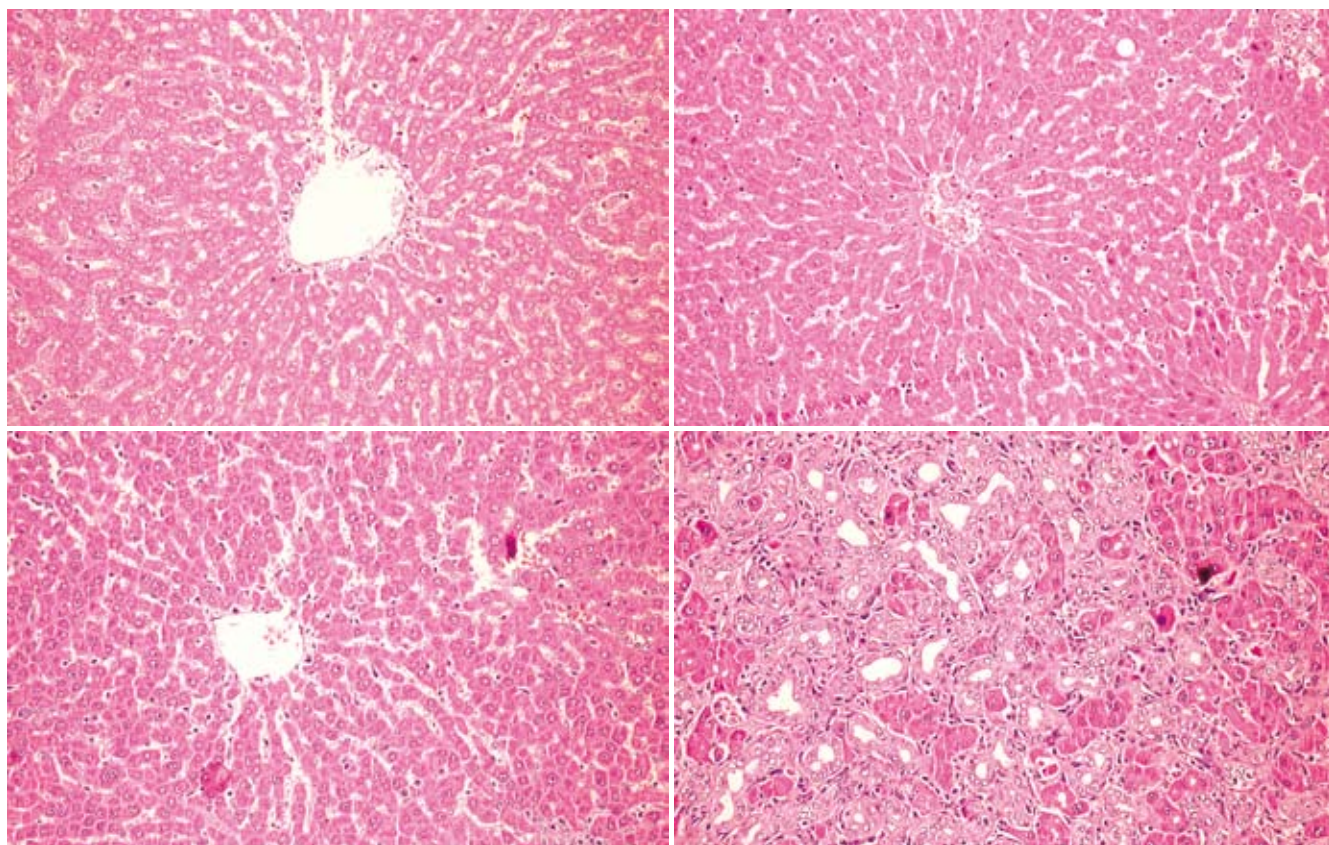


世界华人消化杂志®

WORLD CHINESE
JOURNAL OF DIGESTOLOGY

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

2010年7月18日 第18卷 第20期 (Volume 18 Number 20)



20 / 2010

ISSN 1009-3079



9 771009 307056

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
杨思风教授
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
聂新明教授
陈洪副教授

陈其奎教授
陈卫昌教授
陈贻胜教授
程斌教授
迟宝荣教授
崔立红副教授
邓长生教授
丁士刚主任医师
董蕾教授
杜雅菊主任医师
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
郭晓钟教授
郝建宇教授
何松教授
洪天配教授
胡伏莲教授
胡和平主任医师
黄晓东主任医师
黄颖秋教授
黄缘教授
季国忠教授
江米足主任医师
姜春萌教授
姜慧卿教授
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
李祖国副教授
林志辉教授
刘冰熔教授
刘凤斌教授
刘改芳主任医师
刘海峰主任医师
刘海林主任医师
刘占举教授
陆伦根教授

马红主任医师
马欣主任医师
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
王邦茂教授
王炳元教授
王承尧教授
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
朱春兰主任医师
邹晓平主任医师

消化外科学

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
陈凜教授
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
仇毓东副教授
崔云甫教授
戴朝六教授
戴冬秋教授
单云峰副主任医师
丁义涛教授
董明教授
房林副教授
傅红副教授
傅华群教授
傅志仁主任医师
葛海燕教授
巩鹏副教授
谷俊朝主任医师
顾岩教授
韩天权教授
郝纯毅主任医师
何超教授
何裕隆教授
黄志勇教授
季加孚教授
英卫东副主任医师
蒋龙元副教授
李国威教授
李华副教授
李华山主任医师
李奇林教授
李胜研究员
李涛副主任医师
李文岗教授

李旭副教授
李永翔主任医师
梁力建教授
刘超副教授
刘建教授
卢实春教授
陆才德教授
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
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
裘正军教授
沈柏用副教授
沈世强教授
施诚仁教授
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
汤恢焕教授
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
王要军教授
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
谢敏主任医师
谢晓华副教授
邢光明教授
徐大华主任医师
徐迅迪副主任医师
徐泱副主任医师
许戈良教授
严律南教授
杨柏霖副主任医师
杨家和主任医师
杨秋蒙副主任医师
杨维良教授
伊力亚尔·夏合丁教授
殷正丰教授
于聪慧教授
于则利教授
郁宝铭教授
元云飞教授
张佳林教授
张进祥副教授
张俊副研究员
张群华教授
张水军教授
张宗明教授
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
龚国忠教授
管世鹤副教授
何生松教授
胡国信副主任医师
林菊生教授
刘正稳教授
貌盼勇研究员
宁琴教授
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
杨江华副主任医师
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
周霞秋教授
朱传武主任医师
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
李勇副教授
李振华教授
刘成海研究员
刘孟安教授
刘平教授
刘绍能主任医师

沈洪教授
唐志鹏研究员
王富春教授
王新月教授
谢鸣教授
徐列明教授
许玲副教授
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
李璠教授
刘宝瑞教授
刘彬彬副研究员
刘云鹏教授
沈克平主任医师
肖文华主任医师
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
李健丁教授
龙学颖副主任医师
倪才方教授
魏经国教授
肖恩华教授
徐爱民副教授
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
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
张春虎副教授

消化基础研究

曹洁副教授
曹鹏副研究员
樊红副教授
高春芳研究员
高国全教授
高英堂研究员
管冬元副教授
胡旭初副教授
黄园教授
黄文林教授
李刚教授
李杰副教授
李永哲副研究员
李增山副教授
刘克辛教授
梅林教授
钱睿哲教授
任超世研究员
任浩副教授
台桂香教授
谭学瑞教授
田文静副教授
田颖刚副研究员
王钦红教授
汪思应教授
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
喻荣彬副教授
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

消化病理学

杜祥教授
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
马大烈教授
潘兴华副主任医师
王鲁平主任医师
王娅兰教授
魏蕾教授
颜宏利副教授
于颖彦教授
余宏宇教授
张锦生教授
赵景民教授
朱亮副教授

世界华人消化杂志

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

● 目 次 ● 2010年7月18日 第18卷 第20期 (总第316期)

述 评

2071 胃食管反流病检测方法的进展

蓝宇, 张灵云

基础 研究

2077 miR-200b对胃癌MGC-803细胞增殖的影响以及对Bcl-2表达的调节

王驰, 钟鹰, 栗滔, 黄靓, 毛振江, 肖祥

2084 荔枝核总黄酮抗胆管结扎大鼠肝纤维化的作用及机制

赵永忠, 漆志平, 徐庆, 肖绪华, 郭芳, 侯巧燕, 韦京辰

2090 SUMO-1 siRNA对肝癌细胞SMMC-7721 p53基因表达的影响

郭武华, 袁丽华, 肖志华, 罗良平, 余婷, 张吉翔

2095 吉西他滨联合免疫效应细胞对胰腺癌细胞BxPC-3生长的抑制

余少培, 杨静

临 床 研 究

2102 尼美舒利调控PPAR γ 信号通路抑制食管癌裸鼠移植瘤生长的分子机制

刘俊茹, 杨建柱, 刘淑霞, 左连富

2109 胃癌超声造影的增强强度和微血管密度的相关性

刘大铭, 黄丽萍, 张宏宇, 陈艳春

文 献 综 述

2114 胃MALT淋巴瘤的诊治进展

杨含腾, 关泉林, 袁文臻

2117 GP73与肝脏疾病关系的研究进展

李淑群, 陈谦

2121 腹腔镜手术治疗结直肠癌的研究进展

龚涛, 王彤

2127 肿瘤进化学的研究新进展

吕晓光, 董卫国

研 究 快 报

2132 LNAzyme抑制HCV 5'端非编码区内源性核糖体进入位点基因表达

张梁, 邓益斌

临 床 经 验

2137 老年早期胃癌临床及内镜诊断124例

刘婧, 张子其, 陈孝, 付永和, 张钰

2141 色素放大内镜诊断癌前病变和早期胃癌196例

庄丽维, 王立国, 付宜利

2146 穴位注射并中药腹部热敷对腹部术后胃肠功能的影响

陈月琴, 任迎彬, 谢秀霞

2150 促胃肠动力药物对Oddi括约肌压力的影响

石刚, 吴硕东, 刘波, 孙巍, 张小博, 孔静

2155 骨髓CD34⁺细胞在肝硬化患者中的表达及意义

刘拉羊, 王顺达, 党双锁, 程延安, 周芙玲, 高宁, 贾晓黎, 张欣

2159 蛋白酶激活受体-2在原发性肝癌组织中的表达

海鸥, 谢立群, 李轩, 郑艳敏, 周静

2163 腹腔镜解剖性肝切除术治疗肝癌16例

王恺, 徐智, 黄明文, 罗志强, 方路, 娄思源, 邹书兵

	2166 肝胆恶性肿瘤皮肤转移8例 刘博, 黄晓强, 王敬, 董家鸿, 黄志强
病例报告	2171 多发性内分泌腺瘤病 I 型1例 朱磊, 唐彤丹, 赵钢
附录	2174 《世界华人消化杂志》投稿须知 2179 2010年国内国际会议预告
志 谢	2180 志谢世界华人消化杂志编委
消 息	2083 2008年内科学类期刊总被引频次和影响因子排序 2094 <i>WJG</i> 成功通过评审被PMC收录 2101 《世界华人消化杂志》外文字符标准 2126 《世界华人消化杂志》入选《中国学术期刊评价研究报告-RCCSE权威、核心期刊排行榜与指南》 2131 2009年《世界华人消化杂志》编委审稿总结 2136 《世界华人消化杂志》性质、刊登内容及目标 2140 《世界华人消化杂志》正文要求 2145 汤姆森-路透公布2009年 <i>WJG</i> 影响因子2.092 2154 《世界华人消化杂志》修回稿须知 2158 《世界华人消化杂志》参考文献要求 2165 《2009年版中国科技期刊引证报告》(核心版)发布《世界华人消化杂志》2008年影响因子0.547 2170 《世界华人消化杂志》出版流程 2173 《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》
封面故事	赵永忠, 漆志平, 徐庆, 肖绪华, 郭芳, 侯巧燕, 韦京辰. 荔枝核总黄酮抗胆管结扎大鼠肝纤维化的作用及机制. 世界华人消化杂志 2010; 18(20): 2084-2089 http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/2084.asp
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 李军亮; 形式规范 马连生

 <p>Shijie Huaren Xiaohua Zazhi</p> <p>吴阶平 题写封面刊名 陈可冀 题写版权刊名 (旬刊)</p> <p>创 刊 1993-01-15 改 刊 1998-01-25 出 版 2010-07-18 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 太原消化病研治中心</p>		<p>编辑 世界华人消化杂志编辑委员会 030001, 山西省太原市双塔西街77号 电话: 0351-4078656 E-mail: wcjd@wjgnet.com http://www.wjgnet.com</p> <p>出版 世界华人消化杂志编辑部 030001, 山西省太原市双塔西街77号 电话: 0351-4078656 E-mail: wcjd@wjgnet.com http://www.wjgnet.com</p> <p>印刷 北京科信印刷厂</p> <p>发行 国内: 北京报刊发行局 国外: 中国国际图书贸易总公司 (100044, 北京市399信箱)</p> <p>订购 全国各地邮电局</p> <p>邮购 世界华人消化杂志编辑部 030001, 山西省太原市双塔西街77号 电话: 0351-4078656 E-mail: wcjd@wjgnet.com http://www.wjgnet.com</p>	<p>世界华人消化杂志是一份同行评议性的旬刊, 是一份被《中国科技论文统计源期刊》和《中文核心期刊要目总览》收录的学术类期刊.《世界华人消化杂志》的英文摘要被美国《化学文摘》, 荷兰《医学文摘库/医学文摘》和俄罗斯《文摘杂志》收录.</p> <p>世界华人消化杂志正式开通了在线办公系统(http://www.baishideng.com/wcjd/ch/index.aspx), 所有办公流程一律可以在线进行, 包括投稿、审稿、编辑、审读, 以及作者、读者、编者之间的信息反馈交流.</p> <p>特别声明 本刊刊出的所有文章不代表本刊编辑部和本刊编委会的观点, 除非特别声明. 本刊如有印装质量问题, 请向本刊编辑部调换.</p> <p>2010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 CN 14-1260/R		邮发代号 82-262 国外代号 M 4481 国内定价 每期56.00元 全年2016.00元	广告经营许可证 1401004000050

World Chinese Journal of Digestology

July 2010 Contents in Brief Volume 18 Number 20

EDITORIAL	2071 Detection of gastroesophageal reflux disease: advances in methodology <i>Lan Y, Zhang LY</i>
BASIC RESEARCH	<p>2077 miR-200b overexpression down-regulates Bcl-2 expression and inhibits cell proliferation in human gastric cancer cell line MGC-803 <i>Wang C, Zhong Y, Su T, Huang L, Mao ZJ, Xiao X</i></p> <p>2084 Anti-hepatic fibrosis effect of total flavone from <i>Litchi chinensis</i> Sonn in rats with bile duct occlusion <i>Zhao YZ, Qi ZP, Xu Q, Xiao XH, Guo F, Hou QY, Wei JC</i></p> <p>2090 siRNA-mediated knockdown of the SUMO-1 gene down-regulates mutant p53 expression in hepatocellular carcinoma cell line SMMC-7721 <i>Guo WH, Yuan LH, Xiao ZH, Luo LP, Yu T, Zhang JX</i></p> <p>2095 Gemcitabine in combination with dendritic cell-induced immunoeffector cells inhibits the growth of BxPC-3 cells <i>Yu SP, Yang J</i></p>
CLINICAL RESEARCH	<p>2102 Nimesulide, a selective cyclooxygenase-2 inhibitor, inhibits the growth of esophageal carcinoma <i>in vivo</i> by modulating PPARγ signal transduction pathway <i>Liu JR, Yang JZ, Liu SX, Zuo LF</i></p> <p>2109 Correlation between intensity of ultrasonographic contrast enhancement and microvessel density in gastric cancer <i>Liu DM, Huang LP, Zhang HY, Chen YC</i></p>
REVIEW	<p>2114 Advances in diagnosis and treatment of gastric MALT lymphoma <i>Yang HT, Guan QL, Yuan WZ</i></p> <p>2117 Advances in understanding the relationship between GP73 and hepatic diseases <i>Li SQ, Chen Q</i></p> <p>2121 Laparoscopic surgery for colorectal cancer <i>Gong T, Wang T</i></p> <p>2127 Advances in understanding tumor evolution <i>Ly XG, Dong WG</i></p>
RAPID COMMUNICATION	2132 LNAzyme targeting the HCV internal ribosome entry site inhibits HCV RNA expression in HepG2.9706 cells <i>Zhang L, Deng YB</i>
CLINICAL PRACTICE	<p>2137 Gastroscopic and clinical diagnosis of early gastric cancer in elderly patients: an analysis of 124 cases <i>Liu J, Zhang ZQ, Chen X, Fu YH, Zhang Y</i></p> <p>2141 Magnification chromoendoscopy for the diagnosis of gastric precancerous lesions and early gastric cancer: an analysis of 196 cases <i>Zhuang LW, Wang LG, Fu YL</i></p> <p>2146 Effect of acupuncture point injection and abdominal hot fomentation with Chinese medicine on gastrointestinal function in patients after abdominal surgery <i>Chen YQ, Ren YB, Xie XX</i></p>

	<p>2150 Effects of gastrokinetic agents on human sphincter of Oddi motility <i>Shi G, Wu SD, Liu B, Sun W, Zhang XB, Kong J</i></p> <p>2155 Significance of bone marrow CD34+ cell levels in cirrhotic patients <i>Liu LY, Wang SD, Dang SS, Cheng YA, Zhou FL, Gao N, Jia XL, Zhang X</i></p> <p>2159 Expression of proteinase-activated receptor-2 in primary hepatic carcinoma <i>Hai O, Xie LQ, Li X, Zheng YM, Zhou J</i></p> <p>2163 Total laparoscopic anatomical hepatectomy for primary liver cancer: a report of 16 cases <i>Wang K, Xu Z, Huang MW, Luo ZQ, Fang L, Lou SY, Zou SB</i></p> <p>2166 Hepatobiliary malignancies with cutaneous metastases: an analysis of 8 cases <i>Liu B, Huang XQ, Wang J, Dong JH, Huang ZQ</i></p>
CASE REPORT	<p>2171 Diagnosis and treatment of multiple endocrine neoplasia type 1: a report of one case <i>Zhu L, Tang TD, Zhao G</i></p>
APPENDIX	<p>2174 Instructions to authors of World Chinese Journal of Digestology</p> <p>2179 Meeting events calendar in 2010</p>
ACKNOWLEDGMENT	<p>2180 Acknowledgments to reviewers of World Chinese Journal of Digestology</p>
COVER	<p><i>Zhao YZ, Qi ZP, Xu Q, Xiao XH, Guo F, Hou QY, Wei JC.</i> Anti-hepatic fibrosis effect of total flavone from <i>Litchi chinensis</i> Sonn in rats with bile duct occlusion. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2010; 18(20): 2084-2089 http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/2084.asp</p>
RESPONSIBLE EDITORS FOR THIS ISSUE	<p>Assistant Editor: <i>Xiao-Fang Liu</i> Review Editor: <i>Jun-Liang Li</i> Electronic Page Editor: <i>Ji-Cai He</i> English Language Editor: <i>Tian-Qi Wang</i> Editor-in-Charge: <i>Jun-Liang Li</i> 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 18, 2010

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

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
<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 CN 14-1260/R

COPYRIGHT

© 2010 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. If you do not have web access please contact the editorial office.

Copyright © 2010 by Editorial Department of *World Chinese Journal of Digestology*

胃食管反流病检测方法的进展

蓝宇, 张灵云

蓝宇, 张灵云, 北京大学第四临床医学院 北京积水潭医院消化科 北京市 100035

蓝宇, 主任医师, 教授, 从事消化系统疾病的诊治及消化内镜诊治, 专长胃肠运动障碍性疾病基础及临床研究。

作者贡献分布: 本文综述由蓝宇与张灵云共同完成; 蓝宇审校。

通讯作者: 蓝宇, 主任医师, 教授, 100035, 北京市西城区新街口东街31号, 北京积水潭医院消化科. lanyu-mail@sohu.com

收稿日期: 2010-06-04 修回日期: 2010-07-15

接受日期: 2010-07-16 在线出版日期: 2010-07-18

Detection of gastroesophageal reflux disease: advances in methodology

Yu Lan, Ling-Yun Zhang

Lan Yu, Ling-Yun Zhang, Department of Gastroenterology, the Fourth Clinical Medical College of Peking University & Beijing Jishuitan Hospital, Beijing 100035, China

Correspondence to: Professor Yu Lan, Department of Gastroenterology, the Fourth Clinical Medical College of Peking University & Beijing Jishuitan Hospital, Beijing 100035, China. lanyu-mail@sohu.com

Received: 2010-06-04 Revised: 2010-07-15

Accepted: 2010-07-16 Published online: 2010-07-18

Abstract

The incidence of gastroesophageal reflux disease (GERD) is increasing year by year. Currently, many methods are available for detection of GERD. Traditional detection methods, such as the reflux disease questionnaire and proton pump inhibitor test, are convenient and effective and can be used for primary screening of GERD. Endoscopy, chromoendoscopy, and magnification endoscopy have also been used widely in clinical detection of GERD. The usage of narrow-band imaging endoscopy, light-induced fluorescence endoscopy and confocal endoscopy offers new insight into the esophageal appearance of Barrett's esophagus and non-erosive reflux disease. Endoscopic optical coherence tomography and frequency-domain angle-resolved low-coherence interferometry are optical biopsy techniques that will be used gradually in clinical practice. The 24-hour esophageal pH monitoring, bile reflux monitoring, and esophageal manometry are the most commonly used method for monitoring gastroesophageal reflux but can

not be used to monitor all reflux events. The 24-hour multichannel intraluminal impedance measurement and high-resolution manometry can redeem the shortage of the above detections and have been used gradually in clinical diagnosis. In this paper, we review the advances in methodology for detection of GERD.

Key Words: Gastroesophageal reflux disease; Detection; Methodology

Lan Y, Zhang LY. Detection of gastroesophageal reflux disease: advances in methodology. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(20): 2071-2076

摘要

胃食管反流病(gastroesophageal reflux disease, GERD)发病率逐年上升, 其临床表现多样, 多种检测手段可供选择以确定诊断。传统的检测手段不断更新完善, 反流病问卷及PPI试验经典、简便而且有效, 可用于GERD的初筛; 内镜检查手段日趋更新, 色素及放大内镜在临床中普遍应用, 荧光内镜、窄光谱成像及共聚焦内镜应用于临床使人们对Barrett's食管及非糜烂性反流病的食管表现有了更新的认识, 光学相干层析技术及频率域角分辨低相干干涉测量法被誉为“光活检”技术, 正在逐步走向临床; 24 h食管pH监测及胆汁反流监测、食管测压等仍是目前临床中最常用的监测胃食管反流的方式, 但不能对所有反流事件及食管各段的运动情况进行全面的监测, 新的检测手段如食管内24 h pH+阻抗监测、高分辨的食管测压分析等弥补了上述检查的不足, 在临床中逐渐得到应用。本文对GERD诊断的相关检测方法进行了介绍与评价。

关键词: 胃食管反流病; 检测; 方法

蓝宇, 张灵云. 胃食管反流病检测方法的进展. *世界华人消化杂志* 2010; 18(20): 2071-2076

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/2071.asp>

0 引言

胃食管反流病(gastroesophageal reflux disease, GERD)虽是良性疾病, 但严重影响人们生活质

■背景资料

GERD临床表现复杂多样, 诊断需要综合考虑临床表现及多种检测结果, 特别是对于临床症状不典型的患者, 辅助检测手段尤显重要。GERD的检测手段较多, 传统的检测手段在不断的更新完善中, 如在传统的食管测压基础上提高了分辨率, 增加了GERD的检出率; 新的检测手段如阻抗监测等也逐渐应用于临床, 使得人们对GERD的认识更加深入。

■同行评议者

黄晓东, 主任医师, 武汉市中心医院消化内科

■ 研发前沿

24 h食管pH监测及胆汁反流监测、食管测压等仍是目前临床中最常用的监测胃食管反流的方式,但不能对所有反流事件及食管各段的运动情况进行全面的监测。

量,近年来其发病率呈逐年上升的趋势,对其诊断及治疗越来越受到重视。GERD临床表现复杂多样,诊断需要综合考虑临床表现及多种检测结果,特别是对于临床症状不典型的患者,辅助检测手段尤显重要。GERD的检测手段较多,传统的检测手段在不断的更新完善中,如在传统的食管测压基础上提高了分辨率,增加了GERD的检出率;新的检测手段如阻抗监测等也逐渐应用于临床,使得人们对GERD的认识更加深入。本文旨在介绍近年来GERD的检测方法进展,以期对临床工作有所指导。

1 症状调查问卷及试验性治疗

GERD患者典型的临床症状是诊断最容易取得和直接的证据,2006年达成的GERD定义共识意见推荐GERD的临床诊断可基于GERD的烧心和反流等不适症状^[1]。症状调查问卷中最为常用的是RDQ(reflux disease questionnaire)问卷评分^[2],此问卷是以记录烧心、反酸、非心源性胸痛、反食4个症状的频率及程度的积分作为诊断的依据。Manterola等^[3]将GERD的食管内及食管外表现综合考虑设计出新的调查问卷,利用此问卷以60例健康者为对照,对180例GERD患者进行了症状评估,其结果显示,在取适当的临界值时其敏感性为92%,特异性达95%,阳性预测值为98%,阴性预测值为79%。我国上海、北京、广州等地10家医院多中心研究,对128例有烧心、胸骨后疼痛、反酸、反食等四种消化系统症状的患者进行RDQ评分(按症状程度与发作频率为记分标准,5级记分制),以内镜检查有否RE及24 h食管pH检测为诊断GERD的金标准,并与RDQ分值进行比较,计算出诊断GERD的临界值;以RDQ分值12为临界值,对GERD诊断阳性符合率达88.07%,阴性符合率为68.42%,敏感度为94.12%,特异度为50.00%。表明RDQ调查是诊断GERD的良好的筛选试验^[4]。新近在RDQ的基础上,加入胃肠症状分级量表(GSRS)和胃食管反流对疾病影响等级量表(GIS),强调反流症状对患者生活质量,包括睡眠的影响以及对治疗药物的反应,制定了GERD Q标准。该量表以自我评估的方式对GERD进行诊断。将以上三个问卷中的问题集中为6个条目,2个阳性预测因素(烧心和反流),以及由这2种反流症状导致的睡眠障碍和除处方药之外的OTC药物治疗情况;2个阴性预测因素(上腹痛和恶心)。要求患者反映前1 wk内出现的症状。仅对症状的频率进行分级评分,分为4个等级(无症状、症状出现1 d、

2-3 d、4-7 d),阳性预测因素得分为0、1、2、3分,阴性预测因素得分为3、2、1、0。将评分总和即得出GERD Q评分,总范围为0-18。以满足内镜下见到A-D级(洛杉矶分级)RE、24 h期间食管pH<4的时间超过5.5%、埃索美拉唑治疗14 d结果阳性及症状相关性概率SAP阳性(>95%)4项标准中至少1项可诊断为GERD作为评判标准,找出8为临界值,此时GERD Q诊断GERD的敏感性为65%,特异性为71%。使用GERD Q诊断GERD的准确度与胃肠专科医师类似,且能评估疾病对患者生活的相关影响,有助于治疗选择及衡量治疗效果。GERD Q对家庭(社区)医生和其他初级卫生保健人员来说在没有专科医师指导或内镜检查的前提下是一种有用的诊断和管理GERD的工具^[5]。

试验性治疗是应用较高剂量的质子泵抑制剂(proton pump inhibitor, PPI)在较短的时间内对具有典型胃食管反流症状的患者进行治疗,多采用口服PPI标准剂量,每日2次,共1-2 wk,症状显著缓解者确诊为GERD。试验性治疗有无创、诊断费用低等优点,与症状评分联合应用时敏感性同食管24 h pH监测相似,可达80%^[6],主要针对年轻,无明显消瘦、进行性吞咽困难等警示症状的患者,可在较短时间内做出诊断,尤其适用于一些初级医疗单位^[7]。

2 内镜

内镜可直接观察反流对食管黏膜造成的损伤,是GERD重要的检测手段。对RE及Barrett's食管(Barrett's esophagus, BE)患者,内镜下食管黏膜炎症表现及活检病理是诊断的主要标准;非糜烂性反流病(non-erosive reflux disease, NERD)患者在传统的内镜下食管无明显的黏膜损伤,近年来随着内镜诊断技术的进步,人们观察到部分NERD患者的食管黏膜也有细微的特征性表现。

2.1 RE 内镜下食管黏膜的炎症表现是诊断RE的金标准。根据食管黏膜损伤的范围和程度可以将RE分为不同的等级,目前较为公认的分级标准为洛杉矶标准^[8],将RE分为4个级别: A级:食管黏膜只有纵向破损,长度小于5 mm; B级:食管黏膜只有纵向破损,但长度大于5 mm; C级:食管黏膜破损有融合,但小于全周的75%; D级:食管黏膜破损融合累及全周。

2.2 BE BE是因反流引起的食管下段的复层鳞状上皮被单层柱状上皮所替代的一种病理现象,又名柱状上皮食管,内镜观察及病理活检是诊断BE的金标准。在蒙特利尔定义中引入了内镜

疑似食管化生(endoscopic suspected esophageal metaplasia, ESEM)概念. ESEM是BE内镜下表现, 当活检组织学证实ESEM是柱状上皮时, 应确诊为BE^[1]. 有肠上皮化生的长段BE是食管腺癌的重要危险因素, 所以对BE的准确诊断对早癌的监测及发现均有重要意义. 但因传统内镜分辨率较低, 对黏膜的观察效果有限, 活检部位的针对性不强, 黏膜活检阳性率不高. 近年来不断发展的内镜技术为BE黏膜及其癌变倾向的监测提供了更为有利的工具. 放大内镜(magnification endoscopy)、色素内镜(chromoendoscopy, ChE)等可对BE腺窝形态及食管黏膜毛细血管走行进行细致的观察, 判断BE黏膜中化生的柱状上皮是胃型还是肠型, 从而实现对黏膜增生情况及癌变风险的评估^[9]; 荧光内镜(light-induced fluorescence endoscope, LIFE)是利用氩气等产生的蓝光作为激发光源, 激发组织中的内源性物质产生自体荧光, 根据不同组织荧光特点不同而成像不同进行观察, LIFE观察正常的食管黏膜组织表现为绿光, BE上皮表现为红色, 而HGD则表现为砖红色. LIFE用于BE黏膜及其癌变倾向的监测, 可明显提高BE患者中HGD的检出率^[10]. 共聚焦内镜(confocal endoscopy)是在传统电子内镜检查的同时进行消化系黏膜层的共聚焦显微成像, 观测组织的微观结构变化, 提供放大1 000倍的内镜图像, 并在内镜检查的同时观察黏膜层腺体、细胞结构以及微循环的变化, 从而对体内组织进行精准分析, 指导靶向活检. 在共聚焦内镜中杯状细胞具有特异的形状, 柱状上皮呈绒毛状, 因此可以明确区分鳞状上皮、柱状上皮、肠化的柱状上皮, 对BE的诊断优势非常显著, 其敏感性和准确性均高^[11]. 光学相干层析技术(endoscopic optical coherence tomography, EOCT)及频率域角分辨低相干干涉测量法(frequency-domain angle resolved low-coherence interferometry, fa/LCI)是新近发明的内镜检查技术, 被誉为“光活检”^[12], 在实验室中已显示出其可观的应用前景, 正在逐步走向临床.

