IL-23R基因多态性与炎症性肠病的相关性

陆忠凯, 陈志荣, 朱俊义, 徐亚, 华娴

## ■背景资料

炎症性肠病的发病机制尚不完全明确, 其中遗传因素与炎症性肠病的发病密切相关。目前已发现多个与IBD相关的易感基因及易感单核苷酸多态性(SNP)位点, IL-23R即是其中之一。由于IBD发病机制复杂且存在显著种族差异性, 国际上对IL-23R的研究争议颇多, 而我国目前有关IL-23R基因多态性与IBD临床特征相关性尚不明确。

陆忠凯, 陈志荣, 朱俊义, 徐亚, 华娴, 南京医科大学附属苏州市立医院(东区)消化科 江苏省苏州市 215001  
江苏省医学重点学科-江苏省人民医院胃肠病学开放课题基金资助项目, No. KF200936-2

作者贡献分布: 陆忠凯与陈志荣对此文所作贡献均等; 此课题由陆忠凯与陈志荣共同设计; 病例收集由陆忠凯、朱俊义、徐亚及华娴完成; 研究所用试剂与分析工具由陆忠凯与陈志荣提供; 研究过程由陆忠凯、陈志荣、朱俊义、徐亚及华娴操作完成; 数据分析及本论文写作由陆忠凯与陈志荣完成。

通讯作者: 陈志荣, 博士, 主任医师, 215001, 江苏省苏州市, 南京医科大学附属苏州市立医院(东区)消化科. zhkl@126.com  
电话: 0512-62364012

收稿日期: 2011-05-05 修回日期: 2011-06-12

接受日期: 2011-06-21 在线出版日期: 2011-07-08

## Association between IL-23R single nucleotide polymorphisms and inflammatory bowel disease

Zhong-Kai Lu, Zhi-Rong Chen, Jun-Yi Zhu, Ya Xu, Xian Hua

Zhong-Kai Lu, Zhi-Rong Chen, Jun-Yi Zhu, Ya Xu, Xian Hua, Department of Gastroenterology, Suzhou Municipal Hospital (East Area) Affiliated to Nanjing Medical University, Suzhou 215001, Jiangsu Province, China

Supported by: the Gastroenterology Foundation of the People's Hospital of Jiangsu Province (Key Medical Discipline of Jiangsu Province), No. KF200936-2

Correspondence to: Zhi-Rong Chen, Department of Gastroenterology, Suzhou Municipal Hospital (East Area) Affiliated to Nanjing Medical University, Suzhou 215001, Jiangsu Province, China. zhkl@126.com

Received: 2011-05-05 Revised: 2011-06-12

Accepted: 2011-06-21 Published online: 2011-07-08

## Abstract

**AIM:** To detect the association between single nucleotide polymorphism (SNP) of the interleukin-23 receptor (IL-23R) gene and inflammatory bowel disease (IBD) in Chinese patients.

**METHODS:** We examined three nonsynonymous SNPs in the IL-23R gene which lead to amino acid changes (rs11209026, p.Arg381Gln; rs41313262, p.Val362Ile; rs11465797, p.Thr175Asn). The SNPs were genotyped by polymerase chain reaction (PCR) and sequenced in 198 cases of IBD [124 cases of ulcerative colitis (UC) and 74 cases of Crohn's disease (CD)] and 100 healthy controls. The allele frequencies were

calculated and analyzed to examine the relationship between IL-23R SNPs and IBD.

**RESULTS:** The frequency of the A allele in the IL-23R Arg381Gln locus showed no significant difference between CD patients and controls (2.70% vs 6.00%,  $P > 0.05$ ) and between UC patients and controls (5.65% vs 6.00%,  $P > 0.05$ ). The p.Val362Ile variant was present in 2.42% of UC patients, in 2.70% of CD patients, and in 2.00% of controls, with no significant difference among the three groups. The Thr175Asn (rs11465797 c.524 C>A) variant was not detected in all the three groups.

**CONCLUSION:** IL-23R SNPs might have no association with IBD in Chinese patients.

**Key Words:** Interleukin-23 receptor; Single nucleotide polymorphism; Inflammatory bowel disease

Lu ZK, Chen ZR, Zhu JY, Xu Y, Hua X. Association between IL-23R single nucleotide polymorphisms and inflammatory bowel disease. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(19): 2076-2080

## 摘要

**目的:** 研究我国炎症性肠病患者IL-23R基因单核苷酸多态性特征, 探讨其与炎症性肠病(IBD)的相关性。

**方法:** 采用PCR扩增和测序的方法对198例IBD患者和100名健康体检者(对照组)IL-23R基因3个非同义单核苷酸多态性(rs11209026, p.Arg381Gln; rs41313262, p.Val362Ile; rs11465797, p.Thr175Asn)进行分析, 分别计算其等位基因的表现频率, 并结合临床资料评估其多态性与IBD的相关性。

**结果:** (1)IBD中克罗恩病(CD)患者IL-23R Arg-381Gln等位基因A的表现频率为2.70%, 低于对照组(6.00%), 但无统计学差异, 溃疡性结肠炎(UC)患者的表现频率为5.65%, 与对照组无统计学差异; (2)IBD中CD患者IL-23R Val-362Ile等位基因A的表现频率为2.70%, UC组为2.42%, 对照组为2.00%, 3组间无明显统计

## ■同行评议者

邢建峰, 副教授,  
西安交通大学医学院



学差异; (3) IBD及对照组中均无Thr175Asn等位基因A表现, 相应位点均表现为C。

**结论:** 我国IL-23R单核苷酸多态性与IBD无明显相关性, 遗传异质性可能决定了IBD的易感性。

**关键词:** IL-23R; 单核苷酸多态性; 炎症性肠病

陆忠凯, 陈志荣, 朱俊义, 徐亚, 华娴. IL-23R基因多态性与炎症性肠病的相关性. 世界华人消化杂志 2011; 19(19): 2076-2080

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/2076.asp>

## 0 引言

炎症性肠病(inflammatory bowel disease, IBD)是以机体肠道的非特异性炎症反应为特征的自身免疫性疾病, 包括溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)和克罗恩病(Crohn's disease, CD). IBD的发病机制尚不完全明确, 但遗传因素与IBD的起病密切相关<sup>[1,2]</sup>. 近年来有研究发现IL-23R基因单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)可能与IBD有关, 但分歧较多. 本研究选择IL-23R 3个非同义SNPs(rs11209026 p.Arg381Gln; rs41313262 p.Val362Ile和rs11465797 p.Thr175Asn)<sup>[3]</sup>作为研究对象, 旨在探讨我国IBD IL-23R SNP的发生情况及与IBD的相关性, 从而进一步探讨IBD的发病机制, 现报道如下。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 收集自2005-01/2010-03来南京医科大学附属苏州市立医院住院或门诊确诊为IBD的汉族患者198例, 其中男95例, 女103例, 中位年龄44(10-89)岁. IBD诊断标准参考中华医学会IBD诊治共识意见, 其中排除合并有其他自身免疫性疾病如哮喘、类风湿性关节炎及系统性红斑狼疮等患者. 本研究取得所有患者的知情同意, 并取得南京医科大学附属苏州市立医院伦理委员会同意。

### 1.2 方法

**1.2.1 分组:** 病例分UC和CD两组, 其中UC 124例, CD 74例, 收集其临床资料及外周血样标本5 mL(EDTA-K2抗凝)以提取DNA. 收集100例健康体检血样标本作为对照组。

**1.2.2 基因组DNA的制备:** 以上外周血标本用DNA抽提试剂盒(Tiagen公司产品)抽提基因组DNA, 根据吸光度确定DNA产物浓度和纯度, 用

去离子水稀释基因组DNA样品至50 mg/L。

**1.2.3 IL-23R基因PCR反应:** 参照GenBank中IL-23R序列(NC\_000001.10)使用Primer 5.0设计引物以包含目的位点. rs11209026和rs41313262的引物: 正义: 5'-GAGCAGAGTAAAGAGA-ATAGTAA-3', 反义: 5'-TGGGCTGAGGACT-TAGCCTCTTTAAGCCTC-3', rs11465797的引物: 正义: 5'-CAAGTAACTGGGATTACAGGCATG-3', 反义: 5'-CTTTACCTATATCATCCAGGTG-3'(上海Sangon公司合成). PCR总体积10  $\mu$ L, 包含模板DNA 1  $\mu$ L, 正反义引物2  $\mu$ L, PCR主要混合物5  $\mu$ L, 水2  $\mu$ L. 反应条件: 95  $^{\circ}$ C预变性1 min, 33个循环(95  $^{\circ}$ C 10 s, 60  $^{\circ}$ C 30 s), 72  $^{\circ}$ C 15 s, 4  $^{\circ}$ C 30 min. 目的基因片段长约461 bp和380 bp。

**1.2.4 测序反应:** PCR测序反应中rs11209026和rs41313262的测序引物为5'-GAGCAGAGTAAAGAGAATAGTAA-3'. rs11465797正向测序中出现T后面峰的滑动, 故进行双向测序. 测序反应条件: 96  $^{\circ}$ C变性2 min后进行PCR循环, PCR循环参数为96  $^{\circ}$ C 10 s, 50  $^{\circ}$ C 5 s, 60  $^{\circ}$ C 4 min, 25个循环, 扩增结束后设置4  $^{\circ}$ C保温. 醋酸钠/乙醇法纯化PCR产物, 电泳, 分析出测序图谱(上海纳欣生物有限公司)。

**1.2.5 等位基因频率计算:** 使用Chromas软件根据IL-23R目的基因位点正常碱基排列序列寻找目的位点的等位基因, 并计算等位基因的表现频率。

**统计学处理** 计算各组等位基因频率, 确认其是否符合Hardy-Weinberg平衡定律. 多态性等位基因频率比较采用SPSS13.0软件进行卡方检验,  $P < 0.05$ 为具有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 基因组DNA检测及IL-23R基因PCR扩增产物检测** 从外周血提取的人类基因组DNA, 检测 $A_{260}/A_{280}$ 比值在1.7-1.85, 经0.8%琼脂糖凝胶电泳分析表现为 $>20$  kb的规则条带, 无降解现象. IL-23R基因PCR扩增后产物在2%的琼脂糖凝胶电泳后有规则的461 bp和380 bp条带出现. 显示PCR扩增成功(图1, 2)。

**2.2 IL-23R SNP分析** 研究发现, 测序结果都为单峰的是纯合基因型, IL-23R基因rs11209026位点存在单核苷酸多态性G/A(图3), 对照组中p.Arg381Gln(A等位基因)的频率分别为6.00%, IBD中UC和CD患者的频率分别为5.65%和2.70%, CD组等位基因A的表现频率明显低于

## ■ 研发前沿

目前已发现多个IBD易感基因和易感SNP位点, 这也进一步证实了IBD的发病与遗传因素相关. 但目前尚未找到确切的与我国IBD明显相关的基因和SNP位点, 而这也将是今后研究IBD发病机制的热点之一。

## ■ 相关报道

Duerr等报道, IL-23R存在rs11209026, p.Arg381Gln多态性, 且与CD相关。然而患者家族中存在强烈的传递不平衡。IL-23R基因多态性在不同IBD患者种群中的分布及相关性尚不明确。

表 1 对照组及IBD患者IL-23R SNP分析

分组	n	SNP n(%)			UC组 vs 对照组		CD组 vs 对照组	
		rs11209026(Arg381Gln)	rs41313262(Val362Ile)	rs11465797(Thr175Asn)	P值	OR值	P值	OR值
对照组	100	6(6.00)	2(2.00)	0(0.00)	0.910	0.937	0.509	0.435
UC组	124	7(5.65)	3(2.42)	0(0.00)	1.000	1.215	1.000	1.361
CD组	74	2(2.70)	2(2.70)	0(0.00)	—	—	—	—

rs11209026(c.1142G>A, p.Arg381Gln), rs41313262(c.1084G>A, p.Val362Ile), rs11465797(c.524 C>A, p.Thr175Asn).

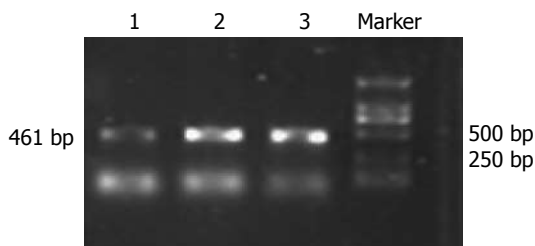


图 1 IL-23R(Arg381Gln/Val362Ile)扩增产物。1: 对照组; 2: UC组; 3: CD组。

UC和正常对照组, 等位基因A可能对CD具有保护作用, 但无统计学差异( $P>0.05$ ,  $OR = 0.435$ ), 而UC的等位基因频率与对照组相似, 无统计学差异。

rs41313262 p.Val362Ile存在SNP G/A(图4), 对照组中p.Val362Ile表现频率为2.00%, IBD中UC和CD患者表现频率分别为2.42%和2.70%。3组间无明显统计学差异( $P>0.05$ ), 而3组IL-23R rs11465797 p.Thr175Asn目的位点均表现为等位基因C, 未发现等位基因A(图5, 表1)。

### 3 讨论

IBD包括UC和CD, 是以肠道非特异性炎症为特征的自身免疫性疾病, 遗传因素在IBD发病中起重要作用<sup>[4]</sup>。当一级亲属中有IBD患者时, IBD患病风险会增高15倍。IBD是一种多基因参与的自身免疫性疾病, 目前已研究出多个IBD易感基因位点, IL-23R就是其中之一。

IL-23R定位于染色体1p32.1-p31.2, 编码区2.9 kb, 由11个外显子组成<sup>[5]</sup>。IL-23通过IL-23/IL-23R/Th17/IL-17途径引起肠黏膜的非特异性炎症反应<sup>[6,7]</sup>。SNP是人类可遗传的变异中最常见的一种, 占有已知多态性的90%以上<sup>[8]</sup>。其中非同义SNP可导致编码的氨基酸发生变化从而影响蛋白质功能, 导致疾病的发生<sup>[9]</sup>。目前国际研究发现IL-23R存在SNP, 其中有3个非同义核苷酸多态性(rs11209026, p.Arg381Gln; rs41313262