2.3 NERD 传统概念中以内镜下未见到明显食管黏膜损伤作为NERD重要的诊断标准. 但近年来随着内镜技术的进步, 人们对食管黏膜的观察更为细致, 发现很多NERD患者的食管黏膜也存在不同程度病变, 只是这些病变多较为细微. 通过放大内镜与ChE的联合应用, 以及内镜新技术如窄光谱成像(narrow band imaging, NBI)、共聚焦内镜均发现NERD患者食管黏膜上皮细

胞间隙明显增宽、上皮排列欠规则^[13,14]. 刘建军等^[15]通过放大内镜观察发现NERD患者的齿状线形态和齿状线下黏膜的不平程度具有特征性表现, 齿状线形态中锯齿型、三角型和半岛型对NERD诊断阳性率为100%, 宽大锯齿型为83.3%; 齿状线下黏膜不平程度中斑块状凹凸不平和绒毛状不平对NERD诊断阳性率为100%, 粗糙不平为91.7%. NBI是在传统电子内镜基础上加用红/绿/蓝3个特殊的滤光片, 使食管黏膜浅层及深层的细微结构和血管形态等有了更好的成像特点. GERD患者的食管黏膜在NBI下主要表现为乳头内血管环的扩张、扭曲, 微小糜烂的增多及鳞状细胞间隙中血供的增多等^[16], 通过NBI的观察可以提高GERD患者、特别是NERD患者的检出率. 但NERD患者的食管黏膜病变较细微, 特征性表现不典型, 内镜下诊断尚无统一的标准, 还需更多的观察与研究.

内镜技术的进展无疑会对GERD的诊断有很大帮助, 但目前NBI、LIFE等的应用仍受到技术、经济等因素的限制, 缺乏大规模多中心的临床对照研究, 对其诊断的敏感性及特异性方面尚无准确的资料, 其诊断也没有统一的标准, 需更多的临床观察及研究.

2.4 食管内胶囊内镜 内镜检查是一种侵入性检查, 尽管目前所用的内镜管径趋于细、软, 但仍有一定的痛苦, 很多患者难以耐受; 而无痛内镜则需要麻醉, 有一定的风险, 老龄、有心脑血管基础病患者的应用也受到限制. 食管内胶囊内镜可以大大减少患者的痛苦, 其安全性及耐受性更好. 有学者应用食管内胶囊内镜对健康志愿者和GERD患者进行观察, 并与普通内镜对比, 发现两者对GERD的诊断率相似^[17]. 但胶囊内镜难以代替普通内镜的活检功能, 且缺乏与普通内镜大规模的临床比较, 其在临床的应用价值尚待评估.

3 反流监测

胃及十二指肠内容物的反流是GERD发病的重要因素, 对反流的监测在GERD患者的诊断及治疗效果评估中占有重要的地位.

3.1 酸反流的监测 对酸反流的监测是通过食管内24 h pH检测, 观察24 h食管腔内pH<4的总时间百分比、直立位时间百分比、仰卧位时间百分比、反流次数、长于5 min的反流次数、持续最长的反流时间等参数, 以DeMeester计分大于14.72为酸反流阳性^[18]. 食管24 h pH监测特异性较高, 若监测结果为阳性, 对GERD患者具有

■相关报道

有研究发现X线检查在正常人群中可有>20%的反流检出率, 而在病理性酸反流的人群中仅有26%的检出率, 提示其敏感性和特异性均较低, 故在无并发病的GERD患者中不推荐该检查方法.

■应用要点

GERD的检查手段较多,且方法不断改进.反流诊断问卷及PPI试验经典、简便而且有效,可用于GERD的初筛.

诊断价值,是检查反流的重要手段,曾被认为是NERD诊断的金标准^[19].但传统的食管内24 h pH监测是将导管从鼻腔插入食管腔内,为侵入性检查,患者较为痛苦,部分患者难以耐受;且该检查也会影响患者正常的生活及进食习惯,使监测结果的可信性下降,敏感性较低.近年来,Bravo无线便携式食管pH监测方法应用于临床,方法是将一个6 mm×6 mm×26 mm的pH胶囊固定于食管齿状线上方6 cm处,利用生物遥测技术将记录到的pH数据传输到体外接收器上,无需留置导管电极.该方法患者易于接受且可以延长记录时间至48甚至96 h,提高诊断的敏感性^[20].但该胶囊价格昂贵,且有脱落风险,目前尚未在临床中得到广泛应用.

3.2 胆汁反流的监测 胃食管反流病的发病与多种成分的反流有关,研究显示单纯酸反流在GERD患者的诊断中阳性率并不高^[21],胆汁等十二指肠液反流的监测越来越受到人们的重视.Bilitec2000是一种便携式光纤分光光度计,是对反流到食管内的胆汁进行监测的最常用的仪器,其与pH监测同步进行可以明显提高GERD,特别是NERD患者诊断的阳性率^[22].胆红素吸收值(Abs)<0.14作为Bilitec 2000的监测阈值,吸收值超过0.14即为胆红素的存在^[23];超过0.14总时间百分比、反流总次数、反流超过5 min的次数及最长反流时间等指标可以进一步反映胆汁反流情况.但十二指肠液成分复杂,易受饮食等因素影响,且在酸性条件下胆红素可由单体变为异构二聚体,从而导致实际反流被低估,因此Bilitec2000的临床应用有一定局限性.

3.3 腔内多通道阻抗监测 腔内多通道阻抗监测(multichannel intraluminal impedance measurement, MII)是近年来出现的一种新的监测方式,可对食管内酸、胆汁、气体等多种反流成分进行监测.MII监测系统包含6-8对电极,每对电极组成一个长度约为2 cm的测量段,对应一个记录通道.当反流物通过一对电极间时,阻抗会发生变化,且此变化会随着反流物的不同而显示出差异:液体成分通过检测电极时阻抗降低15倍,气体通过时阻抗增加5倍左右;通过顺行或逆行的阻抗变化可区分吞咽和反流,从而动态监测气体、液体、食物等在食管腔内的运动情况.MII检测系统带有pH监测通道,可根据pH值和阻抗变化进一步区分酸反流(pH<4)、弱酸反流(pH4-7)以及弱碱反流(pH>7).通过对反流的综合监测可以提高GERD患者的诊断率

及进行更好的病情评估^[24].有资料显示,该技术检测各种反流的敏感性超过90%^[25].该技术在功能上可完全替代传统的单纯pH监测,且可对气体、液体、食物等的反流进行评估和分析,提高pH监测阴性NERD患者的检出率,但考虑到费效比,是否能取代单纯pH监测仍有待进一步研究.且由于阻抗值的大小取决于电极周围环境构成的电传导性, MII监测系统技术会受到食管腔内横径、食管壁厚度、食管黏膜、食管腔内物质的导电性能等多种因素的影响,有时仍无法鉴别吞咽和反流,且无法定量测定反流量,此项技术需进一步完善.

4 食管压力检测

食管压力测定可以确定GERD患者食管动力的情况,了解胃食管反流发生的病理生理学基础.GERD患者食管压力测定主要的异常表现包括下食管括约肌压力(lower esophageal sphincter pressures, LESP)的降低,下食管括约肌一过性松弛(transient lower esophageal sphincter relaxation, TLESRs)的增多,食管收缩频率的减少,收缩波幅的降低及收缩传导速率的减慢,非推进性收缩的增多等^[26-28].该项检查传统的检查方式为侵入性,检测时间较短,观察的结果多为非生理状态,敏感性及特异性均有限,多作为症状不典型,疗效不佳及诊断困难时的辅助检测方法,不能单独作为GERD患者的诊断标准.近年来测压技术也在不断发展中,高分辨率测压(high resolution manometry, HRM)、24 h测压等方法在临床中逐渐显示出其优势.

HRM是在传统测压的基础上新发展的测压技术.他通过大量紧密排列的压力感受器监测从咽喉到胃的压力分布.压力感受器可多达36个,同时记录大量数据,经过计算机汇总描绘出三维的压力分布图,显现出食管上括约肌(upper esophageal sphincter, UES)和食管下括约肌(lower esophageal sphincter, LES)的收缩及舒张、食管各部位压力的状态、变化和蠕动波持续的时间.从而准确地显示食管收缩力、廓清能力与对反流物的抵抗力之间的关系,判断食管收缩是否为有效蠕动,监测是否存在胃食管反流^[29,30].该方法较传统测压具有更高的准确性和可重复性,对于LES功能低下、食管裂孔疝的患者更为适用^[31].

24 h食管测压法最早由Janssens等^[32]报道,该检查方法是将2个电压力传感器分别置于LES

上方5 cm和10 cm处, 压力传感器能精确地测试出24 h的53.3 kPa以下的压力变化, 压力传感器与便携式数据记录仪连接在一起, 患者可正常活动, 压力数据可由计算机分析, 包括立卧位和进食时的差异, 食管收缩的振幅、时限、传播速度和形式等参数均可计算^[33]. 这种24 h食管测压也可以联合食管pH监测一次完成^[34], 在创伤尽可能小的情况下使GERD诊断更加精确. 该法主要用于食管运动异常所致疾病, 如弥漫性食管痉挛、胡桃夹食管等, 在GERD患者的诊断中主要用作不明原因的胸痛的鉴别诊断.

5 其他方法

胃食管反流的检测方法还包括酸诱发试验、X线检查、核素扫描、彩色超声多普勒检查及标志物的检测等, 也都各有特点, 在临床中有其应用之处.

食管酸诱发试验于20世纪中后期开始在临床中应用, 主要是针对具有烧心或胸痛症状而24 h食管pH监测、内镜检查或试验性治疗等均无法确诊的患者, 用来确定患者的症状是否源于食管黏膜对于酸反流敏感性的增加. 食管酸诱发试验在GERD的各类型中差异较大, RE患者中假阳性较多, 而BE患者假阴性较多, 且不同患者食管敏感性不同, 存在个体差异, 使该项检查的敏感性和特异性较低, 限制了其临床应用.

X线检查即胃肠道双重对比造影, GERD患者在X线检查中主要表现为食管中下段黏膜增粗、紊乱、管壁毛糙但柔软, 在并发食管下端溃疡时可表现为突出腔外的龛影; 在检查时还可动态观察有无钡剂从胃内反流入食管而确诊GERD. 该方法简便、无创, 但由于该方法检查是瞬时性的, 因此对反流是生理还是病理性的难以区分. 有研究^[35]发现X线检查在正常人群中可有>20%的反流检出率, 而在病理性酸反流的人群中仅有26%的检出率, 提示其敏感性和特异性均较低, 故在无并发症的GERD患者中不推荐该检查方法.

食管放射性核素检查是予患者摄入经同位素标记的试餐(通常是液体), 然后嘱患者仰卧位, 对食管、胃进行扫描, 观察自发性的胃食管反流及腹部加压时的胃食管反流情况. 放射性核素扫描检查也是一种非侵入性的检查, 具有迅速、安全的特点, 能对食管内残留固体或液体进行定量分析; 此外对抗反流药物的疗效、抗反流术后的评价也有一定意义.

B超检查是实时、直观的图像检测手段, 可以观察食管的蠕动、腹段食管的长度、His角, 并可进行胃排空的测定, 目前主要用于小儿胃食管反流的筛查. 另一种新型的造影技术彩超(contrast-enhanced colour-Doppler sonography)使用了对比剂, 增强了B超检查的敏感性^[36]. B超检查具有价廉、方便、实时、直观、无创性、易普及等优越性, 且可了解GERD的食管病理生理学变化, 但由于检查耗时较长, 且因纵隔脏器等因素影响其阳性率, 目前在临床研究中应用较少.

6 结论

GERD的检查手段较多, 且方法不断改进. 反流诊断问卷及PPI试验经典、简便而且有效, 可用于GERD的初筛; 内镜检查、24 h pH及胆汁反流监测、食管测压等是目前最常用于临床用诊断的方式, 阻抗监测、高分辨的食管测压分析及造影技术彩超等新技术也在临床中逐渐得到更多的应用, 故临床医生必须根据临床需要及医院的自身条件选择适当的检查方法, 以提高患者胃食管反流的检出率, 为临床诊断及疗效评估提供客观的依据.

7 参考文献

- 1 Vakil N, van Zanten SV, Kahrilas P, Dent J, Jones R. The Montreal definition and classification of gastroesophageal reflux disease: a global evidence-based consensus. *Am J Gastroenterol* 2006; 101: 1900-1920; quiz 1943
- 2 Shaw MJ, Talley NJ, Beebe TJ, Rockwood T, Carlsson R, Adlis S, Fendrick AM, Jones R, Dent J, Bytzer P. Initial validation of a diagnostic questionnaire for gastroesophageal reflux disease. *Am J Gastroenterol* 2001; 96: 52-57
- 3 Manterola C, Muñoz S, Grande L, Bustos L. Initial validation of a questionnaire for detecting gastroesophageal reflux disease in epidemiological settings. *J Clin Epidemiol* 2002; 55: 1041-1045
- 4 中国胃食管反流病研究协作组. 反流性疾病问卷在胃食管反流病诊断中的价值. *中华消化杂志* 2003; 23: 651-654
- 5 Jones R, Junghard O, Dent J, Vakil N, Halling K, Wernersson B, Lind T. Development of the GerdQ, a tool for the diagnosis and management of gastroesophageal reflux disease in primary care. *Aliment Pharmacol Ther* 2009; 30: 1030-1038
- 6 Pandak WM, Arezo S, Everett S, Jesse R, DeCosta G, Crofts T, Gennings C, Siuta M, Zfass A. Short course of omeprazole: a better first diagnostic approach to noncardiac chest pain than endoscopy, manometry, or 24-hour esophageal pH monitoring. *J Clin Gastroenterol* 2002; 35: 307-314
- 7 Johnsson F, Hatlebakk JG, Klintonberg AC, Román J. Symptom-relieving effect of esomeprazole 40 mg daily in patients with heartburn. *Scand J Gastroenterol* 2003; 38: 347-353
- 8 Armstrong D, Bennett JR, Blum AL, Dent J, De

■同行评价

本文研究的内容较为重要, 提供了充足的信息, 有一定新颖性, 符合伦理学要求, 科学性、创新性和可读性能反映我国胃肠病学的先进水平.

- Dombal FT, Galmiche JP, Lundell L, Margulies M, Richter JE, Spechler SJ, Tytgat GN, Wallin L. The endoscopic assessment of esophagitis: a progress report on observer agreement. *Gastroenterology* 1996; 111: 85-92
- 9 Sharma P, Weston AP, Topalovski M, Cherian R, Bhattacharyya A, Sampliner RE. Magnification chromoendoscopy for the detection of intestinal metaplasia and dysplasia in Barrett's oesophagus. *Gut* 2003; 52: 24-27
- 10 Kara MA, Peters FP, Ten Kate FJ, Van Deventer SJ, Fockens P, Bergman JJ. Endoscopic video autofluorescence imaging may improve the detection of early neoplasia in patients with Barrett's esophagus. *Gastrointest Endosc* 2005; 61: 679-685
- 11 Kara MA, DaCosta RS, Streutker CJ, Marcon NE, Bergman JJ, Wilson BC. Characterization of tissue autofluorescence in Barrett's esophagus by confocal fluorescence microscopy. *Dis Esophagus* 2007; 20: 141-150
- 12 Das A, Sivak MV Jr, Chak A, Wong RC, Westphal V, Rollins AM, Willis J, Isenberg G, Izatt JA. High-resolution endoscopic imaging of the GI tract: a comparative study of optical coherence tomography versus high-frequency catheter probe EUS. *Gastrointest Endosc* 2001; 54: 219-224
- 13 Kiesslich R, Kanzler S, Vieth M, Moehler M, Neidig J, Thanka Nadar BJ, Schilling D, Burg J, Nafe B, Neurath MF, Galle PR. Minimal change esophagitis: prospective comparison of endoscopic and histological markers between patients with non-erosive reflux disease and normal controls using magnifying endoscopy. *Dig Dis* 2004; 22: 221-227
- 14 García R, Eduardo L, Sergio SC. Magnification Endoscopy in Non Erosive Reflux Disease. Is it Right Classify? *Gastrointest Endosc* 2007; 65: 153
- 15 刘建军, 周丽雅, 林三仁, 夏志伟. 非糜烂性反流病放大内镜下微小变化的临床研究. *胃肠病学* 2005; 10: 281-285
- 16 Sharma P, Wani S, Bansal A, Hall S, Puli S, Mathur S, Rastogi A. A feasibility trial of narrow band imaging endoscopy in patients with gastroesophageal reflux disease. *Gastroenterology* 2007; 133: 454-464; quiz 674
- 17 Lacy BE, O'Shana T, Hynes M, Kelley ML Jr, Weiss JE, Paquette L, Rothstein RI. Safety and tolerability of transoral Bravo capsule placement after transnasal manometry using a validated conversion factor. *Am J Gastroenterol* 2007; 102: 24-32
- 18 DeMeester TR, Wang CI, Wernly JA, Pellegrini CA, Little AG, Klementsich P, Bermudez G, Johnson LF, Skinner DB. Technique, indications, and clinical use of 24 hour esophageal pH monitoring. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1980; 79: 656-670
- 19 Parameswaran K, Anvari M, Efthimiadis A, Kamada D, Hargreave FE, Allen CJ. Lipid-laden macrophages in induced sputum are a marker of oropharyngeal reflux and possible gastric aspiration. *Eur Respir J* 2000; 16: 1119-1122
- 20 Pandolfino JE, Schreiner MA, Lee TJ, Zhang Q, Boniquit C, Kahrilas PJ. Comparison of the Bravo wireless and Ditrappet catheter-based pH monitoring systems for measuring esophageal acid exposure. *Am J Gastroenterol* 2005; 100: 1466-1476
- 21 Martinez SD, Malagon IB, Garewal HS, Cui H, Fass R. Non-erosive reflux disease (NERD)--acid reflux and symptom patterns. *Aliment Pharmacol Ther* 2003; 17: 537-545
- 22 徐晓蓉, 李兆申, 许国铭. 十二指肠胃食管反流在胃食管反流病中的作用. *中华消化杂志* 2004; 43: 269
- 23 Stein HJ, Kauer WK, Feussner H, Siewert JR. Bile acids as components of the duodenogastric refluxate: detection, relationship to bilirubin, mechanism of injury, and clinical relevance. *Hepatogastroenterology* 1999; 46: 66-73
- 24 Zerbib F, Roman S, Ropert A, des Varannes SB, Poudereux P, Chaput U, Mion F, Vérin E, Galmiche JP, Sifrim D. Esophageal pH-impedance monitoring and symptom analysis in GERD: a study in patients off and on therapy. *Am J Gastroenterol* 2006; 101: 1956-1963
- 25 Shay SS, Bomeli S, Richter J. Multichannel intraluminal impedance accurately detects fasting, recumbent reflux events and their clearing. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2002; 283: G376-G383
- 26 Anggiansah A, Taylor G, Bright N, Wang J, Owen WA, Rokkas T, Jones AR, Owen WJ. Primary peristalsis is the major acid clearance mechanism in reflux patients. *Gut* 1994; 35: 1536-1542
- 27 高飞, 李兆申, 许国铭. 动态监测胃食管反流患者食管24h pH值及压力. *第二军医大学学报* 1998; 19: 432-435
- 28 王虹, 高建萍, 周磊. 食管体部动力异常在胃食管反流病中的作用. *胃肠病学* 2004; 9: 13-16
- 29 Pandolfino JE, Shi G, Zhang Q, Ghosh S, Brasseur JG, Kahrilas PJ. Measuring EGJ opening patterns using high resolution intraluminal impedance. *Neurogastroenterol Motil* 2005; 17: 200-206
- 30 Ghosh SK, Pandolfino JE, Zhang Q, Jarosz A, Shah N, Kahrilas PJ. Quantifying esophageal peristalsis with high-resolution manometry: a study of 75 asymptomatic volunteers. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2006; 290: G988-G997
- 31 Fox MR, Bredenoord AJ. Oesophageal high-resolution manometry: moving from research into clinical practice. *Gut* 2008; 57: 405-423
- 32 Janssens J, Vantrappen G, Ghillebert G. 24-hour recording of esophageal pressure and pH in patients with noncardiac chest pain. *Gastroenterology* 1986; 90: 1978-1984
- 33 Stein HJ, DeMeester TR, Eypasch EP, Klingman RR. Ambulatory 24-hour esophageal manometry in the evaluation of esophageal motor disorders and noncardiac chest pain. *Surgery* 1991; 110: 753-761; discussion 761-763
- 34 Lam HG, Dekker W, Kan G, Breedijk M, Smout AJ. Acute noncardiac chest pain in a coronary care unit. Evaluation by 24-hour pressure and pH recording of the esophagus. *Gastroenterology* 1992; 102: 453-460
- 35 Thompson JK, Koehler RE, Richter JE. Detection of gastroesophageal reflux: value of barium studies compared with 24-hr pH monitoring. *AJR Am J Roentgenol* 1994; 162: 621-626
- 36 Farina R, Pennisi F, La Rosa M, Puglisi C, Mazzone G, Riva G, Foti PV, Ettorre GC. Contrast-enhanced colour-Doppler sonography versus pH-metry in the diagnosis of gastro-oesophageal reflux in children. *Radiol Med* 2008; 113: 591-598

编辑 李军亮 电编 何基才

miR-200b对胃癌MGC-803细胞增殖的影响以及对Bcl-2表达的调节

王 驰, 钟 鹰, 栗 滔, 黄 靛, 毛振江, 肖 祥

王 驰, 湖南省桑植县人民医院消化内科 湖南省张家界市 427100
钟 鹰, 南华大学附属第二医院湘潭医院消化内科 湖南省湘潭市 411100
栗 滔, 株洲化工厂总医院 湖南省株洲市 412007
黄 靛, 毛振江, 南华大学附属第二医院消化内科 湖南省衡阳市 421001
肖 祥, 湖南省浏阳市人民医院 湖南省浏阳市 410300
王 驰, 主治医师, 现从事消化系肿瘤研究。
作者贡献分布: 王驰与钟鹰对此文所作贡献均等; 此课题由王驰与钟鹰设计; 研究过程由王驰、钟鹰、栗滔、黄靛、毛振江及肖祥共同操作完成; 研究所用试剂及分析工具由黄靛与毛振江提供; 数据分析由黄靛完成; 本论文写作由王驰与钟鹰完成。
通讯作者: 钟鹰, 主治医师, 411100, 湖南省湘潭市, 南华大学附属湘潭医院消化内科。zhongying7822@163.com
收稿日期: 2010-03-23 修回日期: 2010-05-25
接受日期: 2010-06-02 在线出版日期: 2010-07-18

miR-200b overexpression down-regulates Bcl-2 expression and inhibits cell proliferation in human gastric cancer cell line MGC-803

Chi Wang, Ying Zhong, Tao Su, Liang Huang, Zhen-Jiang Mao, Xiang Xiao

Chi Wang, Department of Gastroenterology, the People's Hospital of Sangzhi, Zhangjiajie 427100, Hunan Province, China

Ying Zhong, Department of Gastroenterology, Xiangtan Hospital & the Second Affiliated Hospital of Nanhua University, Xiangtan 411100, Hunan Province, China

Tao Su, General Hospital of Zhuzhou Chemical Plant, Zhuzhou 412007, Hunan Province, China

Liang Huang, Zhen-Jiang Mao, Department of Gastroenterology, the Second Affiliated Hospital of Nanhua University, Hengyang 421001, Hunan Province, China

Xiang Xiao, Department of Gastroenterology, the People's Hospital of Liuyang, Liuyang 410300, Hunan Province, China

Correspondence to: Ying Zhong, Department of Gastroenterology, the Second Affiliated Xiangtan Hospital of Nanhua University, Xiangtan 411100, Hunan Province, China. zhongying7822@163.com

Received: 2010-03-23 Revised: 2010-05-25

Accepted: 2010-06-02 Published online: 2010-07-18

Abstract

AIM: To investigate the effect of miR-200b overexpression on Bcl-2 expression and cell proliferation in human gastric cancer cell line

MGC-803.

METHODS: A double-stranded DNA oligonucleotide synthesized based on the sequence of the miR-200b was inserted into the miRNAS-electTM pEGP-miR vector to result in a recombinant plasmid expressing miR-200b. After the miR-200b recombinant plasmid was transfected into MGC-803 cells with Lipofectamine 2000, cell strains that stably expressed miR-200b were screened with puromycin. Bcl-2 expression vector was then constructed and introduced into MGC-803 cells that highly expressed miR-200b. The levels of Bcl-2 mRNA and protein were measured by RT-PCR and Western blotting, respectively. Methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) assay was used to analyze the proliferation of MGC-803 cells.

RESULTS: Compared with untransfected MGC-803 cells, the expression of Bcl-2 protein and mRNA decreased by 56.91% and 32.29%, respectively, and cell proliferation was significantly inhibited in MGC-803 cells transfected with the miR-200b expression plasmid. The proliferation of MGC-803 cells was promoted by transfection with the Bcl-2 expression plasmid, which was most obvious at 48 h (increased by 16.82%). Cell proliferation only decreased by 7.97% in MGC-803 cells transfected with both the miR-200b and Bcl-2 expression plasmids. Compared with MGC-803 cells transfected with the Bcl-2 expression plasmid, the expression of Bcl-2 protein decreased by 4.84 times in MGC-803 cells transfected with the miR-200b expression plasmid, and by 1.76 times in those cells transfected with both the miR-200b and Bcl-2 expression plasmids.

CONCLUSION: miR-200b overexpression inhibits MGC-803 cell proliferation, at least in part, by down-regulating Bcl-2 expression.

Key Words: miR-200b; Bcl-2; MGC-803

Wang C, Zhong Y, Su T, Huang L, Mao ZJ, Xiao X. miR-

■背景资料

microRNAs是一类长约22个核苷酸左右、进化保守的内源性非编码单链小分子RNA。自1993年发现第一个被称为lin-4的microRNA以来,研究者对microRNAs的生物合成、功能及作用机制进行了大量研究。近年来许多研究表明, microRNAs具有内源性的调节作用,在个体发育、细胞增殖或凋亡、细胞分化、病毒复制表达、生殖以及肿瘤的发生发展中都具有一定的调控作用。

■同行评议者

姜春萌, 教授, 大连医科大学附属第二医院消化科

■相关报道

越来越多的实验表明, microRNAs可能作为癌基因或者抑癌基因参与癌症的发生发展, 在多种肿瘤当中, 如慢性淋巴细胞白血病、肺癌、乳腺癌、恶性胶质瘤当中均有明显的特征性的microRNAs的表达种类和量的变化。

200b overexpression down-regulates Bcl-2 expression and inhibits cell proliferation in human gastric cancer cell line MGC-803. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2010; 18(20): 2077-2083

摘要

目的: 研究miR-200b对胃癌MGC-803细胞Bcl-2蛋白及mRNA表达的调节作用, 探讨miR-200b对胃癌MGC-803细胞增殖的影响。

方法: 用人工合成的miR-200b相应的双链互补DNA片段, 插入miRNASelect™ pEGP-miR载体, 经测序鉴定后作为microRNA的表达质粒; 用脂质体将miR-200b高表达质粒转染进MGC-803胃癌细胞, 经嘌呤霉素筛选获得阳性克隆。构建Bcl-2高表达质粒, 转染入MGC-803胃癌细胞和含有miR-200b高表达质粒的MGC-803细胞中。用RT-PCR技术和Western blot方法分别检测Bcl-2的mRNA和蛋白表达; 用MTT法检测胃癌MGC-803细胞增殖的变化。

结果: Western blot结果显示, 与正常MGC-803细胞相比, 转染了miR-200b的胃癌MGC-803细胞中, Bcl-2蛋白的表达降低了56.91%, RT-PCR分析显示Bcl-2 mRNA表达降低了32.29%; MTT结果显示转染了miR-200b的细胞增殖受到显著抑制。进一步的实验结果显示, 转染了Bcl-2高表达质粒的胃癌细胞增殖受到促进, 48 h最明显增加了16.82%, 然而转染了miR-200b和Bcl-2高表达质粒的MGC-803细胞增殖却下降了7.97%; Western blot结果显示, 与转染了pCMV6-XL5-Bcl-2高表达质粒的MGC-803细胞组相比, 转染了pEGP-miR-200b高表达质粒的MGC-803细胞中Bcl-2蛋白的表达降低了4.84倍, 而转染了pEGP-miR-200b和pCMV6-XL5-Bcl-2高表达质粒的MGC-803细胞中Bcl-2蛋白的表达量降低了1.76倍。

结论: 过表达的miR-200b抑制MGC-803胃癌细胞增殖, 这种抑制作用至少部分与Bcl-2基因的低表达有关。

关键词: miR-200b; Bcl-2; MGC-803细胞

王驰, 钟鹰, 栗滔, 黄靓, 毛振江, 肖祥. miR-200b对胃癌MGC-803细胞增殖的影响以及对Bcl-2表达的调节. 世界华人消化杂志 2010; 18(20): 2077-2083

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/2077.asp>

0 引言

microRNAs是长度为18-25碱基(basic group, bp)

的内源性非编码小分子RNA, 其通过与靶mRNA 3'端相结合导致mRNA降解或翻译受抑制从而调节基因的表达^[1]。随着研究的不断深入, 越来越多的证据证明microRNAs具有内源性的调节作用, 在个体发育^[2,3]、细胞增殖或凋亡^[4,5]、细胞分化^[6,7]、病毒复制表达^[8,9]、生殖^[10,11]以及肿瘤^[12,13]中都具有一定的调控作用。大量的实验证明, 特异性表达的microRNAs参与调控癌症的发生发展。最近有研究发现, 在间质细胞MDA-MB-231和BT-549乳腺癌中, miR-200家族介导的上皮细胞钙粘蛋白的转录因子上调, 与ZEB1的翻译直接相关, 与组蛋白H3乙酰化增加间接相关^[14]。为进一步研究 miR-200b参与调节癌症的发生发展, 本实验通过构建miR-200b和Bcl-2高表达质粒, 用脂质体将该质粒转染胃癌MGC-803, 检测细胞系中Bcl-2蛋白和mRNA表达情况, 并观察胃癌MGC-803细胞增殖的变化情况。

1 材料和方法

1.1 材料 1640细胞培养基, 美国Gibco公司; 胎牛、小牛血清, 杭州四季青生物有限公司; 质粒提取试剂盒, 天根生化科技(北京)有限公司; 总RNA提取试剂盒(TRIzol法), 北京百泰克生物技术有限公司; RT试剂盒, 美国MBI公司; PCR试剂盒, 天根生化科技有限公司; Lipofectamine™ 2000转染试剂盒, Invitrogen公司; 嘌呤霉素, Sigma公司; 引物合成, 上海生工生物工程服务有限公司; 脂联素兔多克隆抗体, Cell Signaling公司; 载体miRNASelect™ pEGP-miR, 美国Cell Biolabs公司; 胃癌MGC-803细胞系(上海拜力生物公司); *E.coli* DH5 α , Tiangen公司; Bcl-2抗体, Santa Cruz公司; 载体pCMV6-XL5, OriGene公司。

1.2 方法

1.2.1 miR-200b和Bcl-2高表达质粒的构建和鉴定: 根据miR-200b的核苷酸序列5'-TAGCAGCA CAGAAATATTGGC-3', 首先用DNA合成技术得到第一链DNA, 接着通过DNA连接反应合成双链DNA, 之后经过PCR扩增后进行体外重组, 插入载体miRNASelect™ pEGP-miR, 构建的质粒pEGP-200-mi, 随后转化*E.coli* DH5 α 宿主菌。同样, 将Bcl-2序列插入载体pCMV6-XL5构建高表达质粒, 转化到宿主菌中。挑取经酶切初步证实插入正确的单克隆菌落, 将阳性菌液1.5 mL寄上海生工进行DNA序列测定(表1)。

1.2.2 重组质粒的转染: 摇菌扩增质粒之后, 提取

表 1 β -actin和Bcl-2引物序列

名称	扩增长度(bp)	引物序列(5'-3')
β -actin	480	正义链: CATCCTGCGTcTGGACCT 反义链: CAGGAGGAGCAATGATCTTG
Bcl-2	318	正义链: CGACGACTTCTCCCGCCGCTACCGC 反义链: CCGTAGCTGGGGCCGTACAGTTC

质粒. 用100 mL/L胎牛血清1640培养基培养24 h, 换为优化培养基, 采用Lipofectamine™ 2000试剂盒转染, 将脂质体和质粒按照比例孵育, 形成脂质复合体, 均匀的加到细胞培养板中, 6 h后换成含100 mL/L胎牛血清的1640培养基. 待转染48 h后加puromycin筛选阳性克隆, 观察转染情况.