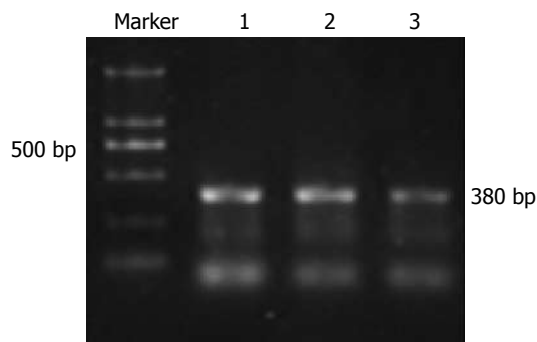


图 2 IL-23R(Thr175Asn)扩增产物。1: 对照组; 2: UC组; 3: CD组。

p.Val362Ile and rs11465797 p.Thr175Asn)可导致精氨酸/谷氨酰胺、缬氨酸/异亮氨酸和苏氨酸/天冬酰胺的转变<sup>[3]</sup>。而我国IL-23R这种SNP与IBD的相关性目前尚不明确。

Duerr等<sup>[9]</sup>曾对CD和对照人群行全基因组扫描, 结果显示IL-23R存在rs11209026, p.Arg381Gln多态性, 且与CD相关。Arg381Gln在患者家族中存在强烈的传递不平衡, 可能是IBD发病的关键。然而国际上对IL-23R p.Arg381Gln与CD的相关性的研究结果不尽相同, Dubinsky等<sup>[10]</sup>肯定了该多态性与非犹太人儿童的CD的相关性。Amre等<sup>[11]</sup>、Borgiani等<sup>[12]</sup>和Tremelling等<sup>[13]</sup>也进一步证实了该基因多态性与加拿大、意大利及北美人群CD的相关性。但Yamazaki等<sup>[14]</sup>、Venegas等<sup>[15]</sup>否认了其于日本及智利CD患者的相关性。这说明IL-23R的作用在不同人群中可能具有遗传异质性。

本研究发现, 我国IL-23R基因rs11209026位点存在SNP(G/A), 我国CD患者p.Arg381Gln的表现频率为2.70%, 对照组6.00%, UC组为5.65%。CD患者p.Arg381Gln的表现频率明显低于正常对照组( $OR = 0.435$ ), 等位基因A可能对CD具有保护作用, 但统计学上均无明显差异( $P>0.05$ )。UC与正常对照组无明显差异。IL-23R p.Arg381Gln这种多态性(c.1142 G>A)使其编码的蛋白质中的一个精氨酸变成谷氨酰胺, 而谷

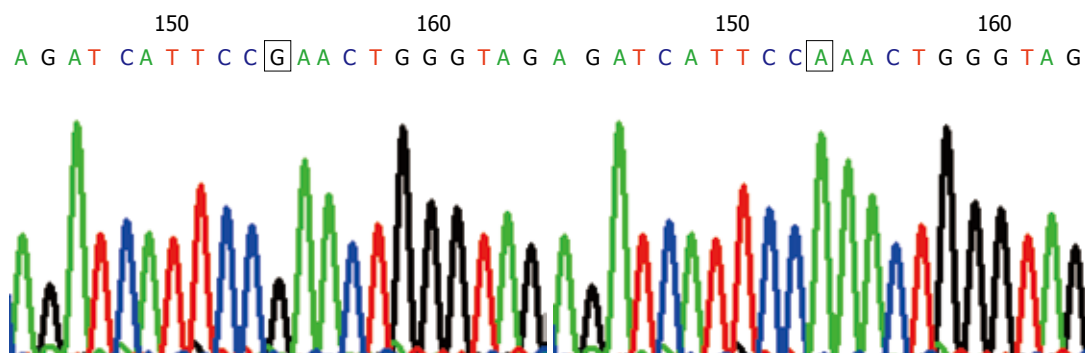


图 3 IL-23R rs11209026 Arg381Gln等位基因G/A测序图. 左图该位点等位基因表现为G, 右图表现为A(方框标出).

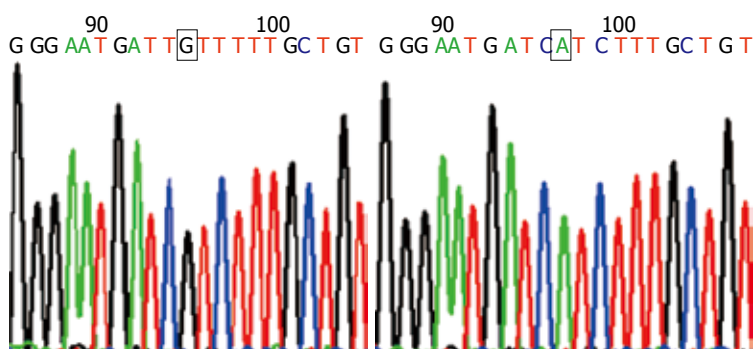


图 4 IL-23R rs41313262(Val362Ile)等位基因G/A测序图. 左图该位点等位基因表现为G, 右图表现为A(方框标出).

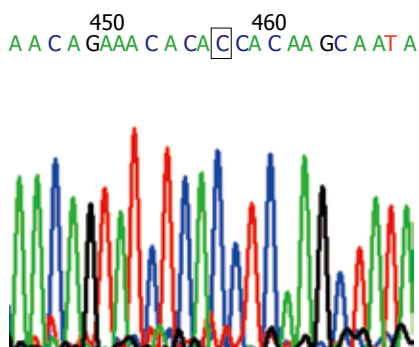


图 5 IL-23R rs11465797(Thr175Asn)C等位基因测序图(方框标出). 未发现等位基因A.

氨基酸是肠道黏膜生长代谢的重要营养物质, 同时具有重要的免疫调节作用, 他在维持肠黏膜屏障结构及功能中起重要作用<sup>[16]</sup>, 故等位基因A可能对CD具有保护作用, 而其低表现频率可能CD发病有关. 本研究中尽管我国CD患者IL-23R p.Arg381Gln频率低于对照组, 但无统计学差异, 表明我国IL-23R Arg381Gln多态性与IBD无明显相关性, 他存在遗传异质性. 由于样本量有限, 还需更大样本进一步研究.

IL-23R另外2个非同义的SNP(rs41313262 p.Val362Ile c.1084 G>A和rs11465797 p.Thr175Asn c.524 C>A), 他可分别导致缬氨酸和苏氨酸向异亮氨酸和天冬酰胺的转变. 本研究中rs41313262 p.Val362Ile存在SNP(G/A), 对

对照组中p.Val362Ile的表现频率为2.00%, IBD中UC的频率为2.42%, CD患者为2.70%. 与对照组相比, UC和CD组OR值分别为1.215和1.361, 提示其多态性对IBD可能是一种危险因素, 但3组间无明显统计学差异( $P>0.05$ ), 提示其多态性与IBD发病无明显相关性. 而IL-23R rs11465797 p.Thr175Asn目的位点均表现为等位基因C, 未发现等位基因A, 表明我国IL-23R无相关多态性表现. 缬氨酸/异亮氨酸和苏氨酸/天冬酰胺可能并不参与IBD的发病, 在肠黏膜的代谢修复中可能存在可替代性.

总之, 我国的IL-23R存在SNP, 但其多态性可能与IBD无明显相关性, 遗传异质性决定了IBD的易感性. 由于样本量有限, IL-23R SNP与我国IBD确切的相关性还需进一步研究.

#### 4 参考文献

- 1 Binder V. Genetic epidemiology in inflammatory bowel disease. *Dig Dis* 1998; 16: 351-355
- 2 Cooney R, Jewell D. The genetic basis of inflammatory bowel disease. *Dig Dis* 2009; 27: 428-442
- 3 Takaku T, Calado RT, Kajigaya S, Young NS. Interleukin-23 receptor (IL-23R) gene polymorphisms in acquired aplastic anemia. *Ann Hematol* 2009; 88: 653-657
- 4 Baumgart DC, Carding SR. Inflammatory bowel disease: cause and immunobiology. *Lancet* 2007; 369: 1627-1640
- 5 Parham C, Chirica M, Timans J, Vaisberg E, Travis M, Cheung J, Pflanz S, Zhang R, Singh KP, Vega

#### ■创新盘点

本研究首次对我国IBD患者IL-23R 3个非同义SNP进行研究, 探讨了其等位基因的表现频率分布, 了解了我国IBD患者的IL-23R基因多态性与IBD的关系.

## ■同行评价

本文选题新颖,对炎症性肠病的发病机制的探讨有重要的现实意义。

- F, To W, Wagner J, O'Farrell AM, McClanahan T, Zurawski S, Hannum C, Gorman D, Rennick DM, Kastelein RA, de Waal Malefyt R, Moore KW. A receptor for the heterodimeric cytokine IL-23 is composed of IL-12Rbeta1 and a novel cytokine receptor subunit, IL-23R. *J Immunol* 2002; 168: 5699-5708
- 6 Kolls JK, Lindén A. Interleukin-17 family members and inflammation. *Immunity* 2004; 21: 467-476
- 7 Afzali B, Lombardi G, Lechler RI, Lord GM. The role of T helper 17 (Th17) and regulatory T cells (Treg) in human organ transplantation and autoimmune disease. *Clin Exp Immunol* 2007; 148: 32-46
- 8 Collins FS, Brooks LD, Chakravarti A. A DNA polymorphism discovery resource for research on human genetic variation. *Genome Res* 1998; 8: 1229-1231
- 9 Duerr RH, Taylor KD, Brant SR, Rioux JD, Silverberg MS, Daly MJ, Steinhart AH, Abraham C, Regueiro M, Griffiths A, Dassopoulos T, Bitton A, Yang H, Targan S, Datta LW, Kistner EO, Schumm LP, Lee AT, Gregersen PK, Barmada MM, Rotter JI, Nicolae DL, Cho JH. A genome-wide association study identifies IL23R as an inflammatory bowel disease gene. *Science* 2006; 314: 1461-1463
- 10 Dubinsky MC, Wang D, Picornell Y, Wrobel I, Katzir L, Quiros A, Dutridge D, Wahbeh G, Silber G, Bahar R, Mengesha E, Targan SR, Taylor KD, Rotter JI. IL-23 receptor (IL-23R) gene protects against pediatric Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis* 2007; 13: 511-515
- 11 Amre DK, Mack D, Israel D, Morgan K, Lambrette P, Law L, Grimard G, Deslandres C, Krupoves A, Bucionis V, Costea I, Bissonauth V, Feguery H, D'Souza S, Levy E, Seidman EG. Association between genetic variants in the IL-23R gene and early-onset Crohn's disease: results from a case-control and family-based study among Canadian children. *Am J Gastroenterol* 2008; 103: 615-620
- 12 Borgiani P, Perricone C, Ciccacci C, Romano S, Novelli G, Biancone L, Petruzzello C, Pallone F. Interleukin-23R Arg381Gln is associated with susceptibility to Crohn's disease but not with phenotype in an Italian population. *Gastroenterology* 2007; 133: 1049-1051; author reply 1049-1051
- 13 Tremelling M, Cummings F, Fisher SA, Mansfield J, Gwilliam R, Keniry A, Nimmo ER, Drummond H, Onnie CM, Prescott NJ, Sanderson J, Bredin F, Berzuini C, Forbes A, Lewis CM, Cardon L, Deloukas P, Jewell D, Mathew CG, Parkes M, Satsangi J. IL23R variation determines susceptibility but not disease phenotype in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 2007; 132: 1657-1664
- 14 Yamazaki K, Onouchi Y, Takazoe M, Kubo M, Nakamura Y, Hata A. Association analysis of genetic variants in IL23R, ATG16L1 and 5p13.1 loci with Crohn's disease in Japanese patients. *J Hum Genet* 2007; 52: 575-583
- 15 Venegas M, Beltrán CJ, Alvarez L, Castro A, Torres T, Leal AD, Lahsen FM, Hermoso MA, Quera R. IL-23R Arg381Gln polymorphism in Chilean patients with inflammatory bowel disease. *Eur Cytokine Netw* 2008; 19: 190-195
- 16 dos Santos RG, Viana ML, Generoso SV, Arantes RE, Davisson Correia MI, Cardoso VN. Glutamine supplementation decreases intestinal permeability and preserves gut mucosa integrity in an experimental mouse model. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 2010; 34: 408-413

编辑 李薇 电编 何基才

ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) CN 14-1260/R 2011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)

# 蓝色橡皮疱痣综合征1例

赵晶, 高善玲, 刘冰熔, 刘中宏, 范玉晶

赵晶, 高善玲, 刘冰熔, 刘中宏, 范玉晶, 哈尔滨医科大学附属第二医院消化科, 黑龙江省哈尔滨市 150086

作者贡献分布: 本文写作由赵晶完成; 刘冰熔与高善玲完成病例临床内镜下治疗; 刘中宏与范玉晶提供相关资料; 高善玲进行修改指导。

通讯作者: 高善玲, 主任医师, 150086, 黑龙江省哈尔滨市南岗区学府路246号, 哈尔滨医科大学附属第二医院消化科. gaoshanling@medmail.com.cn

电话: 0451-86605143

收稿日期: 2011-04-27 修回日期: 2011-06-24

接受日期: 2011-06-28 在线出版日期: 2011-07-08

## One case report of blue rubber bleb nevus syndrome

Jing Zhao, Shan-Ling Gao, Bing-Rong Liu, Zhong-Hong Liu, Yu-Jing Fan

Jing Zhao, Shan-Ling Gao, Bing-Rong Liu, Zhong-Hong Liu, Yu-Jing Fan, the Department of Digestive, the second Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150086, Heilongjiang Province, China

Correspondence to: Shan-Ling Gao, the Department of Digestive, the second Affiliated Hospital of Harbin Medical University, 246 Xuefu Road, Nangang District, Harbin 150086, Heilongjiang Province, China. gaoshanling@medmail.com.cn

Received: 2011-04-27 Revised: 2011-06-24

Accepted: 2011-06-28 Published online: 2011-07-08

## Abstract

Blue rubber bleb nevus syndrome (BRBNS) is a rare disorder characterized by distinctive cutaneous and gastrointestinal venous malformations that usually cause massive or occult gastrointestinal hemorrhage and iron deficiency anemia secondary to the bleeding episodes. Other organs may also be involved. We report a case with symptoms of chronic gastrointestinal hemorrhage. The endoscopy revealed multiple bluish polypoid venous malformations throughout the GI tract. Curative effect was obtained by removing venous malformations of the GI through endoscopic sclerotherapy, ligation and ESD.