1.2.3 稳定转染细胞中miR-200b的表达鉴定: 提取经初步筛选的细胞总RNA以及microRNA, 用12.5%变性聚丙烯酰胺凝胶室温进行电泳(130 V, 2 h). 之后电转移至尼龙膜上, 用合成的反义寡核苷酸探针进行检测, 该探针在5'末端带有 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ 标志物, 其他步骤与标准的Northern blot方法相同.

1.2.4 Western blot检测蛋白表达: 提取细胞总蛋白, 定量, 与上样缓冲液按比例混匀, 100 °C煮5 min, 8% SDS-PAGE电泳后电转移至PVDF膜上, 5%脱脂牛奶室温封闭1 h, 加入一抗, 4 °C孵育过夜, TBST洗涤3次, 每10 min换液1次. 加入二抗, 37 °C孵育45 min, TBST洗涤3次, 每15 min换液1次, 在暗室中压片, 然后显影、定影. 图像应用AlphaImager 2200软件进行分析.

1.2.5 RT-PCR检测mRNA表达: 分别提取总RNA, 定量后逆转录进行聚合酶链反应, 以 β -actin为内参, 其PCR条件: 94 °C预变性5 min, 然后94 °C变性30 s、58 °C退火30 s、72 °C延伸40 s, 30个循环后再72 °C终末延伸5 min; Bcl-2的PCR条件: 94 °C预变性3 min, 94 °C变性30 s、57.9 °C退火30 s、72 °C延伸1 min, 30个循环后再72 °C延伸5 min.

1.2.6 MTT法检测细胞的增殖: 取对数生长期的胃癌MGC-803细胞, 以每孔 2×10^3 个细胞接种于96孔培养板中. 待细胞长到50%融合时更换无血清的1640培养基同步化24 h, 后加100 mL/L胎牛血清, 在不同时间段测定时往培养板中加入10 \times MTT, 继续培养4 h, 用Elx-800酶联免疫检测仪测定 $A_{570\text{nm}}$ 值. 计算细胞生长抑制率, 生长抑制率 = $(1 - \text{实验组}A_{570\text{nm}}/\text{对照组}A_{570\text{nm}}) \times 100\%$.

统计学处理 所有实验重复3次, 结果以mean

■创新盘点

本实验将miR-200b高表达质粒转染到MGC-803细胞中, 探讨其对MGC-803细胞增殖及Bcl-2表达的影响, 并且构建了Bcl-2高表达质粒, 进一步研究miR-200b、Bcl-2以及细胞增殖三者之间的关系.

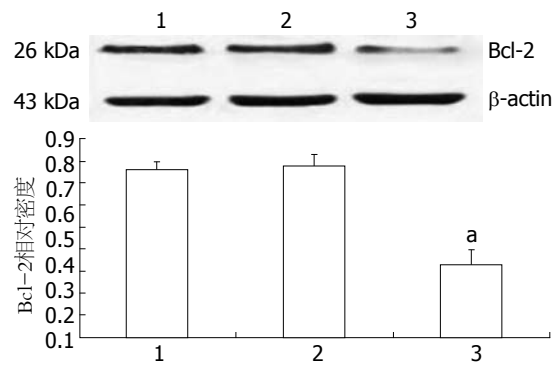


图 1 Western blot检测Bcl-2蛋白的表达. 1: MGC-803; 2: 转染了pEP-miR Null Control的MGC-803; 3: 转染了pEGP-miR-200b的MGC-803. ^a $P < 0.05$ vs 正常MGC-803.

±SD表示, 用SPSS13.0统计软件进行分析, 组内采用One-way ANOVA进行方差分析, 组间采用LSD或者Dunnett's T3检验进行比较, 以 $P < 0.05$ 为有统计学意义.

2 结果

2.1 Western blot检测Bcl-2蛋白表达 与MGC-803细胞组相比, 转染了pEGP-miR-200b高表达质粒的MGC-803细胞中Bcl-2蛋白表达明显减少, 降低了56.91% (0.3289 ± 0.042 vs 0.7632 ± 0.057 , $P < 0.05$). 而转染了pEP-miR Null Control的MGC-803细胞组与正常组组间无统计学意义 ($P > 0.05$). 结果表明转染了miR-200b的MGC-803细胞Bcl-2蛋白的表达水平明显减少(图1).

2.2 miR-200b对Bcl-2 mRNA表达的影响 与对照组相比, 转染了pEGP-miR-200b高表达质粒的MGC-803细胞的Bcl-2 mRNA表达水平明显减少, 降低了32.29% (0.5603 ± 0.05 vs 0.8276 ± 0.07 , $P < 0.05$), 而转染了pEP-miR Null Control的MGC-803细胞组与正常组组间无统计学意义 ($P > 0.05$). 结果表明转染了miR-200b的MGC-803细胞Bcl-2的mRNA水平明显减少(图2).

2.3 MTT法检测细胞增殖结果 由结果可知转染了pEPG-miR-200b高表达质粒的MGC-803细胞的增殖情况受到抑制, 其中在48 h增殖抑制效

■应用要点

本研究发现过表达的miR-200b抑制MGC-803胃癌细胞增殖,这种抑制作用至少部分与Bcl-2基因的低表达有关,提示microRNAs可能成为临床肿瘤治疗方面的新手段。

表 2 MTT法检测细胞增殖结果 (mean ± SD)

	12 h	24 h	48 h
转染了pEPG-miR-200b的MGC-803	0.286 ± 0.032	0.382 ± 0.053 ^a	0.486 ± 0.050 ^a
转染了pEPG-miR-200b和pCMV6-XL5-Bcl-2的MGC-803	0.289 ± 0.041	0.413 ± 0.044 ^{ac}	0.531 ± 0.044 ^{ac}
MGC-803	0.293 ± 0.053	0.451 ± 0.064 ^a	0.577 ± 0.043 ^a
转染了pCMV6-XL5 Control的 MGC-803	0.299 ± 0.065	0.453 ± 0.031	0.581 ± 0.049
转染了pCMV6-XL5-Bcl-2的MGC-803	0.307 ± 0.045	0.524 ± 0.060 ^a	0.674 ± 0.065 ^a

^a*P*<0.05 vs 正常MGC-803; ^c*P*<0.05 vs 转染了pCMV6-XL5-Bcl-2的MGC-803。

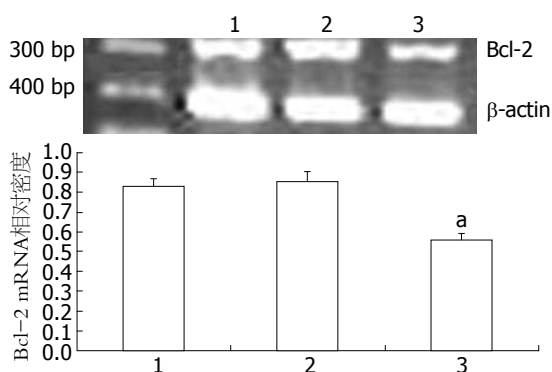


图 2 RT-PCR检测Bcl-2 mRNA的表达。1: MGC-803; 2: 转染了pEP-miR Null Control的MGC-803; 3: 转染了pEP-miR-200b的MGC-803。**P*<0.05 vs 正常MGC-803。

果最强(增殖抑制率15.52%, *P*<0.05)。而转染了pEP-miR Null Control的MGC-803细胞组与正常组组间无统计学意义(*P*>0.05, 图3)。

2.4 Bcl-2对细胞增殖的影响

2.4.1 Bcl-2对胃癌MGC-803细胞增殖的影响: 与MGC-803组相比, 转染了pCMV6-XL5-Bcl-2高表达质粒的MGC-803细胞的增殖受到促进, 在48 h增殖抑制效果最强, 增加了16.82%(*P*<0.05); 转染了pEPG-miR-200b高表达质粒的MGC-803的增殖情况受到抑制, 在48 h降低了15.77%(*P*<0.05); 而转染了pEPG-miR-200b和pCMV6-XL5-Bcl-2高表达质粒的MGC-803细胞组, 其48 h的增殖抑制率相对于正常组降低了7.97%(*P*<0.05)。与pCMV6-XL5-Bcl-2高表达质粒的MGC-803细胞组相比, 转染了pEPG-miR-200b和pCMV6-XL5-Bcl-2高表达质粒的MGC-803细胞组在48h其增殖抑制率降低了21.21%(*P*<0.05)。而转染了pEP-miR Null Control的MGC-803细胞组与正常组组间无统计学意义(*P*>0.05, 表2)。实验结果提示Bcl-2的高表达可能与细胞增殖存在密切联系, 同时也间接验证了miR-200b至少部分通过打靶Bcl-2影响细胞

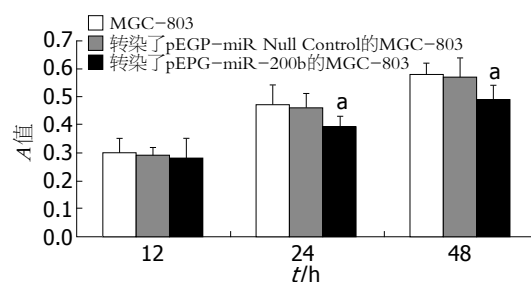


图 3 MTT法检测细胞增殖结果。**P*<0.05 vs 正常MGC-803。

的增殖。

2.4.2 Western blot检测Bcl-2蛋白表达: 与转染了pCMV6-XL5-Bcl-2高表达质粒的MGC-803细胞组相比, 转染了pEPG-miR-200b高表达质粒的MGC-803细胞的Bcl-2蛋白明显减少, 降低了4.84倍(0.1176 ± 0.065 vs 0.6863 ± 0.043 , *P*<0.05, 图4), 而转染了pEPG-miR-200b和pCMV6-XL5-Bcl-2高表达质粒的MGC-803细胞中, Bcl-2蛋白的表达量降低了1.76倍(0.2484 ± 0.047 vs 0.6863 ± 0.043 , *P*<0.05)。相对于转染了pEPG-miR-200b的MGC-803细胞组, 转染了pEPG-miR-200b和pCMV6-XL5-Bcl-2高表达质粒的MGC-803细胞组Bcl-2蛋白的表达量增加了52.65%(0.2484 ± 0.047 vs 0.1176 ± 0.065 , *P*<0.05)。转染了pEP-miR Null Control的MGC-80细胞组与正常组组间无统计学意义(*P*>0.05)。实验结果提示了Bcl-2是miR-200b的靶位点之一。

3 讨论

胃癌是全球高发的恶性肿瘤之一, 但目前我们对胃癌的发病机制尚缺乏全面和深入的了解。现有研究证明, microRNAs可能作为癌基因或者抑癌基因参与癌症的发生发展。本文通过实验发现, 转染了miR-200b高表达质粒的MGC-803细胞增殖受到了抑制; 过表达的miR-200b在MGC-803人胃癌细胞中对Bcl-2具有明显的调节

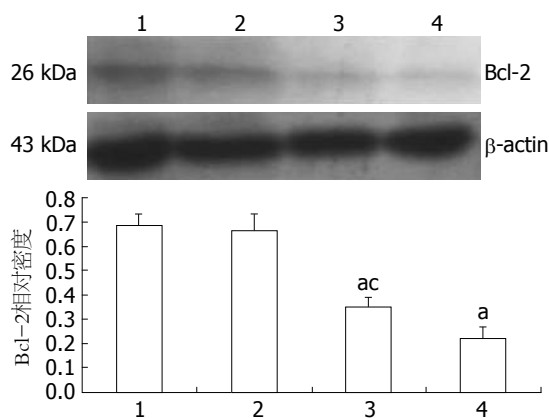


图4 Western blot检测Bcl-2蛋白表达. 1: pCMV6-XL5-Bcl-2的MGC-803; 2: 转染了pCMV6-XL5 Control的MGC-803; 3: 转染了pEGP-miR-200b和pCMV6-XL5-Bcl-2的MGC-803; 4: 转染了pEGP-miR-200b的MGC-803. * $P < 0.05$ vs 转染了pCMV6-XL5-Bcl-2的MGC-803; ** $P < 0.05$ vs 转染了pEGP-miR-200的MGC-803.

作用; 通过转染Bcl-2高表达质粒进一步研究发现, miR-200b对MGC-803细胞增殖的抑制作用, 至少部分是通过调节Bcl-2实现的.

越来越多的证据显示, 人类的一些恶性肿瘤组织中microRNAs基因的表达发生改变, 如肺癌^[15,16]、肝癌^[17]、结肠癌^[18,19]、鼻咽癌^[20]、卵巢癌^[21]、乳腺癌^[22]. microRNA在胃癌中的调节作用也被越来越多的实验证实, Wan等^[23]发现miR-9在人类胃癌中下调, 过表达的miR-9抑制人胃癌MGC-803细胞的生长, miR-9打靶NF- κ B1, 并且调节胃癌细胞的生长. miR-150在胃癌细胞系和组织中高表达, 异位表达的miR-150促进肿瘤和胃癌细胞扩散. 荧光素酶报告基因分析表明, EGR2是miR-150的直接靶位点^[24]. 胆管癌细胞系中miR-21, miR-141, miR-200b过表达, 抑制miR-21和miR-200b会增加对吉西他滨的敏感性, 但是抑制miR-141的表达会抑制细胞增长^[25]. 人类结肠癌细胞系中, miR-200b表达上调, 加入5-氟尿嘧啶处理之后miR-200b表达下调. miR-200b抑制络氨酸磷酸酶蛋白-PTPN12, 从而使c-Abl, Src和Ras等癌基因失活^[26]. 本实验发现, miR-200b对胃癌MGC-803细胞的增殖具有调节作用, 过表达的miR-200b能够抑制胃癌MGC-803细胞的增殖.

癌基因Bcl-2位于染色体18q上, 编码相对分子质量26 000 Da蛋白质. 由于染色体易位(14, 18)导致14号染色体上的免疫球蛋白重链基因(IgH)与18号染色体上的Bcl-2的融合, 从而使Bcl-2蛋白质过表达, 通过将细胞阻滞在G₀/G₁

期而抑制细胞凋亡, 促进肿瘤生长和演进^[27-29]. Bcl-2过度表达与多种上皮性肿瘤的发生发展密切相关, 可导致DNA受损的细胞持续生存、突变产物聚集. Pan等^[30]报道1 196例日本早期胃癌Bcl-2表达与淋巴结转移的关系, 结果显示Bcl-2表达增加更易导致胃癌的浸润发展和淋巴结转移. 在肝癌细胞中, Bcl-2和Mcl-1是miR-29的直接靶位点, 沉默Bcl-2和Mcl-1的表达能够增强miR-29的作用, 然而过表达的Bcl-2和Mcl-1则会降低miR-29的作用. 高表达的miR-29导致线粒体的丢失和细胞色素C向细胞质的释放, 提示miR-29可能通过Mcl-1和Bcl-2参与的线粒体途径促进凋亡^[31].

在我们的实验中, 我们选取Bcl-2为研究对象, 观察miR-200b对Bcl-2的调节作用, 实验结果显示, 用脂质体转染miR-200b高表达质粒到胃癌MGC-803细胞后, 过表达的miR-200b使Bcl-2蛋白和mRNA的表达降低. 为了进一步验证miR-200b, Bcl-2与胃癌MGC-803细胞增殖之间的关系, 我们构建了Bcl-2高表达质粒, 转染进MGC-803胃癌细胞和含有miR-200b高表达质粒的阳性细胞系, MTT结果显示Bcl-2高表达质粒组的胃癌细胞增殖受到促进, Western blot结果提示miR-200b至少部分通过打靶Bcl-2基因并抑制其蛋白表达, 进而抑制细胞增殖.

本实验通过构建miR-200b高表达细胞系, 分析miR-200b对胃癌细胞增殖的影响及Bcl-2表达的调节作用, 并且通过Bcl-2高表达质粒的构建, 进一步确定miR-200b, Bcl-2与细胞增殖之间的关系. 我们的结果显示, 转染了miR-200b高表达质粒的胃癌细胞中Bcl-2在蛋白和mRNA水平都受到了不同程度的抑制, 并且细胞增殖受到抑制, 这种抑制作用至少部分通过miR-200b打靶Bcl-2实现的. 本实验的完成为我们进一步研究探索microRNAs对癌症的调节作用及其临床治疗提供了理论依据.

4 参考文献

- 1 Ambros V. The functions of animal microRNAs. *Nature* 2004; 431: 350-355
- 2 Yin VP, Thomson JM, Thummel R, Hyde DR, Hammond SM, Poss KD. Fgf-dependent depletion of microRNA-133 promotes appendage regeneration in zebrafish. *Genes Dev* 2008; 22: 728-733
- 3 Dore LC, Amigo JD, Dos Santos CO, Zhang Z, Gai X, Tobias JW, Yu D, Klein AM, Dorman C, Wu W, Hardison RC, Paw BH, Weiss MJ. A GATA-1-regulated microRNA locus essential for erythropoiesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 105:

同行评价

本文内容新颖性强, 实验设计基本可行, 方法恰当, 有较好的学术价值.

- 3333-3338
- 4 Meng F, Henson R, Wehbe-Janek H, Ghoshal K, Jacob ST, Patel T. MicroRNA-21 regulates expression of the PTEN tumor suppressor gene in human hepatocellular cancer. *Gastroenterology* 2007; 133: 647-658
 - 5 Li W, Xie L, He X, Li J, Tu K, Wei L, Wu J, Guo Y, Ma X, Zhang P, Pan Z, Hu X, Zhao Y, Xie H, Jiang G, Chen T, Wang J, Zheng S, Cheng J, Wan D, Yang S, Li Y, Gu J. Diagnostic and prognostic implications of microRNAs in human hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer* 2008; 123: 1616-1622
 - 6 Cordes KR, Sheehy NT, White MP, Berry EC, Morton SU, Muth AN, Lee TH, Miano JM, Ivey KN, Srivastava D. miR-145 and miR-143 regulate smooth muscle cell fate and plasticity. *Nature* 2009; 460: 705-710
 - 7 Conaco C, Otto S, Han JJ, Mandel G. Reciprocal actions of REST and a microRNA promote neuronal identity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103: 2422-2427
 - 8 Sullivan CS, Grundhoff AT, Tevethia S, Pipas JM, Ganem D. SV40-encoded microRNAs regulate viral gene expression and reduce susceptibility to cytotoxic T cells. *Nature* 2005; 435: 682-686
 - 9 Lecellier CH, Dunoyer P, Arar K, Lehmann-Che J, Eyquem S, Himber C, Saïb A, Voinnet O. A cellular microRNA mediates antiviral defense in human cells. *Science* 2005; 308: 557-560
 - 10 Tang F, Kaneda M, O'Carroll D, Hajkova P, Barton SC, Sun YA, Lee C, Tarakhovsky A, Lao K, Surani MA. Maternal microRNAs are essential for mouse zygotic development. *Genes Dev* 2007; 21: 644-648
 - 11 Novotny GW, Sonne SB, Nielsen JE, Jonstrup SP, Hansen MA, Skakkebaek NE, Rajpert-De Meyts E, Kjems J, Leffers H. Translational repression of E2F1 mRNA in carcinoma in situ and normal testis correlates with expression of the miR-17-92 cluster. *Cell Death Differ* 2007; 14: 879-882
 - 12 Liu X, Sempere LF, Galimberti F, Freemantle SJ, Black C, Dragnev KH, Ma Y, Fiering S, Memoli V, Li H, DiRenzo J, Korc M, Cole CN, Bak M, Kauppinen S, Dmitrovsky E. Uncovering growth-suppressive MicroRNAs in lung cancer. *Clin Cancer Res* 2009; 15: 1177-1183
 - 13 Schetter AJ, Leung SY, Sohn JJ, Zanetti KA, Bowman ED, Yanaihara N, Yuen ST, Chan TL, Kwong DL, Au GK, Liu CG, Calin GA, Croce CM, Harris CC. MicroRNA expression profiles associated with prognosis and therapeutic outcome in colon adenocarcinoma. *JAMA* 2008; 299: 425-436
 - 14 Tryndyak VP, Beland FA, Pogribny IP. E-cadherin transcriptional down-regulation by epigenetic and microRNA-200 family alterations is related to mesenchymal and drug-resistant phenotypes in human breast cancer cells. *Int J Cancer* 2010; 126: 2575-2583
 - 15 Hayashita Y, Osada H, Tatematsu Y, Yamada H, Yanagisawa K, Tomida S, Yatabe Y, Kawahara K, Sekido Y, Takahashi T. A polycistronic microRNA cluster, miR-17-92, is overexpressed in human lung cancers and enhances cell proliferation. *Cancer Res* 2005; 65: 9628-9632
 - 16 Lebanony D, Benjamin H, Gilad S, Ezagouri M, Dov A, Ashkenazi K, Gefen N, Izraeli S, Rechavi G, Pass H, Nonaka D, Li J, Spector Y, Rosenfeld N, Chajut A, Cohen D, Aharonov R, Mansukhani M. Diagnostic assay based on hsa-miR-205 expression distinguishes squamous from nonsquamous non-small-cell lung carcinoma. *J Clin Oncol* 2009; 27: 2030-2037
 - 17 Su H, Yang JR, Xu T, Huang J, Xu L, Yuan Y, Zhuang SM. MicroRNA-101, down-regulated in hepatocellular carcinoma, promotes apoptosis and suppresses tumorigenicity. *Cancer Res* 2009; 69: 1135-1142
 - 18 Bandrés E, Cubedo E, Agirre X, Malumbres R, Zárate R, Ramirez N, Abajo A, Navarro A, Moreno I, Monzó M, García-Foncillas J. Identification by Real-time PCR of 13 mature microRNAs differentially expressed in colorectal cancer and non-tumoral tissues. *Mol Cancer* 2006; 5: 29
 - 19 Michael MZ, O' Connor SM, van Holst Pellekaan NG, Young GP, James RJ. Reduced accumulation of specific microRNAs in colorectal neoplasia. *Mol Cancer Res* 2003; 1: 882-891
 - 20 Sengupta S, den Boon JA, Chen IH, Newton MA, Stanhope SA, Cheng YJ, Chen CJ, Hildesheim A, Sugden B, Ahlquist P. MicroRNA 29c is down-regulated in nasopharyngeal carcinomas, up-regulating mRNAs encoding extracellular matrix proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 105: 5874-5878
 - 21 Laios A, O'Toole S, Flavin R, Martin C, Kelly L, Ring M, Finn SP, Barrett C, Loda M, Gleeson N, D'Arcy T, McGuinness E, Sheils O, Sheppard B, O' Leary J. Potential role of miR-9 and miR-223 in recurrent ovarian cancer. *Mol Cancer* 2008; 7: 35
 - 22 Kondo N, Toyama T, Sugiura H, Fujii Y, Yamashita H. miR-206 Expression is down-regulated in estrogen receptor alpha-positive human breast cancer. *Cancer Res* 2008; 68: 5004-5008
 - 23 Wan HY, Guo LM, Liu T, Liu M, Li X, Tang H. Regulation of the transcription factor NF-kappaB1 by microRNA-9 in human gastric adenocarcinoma. *Mol Cancer* 2010; 9: 16
 - 24 Wu Q, Jin H, Yang Z, Luo G, Lu Y, Li K, Ren G, Su T, Pan Y, Feng B, Xue Z, Wang X, Fan D. MiR-150 promotes gastric cancer proliferation by negatively regulating the pro-apoptotic gene EGR2. *Biochem Biophys Res Commun* 2010; 392: 340-345
 - 25 Meng F, Henson R, Lang M, Wehbe H, Maheshwari S, Mendell JT, Jiang J, Schmittgen TD, Patel T. Involvement of human micro-RNA in growth and response to chemotherapy in human cholangiocarcinoma cell lines. *Gastroenterology* 2006; 130: 2113-2129
 - 26 Rossi L, Bonmassar E, Faraoni I. Modification of miR gene expression pattern in human colon cancer cells following exposure to 5-fluorouracil in vitro. *Pharmacol Res* 2007; 56: 248-253
 - 27 Su JD, Mayo LD, Donner DB, Durden DL. PTEN and phosphatidylinositol 3'-kinase inhibitors up-regulate p53 and block tumor-induced angiogenesis: evidence for an effect on the tumor and endothelial compartment. *Cancer Res* 2003; 63: 3585-3592
 - 28 Hou Q, Cymbalyuk E, Hsu SC, Xu M, Hsu YT. Apoptosis modulatory activities of transiently expressed Bcl-2: roles in cytochrome C release and Bax regulation. *Apoptosis* 2003; 8: 617-629
 - 29 Prayson RA. Cyclooxygenase-2, Bcl-2, and chromosome 1p analysis in protoplasmic

- astrocytomas. *Hum Pathol* 2004; 35: 317-321
- 30 Pan W, Ishii H, Ebihara Y, Gobe G. Prognostic use of growth characteristics of early gastric cancer and expression patterns of apoptotic, cell proliferation, and cell adhesion proteins. *J Surg Oncol* 2003; 82: 104-110
- 31 Xiong Y, Fang JH, Yun JP, Yang J, Zhang Y, Jia WH, Zhuang SM. Effects of microRNA-29 on apoptosis, tumorigenicity, and prognosis of hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2010; 51: 836-845

编辑 李军亮 电编 何基才

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2010年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

2008 年内科类期刊总被引频次和影响因子排序

代码	期刊名称	总被引频次			影响因子		
		数值	学科排名	离均差率	数值	学科排名	离均差率
1170	JOURNAL OF GERIATRIC CARDIOLOGY	7	41	-0.99	0.043	41	-0.92
G275	WORLD JOURNAL OF GASTROENTEROLOGY	5432	1	3.71	0.792	6	0.52
G803	肝脏	586	25	-0.49	0.594	11	0.14
G938	国际呼吸杂志	645	22	-0.44	0.294	34	-0.43
G415	国际内分泌代谢杂志	663	20	-0.43	0.379	28	-0.27
G501	临床肝胆病杂志	582	27	-0.50	0.441	22	-0.15
G658	临床荟萃	1709	8	0.48	0.356	32	-0.32
G257	临床内科杂志	875	16	-0.24	0.412	24	-0.21
G855	临床消化病杂志	314	32	-0.73	0.294	34	-0.43
G261	临床心血管病杂志	836	17	-0.28	0.371	29	-0.29
G293	临床血液学杂志	408	31	-0.65	0.329	33	-0.37
G491	岭南心血管病杂志	161	39	-0.86	0.158	40	-0.70
G662	内科急危重症杂志	308	34	-0.73	0.279	36	-0.46
G523	内科理论与实践	34	40	-0.97	0.171	39	-0.67
G746	实用肝脏病杂志	312	33	-0.73	0.562	14	0.08
G190	世界华人消化杂志	2480	6	1.15	0.547	17	0.05
G800	胃肠病学	619	23	-0.46	0.621	10	0.19
G326	胃肠病学和肝病杂志	580	28	-0.50	0.415	23	-0.20
G083	心肺血管病杂志	246	37	-0.79	0.361	31	-0.31
G419	心血管病学进展	585	26	-0.49	0.410	25	-0.21
G260	心脏杂志	553	29	-0.52	0.406	26	-0.22
G610	胰腺病学	268	35	-0.77	0.366	30	-0.30
G234	中国动脉硬化杂志	934	15	-0.19	0.557	16	0.07
G267	中国实用内科杂志	2309	7	1.00	0.487	20	-0.06
G211	中国糖尿病杂志	1567	11	0.36	0.570	13	0.10
G380	中国心血管杂志	256	36	-0.78	0.225	37	-0.57
G203	中国心脏起搏与心电生理杂志	657	21	-0.43	0.562	14	0.08
G633	中国血液净化	680	19	-0.41	0.546	18	0.05
G119	中国循环杂志	694	18	-0.40	0.406	26	-0.22
G231	中华肝脏病杂志	3283	4	1.84	1.119	2	1.15
G235	中华高血压杂志	1168	14	0.01	0.730	8	0.40
G639	中华老年多器官疾病杂志	166	38	-0.86	0.207	38	-0.60
G876	中华老年心脑血管病杂志	588	24	-0.49	0.442	21	-0.15
G155	中华内分泌代谢杂志	1612	10	0.40	0.897	5	0.73
G156	中华内科杂志	3484	3	2.02	0.788	7	0.52
G161	中华肾脏病杂志	1643	9	0.42	1.068	3	1.05
G285	中华消化内镜杂志	1314	13	0.14	0.578	12	0.11
G168	中华消化杂志	2571	5	1.23	1.025	4	0.97
G892	中华心率失常学杂志	494	30	-0.57	0.657	9	0.26
G170	中华心血管病杂志	4186	2	2.63	1.375	1	1.64
G172	中华血液学杂志	1501	12	0.30	0.489	19	-0.06
	平均值	1154			0.520		

以上数据摘自2009年版《中国科技期刊引证报告》(核心版). 科学技术文献出版社, 177-178.