**Key Words:** Blue rubber bleb nevus syndrome; Ligation treatment; Sclerotherapy; Endoscopic submucosal dissection

Zhao J, Gao SL, Liu BR, Liu ZH, Fan YJ. One case report of blue rubber bleb nevus syndrome. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(19): 2081-2083

hua Zazhi 2011; 19(19): 2081-2083

## 摘要

蓝色橡皮疱痣综合征是一种罕见疾病, 皮肤及胃肠道出现特征性蓝色疱疹样血管畸形, 临床表现为消化道出血及缺铁性贫血, 其他脏器亦可受累. 本病例以慢性胃肠道出血为主要表现, 我们通过胃肠镜及超声胃镜检查诊断, 并应用内镜下硬化、套扎及内镜下黏膜下层剥离术(ESD)进行治疗, 取得较好疗效。

**关键词:** 蓝色橡皮疱痣综合征; 套扎治疗; 硬化治疗; 内镜下黏膜下层剥离术

赵晶, 高善玲, 刘冰熔, 刘中宏, 范玉晶. 蓝色橡皮疱痣综合征1例. 世界华人消化杂志 2011; 19(19): 2081-2083

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/2081.asp>

## 0 引言

蓝色橡皮疱痣综合征(blue rubber bleb nevus syndrome, BRBNS)是一种罕见疾病, 其特点为皮肤及胃肠道的血管畸形, 临床表现为消化道出血及缺铁性贫血, 其他脏器亦可受累. 现将哈尔滨医科大学附属第二医院院诊断的1例BRBNS患者病例报道如下。

## 1 病例报告

男, 24岁, 以“间断黑便7年”为主诉于2008-12在哈尔滨医科大学附属第二医院就诊. 病程中无腹痛, 腹胀, 有恶心, 无呕吐. 自幼四肢皮肤多发静脉瘤样病变. 曾于2000年行皮肤多处血管瘤剥离术. 体检: 生命体征稳定, 发育正常, 贫血外观, 上肢、下肢、颈部及背部皮肤可见散在大小不等蓝色橡皮样结节, 触之柔软, 压之可消失, 并可见多处皮肤病变手术瘢痕. 入院后血常规检查示: 白细胞:  $2.8 \times 10^9/L$ , RBC:  $2.32 \times 10^{12}/L$ , HGB: 45 g/L, HCT: 16.7%, PLT:  $262 \times 10^9/L$ , 血清铁蛋白测定: 1.520 ng/mL. 胃镜检查见: 距门齿23 cm见食管四壁散在多个青蓝色静脉隆起, 成结节状, 直径0.5-1.5 cm, 未见活动性出血; 另于胃体部及胃窦部小弯侧可见两处半球形隆起,

## ■背景资料

蓝色橡皮疱痣综合征(BRBNS)是一种罕见疾病, 其特点为皮肤及胃肠道的血管畸形, 临床表现为消化道出血及缺铁性贫血, 其他脏器亦可受累, 目前尚缺乏有效治疗。

## ■同行评议者

崔立红, 教授, 中国人民解放军海军总医院消化内科



## ■创新盘点

有关BRBNS的治疗目前尚无有效方法. 本文所采用的内镜下黏膜下层剥离术治疗本病消化系血管病变为目前国内外首创.

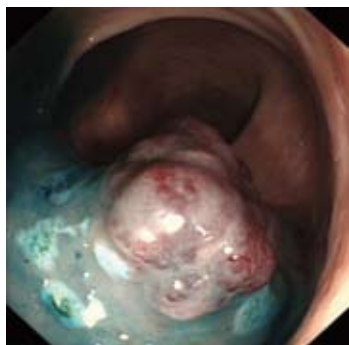


图1 直肠病变行ESD治疗.

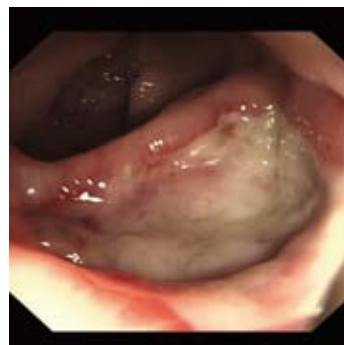


图2 ESD术后10 d复查.

直径约1.0-1.5 cm, 基底部无蒂, 表面黏膜糜烂渗血. 十二指肠降段前壁, 后壁可见两处1.0 cm × 0.6 cm扁平状隆起, 表面不光滑. 超声胃镜见: 病灶处为低回声区, 内部回声不规则, 边界不清晰, 向腔内突起, 与周围血管相通, 病变起源于黏膜下层. 结肠镜检查见: 回肠末端、全结肠及直肠共见8处大疱疹样病变, 表面蓝紫色, 大小约2.5-3.0 cm, 与周围黏膜分界清, 表面黏膜分叶状, 有糜烂及渗血, 诊断为BRBNS. 入院后给予补充铁剂, 输血及其他支持治疗, 并分次对食管、胃、十二指肠及结肠病变进行内镜下治疗. 胃内两处病变行套扎治疗, 食管、十二指肠降段病变、回肠末端及部分结肠病变行硬化治疗, 直肠处病变行ESD(Endoscopic submucosal dissection)治疗, 局部无出血, 病变完整剥离后送病理(图1, 2). 直肠黏膜下见有密集扩张的静脉, 结合肠镜所见符合BRBNS的肠道改变. 间隔数天后, 复查胃肠镜, 原病变处呈溃疡样改变. 术后患者未再出现黑便, 复查血常规: WBC:  $4.8 \times 10^9/L$ , RBC:  $3.34 \times 10^{12}/L$ , HGB: 87 g/L, HCT: 29.1%, PLT:  $192 \times 10^9/L$ . 随访2年, 患者未再出现消化道出血表现.

## 2 讨论

BRBNS是一种罕见疾病, 其特点为皮肤及胃肠道的血管畸形, 临床表现为消化道出血及缺铁性贫血, 其他脏器亦可受累. Gascoyen在1860年报道了皮肤的海绵状血管瘤与能够导致消化道出血的消化道多发的相似血管病变具有相关性. 1958年, 又由Bean对该病进行了详细描述, 故又称Bean综合征. 截至2003年, 世界报道此病患者200余例. BRBNS一般为幼年期发病, 多数病例为散发病例, 有报道显示该病为常染色体显性遗传性疾病, 由位于9号染色体短臂的基因突变导致.

BRBNS的诊断主要是在皮肤或消化道发现典型的蓝色海绵样血管瘤, 病理活检不作为常规检查<sup>[1]</sup>. 一般在出生后或幼年期出现血管瘤, 表现为上肢和躯干的多发的蓝色血管病变. 这些皮肤血管病变的数量和大小通常随年龄增长而增加, 皮肤的病变可表现为蓝色充血囊样病变, 呈橡皮奶头样, 可被压缩, 松手后再次被充盈, 或表现为蓝色斑疹<sup>[2]</sup>. 发生在消化道的病变可通过内窥镜的检查被发现, 内镜下表现为息肉样静脉曲张畸形, 钡剂检查表现为息肉样充盈缺损, 提示息肉病的改变<sup>[1]</sup>. 胃肠道血管畸形可以发生在口腔至肛门的任意部位, 但小肠及末端结肠多见. 发生在消化道的病变可引起不同程度的呕血, 黑便或便血, 除非进行根治治疗, 否则这类患者多因慢性消化道出血而导致不同程度的贫血并需要终身服用铁剂和输血治疗. 不常见的并发症有肠扭转、肠套叠和肠梗塞. CT检查对小肠及结肠病变诊断意义不大, 只有消化道被口服造影剂充填后, 部分胃、小肠及结肠病变可被发现, 表现为腔内息肉样软组织病变影. CT所见上消化道病变主要与消化道息肉病如家族性腺瘤性息肉病、幼年性息肉病、Peutz-Jeghers综合征、Cronkhite-Canada综合征等疾病进行鉴别. BRBNS还可以累及肝脏、肺脏、心脏、胆囊、肾脏、胰腺、脾脏及中枢神经系统, 以及眼睛、咽部、甲状腺、胸腺、肾上腺、生殖器官、骨骼肌、骨及关节. 这些病变通常没有症状, 但是个别病例会出现疼痛, 疼痛可能由血管瘤周围的平滑肌收缩导致或血管内血栓形成及继发钙化导致. 组织学检查可以发现血管腔内有血栓形成, 部分病例还可形成机化血栓及静脉石<sup>[3]</sup>. 目前为止未发现此病恶性变的报道. 极少数病例可因严重的消化道出血或神经系统损害而致死.

目前还没有有效的系统治疗方法. 此病的

治疗主要针对并发症进行治疗, 皮肤病变通常不会导致出血, 如果影响美观可行外科治疗. 消化道病变破裂出血是本病的严重并发症, 少量出血可进行保守治疗, 包括服用铁剂及输血. 在儿科病例, 有应用类固醇激素、抗纤溶药物、大剂量丙种球蛋白及干扰素进行治疗的报道. 干扰素治疗有效, 其作用可能为治疗弥散性血管内凝血<sup>[4,5]</sup>. 但到目前为止, 应用这些药物治疗还没有令人满意的疗效. 消化道病变导致长期慢性失血或大量出血时主要采取内镜下治疗, 包括内镜下硬化或套扎治疗. 对于临床青少年患者出现不明原因黑便或便血, 同时伴有皮肤多发血管瘤者, 应常规进行胃肠镜检查, 如在内镜下发现息肉样蓝色静脉隆起, 可初步诊断为此病, 根据局部病变情况决定内镜下治疗方法, 选择内镜下套扎治疗, 硬化治疗或ESD治疗. 通过本例患者超声胃镜检查发现, 胃肠道血管病变多起源于黏膜下层, 病变向腔内膨出. 目前

国内外尚无应用ESD对局部病变进行切除的报道. 本例患者应用EUS+ESD将局部病变完整切除, 这在国内外文献中尚属首次.

### 3 参考文献

- 1 Kassarian A, Fishman SJ, Fox VL, Burrows PE. Imaging characteristics of blue rubber bleb nevus syndrome. *AJR Am J Roentgenol* 2003; 181: 1041-1048
- 2 Atten MJ, Ahmed S, Attar BM, Richter H, Mehta B. Massive pelvic hemangioma in a patient with blue rubber bleb nevus syndrome. *South Med J* 2000; 93: 1122-1125
- 3 Jennings M, Ward P, Maddocks JL. Blue rubber bleb naevus disease: an uncommon cause of gastrointestinal tract bleeding. *Gut* 1988; 29: 1408-1412
- 4 Kunishige M, Azuma H, Masuda K, Shigekiyo T, Arai Y, Kawai H, Saito S. Interferon alpha-2a therapy for disseminated intravascular coagulation in a patient with blue rubber bleb nevus syndrome. A case report. *Angiology* 1997; 48: 273-277
- 5 Apak H, Celkan T, Ozkan A, Yildiz I, Aydemir EH, Ozdil S, Kuruoglu S. Blue rubber bleb nevus syndrome associated with consumption coagulopathy: treatment with interferon. *Dermatology* 2004; 208: 345-348

### ■同行评价

本文选题较好, 在局部出血治疗上有突破, 有较好的临床参考和实用价值.

编辑 李薇 电编 张洋

ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) CN 14-1260/R 2011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 0.625

**本刊讯** 一年一度的中国科技论文统计结果11月26日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, 2009年《世界华人消化杂志》总被引频次3 009次, 影响因子0.625, 综合评价总分49.4分, 分别位居内科学类48种期刊的第6位、第9位、第6位, 分别位居1 946种中国科技论文统计源期刊(中国科技核心期刊)的第87位、第378位、第351位; 其他指标: 即年指标0.112, 他引率0.79, 引用刊数473种, 扩散因子15.72, 权威因子1 170.03, 被引半衰期4.0, 来源文献量752, 文献选出率0.93, 地区分布数30, 机构分布数30, 基金论文比0.39, 海外论文比0.01.

经过多项学术指标综合评定及同行专家评议推荐, 《世界华人消化杂志》再度被收录为“中国科技论文统计源期刊”(中国科技核心期刊). (编辑部主任: 李军亮 2010-11-28)

# 《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56.00元, 全年2016.00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》(2008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。2009年《世界华人消化杂志》总被引频次3 009次, 影响因子0.625, 综合评价总分49.4分, 分别位居内科学类48种期刊的第6位、第9位、第6位, 分别位居1 946种中国科技论文统计源期刊(中国科技核心期刊)的第87位、第378位、第351位; 其他指标: 即年指标0.112, 他引率0.79, 引用刊数473种, 扩散因子15.72, 权威因子1 170.03, 被引半衰期4.0, 来源文献量752, 文献选出率0.93, 地区分布数30, 机构分布数30, 基金论文比0.39, 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<sup>H</sup>, *H. pylori*不能写成HP,  $T_{1/2}$ 不能写成tl/2或T<sub>1/2</sub>, Vmax不能Vmax,  $\mu$ 不写为英文u. 需排斜体的外文字, 用斜体表示. 如生物学中拉丁学名的属名与种名, 包括亚属、亚种、变种. 如幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *H. pylori*), *Ilex pubescens* Hook, et Arn. var. *glaber* Chang(命名者勿划横线); 常数K; 一些统计学符号(如样本数n, 均数mean, 标准差SD, F检验, t检验和概率P, 相关系数r); 化学名中标明取代位的元素、旋光性和构型符号(如N, O, P, S, d, l)如n-(normal, 正), N-(nitrogen, 氮), o-(ortho, 邻), O-(oxygen, 氧, 习惯不译), d-(dextro, 右旋), p-(para, 对), 例如n-butyl acetate(醋酸正丁酯), N-methylacetanilide(N-甲基乙酰苯胺), o-cresol(邻甲酚), 3-O-methyl-adrenaline(3-O-甲基肾上腺素), d-amphetamine(右旋苯丙胺), l-dopa(左旋多巴), p-aminosalicylic acid(对氨基水杨酸). 拉丁字及缩写in vitro, in vivo, in situ; Ibid, et al, po, vs; 用外文字母代表的物理量, 如m(质量), V(体积), F(力), p(压力), W(功), v(速度), Q(热量), E(电场强度), S(面积), t(时间), z(酶活性, kat), t(摄氏温度, °C), D(吸收剂量, Gy), A(放射性活度, Bq),  $\rho$ (密度, 体积质量, g/L), c(浓度, mol/L),  $\phi$ (体积分数, mL/L), w(质量分数, mg/g), b(质量摩尔浓度, mol/g), l(长度), b(宽度), h(高度), d(厚度), R(半径), D(直径),  $T_{\max}$ ,  $C_{\max}$ , 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、CO<sub>2</sub>结合力、乳酸、磷酸、胆固醇、胆固醇酯、三酰甘油、钠、钙、镁、非蛋白氮、氯化物; 胆红素、蛋白结合碘、肌酸、肌酐、铁、铅、抗坏血酸、尿胆元、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 $1 \times 10^{-3}$  g与 $5 \times 10^{-7}$  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字的文句中, 例如每天不写每d, 但每天8 mg可写8 mg/d. 在一个组合单位符号内不得有1条以上的斜线, 例如不能写成mg/kg/d, 而应写成mg/(kg·d), 且在整篇文章内应统一. 单位符号没有单、复数的区分, 例如, 2 min不是2 mins, 3 h不是3 hs, 4 d不是4 ds, 8 mg不是8 mgs. 半个月, 15 d; 15克, 15 g; 10%福尔马林, 40 g/L甲醛; 95%酒精, 950 mL/L乙醇; 5% CO<sub>2</sub>, 50 mL/L CO<sub>2</sub>; 1 : 1 000肾上腺素, 1 g/L肾上腺素; 胃黏膜含促胃液素36.8 pg/mg, 改为胃黏膜蛋白含促胃液素36.8 ng/g; 10%葡萄糖改为560 mmol/L或100 g/L葡萄糖; 45 ppm =  $45 \times 10^{-6}$ ; 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.