荔枝核总黄酮抗胆管结扎大鼠肝纤维化的作用及机制

赵永忠, 漆志平, 徐庆, 肖绪华, 郭芳, 侯巧燕, 韦京辰

■背景资料

肝纤维化是各种慢性肝病发展为肝硬化的共同病理基础, 肝实质细胞损伤坏死和肝间质细胞增生(主要是肝星状细胞)是其发生的主要机制。如何延缓, 甚至阻止慢性肝病向肝纤维化进展, 成为目前防治肝硬化的研究热点。

赵永忠, 桂林医学院附属医院消化内科 广西壮族自治区桂林市 541001

漆志平, 肖绪华, 桂林医学院 广西壮族自治区桂林市 541004
徐庆, 韦京辰, 桂林医学院药理学教研室 广西壮族自治区桂林市 541004

郭芳, 侯巧燕, 桂林医学院附属医院病理科 广西壮族自治区桂林市 541001

赵永忠, 医学硕士, 副教授, 硕士生导师, 主要从事慢性肝病的基础与临床研究。

广西教育厅科研基金资助项目(桂教科研), No. 200911LX304
广西自然科学基金资助项目(桂科自), No. 200679

作者贡献分布: 此课题由赵永忠、漆志平及韦京辰设计; 研究过程由赵永忠、漆志平、肖绪华、郭芳、侯巧燕及韦京辰操作完成; 研究所用新试剂及分析工具由徐庆与韦京辰提供, 数据分析由赵永忠与漆志平完成; 本论文写作由赵永忠、漆志平、肖绪华及韦京辰完成。

通讯作者: 韦京辰, 讲师, 541004, 广西壮族自治区桂林市, 桂林医学院药理学教研室。taotao@glmc.edu.cn

电话: 0773-5895801

收稿日期: 2010-03-18 修回日期: 2010-06-03

接受日期: 2010-06-22 在线出版日期: 2010-07-18

Anti-hepatic fibrosis effect of total flavone from *Litchi chinensis* Sonn in rats with bile duct occlusion

Yong-Zhong Zhao, Zhi-Ping Qi, Qing Xu, Xu-Hua Xiao, Fang Guo, Qiao-Yan Hou, Jing-Chen Wei

Yong-Zhong Zhao, Department of Gastroenterology, the Affiliated Hospital of Guilin Medical College, Guilin 541001, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China
Zhi-Ping Qi, Xu-Hua Xiao, Guilin Medical College, Guilin 541004, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China
Qing Xu, Jing-Chen Wei, Department of Pharmacology, Guilin Medical College, Guilin 541004, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China

Fang Guo, Qiao-Yan Hou, Department of Pathology, the Affiliated Hospital of Guilin Medical College, Guilin 541001, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China

Supported by: the Scientific Research Foundation of Education Department of Guangxi Zhuang Autonomous Region, No. 200911LX304; and the Natural Science Foundation of Guangxi, No. 200679

Correspondence to: Jing-Chen Wei, Department of Pharmacology, Guilin Medical College, Guilin 541004, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China. taotao@glmc.edu.cn

Received: 2010-03-18 Revised: 2010-06-03

Accepted: 2010-06-22 Published online: 2010-07-18

Abstract

AIM: To determine whether total flavone from *Litchi chinensis* Sonn (TFL) has anti-hepatic fibrosis effects in a rat model of bile duct occlusion (BDO) and to explore potential

mechanisms involved.

METHODS: Hepatic fibrosis was induced in rats by common bile duct ligation. TFL was orally given to fibrotic rats at a dose of 200 or 100 mg/(kg·d). Silymarin was used as a positive control. Four weeks later, serum level of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) was determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA); serum levels of hyaluronic acid (HA), laminin (LN) and procollagen type III (PC III) were measured by radioimmunoassay (RIA); the degree of liver fibrosis was evaluated by HE staining and Masson collagen staining; and the expression of TRAIL in liver tissue was detected by immunohistochemistry using the streptavidin-biotin enzyme complex (SABC) method.

RESULTS: Serum levels of TRAIL, HA, LN and PC III were significantly lower in the high-dose TFL group, sham-operation group and silymarin group than in the model group (all $P < 0.05$) though that was no significant difference between the low-dose TFL group and model group ($P > 0.05$). Serum TRAIL level is correlated with hepatic TRAIL expression level. Serum TRAIL level also has a positive correlation with serum levels of HA, LN and PC III. The degree of liver fibrosis was significantly improved in the high-dose TFL group and silymarin group.

CONCLUSION: TFL at a dose of 200 mg/(kg·d) can inhibit the expression of TRAIL, HA, LN and PC III and improve the degree of liver fibrosis in rats with hepatic fibrosis.

Key Words: Flavone from *Litchi chinensis* Sonn; Hepatic fibrosis; Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand

Zhao YZ, Qi ZP, Xu Q, Xiao XH, Guo F, Hou QY, Wei JC. Anti-hepatic fibrosis effect of total flavone from *Litchi chinensis* Sonn in rats with bile duct occlusion. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(20): 2084-2089

摘要

目的: 研究荔枝核总黄酮(total flavone from

■同行评议者

李康, 副教授, 广东药学院药科学院药物分析教研室

Litchi chinensis Sonn, TFL)抗胆管阻塞性(bile duct occlusion, BDO)大鼠肝纤维化的作用及机制。

方法: 采用胆总管结扎(common bile duct ligation, CBDL)制备肝纤维化大鼠模型。以水飞蓟素(SL)为对照, TFL[200, 100 mg/(kg·d)]灌胃给药, 4 wk后用酶联免疫吸附法(ELISA)检测大鼠血清中肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体(TRAIL)的水平; 放射免疫法(RIA)检测大鼠血清中透明质酸(HA)、层粘连蛋白(LN)及Ⅲ型前胶原(PCⅢ)的水平; 采用HE染色和Masson胶原染色观察大鼠肝纤维化程度; 采用免疫组织化学法(SABC法)检测肝组织TRAIL的表达。

结果: TFL大剂量给药组、假手术组和SL组血清TRAIL均明显低于模型组, 具有显著性差异($7.11 \text{ ng/L} \pm 0.99 \text{ ng/L}$, $5.83 \text{ ng/L} \pm 2.42 \text{ ng/L}$, $7.02 \text{ ng/L} \pm 1.09 \text{ ng/L}$ vs $42.99 \text{ ng/L} \pm 14.39 \text{ ng/L}$, 均 $P < 0.05$), TFL大剂量给药组、假手术组和SL组血清肝纤维化指标HA、LN、PCⅢ均明显低于模型组, 具有显著性差异($103.03 \mu\text{g/L} \pm 2.33 \mu\text{g/L}$, $105.76 \mu\text{g/L} \pm 3.16 \mu\text{g/L}$, $109.64 \mu\text{g/L} \pm 6.50 \mu\text{g/L}$ vs $788.7 \mu\text{g/L} \pm 83.98 \mu\text{g/L}$; $12.43 \mu\text{g/L} \pm 1.45 \mu\text{g/L}$, $7.31 \mu\text{g/L} \pm 0.79 \mu\text{g/L}$, $8.68 \mu\text{g/L} \pm 1.05 \mu\text{g/L}$ vs $26.66 \mu\text{g/L} \pm 2.41 \mu\text{g/L}$; $31.07 \mu\text{g/L} \pm 3.04 \mu\text{g/L}$, $31.78 \mu\text{g/L} \pm 2.33 \mu\text{g/L}$, $33.06 \mu\text{g/L} \pm 3.23 \mu\text{g/L}$ vs $74.32 \mu\text{g/L} \pm 2.43 \mu\text{g/L}$, 均 $P < 0.05$), TFL小剂量给药组血清TFL、HA、LN、PCⅢ与模型组比较无显著性差异($P > 0.05$)。血清TRAIL水平与肝组织中TRAIL表达一致; 血清TRAIL水平与血清HA、LN、PCⅢ呈正相关。TFL大剂量给药组和SL给药组的肝组织均显示肝纤维化程度明显改善。

结论: TFL[200 mg/(kg·d)]能抑制肝纤维化大鼠TRAIL、HA、LN、PCⅢ的表达, 并改善CBDL大鼠肝组织纤维化程度。

关键词: 荔枝核总黄酮; 肝纤维化; 肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体

赵永忠, 漆志平, 徐庆, 肖绪华, 郭芳, 侯巧燕, 韦京辰. 荔枝核总黄酮抗胆管结扎大鼠肝纤维化的作用及机制. 世界华人消化杂志 2010; 18(20): 2084-2089
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/2084.asp>

0 引言

荔枝核又名荔仁或荔枝, 是无患子科常绿乔木植物荔枝(*Litchi chinensis* Sonn)的干燥成熟种

子, 主产于广东、广西等地。其味甘、微苦, 归肝、肾经, 具有行气散结、祛寒止痛之功效。文献报道荔枝核提取物有抗肿瘤、抗病毒、保肝和降糖调脂等作用^[1-4]。荔枝核黄酮类化合物对乙型肝炎病毒、呼吸道合胞病毒、流感病毒和单纯疱疹病毒有明显的抑制作用^[5-8]。对于荔枝核在保肝的基础上是否具有延缓、阻止、甚至逆转肝纤维化进展的作用未见报道。本实验通过建立肝纤维化大鼠模型, 观察荔枝核总黄酮(total flavone from *Litchi chinensis* Sonn, TFL)对肝纤维化大鼠血清及肝组织学肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体(tumor necrosis factor related apoptosis-inducing ligand, TRAIL)变化, 旨在探讨TFL的抗肝纤维化作用及可能的作用机制。

1 材料和方法

1.1 材料 清洁级SD大鼠100只, ♂, 体质量250 g \pm 20 g, 购自桂林医学院实验动物中心。大鼠TRAIL ELISA试剂盒购自上海西唐生物有限公司。美国Santa Cruz公司的大鼠TRAIL单克隆抗体。免疫组织化学检测试剂盒购自福州迈新生物技术开发有限公司。大鼠肝纤维化诊断试剂盒, 包括透明质酸(hyaluronic acid, HA)、层粘连蛋白(laminin, LN)以及Ⅲ型前胶原(type III procollagen, PCⅢ)放射免疫分析测定盒, 均购自上海海研医学生物技术有限公司。荔枝核总黄酮: 由桂林医学院药理实验室提取分离, 将荔枝核干粉用500 mL/L乙醇回流提取, 得到总提取物浸膏, 用水将其溶解后, 水溶部分过D-101大孔树脂, 用800 mL/L乙醇洗脱, 洗脱物减压旋干后, 再用无水乙醇回流、过滤、减压旋干得到E部分, 取E部分经干燥制成粉末, E部分经定性试验和盐酸-镁粉检测为黄酮类化合物, 经分光光度计法检测, 总黄酮含量达853 g/kg^[9], 用蒸馏水稀释为40 g/L和20 g/L两种溶液; 水飞蓟素(利加隆)胶囊: 购自德国马博士大药厂(批号H20060041), 每颗胶囊含水飞蓟素(Silymarin, SL)140 mg。将胶囊内粉末状药品用蒸馏水稀释为10 g/L^[9]。

1.2 方法

1.2.1 造模及分组: 参见文献[10]制备胆管阻塞性肝纤维化大鼠模型, 100只大鼠随机分为5组, 每组20只。肝纤维化模型组: 大鼠腹部皮肤常规消毒, 沿腹正中线切开, 游离胆总管并双重结扎后于节间切断, 而后关腹, 制备模型后第2天用生理盐水灌胃, 每日1次, 每次5 mL/kg, 4 wk后抽取

■ 研发前沿

文献报道荔枝核提取物有抗肿瘤、抗病毒、保肝和降糖调脂等作用, 且荔枝核黄酮类化合物(TFL)对乙型肝炎病毒等多种病毒有明显的抑制作用。对于荔枝核在保肝的基础上是否具有延缓、阻止、甚至逆转肝纤维化进展的作用未见报道。

■ 相关报道

Yamashita等报道在肝纤维化硬化过程中肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体(TRAIL)作为一种病理因子出现,其作用是诱导肝实质细胞凋亡,促进肝纤维化肝硬化的发展。梁艳等研究发现,原发性胆汁性肝硬化患者及乙型肝炎肝硬化患者外周血单个核细胞中TRAIL基因表达水平明显升高,TRAIL在自身免疫性肝病及肝脏病毒损伤中均具有重要作用,不同病因导致的肝硬化均有TRAIL的基因表达增加,认为TRAIL与慢性肝病的发病有关。

表 1 荔枝核总黄酮抗肝纤维化大鼠血清TRAIL、HA、LN、PCⅢ测定结果 (mean ± SD)

分组	n	TRAIL(ng/L)	HA(μg/L)	LN(μg/L)	PCⅢ(μg/L)
假手术组	20	5.83 ± 2.42 ^a	105.76 ± 3.16 ^a	7.31 ± 0.79 ^a	31.78 ± 2.33 ^a
模型组	14	42.99 ± 14.39	788.70 ± 83.98	26.66 ± 2.41	74.32 ± 2.43
SL组	18	7.02 ± 1.09 ^a	109.64 ± 6.50 ^a	8.68 ± 1.05 ^a	33.06 ± 3.23 ^a
TFL大剂量组	17	7.11 ± 0.99 ^a	103.03 ± 2.33 ^a	12.43 ± 1.45 ^a	31.07 ± 3.04 ^a
TFL小剂量组	19	41.03 ± 9.88	714.54 ± 16.82	26.48 ± 2.99	73.38 ± 1.83

^aP<0.05 vs 模型组。

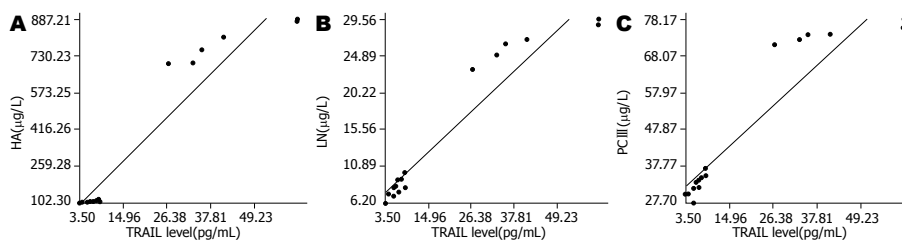


图 1 血清TRAIL水平与HA、LN、PCⅢ的相关性。A: HA; B: LN; C: PCⅢ。

下腔静脉血,取大鼠肝脏组织,置于甲醛液中固定制备石蜡标本。假手术对照组:打开腹腔并游离胆总管,不结扎不切断胆总管。术后第2天用生理盐水灌胃,每日1次,每次5 mL/kg,4 wk后同上处理。SL给药组:制备模型后第2天起用SL灌胃[50 mg/(kg·d)]^[11],每日1次,4 wk后同上处理。TFL大剂量给药组:制备模型后第2天起用TFL灌胃[200 mg/(kg·d)],每日1次,4 wk后同上处理。TFL小剂量给药组:制备模型后第2天起用TFL灌胃[100 mg/(kg·d)],每日1次,4 wk后同上处理。

1.2.2 观察指标: (1)肝病理学检查:肝组织HE染色和Masson胶原染色,并按照国际上通用的Ishak评分标准^[12]对肝组织纤维化程度进行评分。Ishak评分标准分为7级,正常肝组织无纤维化,计为0分;有些汇管区纤维化,有或无短纤维隔,计为1分;汇管区纤维化,纤维隔形成,计为2分;多数汇管区纤维化,偶有汇管-汇管桥接纤维化,计为3分;汇管区纤维化伴明显汇管-汇管桥接纤维化和汇管-中央桥接纤维化,计为4分;明显汇管-汇管桥接纤维化/汇管-中央桥接纤维化,偶有结节,计为5分;可能或肯定肝硬化,计为6分。(2)ELISA法检测血清TRAIL水平;RIA法检测血清HA、LN、PCⅢ。(3)采用免疫组织化学法(SABC法)检测肝组织TRAIL表达情况。严格按照产品说明书规范进行操作。结果判断:光镜下高倍视野(40×10)观察,细胞膜或胞质棕黄色着染者为阳性,细胞着染数量<25%为阴性(-),25%-50%为弱阳性(+),>50%为强阳性(++).

统计学处理 采用SPSS11.5统计软件进行数

据的统计分析,血清TRAIL、HA、LN、PCⅢ含量结果以mean±SD表示,先进行数据的正态性检验及方差齐性检验,符合上述条件的行单因素方差分析,组间比较应用Student-Newman-Keuls检验,各指标间相关分析采用Pearson相关检验,P<0.05认为差异有显著性意义。

2 结果

2.1 一般情况 实验过程中共有12只大鼠死亡,死亡的大鼠当即解剖尸检并且行病理切片检查,11只大鼠均于术后第2天死于急性肝衰竭,1只大鼠于术后第7天死于腹部切口感染,所有死亡动物均不进入数据统计。

2.2 各组大鼠血清TRAIL、HA、LN、PCⅢ水平 TFL大剂量给药组、假手术组和水飞蓟素组血清TRAIL均明显低于模型组,具有显著性差异(P<0.05),TFL大剂量给药组、假手术组和水飞蓟素组血清肝纤维化指标HA、LN、PCⅢ均明显低于模型组,具有显著性差异(P<0.05),TFL小剂量给药组血清TFL、HA、LN、PCⅢ与模型组比较无显著性差异(P>0.05,表1)。

2.3 血清TRAIL水平与HA、LN、PCⅢ的相关性分析 血清TRAIL水平与HA、LN、PCⅢ均呈正相关(r=0.96、0.96、0.93,均P<0.01,图1)。相关方程分别是:TRAIL与HA: Y = 35.7827+16.3082X; TRAIL与LN: Y = 6.1008+0.447X; TRAIL与PCⅢ: Y = 28.6514+0.9741X。

2.4 肝病理学检查结果 HE染色:与假手术组比较,模型组可见汇管区、汇管区之间、汇管区

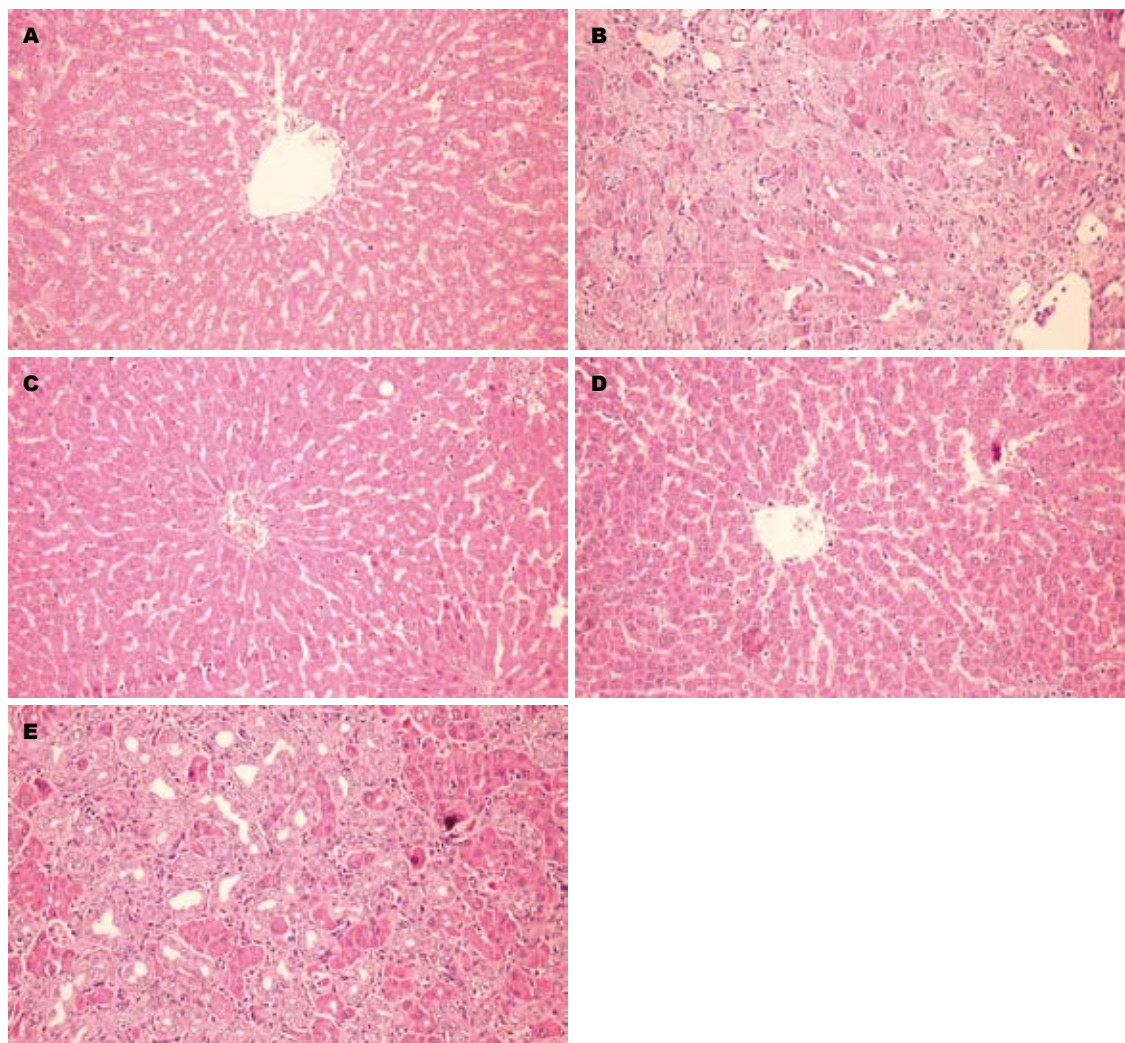


图2 各组大鼠HE染色图片($\times 400$)。A: 假手术组; B: 模型组; C: SL组; D: TFL大剂量组; E: TFL小剂量组。

■创新盘点

对于荔枝核在保肝的基础上是否具有延缓、阻止、甚至逆转肝纤维化进展的作用未见报道。本实验通过建立肝纤维化大鼠模型, 观察荔枝核总黄酮对肝纤维化大鼠血清及肝组织TRAIL变化, 结果表明, 荔枝核总黄酮[200 mg/(kg·d)]能抑制肝纤维化大鼠TRAIL、HA、LN、PCⅢ的表达, 并改善胆总管结扎大鼠肝组织纤维化程度。

与中央静脉之间胆小管弥漫性增生, 正常肝小叶结构少见; TFL大剂量给药组和水飞蓟素组均可见汇管区、汇管区之间、汇管区与中央静脉之间胆小管少量增生, 汇管区增生较模型组明显缩小; TFL小剂量给药组可见汇管区、汇管区之间、汇管区与中央静脉之间胆小管弥漫性增生, 坏死肝细胞较模型组少, 而较TFL大剂量给药组和水飞蓟素组多; Masson染色: 模型组可见大量胶原沉积于胆管周围, 在汇管区之间、汇管区之间、汇管区与中央静脉之间形成完整的纤维间隔, 肝实质内有程度不等的胶原沉积, 仅在中央静脉周围存留肝细胞, 肝细胞与增生的胆小管相比明显减少。TFL大剂量给药组和水飞蓟素组可见有少量胶原沉积于胆管周围, 在汇管区之间、汇管区之间、汇管区与中央静脉之间纤维间隔多不完整, 肝实质内有少量胶原沉积。TFL小剂量给药组可见大量胶原沉积于胆管周围, 但汇管区之间、汇管区之间、汇管区与

中央静脉之间未形成完整的纤维间隔, 分布较凌乱。Ishak评分模型组为4分, 假手术组为0分, TFL大剂量给药组和水飞蓟素组Ishak评分为均1分, TFL小剂量给药组Ishak评分为3分(图2, 3)。

2.5 TRAIL免疫组织化学染色分析 光镜下高倍视野(SABC $\times 400$)观察, TRAIL在肝组织中表达的阳性反应产物呈棕黄色, 肝细胞细胞膜和胞质均有分布。假手术组(-): 肝内TRAIL几乎无表达; TFL小剂量给药组和模型组(++): 肝内TRAIL表达明显增强, 阳性细胞数目明显增多, 主要见于肝实质细胞、炎性细胞以及间质细胞, 阳性物质主要集中在胞质内, 胞膜上也有少量表达。TFL大剂量给药组和水飞蓟素给药组(+): 肝内TRAIL表达量减少, 接近正常肝组织水平, 阳性表达集中在汇管区、间质细胞和炎性细胞胞质内, 阳性程度弱于模型组(图4)。

3 讨论

肝纤维化是各种慢性肝病发展为肝硬化的共

■应用要点

本实验旨在探讨荔枝核总黄酮(TFL)的抗肝纤维化作用及可能的作用机制,结果表明,TFL可抑制或延缓肝纤维化的发展,并推测TFL改善肝纤维化可能与TRAIL的表达有关.TFL抗肝纤维化的有效成分、作用机制、体内过程等还需要进一步的研究.

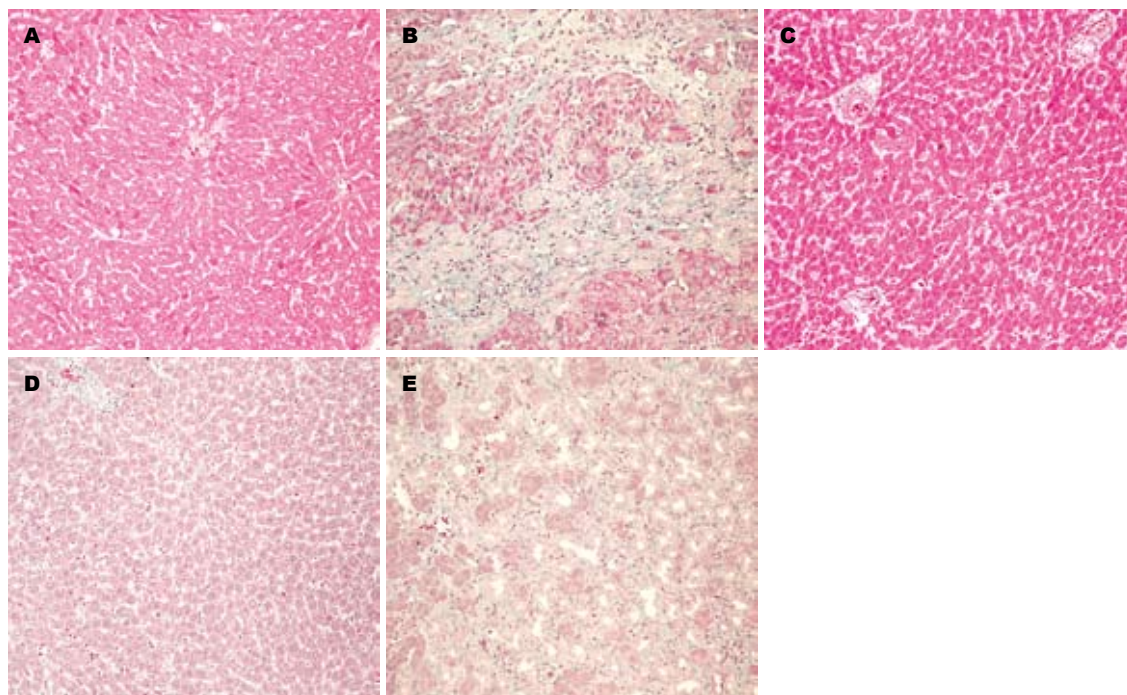


图 3 各组大鼠Masson染色图片($\times 400$). A: 假手术组; B: 模型组; C: SL组; D: TFL大剂量组; E: TFL小剂量组.

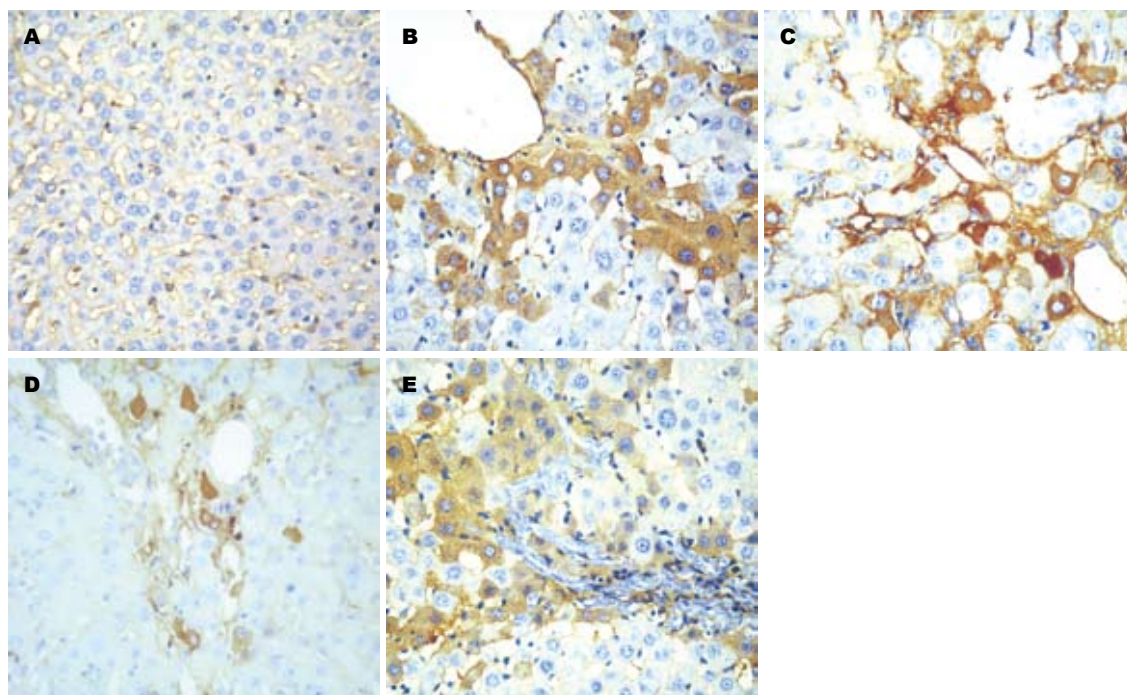


图 4 各组大鼠TRAIL免疫组织化学染色图片(SABC $\times 400$). A: 假手术组; B: 模型组; C: SL组; D: TFL大剂量组; E: TFL小剂量组.

同病理基础,肝实质细胞损伤坏死和肝间质细胞增生[主要是肝星状细胞(hepatic stellate cell, HSC)]是其发生的主要机制. Yamashita等^[13]报道在肝纤维化硬化过程中TRAIL作为一种病理性因子出现,其作用是诱导肝实质细胞凋亡,促进肝纤维化肝硬化的发展. 梁艳等^[14]研究发现,原发性胆汁性肝硬化患者及乙型肝炎肝硬化患者

外周血单个核细胞中TRAIL基因表达水平明显升高,TRAIL在自身免疫性肝病及肝脏病毒损伤中均具有重要作用,不同病因导致的肝硬化均有TRAIL的基因表达增加,认为TRAIL与慢性肝病的发病有关. 本实验结果显示,模型组血清TRAIL显著高于假手术对照组,血清TRAIL水平与血清HA、LN、PCIII呈正相关,血清TRAIL水

平与肝组织中TRAIL表达一致,提示TRAIL可能在肝纤维化发生发展过程中起促进作用。

当各种致病因子作用于肝脏,受损肝细胞通过产生并释放氧自由基、脂质过氧化物、蛋白酶、细胞因子和生长因子等,直接或间接地损害邻近的肝脏细胞,并引起肝库普弗细胞、肝窦内皮细胞、血小板、和肝细胞分泌更多种细胞因子,从而导致恶性循环,当阻断其中的环节,可以有效地缓解肝纤维化进程。氧自由基、过氧化物等在不同肝脏疾病的发生、发展过程中起着重要的作用,因而抗氧化损伤是治疗肝纤维化的一个重要环节。

水飞蓟素是一种生物类黄酮,具有强力抗氧化性^[15,16],主要是通过对抗氧化应激和脂质过氧化下调多种因素对HSC的激活,在BDO肝纤维化模型中则通过抑制细胞因子的表达,抑制HSC的激活,减少肝胶原含量^[17]、下调转化生长因子 β (transforming growth factor- β , TGF β)、前胶原 α 1(procollagen α 1)和基质金属蛋白酶组织抑制因子1(tissue inhibitor of metalloproteinase-1, TIMP-1)的mRNA水平^[17],促进细胞外基质的降解,所以本实验将水飞蓟素给药组作为阳性对照组。

肖柳英等^[18]的实验研究结果发现荔枝核高、低剂量组均能明显降低CCl₄急性肝损伤模型小鼠血清丙二醛(maleic dialdehyde, MDA)含量的明显降低;MDA为脂质过氧化的产物,其含量高低可反映体内脂质过氧化的程度;血清的超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)的活性均升高,提示荔枝核对急性肝损伤有保护作用。徐庆等^[5]研究提示TFL具有明显的抗炎、保肝作用。

本实验结果,TFL大剂量给药组、假手术对照组和水飞蓟素组血清TRAIL、HA、LN、PCIII均显著低于模型组,肝组织病理学检查显示肝纤维化程度得到明显改善。表明一定药物浓度的TFL可抑制或延缓肝纤维化的发展,并推测TFL改善肝纤维化可能与TRAIL的表达有关。TFL抗肝纤维化的有效成分、作用机制、体内过程等还需要进一步的研究。

4 参考文献

1 肖柳英,洪晖菁,潘竞锵,吕俊华,张世平.荔枝核的抑瘤作用及对肝癌组织端粒酶活性的影响.中国药

- 2007; 18: 1366-1368
- 2 王辉,陶小红,王洋,黄雪松,郭国庆,沈伟哉.荔枝核提取物体外抗病毒活性及其机制研究.中国药科大学学报 2008; 39: 437-441
- 3 肖柳英,潘竞锵,饶卫农,韩超,谭海荣,萧丽珊,梁立帆,江燕梅.荔枝核颗粒对小鼠肝损伤保护作用的实验研究.中华中医药杂志 2005; 20: 42-43, 47
- 4 张永明,袁红,田菊霞,沈礼,余海泳,尹洪萍,范超明.荔枝核皂甙提取物对小鼠糖异生作用和血脂代谢的影响.杭州师范学院学报(自然科学版) 2005; 4: 435-436
- 5 徐庆,宋芸娟,李丽亚,侯巧燕.荔枝核总黄酮的抗鸭乙型肝炎病毒作用.世界华人消化杂志 2005; 13: 2082-2085
- 6 梁荣感,刘卫兵,唐祖年,徐庆.荔枝核黄酮类化合物体外抗呼吸道合胞病毒的作用.第四军医大学学报 2006; 27: 1881-1883
- 7 罗伟生,龚受基,梁荣感,徐庆.荔枝核黄酮类化合物体外抗流感病毒作用的研究.中国中药杂志 2006; 31: 1379-1380
- 8 魏金亮,许珍,王璐,谢超胜,赵颖岚,刘伟,侯炜,汪晖.荔枝核黄酮体外抗单纯疱疹病毒的作用.武汉大学学报(医学版) 2009; 30: 89-92
- 9 王宇,贾继东,马雪梅,杨寄华,马红,王宝恩.水飞蓟素、己酮可可碱对大鼠胆管阻塞性肝纤维化的疗效及机制.胃肠病学和肝病学杂志 2007; 16: 51-56
- 10 Raetsch C, Jia JD, Boigk G, Bauer M, Hahn EG, Riecken EO, Schuppan D. Pentoxifylline downregulates profibrogenic cytokines and procollagen I expression in rat secondary biliary fibrosis. *Gut* 2002; 50: 241-247
- 11 Jia JD, Bauer M, Cho JJ, Ruehl M, Milani S, Boigk G, Riecken EO, Schuppan D. Antifibrotic effect of silymarin in rat secondary biliary fibrosis is mediated by downregulation of procollagen alpha1(I) and TIMP-1. *J Hepatol* 2001; 35: 392-398
- 12 Ishak K, Baptista A, Bianchi L, Callea F, De Groote J, Gudat F, Denk H, Desmet V, Korb G, MacSween RN. Histological grading and staging of chronic hepatitis. *J Hepatol* 1995; 22: 696-699
- 13 Yamashita Y, Shimada M, Tanaka S, Okamamoto M, Miyazaki J, Sugimachi K. Electroporation-mediated tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)/Apo2L gene therapy for hepatocellular carcinoma. *Hum Gene Ther* 2002; 13: 275-286
- 14 梁艳,杨再兴,王燕,李畅,曹伟娟,仲人前.原发性胆汁性肝硬化患者血浆可溶型肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体的表达及临床意义.第二军医大学学报 2007; 28: 151-153
- 15 Schuppan D, Hahn EG. Clinical studies with silymarin: fibrosis progression is the end point. *Hepatology* 2001; 33: 483-484
- 16 Saller R, Meier R, Brignoli R. The use of silymarin in the treatment of liver diseases. *Drugs* 2001; 61: 2035-2063
- 17 Boigk G, Stroedter L, Herbst H, Waldschmidt J, Riecken EO, Schuppan D. Silymarin retards collagen accumulation in early and advanced biliary fibrosis secondary to complete bile duct obliteration in rats. *Hepatology* 1997; 26: 643-649
- 18 肖柳英,潘竞锵,饶卫农,韩超,肖丽珊.荔枝核对小鼠肝炎动物模型的实验研究.中国实用医药 2006; 1: 11-12, 112

■同行评价

本研究为新药开发,选题新颖,有一定的临床参考价值。

编辑 曹丽鸥 电编 何基才

SUMO-1 siRNA对肝癌细胞SMMC-7721 *p53*基因表达的影响

郭武华, 袁丽华, 肖志华, 罗良平, 余婷, 张吉翔

■背景资料

SUMO修饰调节许多和癌症发生发展相关蛋白质的功能, 在癌症的发生发展中发挥重要的作用。前期研究发现, 在肝癌细胞株及临床肝癌标本中SUMO-1基因均显著高表达, 而在癌旁肝组织中SUMO-1基因表达明显较低, 因此推测SUMO-1基因在肝癌的发生发展中具有重要的作用。

郭武华, 罗良平, 余婷, 南昌大学第二附属医院肿瘤科 江西省分子医学重点实验室 江西省南昌市 330006
袁丽华, 肖志华, 张吉翔, 南昌大学第二附属医院消化科 江西省分子医学重点实验室 江西省南昌市 330006
郭武华, 副教授, 主任医师, 硕士生导师, 主要从事原发性肝癌的综合治疗及肿瘤的介入治疗研究。

国家自然科学基金资助项目, No. 30360037

江西省教育厅科技支撑基金资助项目, No. GJJ09107

作者贡献分布: 此课题由张吉翔与郭武华设计; 研究过程由郭武华、袁丽华及肖志华操作完成; 研究所用试剂及分析工具由张吉翔提供; 数据分析由张吉翔与郭武华完成; 本论文写作由郭武华完成。

通讯作者: 张吉翔, 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科, 江西省分子医学重点实验室。

jixiangz@tom.com

电话: 0791-6292706 传真: 0791-6262262

收稿日期: 2010-03-05 修回日期: 2010-06-04

接受日期: 2010-06-07 在线出版日期: 2010-07-18

siRNA-mediated knockdown of the SUMO-1 gene down-regulates mutant *p53* expression in hepatocellular carcinoma cell line SMMC-7721

Wu-Hua Guo, Li-Hua Yuan, Zhi-Hua Xiao,
Liang-Ping Luo, Ting Yu, Ji-Xiang Zhang

Wu-Hua Guo, Liang-Ping Luo, Ting Yu, Department of Oncology, the Second Affiliated Hospital of Nanchang University; Jiangxi Provincial Key Laboratory of Molecular Medicine, Jiangxi 330006, Nanchang Province, China
Li-Hua Yuan, Zhi-Hua Xiao, Ji-Xiang Zhang, Department of Gastroenterology, the Second Affiliated Hospital of Nanchang University; Jiangxi Provincial Key Laboratory of Molecular Medicine, Jiangxi 330006, Nanchang Province, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30360037; and the Science and Technology Foundation of Education Department of Jiangxi Province, No. GJJ09107

Correspondence to: Professor Ji-Xiang Zhang, Department of Gastroenterology, the Second Affiliated Hospital of Nanchang University; Jiangxi Provincial key Laboratory of Molecular Medicine, Jiangxi 330006, Nanchang Province, China. jixiangz@tom.com

Received: 2010-03-05 Revised: 2010-06-04

Accepted: 2010-06-07 Published online: 2010-07-18

Abstract

AIM: To determine whether the SUMO-1 gene controls the expression of mutant *p53* in hepatocellular carcinoma cell line SMMC-7721,

and whether siRNA-mediated SUMO-1 knockdown inhibits the proliferation of SMMC-7721 cells.

METHODS: Synthetic SUMO-1 siRNA was transfected into SMMC-7721 cells to silence the expression of the SUMO-1 gene. The expression level of mutant *p53* in SMMC-7721 cells was detected by RT-PCR and Western blot experiments after SUMO-1 down-regulation. SMMC-7721 cell proliferation was examined by MTT assay at 24, 48 and 72 h after siRNA transfection.

RESULTS: Both SUMO-1 and mutant *p53* were highly expressed in SMMC-7721 cells. The expression of mutant *p53* was down-regulated coincidentally with SUMO-1 silencing in SMMC-7721 cells. The expression of mutant *p53* in SMMC-7721 cells at 24, 48 and 72 h after siRNA transfection decreased by $5.73\% \pm 0.61\%$, $69.43\% \pm 1.22\%$ and $57.71\% \pm 0.94\%$, respectively. SUMO-1 knockdown inhibits the proliferation of SMMC-7721 cells. The reduced rates of cell proliferation at 24, 48 and 72 h after siRNA transfection were 70.96%, 71.57% and 81.56%, respectively.

CONCLUSION: SUMO-1 controls SMMC-7721 cell proliferation possibly by regulating the expression of mutant *p53* at the transcriptional level.

Key Words: SUMO-1; *p53*; Gene; Mutation; Hepatocellular carcinoma

Guo WH, Yuan LH, Xiao ZH, Luo LP, Yu T, Zhang JX. siRNA-mediated knockdown of the SUMO-1 gene down-regulates mutant *p53* expression in hepatocellular carcinoma cell line SMMC-7721. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(20): 2090-2094

摘要

目的: 研究肝癌细胞SMMC-7721中SUMO-1基因对突变型*p53*基因表达的影响, 及SUMO-1基因对肝癌细胞增殖的作用。

方法: 通过将有效的人工合成的SUMO-1

■同行评议者

范学工, 教授, 中南大学湘雅医院感染病科

siRNA转染肝癌细胞SMMC-7721后沉默SUMO-1基因的表达. 通过RT-PCR及Western blot实验来观察SUMO-1基因表达下调后对SMMC-7721中突变型*p53*基因表达的影响. 通过MTT实验来检测SUMO-1 siRNA转染SMMC-7721后在24、48及72 h对细胞增殖的影响.

结果: 在SMMC-7721中, SUMO-1和突变型*p53*基因均高表达. SUMO-1基因表达下调后, SMMC-7721中突变型*p53*基因在mRNA及蛋白水平同步表达下调, 24、48及72 h表达下调率分别为 $5.73\% \pm 0.61\%$ 、 $69.43\% \pm 1.22\%$ 及 $57.71\% \pm 0.94\%$. 细胞增殖明显受到抑制, 24、48及72 h SMMC7721增殖抑制率分别为70.96%、71.57%及81.56%.

结论: 在转录水平, SUMO-1基因控制突变型*p53*基因的表达, 并和突变型*p53*基因共同控制SMMC-7721细胞的增殖.

关键词: SUMO-1; *p53*; 基因; 突变; 肝癌

郭武华, 袁丽华, 肖志华, 罗良平, 余婷, 张吉翔. SUMO-1 siRNA对肝癌细胞SMMC-7721 *p53*基因表达的影响. 世界华人消化杂志 2010; 18(20): 2090-2094
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/2090.asp>

0 引言

SUMO-1是SUMO(small ubiquitin-like modifier)家族成员之一, 主要作用为参与蛋白翻译后功能的修饰, 在转录、DNA修复、核质物质转运及染色体分离等方面发挥重要的调节作用^[1,2]. SUMO-1基因与许多癌症发生发展相关因素关系密切, 增殖细胞核抗原、雌激素受体、*p53*、NF- κ B信号调节、端粒酶长度的维持都受到SUMO-1蛋白的调节. 抑癌基因*p53*在细胞的发生、分化、凋亡等方面发挥重要的作用, 如果*p53*基因活性被抑制, 细胞就容易发生癌变. *p53*基因缺失或突变可引起多种癌症的发生, 但如失活的*p53*基因重新被激活, 就可能使肿瘤的生长受到抑制甚至消亡. SUMO-1修饰可抑制*p53*基因的活性^[3,4], 促进癌症的发生发展. 研究发现, 在肝癌传代细胞株SMMC-7721中*p53*基因明显的高表达, 由于野生型P53蛋白的半衰期极短(仅约6 min), 而突变型P53蛋白相对稳定, 因此在SMMC-7721中的是突变型*p53*基因的表达^[5-7]. 我们前期研究发现在肝癌细胞SMMC-7721中SUMO-1基因明显高表达^[8], 本研究旨在探讨在

SMMC-7721细胞中SUMO-1基因和*p53*基因表达的关系.

1 材料和方法

1.1 材料 肝癌细胞株SMMC-7721购自中国典型培养物保藏中心. 培养条件: SMMC-7721培养在含100 mL/L胎牛血清(PAA)、100 kU/L青霉素和100 mg/L链霉素的RPMI 1640(Invitrogen)培养液中, 培养箱条件为37 °C, 饱和湿度, 50 mL/L CO₂. PCR热循环仪(GeneAmp® PCR System 9600), Western blot仪器(Bio-Rad), GeneGenius Match(syngene)全自动凝胶成像分析系统, 酶标仪(DENLEY MK-2). RNA提取试剂TRIzol(Invitrogen); RT-PCR试剂: Oligo(dT)(Promega), M-MLV RT 5× Buffer(Promega), dNTP(Generay Biotech), Rnase抑制剂(Promega), M-MLV逆转录酶(Promega), Master Mix(2×Taq PCR)(Tiangen), DNA ladder(Tiangen); Western blot试剂: 总蛋白提取试剂(applygen), SUMO-1一抗(兔多克隆抗体, ABZOOM), β -actin一抗(兔多克隆抗体, Santa Cruz), P53一抗(兔多克隆抗体, Santa Cruz), 二抗(羊抗兔, ZSGB-B10); Lipofectamine™ 2000 Transfection Reagent(Invitrogen), MTT(Sigma). 从网址<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>的GenBank中获得人SUMO-1、*p53*和 β -actin基因序列, 应用Primer Premier 5.0软件设计引物, 由Generay Biotech公司合成, 各引物序列见表1. 设计三对针对SUMO-1 mRNA序列的siRNA, 靶序列编码分别为001: 5'-CAAGAACTCAAAGAATCA-3', 002: 5'-GGAAGAAGATGTGATTGAA-3', 003: 5'-CAATGAATTCACCTCAGGTT-3', 由广州锐博生物(ribobio)合成. 荧光标记的siRNA(FAM-siRNA)及阴性对照siRNA(NControl)购自广州锐博生物.

1.2 方法

1.2.1 肝癌细胞SMMC-7721 siRNA转染效率检测实验: FAM-siRNA分3个终浓度, 分别是30、50和100 nmol/L并设空白对照组. 按操作说明用不含血清的RPMI 1640稀释适当量的Lipofectamine™ 2000和FAM-siRNA, 混合形成FAM-siRNA转染试剂混合液, 加入肝癌细胞SMMC-7721密度为30%-40%的12孔板中, 轻轻摇晃混合. 在37 °C的CO₂培养箱中培养6-8 h即可在荧光显微镜下观察转染效率. 经重复实验确定在终浓度100 nmol/L荧光强度最强, 几乎所

■ 研发前沿

在肝癌细胞株SMMC-7721中, 突变型*p53*显著高表达. 由于SUMO-1修饰具有抑制细胞内*p53*水平的作用, 促进癌症的发生与发展, 研究SUMO-1基因表达与突变型*p53*基因表达之间的关系具有重要的意义.

■相关报道

研究显示, SUMO基因参与许多蛋白质翻译后功能的调节, 许多和癌症发生发展相关的蛋白质存在SUMO修饰. 在肝癌及其传代细胞中, SUMO-1基因显著地高表达, 抑制SUMO-1基因的表达可显著地抑制肝癌的生长.

表 1 PCR反应引物

基因	引物序列	产物长度(bp)
SUMO-1	正义 5'-AGGAGGCAAAACCTTCAACT-3'	245
	反义 5'-TTCTTCCTCCATCCCAGTT-3'	
<i>p53</i>	正义 5'-TTGAGGTGCGTGTGTTGTG-3'	335
	反义 5'-TTTATGGCGGGAGGTAGA-3'	
β -actin	正义 5'-ACACTGTGCCCATCTACGAGG-3'	621
	反义 5'-AGGGGCCGGACTCGTCATACT-3'	

有细胞都有荧光.

1.2.2 有效SUMO-1基因siRNA片段筛查实验: 实验分6组, 分别为待筛查的3对siRNA和阴性对照(NControl)组、脂质体(Lipofectamine)组及空白对照组(Blank组). 转染终浓度为100 nmol/L, 按操作说明进行转染, 在转染后24、48、72 h分别提取RNA及总蛋白, 采用RT-PCR及Western blot检测SUMO-1基因的表达.

1.2.3 SUMO-1基因沉默后*p53*基因的表达: 在SUMO-1 siRNA转染后24、48、72 h时分别提取RNA及总蛋白, 采用RT-PCR及Western blot检测*p53*基因的表达, 以正常细胞作为对照. 采用TRIzol提取各组SMMC-7721总RNA, 逆转录合成cDNA. PCR扩增每组*p53*基因的表达, 以 β -actin作为内参照. *p53* PCR第1阶段通过94 °C 5 min预变性, 然后94 °C 35 s、56 °C 35 s、72 °C 35 s 30个循环, 第3阶段72 °C延迟延伸7 min. 将各组SMMC-7721裂解, 提取总蛋白. SDS-PAGE聚丙烯酰胺凝胶电泳, 蛋白通过电转移至硝酸纤维素膜上. 用50 g/L脱脂奶粉封闭2 h, 用P53一抗孵育过夜, 二抗孵育2 h, 电化学发光试剂显色, 经曝光、显影、定影后通过GeneGenius Match全自动凝胶成像分析系统测条带的灰度值, 以各自 β -actin值为参照, 计算P53蛋白的表达量.

1.2.4 四甲基偶氮唑盐(MTT)实验: siRNA组: 有效的SUMO-1基因siRNA组; NControl组: 阴性对照组; Lipofectamine组: 单用LipofectamineTM 2000组; Blank组: 空白对照组. 在96孔板接种SMMC-7721, 在转染时细胞比例为30%-40%, 每组3个孔. 按操作说明转染24、48及72 h后去掉培养基, 加入用无血清1640配制的5 g/L的MTT溶液100 μ L/孔, 在37 °C的CO₂培养箱中温育4 h后去掉上清液, 每孔加入二甲亚砜溶液200 μ L, 在平板摇床上摇20 min, 使用酶标仪测定吸光度值(A), 检测波长450 nm. 本实验重复3次.

统计学处理 数据以mean \pm SD表示, 应用SPSS12.0统计软件进行数据处理, 采用两样本比

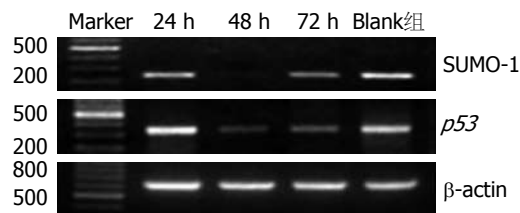
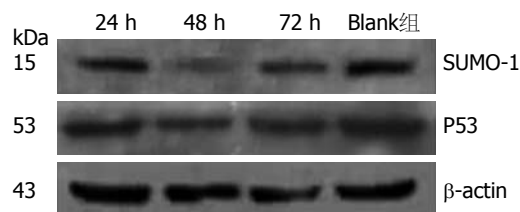
图 1 SUMO-1 siRNA干扰后SUMO-1及*p53* mRNA的表达.

图 2 SUMO-1 siRNA干扰后SUMO-1及P53蛋白的表达.

较的*t*检验进行统计分析, 以 $P<0.05$ 判定差异有统计学意义.

2 结果

2.1 SUMO-1与*p53*基因的表达 针对靶序列5'-CAAGAACTCAAAGAATCA-3'的001 siRNA SUMO-1沉默效果最好, 24 h RT-PCR测得沉默效果最高为9.80%, 48 h沉默效果最高为73.43%, 72 h沉默效果最高为46.56%, 达到实验的要求(图1). Western blot检测SUMO-1蛋白的表达变化和RT-PCR的变化规律一致(图2). *p53*基因在siRNA导致SUMO-1基因沉默后这些基因的表达也明显下调, 24、48及72 h表达下调率分别为5.73% \pm 0.61%、69.43% \pm 1.22%及57.71% \pm 0.94%, 变化规律和SUMO-1表达水平一致(图1, 2).

2.2 MTT实验各组*A*值 siRNA组和其他组*A*值在24、48及72 h均差别明显, 24、48及72 h SMMC-7721增殖抑制率分别为70.96%、71.57%及81.56%($P<0.001$, 图3, 表2).

3 讨论

SUMO蛋白是Ublp(ubiquitin-like protein)蛋白

表 2 MTT实验各组的4值

	RNA干扰组	阴性对照组	脂质体组	空白对照组
24 h	0.027 ± 0.0023	0.084 ± 0.0078	0.088 ± 0.0071	0.093 ± 0.008
48 h	0.058 ± 0.0036	0.169 ± 0.0046	0.197 ± 0.0086	0.204 ± 0.012
72 h	0.064 ± 0.0069	0.335 ± 0.0145	0.325 ± 0.0021	0.347 ± 0.022

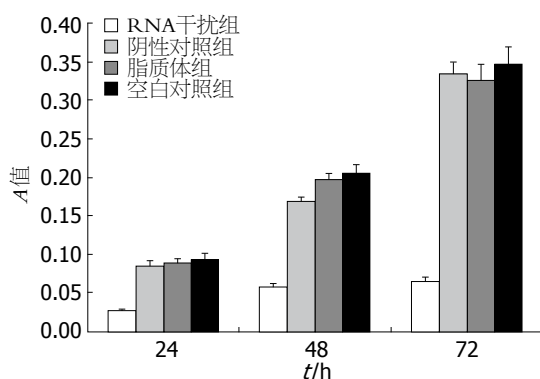


图 3 MTT实验各组4值.

家族中的一员, 主要参与蛋白翻译后功能的修饰(SUMOylation). SUMO在进化中高度保守, 目前在脊椎动物中至少发现4种SUMO家族蛋白, 分别是SUMO-1、SUMO-2、SUMO-3和SUMO-4. SUMO-2和SUMO-3结构有96%相同, 而SUMO-2/3和SUMO-1仅有46%的结构相同^[1]. SUMO和泛素竞争结合同一底物的同一个作用点^[9], 因此被SUMO修饰的蛋白不能再和泛素结合. 和其他泛素样蛋白功能不同, SUMO结合到靶蛋白后不是引起靶蛋白降解, 而是通过和靶蛋白共价结合后调节靶蛋白的功能. SUMO-1广泛参与人类癌症相关基因功能的调节, 促进癌症的发生与发展^[3,10-13]. 因此, SUMO-1和癌症的发生、发展关系密切, 是癌症发生、发展的一个重要的调节因子.

*p53*基因是一种重要的抑癌基因, 是一种控制细胞周期的重要的启动因子, 在细胞的发生、分化及凋亡中发挥重要的作用. *p53*功能缺陷、抑制或突变的细胞容易发生癌变, 在人类50%以上的肿瘤组织中均发现了*p53*基因的突变, 这是肿瘤中最常见的遗传学改变, 说明该基因的改变很可能是人类肿瘤产生的主要发病因素. *p53*基因突变后, 由于其空间构象发生改变, 失去了对细胞生长、凋亡和DNA修复的调控作用, *p53*基因由抑癌基因转变为癌基因, 转而促进癌症的发生发展. 野生型P53蛋白在细胞内代谢的时间很短, P53蛋白的代谢和MDM2(murine

double minute-2)基因关系密切. MDM2一种具有环状结构的E3连接酶, 具有结合P53蛋白的作用, 并促进P53蛋白的泛素化及降解^[3], 因此, MDM2是*p53*基因的负调节因子. MDM2也是泛素的一个结合底物, MDM2和泛素结合后导致MDM2的降解^[14], 细胞内P53蛋白的浓度增加. 但MDM2蛋白发生SUMO-1修饰后, SUMO-1使MDM2分子不能再和泛素结合, 因此在细胞内有更多的MDM2和P53蛋白结合, 再经泛素化而导致P53蛋白浓度下降^[15]. 因此, SUMO-1基因是*p53*基因的负调节因子.

在SMMC-7721中, 文献报道及我们的研究证实*p53*基因都明显高表达^[5-7], 根据野生型P53蛋白代谢规律及其功能, 推测这种P53蛋白是一种突变的类型, 并具有促进SMMC-7721增殖的作用^[16,17]. 前期的研究证实肝癌细胞及临床肝癌中SUMO-1基因明显高表达, SUMO-1可能是肝癌潜在的一个诊断和治疗的靶点^[8]. 本研究进一步证实肝癌细胞SMMC-7721中同时存在SUMO-1和*p53*基因(突变型)的表达, 说明SUMO-1蛋白并不促进突变型P53蛋白的降解, 在促进SMMC-7721的发生发展上可能具有协同的作用. 通过RNAi的方法, 抑制SMMC-7721中SUMO-1基因的表达, 可导致肝癌细胞*p53*基因表达明显下调及细胞生长明显的受到抑制, SMMC-7721的生长明显和SUMO-1及突变型*p53*基因表达有关. 由于突变型*p53*基因在mRNA及蛋白的表达存在明显的同步性, 因此可以推测SUMO-1基因对突变型*p53*基因表达的控制主要作用在转录水平, SUMO-1基因在转录水平促进突变型*p53*基因的表达. 进一步研究SUMO-1基因如何控制突变型*p53*基因的表达可进一步揭示肿瘤发生发展的规律, 并为肿瘤的治疗找到新的靶点.

4 参考文献

- Di Bacco A, Ouyang J, Lee HY, Catic A, Ploegh H, Gill G. The SUMO-specific protease SENP5 is required for cell division. *Mol Cell Biol* 2006; 26: 4489-4498
- Martin S, Nishimune A, Mellor JR, Henley JM.

■应用要点

通过RNAi方法抑制肝癌细胞SMMC-7721中SUMO-1基因的表达, 来抑制突变型*p53*基因的表达, 对以突变型*p53*基因为治疗靶点来抑制肿瘤的发展具有一定的应用价值.