《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, 2008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

2.5 统计学符号 (1) $t$ 检验用小写 $t$ ; (2) $F$ 检验用英文大写 $F$ ; (3)卡方检验用希文小写 $\chi^2$ ; (4)样本的相关系数用英文小写 $r$ ; (5)自由度用希文小写 $\nu$ ; (6)样本数用英文小写 $n$ ; (7)概率用英文斜体大写 $P$ . 在统计学处理中在文字叙述时平均数 $\pm$ 标准差表示为 $\text{mean} \pm \text{SD}$ , 平均数 $\pm$ 标准误为 $\text{mean} \pm \text{SE}$ . 统计学显著性用 $^aP < 0.05$ ,  $^bP < 0.01$  ( $P > 0.05$  不注). 如同一表中另有一套 $P$ 值, 则 $^cP < 0.05$ ,  $^dP < 0.01$ ; 第三套为 $^eP < 0.05$ ,  $^fP < 0.01$ 等.

2.6 数字用法 遵照国家标准GB/T 15835-1995出版物上数字用法的规定, 作为汉语词素者采用汉字数字, 如二氧化碳、十二指肠、三倍体、四联球菌、五四运动、星期六等. 统计学数字采用阿拉伯数字, 如1000-1500 kg, 3.5 mmol/L  $\pm$  0.5 mmol/L等. 测量的数据不能超过其测量仪器的精密度, 例如6347意指6000分之一的精密度. 任何一个数字, 只允许最后一位有误差, 前面的位数不应有误差. 在一组数字中的 $\text{mean} \pm \text{SD}$ 应考虑到个体的变差, 一般以SD的1/3来定位数, 例如3614.5 g  $\pm$  420.8 g, SD的1/3达一百多g, 平均数波动在百位数, 故应写成3.6 kg  $\pm$  0.4 kg, 过多的位数并无意义. 又如8.4 cm  $\pm$  0.27 cm, 其SD/3 = 0.09 cm, 达小数点后第2位, 故平均数也应补到小数点后第2位. 有效位数以后的数字是无效的, 应该舍. 末尾数字, 小于5则舍, 大于5则进, 如恰等于5, 则前一位数逢奇则进, 逢偶(包括“0”)且5之后全为0则舍. 末尾时只可1次完成, 不得多次完成. 例如23.48, 若不要小数点, 则应成23, 而不应该23.48  $\rightarrow$  23.5  $\rightarrow$  24. 年月日采用全数字表达法, 请按国家标准GB/T 7408-94书写. 如1985年4月12日, 可写作1985-04-12; 1985年4月, 写作1985-04; 从1985年4月12日23时20分50秒起至1985年6月25日10时30分止, 写作1985-04-12 T23:20:50/1985-06-25 T10:30:00; 从1985年4月12日起至1985年6月15日止, 写作1985-04-12/06-16, 上午8时写作08:00, 下午4时半写作16:30. 百分数的有效位数根据分母来定: 分母 $\leq 100$ , 百分数到个位;  $101 \leq \text{分母} \leq 1000$ , 百分数到小数点后1位; 余类推. 小数点前后的阿拉伯数字, 每3位间空1/4阿拉伯数字距离, 如1486800.475 65. 完整的阿拉伯数字不移行!

2.7 标点符号 遵照国家标准GB/T 15834-1995标点符号用法的要求, 本刊论文中的句号都采用黑圆点; 数字间的起止号采用“-”字线, 并列的汉语词间用顿号分开, 而并列的外文词、阿拉伯数字、外文缩略词及汉语拼音字母拼写词间改用逗号分开, 参考文献中作者间一律用逗号

分开; 表示终了的标点符号, 如句号、逗号、顿号、分号、括号及书名号的后一半, 通常不用于一行之首; 而表示开头的标点符号, 如括号及书名号的前一半, 不宜用于一行之末. 标点符号通常占一格, 如顿号、逗号、分号、句号等; 破折号应占两格; 英文连字符只占一个英文字符的宽度, 不宜过长, 如5-FU. 外文字符下划一横线表示用斜体, 两横线表示用小写, 三横线表示用大写, 波纹线表示用黑体.

### 3 稿件格式

3.1 题名 简明确切地反映论文的特定内容, 鲜明而有特色, 阿拉伯数字不宜开头, 不用副题名, 一般20个字. 避免用“的研究”或“的观察”等非特定词.

3.2 作者 论文作者的署名, 按照国际医学杂志编辑委员会(ICMJE, International Committee of Medical Journal Editors)作者资格标准执行. 作者标准为: (1)对研究的理念和设计、数据的获得、分析和解读做出重大贡献; (2)起草文章, 并对文章的重要的知识内容进行批评性修改; (3)接受对准备发表文章的最后一稿. 作者应符合条件1, 2, 3, 对研究工作有贡献的其他人可放入致谢中. 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:  $^aP<0.05$ ,  $^bP<0.01$ ( $P>0.05$ 不注). 如同一表中另有一套 $P$ 值, 则 $^cP<0.05$ ,  $^dP<0.01$ ; 第3套为 $^eP<0.05$ ,  $^fP<0.01$ .  $P$ 值后注明何种检验及其具体数字, 如 $P<0.01$ ,  $t = 4.56$  vs 对照组等, 注在表的左下方. 表内采用阿拉伯数字, 共同的计量单位符号应注在表的右上方, 表内个位数、小数点、±、-应上下对齐. “空白”表示无此项或未测, “-”代表阴性未发现, 不能用同左、同上等. 表图勿与正文内容重复. 表图的标目尽量用 $t/\text{min}$ ,  $c/(\text{mol/L})$ ,  $p/\text{kPa}$ ,  $V/\text{mL}$ ,  $t/^\circ\text{C}$ 表达.

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<sup>[1]</sup>报告……, 潘伯荣等<sup>[2-5]</sup>认

《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.