■同行评价

本研究设计合理, 结果可靠, 对进一步研究肝癌的发生机制, 及潜在的治疗靶点有一定的参考价值。

- 3 Carter S, Bischof O, Dejean A, Vousden KH. C-terminal modifications regulate MDM2 dissociation and nuclear export of p53. *Nat Cell Biol* 2007; 9: 428-435
- 4 Kim KI, Baek SH. SUMOylation code in cancer development and metastasis. *Mol Cells* 2006; 22: 247-253
- 5 李祺福, 唐剑, 刘庆榕, 石松林, 陈祥峰, 宋建晔. HMBA诱导人肝癌SMMC-7721细胞分化过程中Nucleophosmin的表达与定位变化. *中国生物化学与分子生物学报* 2008; 24: 172-179
- 6 Xu DH, Tang J, Li QF, Shi SL, Chen XF, Liang Y. Positional and expressive alteration of prohibitin during the induced differentiation of human hepatocarcinoma SMMC-7721 cells. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 5008-5014
- 7 马力, 张月宁. 鸦胆子油乳诱导肝癌细胞凋亡及对相关基因表达的影响. *世界华人消化杂志* 2004; 12: 559-562
- 8 郭武华, 袁丽华, 肖志华, 张吉翔. SUMO-1基因在肝癌中的表达及意义. *重庆医学* 2009; 38: 3115-3117
- 9 Ulrich HD. Mutual interactions between the SUMO and ubiquitin systems: a plea of no contest. *Trends Cell Biol* 2005; 15: 525-532
- 10 Buschmann T, Fuchs SY, Lee CG, Pan ZQ, Ronai Z. SUMO-1 modification of Mdm2 prevents its self-ubiquitination and increases Mdm2 ability to ubiquitinate p53. *Cell* 2000; 101: 753-762
- 11 Pfander B, Moldovan GL, Sacher M, Hoege C, Jentsch S. SUMO-modified PCNA recruits Srs2 to prevent recombination during S phase. *Nature* 2005; 436: 428-433
- 12 Karamouzis MV, Konstantinopoulos PA, Badra FA, Papavassiliou AG. SUMO and estrogen receptors in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2008; 107: 195-210
- 13 Xhemalce B, Riising EM, Baumann P, Dejean A, Arcangioli B, Seeler JS. Role of SUMO in the dynamics of telomere maintenance in fission yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; 104: 893-898
- 14 Song MS, Song SJ, Kim SY, Oh HJ, Lim DS. The tumour suppressor RASSF1A promotes MDM2 self-ubiquitination by disrupting the MDM2-DAXX-HAUSP complex. *EMBO J* 2008; 27: 1863-1874
- 15 Lee MH, Lee SW, Lee EJ, Choi SJ, Chung SS, Lee JI, Cho JM, Seol JH, Baek SH, Kim KI, Chiba T, Tanaka K, Bang OS, Chung CH. SUMO-specific protease SUSP4 positively regulates p53 by promoting Mdm2 self-ubiquitination. *Nat Cell Biol* 2006; 8: 1424-1431
- 16 孙宝华, 武忠弼, 阮幼冰, 杨木兰. 肝细胞癌mdm2基因表达及其与p53基因突变的关系. *世界华人消化杂志* 1999; 7: 291-294
- 17 Oren M, Rotter V. Mutant p53 gain-of-function in cancer. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2010; 2: a001107

编辑 曹丽鸥 电编 何基才

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2010年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

WJG 成功通过评审被 PMC 收录

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

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

吉西他滨联合免疫效应细胞对胰腺癌细胞BxPC-3生长的抑制

余少培, 杨 静

余少培, 杨静, 安康职业技术学院基础医学系 陕西省安康市 725000

余少培, 1985年陕西理工大学本科毕业, 主要从事肿瘤生物学与生物化学研究。

作者贡献分布: 余少培与杨静对此文所作贡献均等; 此课题由余少培与杨静设计; 研究过程由余少培与杨静操作完成; 研究所用新试剂及分析工具由余少培提供; 实验及数据分析由杨静完成; 本论文写作由余少培与杨静完成。

通讯作者: 余少培, 副教授, 725000, 陕西省安康市, 安康职业技术学院基础医学系. yushaopei2010@163.com

电话: 0915-3285006

收稿日期: 2010-04-04 修回日期: 2010-06-11

接受日期: 2010-06-22 在线出版日期: 2010-07-18

Gemcitabine in combination with dendritic cell-induced immunoeffector cells inhibits the growth of BxPC-3 cells

Shao-Pei Yu, Jing Yang

Shao-Pei Yu, Jing Yang, Department of Basic Medical Sciences, Ankang Occupational Technical College, Ankang 725000, Shaanxi Province, China

Correspondence to: Associated Professor Shao-Pei Yu, Department of Basic Medical Sciences, Ankang Occupational Technical College, Ankang 725000, Shaanxi Province, China. yushaopei2010@163.com

Received: 2010-04-04 Revised: 2010-06-11

Accepted: 2010-06-22 Published online: 2010-07-18

Abstract

AIM: To investigate the effect of gemcitabine (GEM) in combination with T lymphocytes activated by BxPC-3 cell whole lysate-pulsed dendritic cells (DCs) on the growth of BxPC-3 cells.

METHODS: After T lymphocytes were incubated with monocyte-derived DCs sensitized with whole lysate of BxPC-3 cells, the concentrations of IL-2, IFN- γ , TNF- α , IL-10 and TGF- β in cell supernatants were measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Subsequently, GEM and activated T lymphocytes, alone or in combination, were added into cultured BxPC-3 cells. After incubation for 24 h, BxPC-3 cell proliferation was measured by methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) assay and colony formation

assay, and early apoptosis of BxPC-3 cells was detected by flow cytometry.

RESULTS: After stimulation with sensitized DCs, the secretion of IL-2, IFN- γ and TNF- α by T lymphocytes was significantly enhanced ($1\,379\text{ ng/L} \pm 307\text{ ng/L}$ vs $370\text{ ng/L} \pm 64\text{ ng/L}$, $1\,269\text{ ng/L} \pm 264\text{ ng/L}$ vs $420\text{ ng/L} \pm 114\text{ ng/L}$, and $1\,062\text{ ng/L} \pm 172\text{ ng/L}$ vs $515\text{ ng/L} \pm 27\text{ ng/L}$, all $P < 0.01$), while the production of IL-10 and TGF- β showed no significant changes (both $P > 0.05$). Compared with the negative control group, activated T lymphocytes and GEM, alone or in combination, could inhibit the growth of BxPC-3 cells. The death rate and apoptosis rate were highest, and the rate of colony formation was lowest in BxPC-3 cells treated with activated T lymphocytes and GEM in combination.

CONCLUSION: DCs sensitized with BxPC-3 cell whole lysate can induce the formation of tumor-killing cytotoxic T cells. Dendritic cell-induced immunoeffector cells in combination with gemcitabine have stronger tumor-killing activity than immunoeffector cells alone.

Key Words: Pancreatic carcinoma; Gemcitabine; Dendritic cell; Immunotherapy; T lymphocyte

Yu SP, Yang J. Gemcitabine in combination with dendritic cell-induced immunoeffector cells inhibits the growth of BxPC-3 cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(20): 2095-2101

摘要

目的: 观察负载肿瘤抗原的树突状细胞(dendritic cells, DCs)所致敏的T淋巴细胞联合吉西他滨(GEM)抑制胰腺癌BxPC-3细胞生长的作用。

方法: 以反复冻融法提取BxPC-3的全细胞抗原, 致敏DCs后刺激T淋巴细胞的增殖和活化。以酶联免疫吸附实验(ELISA)检测不同刺激环境下T细胞培养上清中IL-2、IFN- γ 、TNF- α 、IL-10和TGF- β 的含量。以细胞集落形

■背景资料

胰腺癌是消化系统恶性程度最高的肿瘤之一, 吉西他滨已被列为晚期胰腺癌一线化疗的首选药物, 但其单一应用时的临床疗效仍较有限, 联合生物治疗可能是提高胰腺癌疗效的可行策略。

■同行评议者

郭晓钟, 教授, 中国人民解放军沈阳军区总医院消化内科

■研究前沿

树突状细胞摄取、加工和递呈肿瘤抗原给淋巴细胞,由此激发体内的抗肿瘤免疫功能,是当前肿瘤生物免疫治疗研究的主要策略之一。将化学药物和生物治疗联合应用,是目前肿瘤治疗的研究热点。

成实验、细胞杀伤实验(MTT法)和流式细胞仪测凋亡率,检测T淋巴细胞、GEM以及两者联合应用对BxPC-3细胞生长的抑制效应。

结果: BxPC-3细胞裂解物致敏的DCs能显著促进T淋巴细胞分泌IL-2、IFN- γ 和TNF- α (1 379 ng/L \pm 307 ng/L, 1 269 ng/L \pm 264 ng/L, 1 062 ng/L \pm 172 ng/L vs 370 ng/L \pm 64 ng/L, 420 ng/L \pm 114 ng/L, 515 ng/L \pm 27 ng/L, 均 $P<0.01$), 而IL-10和TGF- β 的分泌较少($P>0.05$)。与阴性对照组相比,活化T淋巴细胞、GEM以及两者联合应用对BxPC-3细胞的生长均有一定的抑制作用,但两者联合应用时对BxPC-3细胞的杀伤率和致凋亡率最高,而集落形成率最低,差异均具有统计学意义(51.41% \pm 3.64%, 51.7% vs 5.54% \pm 1.61%, 93.4%, 均 $P<0.01$)。

结论: 负载胰腺癌BxPC-3细胞抗原的DCs可诱导出杀伤肿瘤细胞的免疫活性T淋巴细胞,并且联合GEM后能显著抑制肿瘤细胞的生长。生物治疗联合化疗抑制胰腺癌细胞生长的作用明显,将有很好的临床应用前景。

关键词: 胰腺癌; 吉西他滨; 树突状细胞; 免疫治疗; T淋巴细胞

余少培, 杨静. 吉西他滨联合免疫效应细胞对胰腺癌细胞BxPC-3生长的抑制. 世界华人消化杂志 2010; 18(20): 2095-2101
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/2095.asp>

0 引言

胰腺癌是消化系恶性程度最高的肿瘤之一,在世界范围内恶性肿瘤发病率中排第13位,病死率排第8位^[1]。胰腺癌的早期诊断较为困难,且病程进展较快,其死亡率和发病率比例接近1:1,5年生存率不足5%,是预后最差的肿瘤之一^[2]。如何提高晚期胰腺癌疗效,改善预后是临床亟须解决的问题。吉西他滨(Gemcitabine, GEM)是一种抗代谢类的抗肿瘤药物,可抑制肿瘤细胞的增殖和促进其凋亡。在临床上, GEM已被列为晚期胰腺癌一线化疗的首选药物,但其单一应用时的临床疗效仍较有限^[3]。树突状细胞(dendritic cells, DCs)是体内已知的功能最强大的肿瘤抗原专职递呈细胞,负载肿瘤抗原的DCs是目前最具临床应用潜能的生物免疫治疗细胞。我们用GEM联合胰腺癌BxPC-3细胞冻融物致敏DCs诱导的活化T淋巴细胞,体外作用于BxPC-3细胞,观察对胰腺癌细胞生长的影响,为临床探索有效的胰腺癌综合治疗方案提供实验依据和思路。

1 材料和方法

1.1 材料 人胰腺癌细胞株BxPC-3由西京医院肝胆外科实验室李霄博士惠赠; 重组人粒细胞巨噬细胞集落刺激因子(rhGM-CSF)、重组人白介素-4(rhIL-4)和重组人肿瘤坏死因子- α (rhTNF- α)购自Peprotech公司; IL-2、IFN- γ 、TNF- α 、IL-10和TGF- β 的ELISA检测试剂盒均购自Biosource公司; Annexin V-FITC细胞凋亡检测试剂盒购自上海Beyotime公司; RPMI 1640细胞培养基和T淋巴细胞尼龙毛柱为Gibco公司产品; 胎牛血清购自杭州四季青公司、人淋巴细胞分离液购自天津TBD公司; GEM为Lilly公司产品; 抗凝新鲜全血由本院附属医院输血科提供。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养: BxPC-3培养于含100 mL/L胎牛血清的RPMI 1640培养基内。置于37℃、饱和湿度、50 mL/L CO₂孵育箱中常规培养。取指数生长期细胞进行细胞实验。

1.2.2 肿瘤抗原制备: 取指数生长期的BxPC-3,制成 1×10^9 /L细胞悬液, PBS离心洗涤3次,弃上清,重悬, -80℃-37℃反复冻融5次,以3 000 r/min的速度离心30 min, 上清过滤于无菌的EP管内,紫外分光光度仪测蛋白浓度,按500 μ g/管分装于无菌EP管内, -80℃保存备用。

1.2.3 DCs的培养及形态鉴定: 将新鲜健康人外周静脉抗凝血,以密度梯度离心法分离出单个核细胞,以含200 mL/L胎牛血清的RPMI 1640完全培养基重悬细胞,在50 mL/L CO₂、37℃的环境中培养4 h,吸出未贴壁细胞,再补充含30 μ g/L rhIL-4和100 μ g/L rhGM-CSF的RPMI 1640完全培养基,继续培养于37℃、50 mL/L CO₂的培养箱中培养,隔日半量补充rhIL-4和rhGM-CSF。培养至第6天,收集疏松黏附细胞和半悬浮细胞即为未致敏DCs。取部分细胞, PBS离心洗涤2次, 4 g/L戊二醛固定后行透射电镜检查。再取部分细胞,以PBS调整浓度为 1×10^9 /L,取9滴细胞悬液,加入1滴4 g/L台盼蓝溶液,混匀,充入Neu-baure细胞计数板中,于3 min内计数活细胞和死细胞数,计算活细胞率(%)。

1.2.4 致敏DCs及抗原活化的T淋巴细胞制备: DCs培养至第6天,在培养基中加入上述制备的BxPC-3裂解物(120 mg/L)培养24 h,为致敏DCs; 同时设立只加入PBS缓冲液的实验分组,记为未致敏DCs。再更换含20 mg/L rhTNF- α 的完全培养基继续培养24 h。培养结束后加入丝裂霉素25 mg/L, 37℃孵育30 min,收获的细胞即为致敏

DCs和未致敏DCs. 将前面以密度梯度离心法分离出的单个核细胞按操作说明用T淋巴细胞纯化尼龙毛柱进行分离, 得到T淋巴细胞. 重悬致敏DCs、未致敏DCs及T淋巴细胞, 使其密度均为 $1 \times 10^9/L$, 按DCs:T = 1:20的比例, 将细胞混合接种于含200 mL/L 胎牛血清的RMPI 1640完全培养基中, 置于37 °C、50 mL/L CO₂培养箱中培养96 h.

1.2.5 ELISA检测T淋巴细胞培养上清中细胞因子含量: 按T淋巴细胞培养环境的不同, 将T淋巴细胞分为4组: (1)阴性对照组; (2)裂解物组: 添加120 mg/L 的BxPC-3裂解物; (3)未致敏DCs组: 与未致敏DCs混合培养; (4)致敏DCs组: 与致敏DCs混合培养. ELISA检测各组T淋巴细胞培养上清中IL-2、IFN- γ 、TNF- α 、IL-10和TGF- β 的含量. 具体操作方法参照试剂盒说明书. 过程简述如下: 在微孔反应板中分别加入不同浓度标准品和待测样本各100 μ L, 再加生物素化抗体工作液50 μ L, 振荡混匀后置室温反应120 min; 将孔内液体吸干, 充分洗涤5次后干燥; 加入酶结合物工作液100 μ L, 振荡混匀, 置室温中反应30 min; 将孔内液体吸干, 充分洗涤5次后干燥; 每孔加入显色剂A、B各50 μ L, 振荡混匀, 37 °C下避光显色10 min; 加入终止液50 μ L, 振荡混匀; 以酶标仪(490 nm)测定各孔吸光度, 以标准曲线法算出各细胞因子含量.

1.2.6 MTT检测T淋巴细胞和GEM对BxPC-3的杀伤率: 取指数生长期的BxPC-3为靶细胞, 离心洗涤2次后调整细胞浓度为 $1 \times 10^7/L$. 按不同的处理因素进行分组: (1)空白对照组: 只含空白培养液; (2)阴性对照组: 只含BxPC-3细胞; (3)未活化T淋巴细胞组: 将未经致敏DCs刺激的T细胞与靶细胞按20:1的比例接种; (4)活化T淋巴细胞组: 将经致敏DCs刺激后的活化T淋巴细胞与靶细胞按20:1的比例接种; (5)GEM组: 靶细胞培养基中添加终浓度为25 mg/L GEM; (6)GEM+未活化T淋巴细胞组; (7)GEM+活化T淋巴细胞组. 每个处理均设5个复孔. 培养24 h后, 洗去各孔中的不贴壁细胞, 补充完全培养基200 μ L, 再加入5 g/L MTT 20 μ L, 37 °C、50 mL/L CO₂培养箱中孵育4 h后弃上清, 每孔加二甲亚砜150 μ L, 充分溶解后, 放入酶标仪中, 以空白对照孔调0, 于波长490 nm处测定吸光度(A)值, 并计算各实验组对BxPC-3的杀伤率. 杀伤率 = (1-实验组A值/阴性对照组A值) \times 100%. 实验重复3次, 取均值做为最终结果.

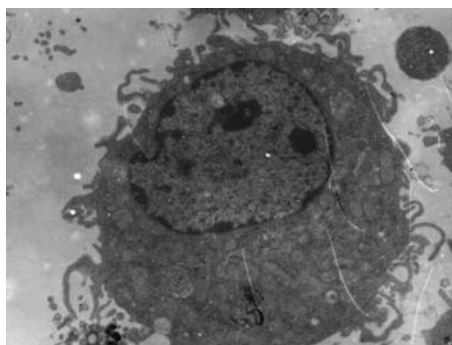


图1 培养6 d的DCs透射电镜照片($\times 4\ 000$).

1.2.7 细胞集落形成实验: 取对数生长期的细胞, 经2.5 g/L胰酶消化, 制备单细胞悬液, 接种于35 mm塑料平皿中, 300个细胞/皿. 将平皿在37 °C孵箱中培养24 h后, 进行上一步骤中的实验处理. 2 wk后待培养皿中出现肉眼可见的细胞集落即终止培养, 以PBS漂洗2次, 2 g/L结晶紫染色15 min, 缓慢漂洗培养皿后置于室温中干燥. 显微镜下计数细胞数>50个的集落数. 以阴性对照组的集落形成率为100%, 计算出各实验组的集落形成率. 实验重复3次, 取均值做为最终结果.

1.2.8 流式检测BxPC-3凋亡率: 取指数生长期的BxPC-3, 按MTT的实验分组加入相应的细胞及药物, 继续培养24 h. 培养结束后按照凋亡检测试剂盒的说明处理各组样品, 而后进行流式细胞术分析, 检测凋亡率. 实验重复3次, 取均值做为最终结果.

统计学处理 测定结果用SPSS11.0统计软件分析, 数据均用mean \pm SD表示, 多样本均数比较采用完全随机设计方差分析, 两组间均数比较采用SNK-q检验. 取 $P < 0.05$ 为有统计学意义.

2 结果

2.1 DCs形态观察 培养至第6天时, 光镜下可见细胞生长良好, 培养基无污染; 细胞体积较大, 呈半悬浮生长; 大部分细胞形状不规则, 表面呈毛刺样, 胞核清晰; 部分细胞有典型树枝样突起. 透射电镜下可见细胞体积较大, 胞体周围呈不规则树突状胞质突起和褶皱, 突起粗细不等, 形似树枝; 胞质丰富, 内含较多的胞饮小泡, 溶酶体罕见; 胞核较大, 呈圆形或卵圆形, 多偏向一侧. 所培养的细胞具有典型的DCs形态特征(图1). 台盼蓝排斥试验结果: 低倍光镜下计数100个细胞, 其中蓝染细胞均仅为1-2个, 活细胞率大于98%.

2.2 细胞因子含量检测 ELISA检测结果显示: 阴

■相关报道

近年来, 许多临床研究报道吉西他滨与其他化疗药物联合应用能在一定程度上改善胰腺癌患者的生存质量, 但大规模的临床随机对照研究均未能显示出更长的生存时间. 也有资料显示, 树突状细胞所诱导的抗胰腺癌细胞毒性T淋巴细胞活性有限, 在体内实验中对已形成的肿瘤治疗效果欠佳. 因此, 两者联合应用可能是提高胰腺癌生物疗效的可行策略.

■创新盘点

本研究首次将负载胰腺癌细胞BxPC-3抗原的DCs疫苗和GEM联合应用于BxPC-3的体外培养。通过细胞杀伤实验、克隆形成实验和凋亡细胞检测发现,经DCs疫苗刺激的T淋巴细胞联合GEM作用于BxPC-3,可显著杀伤胰腺癌细胞、抑制其增殖并诱导凋亡。

表 1 各组T淋巴细胞培养上清中细胞因子的含量 (means \pm SD, pg/L)

分组	IL-2	IFN- γ	TNF- α	IL-10	TGF- β
阴性对照组	0	0	0	0	0
细胞裂解物组	85 \pm 9	70 \pm 11	196 \pm 25	44 \pm 6	43 \pm 7
未致敏DCs组	370 \pm 64	420 \pm 114	515 \pm 27	40 \pm 8	52 \pm 5
致敏DCs组	1 379 \pm 307 ^a	1 269 \pm 264 ^a	1 062 \pm 172 ^a	56 \pm 3	57 \pm 7

^a $P < 0.001$ vs 裂解物组和未致敏DCs组。

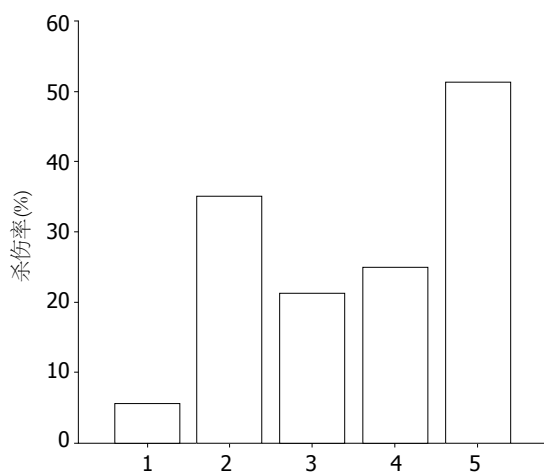


图 2 各实验组对BxPC-3细胞的杀伤率。1: 未活化T淋巴细胞; 2: 活化T淋巴细胞; 3: GEM; 4: GEM+未活化T淋巴细胞; 5: GEM+活化T淋巴细胞。

性对照组T淋巴细胞的培养上清中各细胞因子分泌量极少,基本为0。致敏DCs组的T淋巴细胞分泌IL-2、IFN- γ 和TNF- α 的能力显著提高,与其余各组相比差异有统计学意义($P < 0.01$);而IL-10和TGF- β 的分泌量在三个实验组之间无显著差异($P > 0.05$,表1)。

2.3 杀伤实验 以MTT法检测各实验组对BxPC-3的杀伤率。统计分析显示:未活化T淋巴细胞对BxPC-3的杀伤率最低,为5.54% \pm 1.61%;经致敏DCs活化的T淋巴细胞,其杀伤率提高至35.24% \pm 3.25%,两者相比差异有统计学意义($P < 0.01$)。GEM单独应用时的杀伤率为21.34% \pm 2.55%;分别联合未活化和活化T淋巴细胞后,其杀伤率为24.89% \pm 2.98%、51.41% \pm 3.64%;与其他各组相比,活化的T淋巴细胞联合GEM的杀伤率最高,差异有统计学意义($P < 0.01$,图2)。

2.4 细胞集落形成实验 加入未活化T淋巴细胞,BxPC-3集落形成率为93.4%,而加入活化T淋巴细胞,BxPC-3集落形成率为61.9%,两组相比差异有统计学意义($P < 0.01$)。GEM单独应用时的集落形成率为70.5%;分别联合未活化和活化T淋

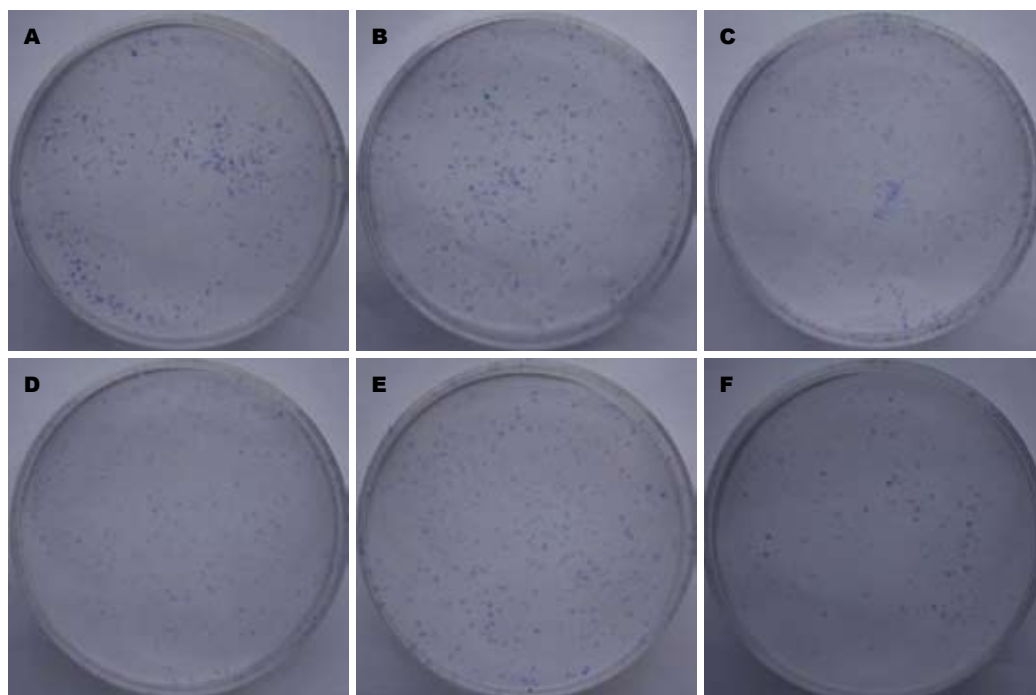
巴细胞后,形成率为67.9%和51.7%;与其他各组相比,GEM联合活化T淋巴细胞的集落形成率最低,差异有统计学意义($P < 0.01$,图3)。

2.5 凋亡率检测 流式细胞仪检测各组BxPC-3凋亡率显示:BxPC-3自发凋亡率很低,为1.17% \pm 0.25%,加入未活化T淋巴细胞,凋亡率为3.03% \pm 0.65%,两者相比差异无统计学意义($P > 0.05$);而加入活化T淋巴细胞后,BxPC-3的凋亡率升高至24.33% \pm 1.91%,与阴性对照组和未活化T淋巴细胞组相比,差异均有统计学意义($P < 0.01$)。GEM单独应用时的凋亡率为10.60% \pm 2.05%;分别联合未活化和活化T淋巴细胞后,凋亡率为12.41% \pm 1.45%、32.22% \pm 1.76%;与其他各组相比,活化T淋巴细胞联合GEM致BxPC-3的凋亡率最高,差异有统计学意义($P < 0.01$,图4)。

3 讨论

胰腺癌的治疗首选胰十二指肠切除术^[4],但因胰腺癌的早期诊断较为困难,因此临床手术切除率仅为15%左右^[5];同时手术并不能完全清除癌灶周围的微小病变,对血液中可能存在的癌细胞更无能为力^[6],因此必须联合其他非手术措施如化疗^[7]、放疗^[8,9]、生物治疗^[10]等进行综合治疗,才有可能避免或防止术后肿瘤复发与转移,提高胰腺癌患者的长期生存率。

化学药物治疗胰腺癌已有多年的历史,目前临床使用的一线化疗药物是GEM^[11]。GEM是一种抗代谢类抗癌药物,其化学结构为盐酸双氟脱氧胞苷,为细胞周期特异性药物,主要作用于DNA合成期的肿瘤细胞,即S期细胞。在一定的条件下,其被细胞摄入后在细胞内产生活性代谢产物-GEM的二磷酸盐和三磷酸盐^[8]。这些代谢物通过竞争嵌入DNA双链,引起DNA双链错误识别,将细胞有丝分裂阻止在G₁期,进而DNA双链断裂,导致细胞死亡^[12]。尽管GEM是胰腺癌的标准治疗药物,但接受治疗的患者其中位生存期仅为5.4-5.6 mo,1年生存率仅为16%-19%^[13]。为



■应用要点

本研究发现DCs疫苗联合GEM对BxPC-3细胞的生长具有高效的抑制作用, 其机制可能是两者之间存在互相促进的协同作用。

图3 细胞集落形成实验. A: 阴性对照组; B: 未活化T淋巴细胞组; C: 活化T淋巴细胞组; D: GEM组; E: GEM+未活化T淋巴细胞组; F: GEM+活化T淋巴细胞组。

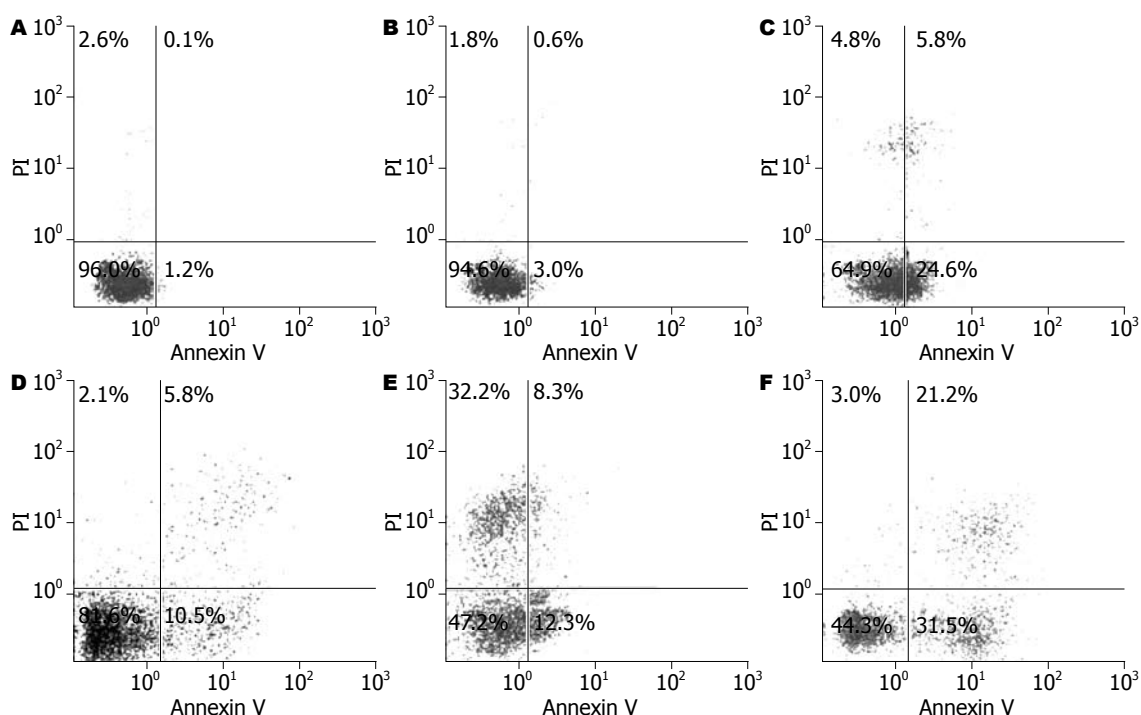


图4 流式细胞仪检测各组BxPC-3凋亡率. A: 阴性对照组; B: 未活化T淋巴细胞组; C: 活化T淋巴细胞组; D: GEM组; E: GEM+未活化T淋巴细胞组; F: GEM+活化T淋巴细胞组。

了进一步提高疗效, 临床医师将许多药物与吉西他滨联合应用, 包括5-氟尿嘧啶^[14]、顺铂^[15,16]、奥沙利铂^[17,18]、卡培他滨^[19-21]、多西紫杉醇^[22,23]等。虽然这些治疗方案都能在一定程度上改善胰腺癌患者的生存质量, 但大规模的临床随机对照研究均未能显示出更长的生存时间。如何

突破胰腺癌临床治疗瓶颈, 寻找更为有效的治疗方案, 是目前胰腺癌研究的重点问题。

DCs是体内已知的最重要的专职抗原呈递细胞, 广泛分布于体内各组织中。DCs摄取抗原后将其加工提呈给T淋巴细胞^[24]; 同时DCs表面高表达MHC-II类分子和协同刺激分子, 可刺

同行评价

本文设计科学、合理, 所得结果可信, 为今后进一步研究打下了基础, 同时预示化疗联合生物免疫治疗可以提高胰腺癌的疗效。

激活T淋巴细胞增殖分化, 产生针对抗原的特异性细胞免疫应答反应以清除抗原^[25]。因此, 利用DCs摄取、加工和递呈肿瘤抗原给淋巴细胞, 由此激发体内的抗肿瘤免疫功能, 是当前肿瘤生物免疫治疗研究的主要策略之一^[26-28]。在本研究中, 我们用负载BxPC-3细胞抗原的DCs疫苗刺激T淋巴细胞, 发现T淋巴细胞可显著分泌IL-2、TNF- α 和IFN- γ 等Th1型细胞因子, 而Th2型细胞因子的IL-10和TGF- β 则无显著变化; 这表明胰腺癌的DCs疫苗能够有效地将肿瘤抗原呈递给T淋巴细胞并刺激其增殖和活化, 产生抗肿瘤的细胞免疫应答。但目前也有资料显示, DCs所诱导的抗胰腺癌细胞毒性T淋巴细胞活性有限, 在体内实验中对已形成的肿瘤治疗效果欠佳^[29]。因此, 联合GEM等化疗药物可能是提高胰腺癌生物疗效的可行策略。

综合胰腺癌化疗和生物治疗的优缺点, 本研究首次将负载胰腺癌细胞BxPC-3抗原的DCs疫苗和GEM联合应用于BxPC-3的体外培养。通过细胞杀伤实验、克隆形成实验和凋亡细胞检测发现, 经DCs疫苗刺激的T淋巴细胞联合GEM作用于BxPC-3, 可显著杀伤胰腺癌细胞、抑制其增殖并诱导凋亡; 联合应用的各项检测结果均优于T淋巴细胞和GEM单独应用。总之, DCs疫苗联合GEM对BxPC-3细胞的生长具有高效的抑制作用, 其机制可能是两者之间存在互相促进的协同作用。我们将在后续的动物实验中验证体外实验的结果, 希望为临床胰腺癌的治疗提供新思路和新选择。

参考文献

- Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Thun MJ. Cancer statistics, 2009. *CA Cancer J Clin* 2009; 59: 225-249
- Rozen P, Liphshitz I, Rosner G, Barchana M, Lachter J, Pel S, Shohat T, Santo E. Pancreatic cancer in Israel: the epidemiology, possibilities of prevention, early detection and screening. *Isr Med Assoc J* 2009; 11: 710-713
- Mackenzie RP, McCollum AD. Novel agents for the treatment of adenocarcinoma of the pancreas. *Expert Rev Anticancer Ther* 2009; 9: 1473-1485
- 余子建, 戴小明. 胰腺癌扩大根治术与血管骨骼化问题探讨. *世界华人消化杂志* 2009; 17: 490-494
- 陆嘉德, 章真. 局部进展期胰腺癌的多学科综合治疗. *中国癌症杂志* 2009; 19: 574-579
- Stan SD, Singh SV, Brand RE. Chemoprevention strategies for pancreatic cancer. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2010; 7: 347-356
- 张翼, 石欣. 胰腺癌化疗进展. *世界华人消化杂志* 2009; 17: 1422-1426
- Kennedy EP, Yeo CJ. The case for routine use of adjuvant therapy in pancreatic cancer. *J Surg Oncol* 2007; 95: 597-603
- Landry J, Catalano PJ, Staley C, Harris W, Hoffman J, Talamonti M, Xu N, Cooper H, Benson AB 3rd. Randomized phase II study of gemcitabine plus radiotherapy versus gemcitabine, 5-fluorouracil, and cisplatin followed by radiotherapy and 5-fluorouracil for patients with locally advanced, potentially resectable pancreatic adenocarcinoma. *J Surg Oncol* 2010; 101: 587-592
- 周国雄, 秦金丹, 张海峰, 黄介飞. 胰腺癌基因治疗的研究现状. *世界华人消化杂志* 2009; 17: 2757-2761
- Squadroni M, Fazio N. Chemotherapy in pancreatic adenocarcinoma. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2010; 14: 386-394
- Wong A, Soo RA, Yong WP, Innocenti F. Clinical pharmacology and pharmacogenetics of gemcitabine. *Drug Metab Rev* 2009; 41: 77-88
- 朱志霞, 张为民. 吉西他滨与靶向药物联合治疗胰腺癌研究进展. *广东医学* 2009; 30: 1188-1191
- Mehta SP. Palliative chemotherapy for pancreatic malignancies. *Surg Clin North Am* 2010; 90: 365-375
- Palmer DH, Stocken DD, Hewitt H, Markham CE, Hassan AB, Johnson PJ, Buckels JA, Bramhall SR. A randomized phase 2 trial of neoadjuvant chemotherapy in resectable pancreatic cancer: gemcitabine alone versus gemcitabine combined with cisplatin. *Ann Surg Oncol* 2007; 14: 2088-2096
- Heinrich S, Pestalozzi BC, Schäfer M, Weber A, Bauerfeind P, Knuth A, Clavien PA. Prospective phase II trial of neoadjuvant chemotherapy with gemcitabine and cisplatin for resectable adenocarcinoma of the pancreatic head. *J Clin Oncol* 2008; 26: 2526-2531
- Banerjee S, Kaseb AO, Wang Z, Kong D, Mohammad M, Padhye S, Sarkar FH, Mohammad RM. Antitumor activity of gemcitabine and oxaliplatin is augmented by thymoquinone in pancreatic cancer. *Cancer Res* 2009; 69: 5575-5583
- Poplin E, Feng Y, Berlin J, Rothenberg ML, Hochster H, Mitchell E, Alberts S, O'Dwyer P, Haller D, Catalano P, Cella D, Benson AB 3rd. Phase III, randomized study of gemcitabine and oxaliplatin versus gemcitabine (fixed-dose rate infusion) compared with gemcitabine (30-minute infusion) in patients with pancreatic carcinoma E6201: a trial of the Eastern Cooperative Oncology Group. *J Clin Oncol* 2009; 27: 3778-3785
- 谢德荣, 梁汉霖, 杨琼, 郭双双, 江志敏, 陈邓林. 吉西他滨联合卡培他滨一线治疗晚期胰腺癌的Meta分析. *世界华人消化杂志* 2007; 15: 1868-1871
- Cunningham D, Chau I, Stocken DD, Valle JW, Smith D, Steward W, Harper PG, Dunn J, Tudur-Smith C, West J, Falk S, Crellin A, Adab F, Thompson J, Leonard P, Ostrowski J, Eatock M, Scheithauer W, Herrmann R, Neoptolemos JP. Phase III randomized comparison of gemcitabine versus gemcitabine plus capecitabine in patients with advanced pancreatic cancer. *J Clin Oncol* 2009; 27: 5513-5518
- Desai S, Ben-Josef E, Griffith KA, Simeone D, Greenson JK, Francis IR, Hampton J, Colletti L, Chang AE, Lawrence TS, Zalupski MM. Gemcitabine-based combination chemotherapy followed by radiation with capecitabine as adjuvant therapy for resected pancreas cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2009; 75: 1450-1455
- Fine RL, Fogelman DR, Schreibman SM, Desai M,

- Sherman W, Strauss J, Guba S, Andrade R, Chabot J. The gemcitabine, docetaxel, and capecitabine (GTX) regimen for metastatic pancreatic cancer: a retrospective analysis. *Cancer Chemother Pharmacol* 2008; 61: 167-175
- 23 Kulke MH, Tempero MA, Niedzwiecki D, Hollis DR, Kindler HL, Cusnir M, Enzinger PC, Gorsch SM, Goldberg RM, Mayer RJ. Randomized phase II study of gemcitabine administered at a fixed dose rate or in combination with cisplatin, docetaxel, or irinotecan in patients with metastatic pancreatic cancer: CALGB 89904. *J Clin Oncol* 2009; 27: 5506-5512
- 24 贺子彪, 杨伟明, 焦保庭, 宋辉. 体外联合抗原修饰的树突状细胞的抗癌效应. *世界华人消化杂志* 2008; 16: 105-108
- 25 Tucci M, Quatraro C, Dammacco F, Silvestris F. Increased IL-18 production by dendritic cells in active inflammatory myopathies. *Ann N Y Acad Sci* 2007; 1107: 184-192
- 26 Seya T, Shime H, Ebihara T, Oshiumi H, Matsumoto M. Pattern recognition receptors of innate immunity and their application to tumor immunotherapy. *Cancer Sci* 2010; 101: 313-320
- 27 Babatz J, Röhlig C, Löbel B, Folprecht G, Haack M, Günther H, Köhne CH, Ehninger G, Schmitz M, Bornhäuser M. Induction of cellular immune responses against carcinoembryonic antigen in patients with metastatic tumors after vaccination with altered peptide ligand-loaded dendritic cells. *Cancer Immunol Immunother* 2006; 55: 268-276
- 28 余彤, 杨建民. 肿瘤多肽疫苗的研究进展. *世界华人消化杂志* 2008; 16: 1597-1601
- 29 Bontkes HJ, Kramer D, Ruizendaal JJ, Meijer CJ, Hooijberg E. Tumor associated antigen and interleukin-12 mRNA transfected dendritic cells enhance effector function of natural killer cells and antigen specific T-cells. *Clin Immunol* 2008; 127: 375-384

编辑 李军亮 电编 何基才

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2010年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

《世界华人消化杂志》外文字符标准

本刊讯 本刊论文出现的外文字符应注意大小写、正斜体与上下角标。静脉注射iv, 肌肉注射im, 腹腔注射ip, 皮下注射sc, 脑室注射icv, 动脉注射ia, 口服po, 灌胃ig. s(秒)不能写成S, kg不能写成Kg, mL不能写成ML, lcpm(应写为1/min)÷E%(仪器效率)÷60=Bq, pH不能写PH或P^H, *H pylori*不能写成HP, T_{1/2}不能写成tl/2或T_{1/2}¹, V_{max}不能V_{max}, μ不写为英文u. 需排斜体的外文字, 用斜体表示. 如生物学中拉丁学名的属名与种名, 包括亚属、亚种、变种. 如幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *H. pylori*), *Ilex pubescens* Hook, *et Arn. var. glaber* Chang(命名者勿划横线); 常数K; 一些统计学符号(如样本数n, 均数mean, 标准差SD, F检验, t检验和概率P, 相关系数r); 化学名中标明取代位的元素、旋光性和构型符号(如N, O, P, S, d, l)如n-(normal, 正), N-(nitrogen, 氮), o-(ortho, 邻), O-(oxygen, 氧, 习惯不译), d-(dextro, 右旋), p-(para, 对), 例如n-butyl acetate(醋酸正丁酯), N-methylacetanilide(N-甲基乙酰苯胺), o-cresol(邻甲酚), 3-O-methyl-adrenaline(3-O-甲基肾上腺素), d-amphetamine(右旋苯丙胺), l-dopa(左旋多巴), p-aminosalicylic acid(对氨基水杨酸). 拉丁字及缩写in vitro, in vivo, in situ; Ibid, et al, po, vs; 用外文字母代表的物理量, 如m(质量), V(体积), F(力), p(压力), W(功), v(速度), Q(热量), E(电场强度), S(面积), t(时间), z(酶活性, kat), t(摄氏温度, °C), D(吸收剂量, Gy), A(放射性活度, Bq), ρ(密度, 体积质量, g/L), c(浓度, mol/L), φ(体积分数, mL/L), w(质量分数, mg/g), b(质量摩尔浓度, mol/g), l(长度), b(宽度), h(高度), d(厚度), R(半径), D(直径), T_{max}, C_{max}, V_d, T_{1/2} CI等. 基因符号通常用小写斜体, 如ras, c-myc; 基因产物用大写正体, 如P16蛋白.

尼美舒利调控PPAR γ 信号通路抑制食管癌裸鼠移植瘤生长的分子机制

刘俊茹, 杨建柱, 刘淑霞, 左连富

■背景资料

COX-2与肿瘤的发生、发展密切相关, COX-2抑制剂可通过多种途径抑制肿瘤细胞生长并诱导凋亡, 但其机制并不局限于COX-2. PPAR γ 也与肿瘤的发生有关, 二者间是否有关, 进一步探讨COX-2抑制剂的抗食管癌作用机制具有重要意义.

刘俊茹, 杨建柱, 河北医科大学第三医院病理科 河北省石家庄市 050051

刘淑霞, 河北医科大学病理教研室 河北省石家庄050017
左连富, 河北医科大学第四医院肿瘤研究所 河北省石家庄050011

刘俊茹, 医学博士, 副主任医师, 副教授, 主要从事肿瘤病理的临床及实验研究.

河北省卫生厅医学科学研究重点课题基金资助项目, No. 04004

作者贡献分布: 本课题思路由刘俊茹与左连富设计; 实验过程由刘俊茹、杨建柱及刘淑霞完成; 数据收集由刘俊茹、杨建柱及刘淑霞完成; 论文写作由刘俊茹、杨建柱、刘淑霞及左连富共同完成.

通讯作者: 刘俊茹, 副主任医师, 副教授, 050051, 河北省石家庄市自强路139号, 河北医科大学第三医院病理科.

liujr1207@163.com

电话: 0311-88603375

收稿日期: 2010-04-13 修回日期: 2010-06-15

接受日期: 2010-06-22 在线出版日期: 2010-07-18

Nimesulide, a selective cyclooxygenase-2 inhibitor, inhibits the growth of esophageal carcinoma *in vivo* by modulating PPAR γ signal transduction pathway

Jun-Ru Liu, Jian-Zhu Yang, Shu-Xia Liu, Lian-Fu Zuo

Jun-Ru Liu, Jian-Zhu Yang, Department of Pathology, the Third Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050051, Hebei Province, China

Shu-Xia Liu, Department of Pathology, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, Hebei Province, China

Lian-Fu Zuo, Hebei Provincial Tumor Institute, the Fourth Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050051, Hebei Province, China

Supported by: the Major Medical Research Program of Health Department of Hebei Province, No. 04004

Correspondence to: Associated Professor Jun-Ru Liu, Department of Pathology, the Third Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050051, Hebei Province, China. liujr1207@163.com

Received: 2010-04-13 Revised: 2010-06-15

Accepted: 2010-06-22 Published online: 2010-07-18

Abstract

AIM: To detect the expression of cyclooxygenase-2 (COX-2) and peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ) in human esophageal carcinoma, to investigate the inhibitory effects of nimesulide on tumor growth in esophageal carcinoma xenografts in nude mice, and to

explore potential mechanisms involved.

METHODS: The expression of PPAR γ and COX-2 in 18 normal esophageal epithelial specimens and 59 esophageal squamous cell carcinoma (ESCC) specimens were examined by immunohistochemistry. A nude mouse model bearing Eca-109 cell xenografts was established. The mice were divided randomly into control group and nimesulide group [treated with nimesulide at a dose of 20 mg/(kg·d) for 4 wk]. The tumor volume and reduced rate of tumor growth were calculated according to the length and width of xenograft tumors. Cell apoptosis was detected by flow cytometry. The expression of COX-2 and PPAR γ mRNAs and proteins was detected by RT-PCR and immunohistochemistry, respectively.

RESULTS: The immunohistochemical score of PPAR γ was significantly lower in ESCC than in normal esophageal epithelium (2.88 ± 2.23 vs 6.29 ± 2.17 , $P < 0.05$), while that of COX-2 was significantly higher in ESCC than in normal esophageal epithelium (2.12 ± 1.77 vs 0.82 ± 0.46 , $P < 0.05$). The immunohistochemical score of PPAR γ decreased as tumor pathological grade increased. The immunohistochemical score of PPAR γ was closely related to tumor differentiation degree ($P < 0.05$). The expression level of COX-2 was significantly higher in well and moderately differentiated ESCC than in poorly differentiated ESCC ($P < 0.05$). Nimesulide significantly inhibited tumor growth in esophageal carcinoma xenografts when compared with the control group (tumor volume: $807.68 \text{ mm}^3 \pm 217.76 \text{ mm}^3$ vs $2116.77 \text{ mm}^3 \pm 362.47 \text{ mm}^3$; tumor weight: $0.81 \text{ g} \pm 0.21 \text{ g}$ vs $1.45 \text{ g} \pm 0.39 \text{ g}$; both $P < 0.05$), and the reduced rate of tumor growth was $44.14\% \pm 6.3\%$. Nimesulide treatment increased the apoptosis rate from $15.86\% \pm 2.57\%$ to $32.21\% \pm 5.98\%$. COX-2 expression was down-regulated, and PPAR γ expression up-regulated in the nimesulide group when compared with the control group. A negative correlation was noted between the expression of COX-2 and

■同行评议者

王娅兰, 教授, 重庆医科大学基础医学院病理教研室

PPAR γ .

CONCLUSION: Down-regulation of PPAR γ expression and up-regulation of COX-2 expression are related to the carcinogenesis of ESCC. Nimesulide inhibits tumor growth and induces apoptosis in esophageal carcinoma xenografts possibly by down-regulating COX-2 expression and up-regulating PPAR γ expression.

Key Words: Nimesulide; Esophageal carcinoma; Nude mouse; Apoptosis; Peroxisome proliferator-activated receptor γ ; Cyclooxygenase-2

Liu JR, Yang JZ, Liu SX, Zuo LF. Nimesulide, a selective cyclooxygenase-2 inhibitor, inhibits the growth of esophageal carcinoma *in vivo* by modulating PPAR γ signal transduction pathway. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(20): 2102-2108

摘要

目的: 探讨选择性环氧合酶-2(COX-2)抑制剂尼美舒利对食管癌Eca-109裸鼠移植瘤的生长抑制作用及对COX-2、过氧化物酶体增殖因子活化受体 γ (PPAR γ)表达的影响, 分析其可能机制。

方法: 采用免疫组织化学方法, 检测18例食管正常鳞状上皮及59例食管鳞状细胞癌中PPAR γ 及COX-2的表达, 分析其在食管癌发生中的意义; 建立食管癌裸鼠移植瘤模型, 给予尼美舒利4 wk, 剥离瘤结节, 计算瘤体体积和肿瘤生长抑制率; FCM法检测细胞凋亡率; RT-PCR和免疫组织化学方法检测COX-2和PPAR γ mRNA和蛋白的表达变化。

结果: PPAR γ 在食管鳞状细胞癌和正常鳞状上皮的免疫组织化学染色平均积分分别为 2.88 ± 2.23 和 6.29 ± 2.17 , 鳞状细胞癌的PPAR γ 蛋白表达显著低于正常鳞状上皮($P < 0.05$); 食管鳞状细胞癌的COX-2平均积分为 2.12 ± 1.77 , 显著高于正常鳞状上皮的 0.82 ± 0.46 , 差异有显著性($P < 0.05$); 食管鳞状细胞癌的PPAR γ 及COX-2蛋白表达与肿瘤分化程度有关, PPAR γ 的表达随肿瘤分化程度降低而逐渐降低($P < 0.05$), 高、中分化鳞状细胞癌的COX-2表达显著高于低分化鳞状细胞癌($P < 0.05$)。尼美舒利对裸鼠移植瘤的生长有明显的抑制作用, 给药4 wk后, 尼美舒利组的移植瘤体积及瘤质量分别为 $807.68 \text{ mm}^3 \pm 217.76 \text{ mm}^3$ 及 $0.81 \text{ g} \pm 0.21 \text{ g}$, 显著低于对照组($2116.77 \text{ mm}^3 \pm 362.47 \text{ mm}^3$, $1.45 \text{ g} \pm 0.39 \text{ g}$, $P < 0.05$), 肿瘤抑制率为 $44.14\% \pm 6.3\%$; 尼美舒利组的肿瘤细胞的凋亡率 $32.21\% \pm 5.98\%$,

显著高于对照组($15.86\% \pm 2.57\%$); 尼美舒利组的COX-2 mRNA及蛋白的表达显著降低, 而PPAR γ mRNA及蛋白的表达则显著增高($P < 0.05$); COX-2与PPAR γ 的表达呈显著负相关($P < 0.05$)。

结论: PPAR γ 表达降低、COX-2表达上调与食管癌的发生有关; COX-2抑制剂尼美舒利能抑制食管癌裸鼠移植瘤的生长并诱导凋亡, 其机制部分与抑制COX-2表达及上调PPAR γ 表达有关。

关键词: 尼美舒利; 食管癌; 裸鼠; 凋亡; 过氧化物酶体增殖因子活化受体 γ ; 环氧合酶-2

刘俊茹, 杨建柱, 刘淑霞, 左连富. 尼美舒利调控PPAR γ 信号通路抑制食管癌裸鼠移植瘤生长的分子机制. *世界华人消化杂志* 2010; 18(20): 2102-2108

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/2102.asp>

0 引言

目前研究证实选择性环氧合酶-2(cyclooxygenase-2, COX-2)与肿瘤的发生、发展过程密切相关, 已成为肿瘤诊断及治疗的一个重要的作用靶点^[1-5]。近年来, 过氧化物酶体增殖因子活化受体 γ (peroxisome proliferator-activated receptors γ , PPAR γ)在肿瘤发生、发展中的作用已受到广泛关注, 研究表明许多恶性肿瘤存在PPAR γ 的异常表达^[6-10], PPAR γ 是否与食管癌的发生有关? PPAR γ 与COX-2间是否有相关性? 为此, 我们检测了食管癌组织及食管正常鳞状上皮中PPAR γ 及COX-2蛋白的表达, 并进一步以体内构建食管癌裸鼠移植瘤模型为研究对象, 观察尼美舒利的抗肿瘤作用, 采用多种实验技术检测PPAR γ 及COX-2 mRNA及蛋白的表达变化, 为尼美舒利应用于食管癌的治疗提供试验性理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料 收集河北医科大学第四医院2004-09/2004-12食管癌手术切除并经病理诊断证实的浸润型食管鳞癌标本59例, 每例标本分别取癌组织及正常食管组织。其中男37例, 女22例, 年龄42-72(中位年龄为59)岁; 高分化鳞状细胞癌19例, 中分化鳞状细胞癌25例, 低分化鳞状细胞癌15例; 正常食管组织18例。所有患者术前均未接受化疗、放疗及其他抗癌治疗。人食管癌Eca109细胞中国人民解放军第四军医大学实验动物中心提供; 健康BALB/C/nu/nu裸小鼠, 4 wk, δ , 体质量16-18 g, 购自中国医学科学院

■研究前沿

近年来, COX-2、PPAR γ 与肿瘤的关系日益受到人们的重视, COX-2抑制剂的抗食管癌机制研究多侧重于细胞培养, 其体内抗肿瘤效果及机制尚不清楚。

■相关报道

有研究显示,抑制COX-2、激活PPAR γ 表达可抑制肿瘤细胞生长,COX-2与PPAR γ 二者间的表达具有相关性,COX-2抑制剂可通过抑制COX-2表达并上调PPAR γ 而抑制肿瘤细胞生长,也有研究有不同结果。

实验动物研究所繁殖场(京动许字017),动物饲养于本校实验动物中心,实验动物使用许可证号:SYXK(冀)2003-0026,清洁级动物室内(SPF级),该研究经学校实验动物管理部门批准。尼美舒利为美国Caymen公司产品,用0.5%羧甲基纤维素钠溶解;鼠抗人COX-2抗体、鼠抗人PPAR γ 单克隆抗体均为美国Santa Cruz公司产品,TRIzol为美国Sigma公司产品,反转录酶AMV及Taq DNA聚合酶为美国Promega公司产品,RPMI 1640、胰蛋白酶为Gibco公司产品。

1.2 方法

1.2.1 人食管癌裸鼠移植瘤实验:常规培养并收集食管癌Eca109细胞,分别将 2×10^6 个细胞接种于12只裸鼠的左前和右后腋皮下,随机分为对照组(0.5%羧甲基纤维素钠)和尼美舒利用药组20 mg/(kg·d),每组6只。尼美舒利用药组于接种后第2天灌胃给药,对照组只给予同剂量的羧甲基纤维素钠溶液,连续给药4 wk。从出现瘤结节开始定期用游标卡尺测量肿瘤的最长径(a)和最短径(b),计算其体积($V = ab^2/2$),每周2次,绘制肿瘤生长曲线。4 wk后处死裸鼠,剥离皮下肿瘤,称瘤质量,计算抑瘤率。抑瘤率 = (对照组瘤质量 - 实验组瘤质量)/对照组瘤质量 $\times 100\%$ 。取出瘤体后,一份液氮冻存,以备提取RNA,进行RT-PCR,另一份10%中性甲醛固定后,经常规病理切片,以备HE及免疫组织化学染色。

1.2.2 流式细胞术检测肿瘤细胞凋亡率:用网搓法将肿瘤制备成单细胞悬液,加入10%鸡红细胞作为内参标准,与样品同步染色,加入碘化丙啶一步插入DNA荧光染色,在4℃冰箱避光染色30 min,以500目铜网过滤,使样品成为合格的单细胞悬液,采用美国Beckman Coulter公司生产的Epics-XL II型流式细胞仪进行DNA检测,以二倍体峰($G_{0/1}$)前出现亚 G_1 峰表示凋亡细胞峰位,根据亚 G_1 峰的分布组方图计算细胞凋亡率。

1.2.3 RT-PCR检测移植瘤组织中PPAR γ 、COX-2 mRNA的表达: TRIzol试剂盒说明一步法提取肿瘤组织总RNA,紫外分光光度计测定RNA纯度并定量。用M-MLV逆转录酶反转录合成cDNA后进行PCR扩增,PPAR γ (250 bp)引物上游序列: 5'-GAGCCCAAGTTTGAGTTTGCT-3',下游序列: 5'-CCGTGACAATCTGTCTGAGGT-3'。COX-2(255 bp)引物上游序列: 5'-AGAATGCAT TGGAAACATCGACAG-3',下游序列: 5'-CCTG TTGCGGAGAAAGGAGTC-3'。GAPDH(414 bp)引物上游序列: 5'-CAACAGCCTCAAGATCAT

CAGC-3',下游序列: 5'-TTCTAGACGGCAGC TCAGGTC-3'。反应条件为: 95℃预变性5 min后,95℃变性1 min,55℃退火50 s,72℃延伸50 s,共35个循环,最后72℃延伸10 min。5 μ L PCR产物在1.5%琼脂糖凝胶中电泳,溴化乙锭显色,目的条带用凝胶成像分析系统做吸光度测定,PPAR γ 、COX-2与GAPDH吸光度的比值作为目的基因mRNA的相对含量。

1.2.4 免疫组织化学检测PPAR γ 和COX-2蛋白的表达:厚4 μ m石蜡切片,常规脱蜡水化,应用免疫组织化学SP(streptavidin-peroxidase)法,即链霉菌抗生物素蛋白-过氧化物酶连结法,鼠抗人PPAR γ 、COX-2单克隆抗体(1:150稀释),以PBS代替一抗作为阴性对照,DAB显色,光镜观察阳性信号。

1.2.5 结果判定:以细胞质内出现棕黄色细颗粒为阳性细胞。COX-2及PPAR γ 的免疫组织化学染色表达情况采用半定量法推算,分别按以下比例计分:细胞染色阳性率在0%-4%计0分,5%-24%计1分,25%-49%计2分,50%-74%计3分,75%-100%计4分;染色强度用0(阴性)、1(弱阳性)和2(强阳性)来表示。各指标的表达水平用细胞染色阳性率与染色强度评分的乘积来表示,具体结果统计按Krajewska等^[11]推荐的方法进行。

统计学处理 所有数据用mean \pm SD表示,应用SPSS16.0统计软件进行统计,采用t检验和方差分析,双变量的相关分析采用Pearson相关分析, $P < 0.05$ 有统计学意义。

2 结果

2.1 PPAR γ 及COX-2在食管鳞癌组织中的表达 PPAR γ 及COX-2的阳性反应物质均呈棕黄色,位于细胞质中(图1, 2)。食管鳞状细胞癌的PPAR γ 表达(2.88 ± 2.23),显著低于正常鳞状上皮(6.29 ± 2.17 , $P < 0.05$),在食管鳞状细胞癌中,PPAR γ 蛋白的免疫组织化学平均积分随肿瘤分化程度降低而降低,不同分化程度食管鳞状细胞癌的PPAR γ 表达有显著性差异($P < 0.05$)。相反,食管鳞状细胞癌的COX-2平均积分(2.12 ± 1.77)则显著高于食管正常鳞状上皮(0.82 ± 0.46 , $P < 0.05$),高分化与中分化鳞状细胞癌的COX-2表达显著高于低分化鳞状细胞癌($P < 0.05$, 表1)。

2.2 尼美舒利对食管癌裸鼠移植瘤的生长抑制作用 裸鼠皮下接种食管癌Eca-109细胞后,5 d后可见肿瘤形成,成瘤率达100%。随时间延长,对照组的移植瘤持续增长,体积明显增大,而尼

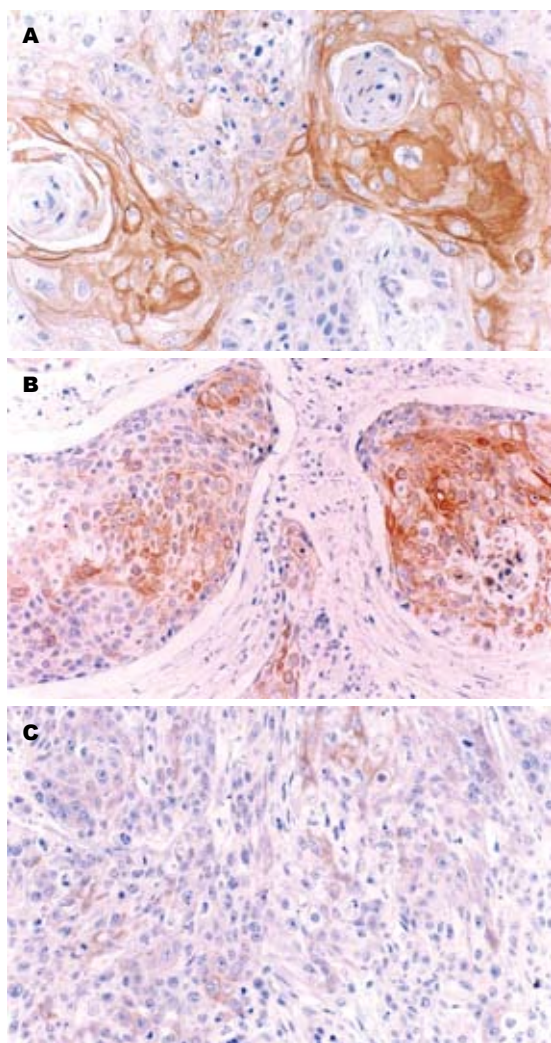


图 1 PPAR γ 在食管鳞状细胞癌组织中的表达(IHC $\times 200$). A: 高分化鳞状细胞癌; B: 中分化鳞状细胞癌; C: 低分化鳞状细胞癌.