2010年,《世界华人消化杂志》将坚持开放获取(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。

为……; PCR方法敏感性高<sup>[6-7]</sup>。文献序号作正文叙述时,用与正文同号的数字并排,如本实验方法见文献[8]。所引参考文献必须以近2-3年SCIE, PubMed,《中国科技论文统计源期刊》和《中文核心期刊要目总览》收录的学术类期刊为准,通常应只引用与其观点或数据密切相关的国内外期刊中的最新文献。期刊: 序号, 作者(列出全体作者), 文题, 刊名, 年, 卷, 起页-止页, PMID和DOI编号; 书籍: 序号, 作者(列出全部), 书名, 卷次, 版次, 出版地, 出版社, 年, 起页-止页。

5 网络版的发表前链接 本刊即将开始实行网络版的每篇文章上都有该文发表前纪录的链接, 包括首次提交的稿件, 同行评议人报告, 作者给审稿人回信和作者修回稿, 以PDF格式上传。读者可以针对论文、审稿意见和作者的修改情况发表意见, 指出问题与不足; 作者也可以随时修改完善自己发表的论文, 使文章的发表成为一个编者、同行评议者、读者、作者互动的动态过程。

## 4 写作格式实例

### 4.1 述评写作格式实例

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

### 4.2 研究原著写作格式实例

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

### 4.3 焦点论坛写作格式实例

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

### 4.4 文献综述写作格式实例

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

### 4.5 研究快报写作格式实例

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

### 4.6 临床经验写作格式实例

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

### 4.7 病例报告写作格式实例

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

## 5 投稿方式

接受在线投稿, 不接受其他方式的投稿, 如E-mail、打印稿。在线投稿网址: <http://www.baishideng.com/wcjd/ch/index.aspx>。无法在线提交的通过[submission@wjgnet.com](mailto:submission@wjgnet.com), 电话: 010-8538-1892, 传真: 010-8538-1893寻求帮助。投稿须知下载网址<http://www.wjgnet.com/1009-3079/tgxz.pdf>。审稿过程平均时间需要14-28 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](mailto:wcjd@wjgnet.com)  
<http://www.wjgnet.com>

## 2011年国内国际会议预告

2011-07-14/17

第五届地坛国际感染病会议

会议地点: 北京市

联系方式: info@bjditan.org

2011-07-14/17

2011年临床肿瘤学新进展高级研讨会

会议地点: 杭州市

联系方式: 0571-82888888

2011-07-22/24

第四届全国脂肪肝病专题研讨会

会议地点: 重庆市

联系方式: 010-85867619

2011-07-25/29

2011年第四届全国糖尿病及其并发症营养治疗新进展学习班

会议地点: 上海市

联系方式: tangyan8503@yahoo.cn

2011-07-29/30

肝脏疾病转化医学论坛(长春)暨第三届长春国际肝病高峰论坛

会议地点: 长春市

联系方式: gbgflt@yahoo.cn

2011-08-04/07

第五届中国肿瘤内科大会

会议地点: 北京市

联系方式: 010-87788701

2011-08-05/07

第八届中国肝病学发展论坛

会议地点: 济南市

联系方式: 0531-87100518

2011-08-20/22

第十五次全国中西医结合儿科学术会议

会议地点: 兰州市

联系方式: zxyek@sina.com

2011-08-31/09-02

腹腔间室综合症的护理进展

会议地点: 延吉市

联系方式: qiyan68@126.com

2011-09

中华医学会超声医学分会第十一次全国超声医学学术会议

会议地点: 青岛市

联系方式: http://www.nccsum.org/

2011-09-14/17

第六届全国疑难及重症肝病大会

会议地点: 兰州市

联系方式: office@cnsld.org

2011-09-14/18

第十四届全国临床肿瘤学大会暨2011年CSCO学术年会

会议地点: 福州市

联系方式: 010-67726451

2011-09-16/18

第七届全国消化系统中晚期恶性肿瘤学术年会

会议地点: 济南市

联系方式: xiaohuahuiyi@126.com

2011-10-13/16

2011年亚太地区国际肿瘤生物学和医学学术会议

会议地点: 上海市

联系方式: clinimmunchina@yahoo.com

2011-10-14/16

中华医学会第五次全国艾滋病、病毒性丙型肝炎暨全国热带病学术会议

会议地点: 重庆市

联系方式: www.nccsid.org

2011-10-21/23

中华医学会病理学分会第十七次学术会议

会议地点: 杭州市

联系方式: leighdai@cma.org.cn

2011-11-18/23

第十一届全国消化道恶性病变介入诊疗研讨会暨2011全国内镜/介入/放疗新技术国际论坛

会议地点: 北京市

联系方式: doctor302@163.com

2011-11-25/27

2011年全国消化道静脉曲张及其伴发消化疾病内镜诊治研讨会

会议地点: 西安市

联系方式: 2011varices@sina.com

2011-12-08/11

第11次全国消化系疾病学术会议

会议地点: 杭州市

联系方式: csgdabstract@126.com

2011-12-09/11

江苏省第四次胃肠外科学术会议

会议地点: 南京市

联系方式: jswcwk@yahoo.com.cn

## 志谢世界华人消化杂志编委

本期文章审稿中(包括退稿), 我刊编委付出了宝贵的时间和大量的精力, 提高了《世界华人消化杂志》的学术质量, 在此表示衷心感谢!

白爱平 副教授  
南昌大学第一附属医院消化内科

陈洪 主任医师  
东南大学附属中大医院消化科

陈贻胜 教授  
福建省立医院消化内科

房林 副教授  
同济大学附属上海市第十人民医院普外科

戈之铮 教授  
上海交通大学医学院附属仁济医院消化科

关玉盘 教授  
首都医科大学附属北京朝阳医院消化科

何松 教授  
重庆医科大学附属第二医院消化内科

何晓顺 教授  
中山大学附属第一医院器官移植科

黄恒青 主任医师  
福建省第二人民医院 消化内科

黄晓东 主任医师  
武汉市中心医院消化内科

江学良 主任医师  
中国人民解放军济南军区总医院消化科

姜春萌 教授  
大连医科大学附属第二医院消化科

姜慧卿 教授  
河北医科大学第二医院消化科

李革 副教授  
延边大学附属医院普外1科

李晟磊 副主任医师  
郑州大学第一附属医院病理科

李瑜元 教授  
广州市第一人民医院内科

梁力建 教授  
中山大学附属第一医院肝胆外科

廖家智 副主任医师  
华中科技大学同济医学院附属同济医院消化内科

刘超 副教授  
中山大学孙逸仙纪念医院肝胆胰外科

倪润洲 教授  
南通大学附属医院消化内科

牛英才 副研究员  
齐齐哈尔医学院医药科学研究所

欧希龙 副教授  
东南大学中大医院消化科

沈琳 主任医师  
北京大学临床肿瘤医院消化内科

孙殿兴 主任医师  
白求恩国际和平医院肝病科

王学美 研究员  
北京大学第一医院中西医结合研究室

肖恩华 教授  
中南大学湘雅二医院放射教研室

薛东波 教授  
哈尔滨医科大学附属第一医院微创胆道外科

殷正丰 教授  
中国人民解放军第二军医大学东方肝胆外科医院

张宗明 教授  
清华大学第一附属医院消化医学中心

朱亮 副教授  
大连医科大学生理教研室