美舒利组肿瘤生长缓慢, 除第6天外, 尼美舒利处理组的裸鼠移植瘤体积均显著低于对照组 ($P < 0.05$). 用药4 wk后, 尼美舒利处理组的裸鼠移植瘤体的平均瘤质量为 $0.81 \text{ g} \pm 0.21 \text{ g}$, 显著低于对照组的 $1.45 \text{ g} \pm 0.39 \text{ g}$ ($P < 0.05$), 抑制率为 $44.14\% \pm 6.3\%$ (图3, 4).

2.3 尼美舒利对食管癌移植瘤细胞凋亡率的影响 FCM结果显示, 尼美舒利组的细胞凋亡率显著高于对照组 ($32.21\% \pm 5.98\%$ vs $15.86\% \pm 2.57\%$, $P < 0.05$), 表明尼美舒利可增加移植瘤肿瘤细胞的凋亡率.

2.4 尼美舒利对移植瘤组织COX-2 mRNA及蛋白表达的影响 RT-PCR显示, COX-2 mRNA在对照组瘤组织内表达较高, 相对表达量为 0.95 ± 0.12 , 在尼美舒利处理组相对表达量为 0.60 ± 0.07 , 显著低于对照组 ($P < 0.05$, 图5). 免疫组织化学染色显示, 对照组瘤组织COX-2平均积分为

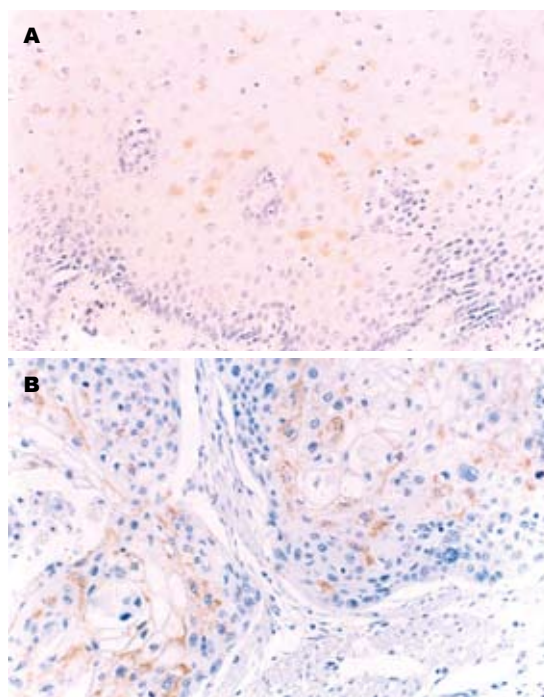


图 2 COX-2在食管正常鳞状上皮和鳞状细胞癌组织中的表达. A: 正常鳞状上皮(IHC $\times 100$); B: 鳞状细胞癌(IHC $\times 200$).

表 1 PPAR γ 、COX-2在食管正常鳞状上皮和鳞状细胞癌组织中的表达 (mean \pm SD)

分组	n	免疫组织化学平均积分	
		PPAR γ	COX-2
正常鳞状上皮	18	6.29 ± 2.17	0.82 ± 0.46
鳞状细胞癌	59	2.88 ± 2.23^a	2.12 ± 1.77^a
高分化	19	4.69 ± 1.99^{ab}	2.28 ± 0.37^a
中分化	25	2.69 ± 1.74^a	2.26 ± 0.46^a
低分化	15	0.92 ± 0.99^c	1.76 ± 0.48

^a $P < 0.05$ vs 食管正常鳞状上皮; ^b $P < 0.05$ vs 中分化鳞状细胞癌;

^c $P < 0.05$ vs 低分化鳞状细胞癌.

4.83 ± 0.82 , 而在尼美舒利处理组瘤组织COX-2染色变浅, COX-2平均积分为 2.83 ± 0.75 , 显著低于对照组 ($P < 0.05$, 图6).

2.5 尼美舒利对移植瘤组织PPAR γ mRNA及蛋白表达的影响 RT-PCR结果显示, PPAR γ mRNA在对照组瘤组织的相对表达量 0.49 ± 0.10 , 尼美舒利组的相对表达量为 0.93 ± 0.11 , 尼美舒利处理后, PPAR γ mRNA的表达明显增高 ($P < 0.05$, 图7). 同样, 免疫组织化学结果显示PPAR γ 蛋白在对照组表达较弱, 平均积分为 1.83 ± 0.75 , 尼美舒利处理后, PPAR γ 表达明显增高, 平均积分为 4.50 ± 0.55 , 显著高于对照组 ($P < 0.05$, 图8).

2.6 COX-2及PPAR γ 表达的相关性分析 经Pear-

■创新盘点

本研究首先分析COX-2及PPAR γ 在食管癌发生过程中的表达变化, 进而建立食管癌裸鼠移植瘤模型, 灌胃给予尼美舒利, 观察尼美舒利的体内抗肿瘤作用并探讨其机制, 为选择性COX-2抑制剂的临床抗肿瘤治疗提供实验参考.

应用要点

本文研究结果显示, COX-2表达上调及PPAR γ 表达下调与食管鳞癌的发生有关, COX-2抑制剂尼美舒利可通过抑制COX-2表达并上调PPAR γ 表达而发挥其抗肿瘤作用, COX-2与PPAR γ 表达呈负相关。



图3 人食管癌裸鼠移植瘤。上排为对照组; 下排为尼美舒利组。

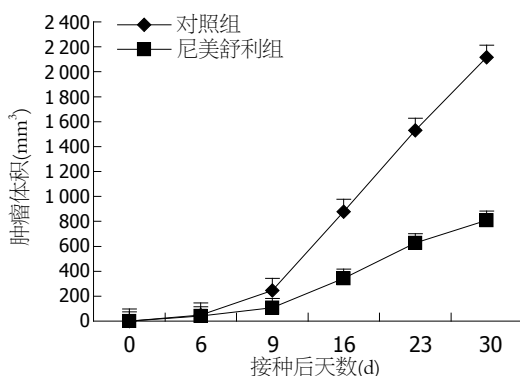


图4 人食管癌裸鼠移植瘤生长曲线。

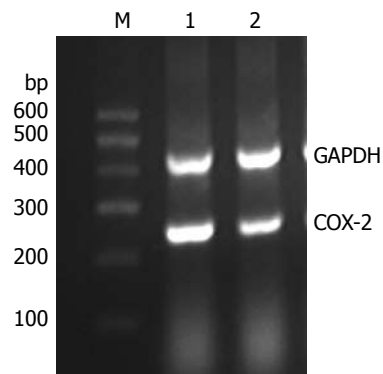


图5 人食管癌裸鼠移植瘤组织中COX-2 mRNA的表达。1: 对照组; 2: 尼美舒利组。

son相关性分析显示, 从食管正常鳞状上皮到鳞状细胞癌, COX-2表达增高, 而PPAR γ 表达则显著降低, 两间呈显著负相关($P < 0.05$)。同样, 体内实验结果显示, COX-2抑制剂尼美舒利可显著抑制COX-2 mRNA及蛋白表达, 同时上调PPAR γ mRNA及蛋白表达, 二者呈显著负相关($P < 0.05$)。

3 讨论

越来越多的研究表明, COX-2表达上调是肿瘤发生的重要生物分子基础, 在多种恶性肿瘤如结肠癌、胃癌、肺癌、前列腺癌等组织中表达上调。流行病学调查发现, 口服非甾体类抗炎药和COX-2抑制剂可降低结直肠癌、乳腺癌

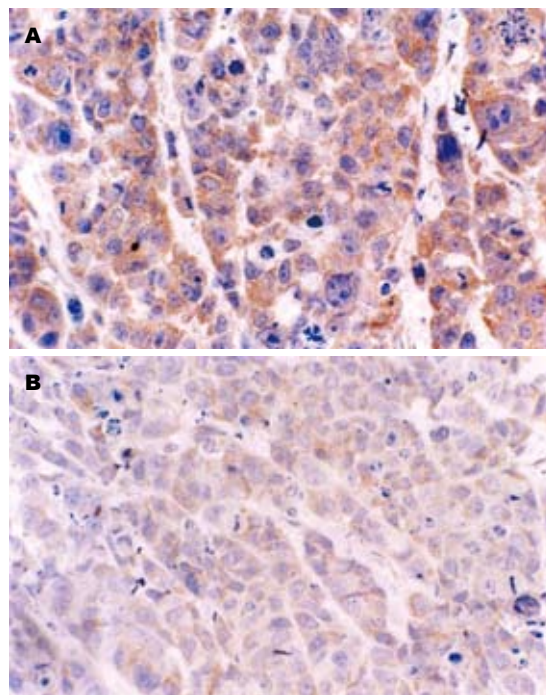


图6 人食管癌裸鼠移植瘤组织中COX-2蛋白的表达(IHC $\times 400$)。A: 对照组; B: 尼美舒利组。

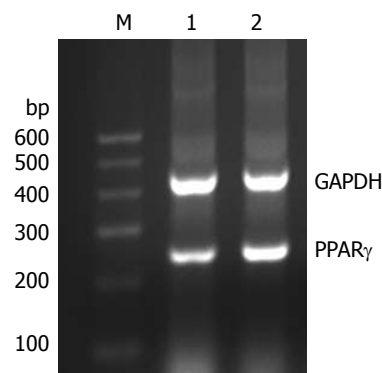


图7 人食管癌裸鼠移植瘤组织中PPAR γ mRNA的表达。1: 对照组; 2: 尼美舒利组。

等的发病风险^[12-14], 抑制COX-2可抑制肿瘤细胞生长^[15,16], 我们前期的研究表明, COX-2选择性抑制剂尼美舒利能够诱导食管癌Eca-109细胞凋亡, 从而抑制其生长^[17,18]。但对于这个肿瘤靶向分子在肿瘤中的表达与信号传导通路的关系目前尚不明确。

PPAR γ 是一类配体激活的转录因子, 属于核激素受体超家族的一员, 与配体结合后导致PPAR靶基因的mRNA水平改变从而调节其功能, PPAR γ 可被许多不同结构的化合物包括长链脂肪酸、贝特类降血脂药、抗糖尿病药物等活化, 尽管化学结构不同, 但都有一特定的结构即亲脂的骨架和酸性碳水化合物部分。一些非甾体类抗炎药具有这些结构特点因此能活化PPARs^[19]。研究显示, PPAR γ 与肿瘤关系密切, 但在肿瘤发生、发展中的生物学作用研究结

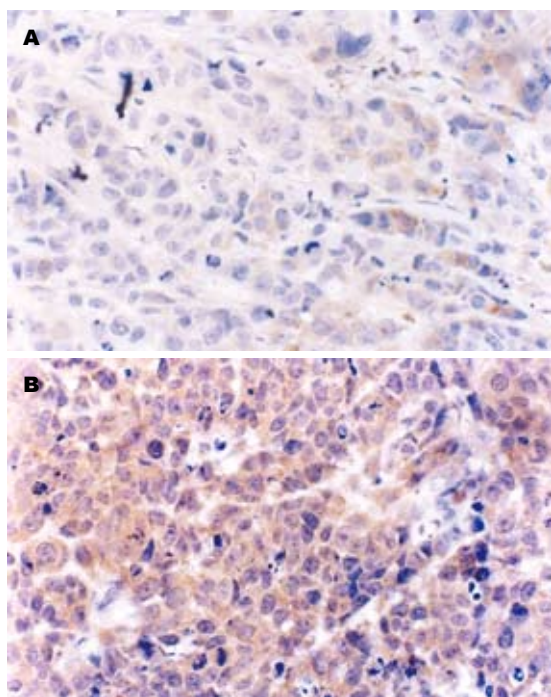


图 8 人食管癌裸鼠移植瘤组织中PPAR γ 蛋白的表达(IHC \times 400). A: 对照组; B: 尼美舒利组.

果不一, 有细胞培养及动物实验研究结果显示, PPAR γ 被配体激活不仅可抑制肿瘤细胞的增殖, 而且可导致肿瘤细胞的凋亡^[20-23], 但也有结果表明, PPAR γ 有促进肿瘤生长作用^[24,25].

COX-2与PPAR γ 都与肿瘤密切相关, 二者间是否有关, Badawi等^[26]研究结果表明COX-2抑制剂和PPAR γ 配体在鼠乳腺癌形成过程中可下调COX-2表达、上调PPAR γ 表达. 而且, 激活PPAR γ 后可诱导人结肠癌HT-29细胞凋亡并下调COX-2蛋白表达^[27], 余力伟等^[28]研究表明COX-2抑制剂可能通过非COX-2途径调控PPARs信号转导通路而抑制结肠癌细胞增殖, 提示COX-2与PPAR γ 可能具有一定关系. PPAR γ 是否参与食管癌的发生、发展? 他们的相关性如何? 本研究结果显示食管癌组织中COX-2表达明显高于正常食管上皮, 而PPAR γ 表达则显著低于食管正常鳞状上皮, 双变量相关分析显示二者呈显著负相关. 但在食管癌组织中, 肿瘤分化越差, 二者表达越低, 表明COX-2与PPAR γ 表达可能有关.

为阐明PPAR γ 是否参与尼美舒利的抗肿瘤作用机制, 我们进行了体内水平实验, 结果表明COX-2抑制剂尼美舒利可抑制食管癌裸鼠移植瘤生长并诱导肿瘤细胞凋亡, 尼美舒利作用后, 肿瘤组织中COX-2 mRNA及蛋白表达降低, 同时PPAR γ mRNA及蛋白表达升高, COX-2与PPAR γ 表达之间呈显著负相关, 尼美舒利可上

调PPAR γ 表达, 与Nikitakis等^[29]和Sun等^[30]的研究结果一致. 关于尼美舒利上调PPAR γ 表达的机制, 我们推测尼美舒利可能通过抑制COX-2活性, 降低PGE₂水平使花生四烯酸蓄积, 从而使PPAR γ 的天然配体15d-PGJ₂水平增高而活化PPAR γ .

总之, 在食管癌发生过程中, COX-2表达上调, 而PPAR γ 表达下调, COX-2抑制可通过抑制抑制裸鼠移植瘤生长从而发挥抗肿瘤作用, 其机制与抑制COX-2表达, 激活PPAR γ 从而诱导肿瘤细胞凋亡有关, COX-2抑制剂可能具有PPAR γ 配体的作用, 为COX-2抑制剂的抗肿瘤作用提供了新的理论依据.

4 参考文献

- Buchanan FG, Holla V, Katkuri S, Matta P, DuBois RN. Targeting cyclooxygenase-2 and the epidermal growth factor receptor for the prevention and treatment of intestinal cancer. *Cancer Res* 2007; 67: 9380-9388
- Tuynman JB, Vermeulen L, Boon EM, Kemper K, Zwiderman AH, Peppelenbosch MP, Richel DJ. Cyclooxygenase-2 inhibition inhibits c-Met kinase activity and Wnt activity in colon cancer. *Cancer Res* 2008; 68: 1213-1220
- Uddin S, Ahmed M, Hussain A, Assad L, Al-Dayel F, Bavi P, Al-Kuraya KS, Munkarah A. Cyclooxygenase-2 inhibition inhibits PI3K/AKT kinase activity in epithelial ovarian cancer. *Int J Cancer* 2010; 126: 382-394
- Menczer J. Cox-2 expression in ovarian malignancies: a review of the clinical aspects. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2009; 146: 129-132
- Baek JY, Hur W, Wang JS, Bae SH, Yoon SK. Selective COX-2 inhibitor, NS-398, suppresses cellular proliferation in human hepatocellular carcinoma cell lines via cell cycle arrest. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 1175-1181
- Krishnan A, Nair SA, Pillai MR. Biology of PPAR gamma in cancer: a critical review on existing lacunae. *Curr Mol Med* 2007; 7: 532-540
- Kristiansen G, Jacob J, Buckendahl AC, Grützmann R, Alldinger I, Sipos B, Klöppel G, Bahra M, Langrehr JM, Neuhaus P, Dietel M, Pilarsky C. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma is highly expressed in pancreatic cancer and is associated with shorter overall survival times. *Clin Cancer Res* 2006; 12: 6444-6451
- Han S, Roman J. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma: a novel target for cancer therapeutics? *Anticancer Drugs* 2007; 18: 237-244
- Ma XM, Yu H, Huai N. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma is essential in the pathogenesis of gastric carcinoma. *World J Gastroenterol* 2009; 15: 3874-3883
- Nakamura Y, Suzuki T, Sugawara A, Arai Y, Sasano H. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma in human prostate carcinoma. *Pathol Int* 2009; 59: 288-293
- Krajewska M, Krajewski S, Epstein JI, Shabaik A, Sauvageot J, Song K, Kitada S, Reed JC.

■同行评价

本文选题新颖, 内容充实, 具有一定的临床应用价值.

- Immunohistochemical analysis of bcl-2, bax, bcl-X, and mcl-1 expression in prostate cancers. *Am J Pathol* 1996; 148: 1567-1576
- 12 Konturek PC, Rembiesz K, Burnat G, Konturek SJ, Tusinela M, Bielanski W, Rehfeld J, Karcz D, Hahn E. Effects of cyclooxygenase-2 inhibition on serum and tumor gastrins and expression of apoptosis-related proteins in colorectal cancer. *Dig Dis Sci* 2006; 51: 779-787
- 13 Harris RE, Beebe-Donk J, Alshafie GA. Reduction in the risk of human breast cancer by selective cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitors. *BMC Cancer* 2006; 6: 27
- 14 Harris RE, Beebe-Donk J, Alshafie GA. Reduced risk of human lung cancer by selective cyclooxygenase 2 (COX-2) blockade: results of a case control study. *Int J Biol Sci* 2007; 3: 328-334
- 15 Harris RE. Cyclooxygenase-2 (cox-2) blockade in the chemoprevention of cancers of the colon, breast, prostate, and lung. *Inflammopharmacology* 2009; 17: 55-67
- 16 Xu XF, Xie CG, Wang XP, Liu J, Yu YC, Hu HL, Guo CY. Selective inhibition of cyclooxygenase-2 suppresses the growth of pancreatic cancer cells in vitro and in vivo. *Tohoku J Exp Med* 2008; 215: 149-157
- 17 刘俊茹, 齐凤英, 左连富, 李丽, 张玉军, 郭建文, 刘江惠. 尼美舒利对人食管癌Eca-109细胞凋亡及Survivin和Caspase-3表达的影响. *中国肿瘤临床* 2006; 33: 16-19
- 18 刘俊茹, 齐凤英, 左连富, 李丽, 郭建文, 刘江惠. 尼美舒利对食管癌Eca-109细胞增殖及COX-2和P27kip1表达的影响. *基础医学与临床* 2006; 26: 729-733
- 19 Lehmann JM, Lenhard JM, Oliver BB, Ringold GM, Kliewer SA. Peroxisome proliferator-activated receptors alpha and gamma are activated by indomethacin and other non-steroidal anti-inflammatory drugs. *J Biol Chem* 1997; 272: 3406-3410
- 20 Takashima T, Fujiwara Y, Hamaguchi M, Sasaki E, Tominaga K, Watanabe T, Oshitani N, Higuchi K, Arakawa T. Relationship between peroxisome proliferator-activated receptor-gamma expression and differentiation of human esophageal squamous cell carcinoma. *Oncol Rep* 2005; 13: 601-606
- 21 Nagata D, Yoshihiro H, Nakanishi M, Naruyama H, Okada S, Ando R, Tozawa K, Kohri K. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma and growth inhibition by its ligands in prostate cancer. *Cancer Detect Prev* 2008; 32: 259-266
- 22 Mustafa A, Kruger WD. Suppression of tumor formation by a cyclooxygenase-2 inhibitor and a peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonist in an in vivo mouse model of spontaneous breast cancer. *Clin Cancer Res* 2008; 14: 4935-4942
- 23 Shim J, Kim BH, Kim YI, Kim KY, Hwangbo Y, Jang JY, Dong SH, Kim HJ, Chang YW, Chang R. The peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligands, pioglitazone and 15-deoxy-Delta(12,14)-prostaglandin J(2), have antineoplastic effects against hepatitis B virus-associated hepatocellular carcinoma cells. *Int J Oncol* 2010; 36: 223-231
- 24 Choi IK, Kim YH, Kim JS, Seo JH. PPAR-gamma ligand promotes the growth of APC-mutated HT-29 human colon cancer cells in vitro and in vivo. *Invest New Drugs* 2008; 26: 283-288
- 25 Saez E, Rosenfeld J, Livolsi A, Olson P, Lombardo E, Nelson M, Banayo E, Cardiff RD, Izpisua-Belmonte JC, Evans RM. PPAR gamma signaling exacerbates mammary gland tumor development. *Genes Dev* 2004; 18: 528-540
- 26 Badawi AF, Eldeen MB, Liu Y, Ross EA, Badr MZ. Inhibition of rat mammary gland carcinogenesis by simultaneous targeting of cyclooxygenase-2 and peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *Cancer Res* 2004; 64: 1181-1189
- 27 Yang WL, Frucht H. Activation of the PPAR pathway induces apoptosis and COX-2 inhibition in HT-29 human colon cancer cells. *Carcinogenesis* 2001; 22: 1379-1383
- 28 余力伟, 马向涛. COX-2抑制剂NS398调控PPARs信号转导通路抑制结肠癌细胞增殖的分子机制. *世界华人消化杂志* 2006; 14: 2928-2932
- 29 Nikitakis NG, Hebert C, Lopes MA, Reynolds MA, Sauk JJ. PPARgamma-mediated antineoplastic effect of NSAID sulindac on human oral squamous carcinoma cells. *Int J Cancer* 2002; 98: 817-823
- 30 Sun WH, Chen GS, Ou XL, Yang Y, Luo C, Zhang Y, Shao Y, Xu HC, Xiao B, Xue YP, Zhou SM, Zhao QS, Ding GX. Inhibition of COX-2 and activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma synergistically inhibits proliferation and induces apoptosis of human pancreatic carcinoma cells. *Cancer Lett* 2009; 275: 247-255

编辑 李军亮 电编 何基才

胃癌超声造影的增强强度和微血管密度的相关性

刘大铭, 黄丽萍, 张宏宇, 陈艳春

刘大铭, 黄丽萍, 张宏宇, 陈艳春, 中国医科大学附属盛京医院超声科 辽宁省沈阳市 110004

刘大铭, 2007年中国医科大学在读硕士, 主要从事腹部超声诊断及超声造影研究。

辽宁省教育厅2008年度高等学校创新团队计划基金资助项目, No. 2008T210

作者贡献分布: 刘大铭与黄丽萍对此文所作贡献均等; 此课题由黄丽萍、刘大铭及张宏宇设计; 研究过程由刘大铭、黄丽萍及张宏宇操作完成; 研究所用新试剂及分析工具由黄丽萍提供; 数据分析由陈艳春完成; 本论文写作由刘大铭与黄丽萍完成。

通讯作者: 黄丽萍, 副教授, 110004, 辽宁省沈阳市和平区三好街36号, 中国医科大学附属盛京医院超声科。

lipinghuang08@sina.com

电话: 024-96615-74194

收稿日期: 2010-03-15 修回日期: 2010-05-17

接受日期: 2010-05-25 在线出版日期: 2010-07-18

Correlation between intensity of ultrasonographic contrast enhancement and microvessel density in gastric cancer

Da-Ming Liu, Li-Ping Huang, Hong-Yu Zhang, Yan-Chun Chen

Da-Ming Liu, Li-Ping Huang, Hong-Yu Zhang, Yan-Chun Chen, Department of Ultrasound, Shengjing Hospital of China Medical University, Shenyang 110004, Liaoning Province, China

Supported by: the 2008 Creative Team Program of Liaoning Provincial Department of Education, No. 2008T210

Correspondence to: Associate Professor Li-Ping Huang, Department of Ultrasound, Shengjing Hospital of China Medical University, 36 Sanhao Street, Heping District, Shenyang 110004, Liaoning Province, China. lipinghuang08@sina.com

Received: 2010-03-15 Revised: 2010-05-17

Accepted: 2010-05-25 Published online: 2010-07-18

Abstract

AIM: To investigate the correlation between the enhanced intensity (EI) revealed by contrast-enhanced ultrasonography (CEUS) and microvessel density (MVD) in gastric cancer.

METHODS: Thirty-seven patients who had pathologically confirmed gastric cancer and underwent CEUS were enrolled in this study. Parameters of the time-intensity curve (TIC), including peak intensity (PI) and basic intensity (BI) of gastric cancer and normal gastric wall, were analyzed. EI (EI = PI - BI) was then calculated. Immunohistochemical staining for CD34

was performed to evaluate MVD. The correlation between EI and MVD was then analyzed.

RESULTS: The EI in gastric cancer lesions was significantly higher than that in normal gastric wall (19.46 ± 5.97 vs 14.25 ± 2.55 , $P < 0.01$). The MVD in gastric cancer lesions was also significantly higher than that in normal gastric wall (84.68 ± 37.99 vs 21.09 ± 5.49 , $P < 0.01$). There was a positive linear correlation between EI and MVD in gastric cancer lesions ($r = 0.77$, $P < 0.01$).

CONCLUSION: EI is positively correlated with MVD in patients with gastric cancer. CEUS may be used for assessing the angiogenesis, biological behavior and prognosis of gastric cancer.

Key Words: Gastric cancer; Contrast-enhanced ultrasonography; Enhanced intensity; Microvessel density

Liu DM, Huang LP, Zhang HY, Chen YC. Correlation between intensity of ultrasonographic contrast enhancement and microvessel density in gastric cancer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(20): 2109-2113

摘要

目的: 探讨胃癌超声造影的增强强度和胃癌病灶微血管密度(microvessel density, MVD)的相关性。

方法: 住院手术并有病理明确诊断的37例胃癌患者作为研究对象。术前进行超声造影检查, 应用声学定量软件绘制胃癌病灶和癌旁正常胃壁的时间-强度曲线, 定量分析超声造影的增强强度, 术后病理标本应用抗CD34免疫组织化学法染色并检测肿瘤的MVD, 分析胃癌病灶超声造影的增强强度和MVD的相关性。

结果: 37例胃癌病灶的增强强度高于癌旁正常胃壁(19.46 ± 5.97 vs 14.25 ± 2.55 , $P < 0.01$), 胃癌病灶的MVD高于癌旁正常胃壁(84.68 ± 37.99 vs 21.09 ± 5.49 , $P < 0.01$), 差异有统计学意义。胃癌病灶的增强强度和MVD呈正相关($r = 0.77$, $P < 0.01$)。

结论: 胃癌病灶的超声造影增强强度和MVD

■背景资料

胃癌的微血管密度(MVD)是反映肿瘤血管生成活性和强度的重要指标, 是一种重要、独立的预后标志。但MVD计数需要通过手术或者活检取材后才能获得, 本研究对胃癌患者术前进行超声造影检查, 探讨超声造影的增强强度和MVD计数的相关性。

■同行评议者

孙明军, 教授, 中国医科大学附属第一医院内镜中心; 欧希龙, 副教授, 东南大学中大医院消化科

■研发前沿

术前判定胃癌的血流灌注状态多进行增强CT或增强MRI检查,因普通超声检查无法显示微血管,以往应用较少,近来超声造影剂声诺维应用于临床,因其可以动态、实时显示病灶的血流灌注状态,超声造影开始应用于胃肠检查。

呈正相关,胃癌超声造影可以评价肿瘤新生血管生成和生物学行为。

关键词: 胃癌; 超声造影; 增强强度; 微血管密度

刘大铭, 黄丽萍, 张宏宇, 陈艳春. 胃癌超声造影的增强强度和微血管密度的相关性. 世界华人消化杂志 2010; 18(20): 2109-2113

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/2109.asp>

0 引言

胃癌是最常见的恶性肿瘤之一,病死率占恶性肿瘤的首位^[1]. 胃癌的新生血管是肿瘤生长、转移的基础,肿瘤的微血管密度(microvessel density, MVD)是反映肿瘤血管生成活性和强度的重要指标^[2]. 胃癌的MVD计数被认为是一种重要、独立的预后标志. 近年来,对胃癌MVD的研究越来越受到重视,但是MVD需要通过手术或者活检取材后才能获得,我们对胃癌患者术前进行超声造影(contrast enhanced ultrasonography, CEUS)检查,探讨胃癌CEUS时间-强度曲线的增强强度(enhanced intensity, EI)和术后病理MVD结果的相关性。

1 材料和方法

1.1 材料 选自我院2008-06/2009-07经手术和病理明确诊断的胃癌患者37例,其中男22例,女15例,年龄30-75(平均 57.4 ± 13.0)岁. 所有患者术前均未接受放疗、化疗,也无长期服用非甾体类抗炎药或糖皮质激素病史. 造影剂采用Bracco公司的SonoVue(声诺维),用5 mL生理盐水配成混悬液后,每次2.4 mL经肘前浅静脉团注,再用5 mL生理盐水冲管. 仪器采用GE公司LOGIQ 9超声诊断仪,使用4C造影探头,频率为2-4 MHz,低机械指数0.07-0.10. 该机配备CPS(contrast pulse sequence)造影专用程序, TAD(tru agent detection)造影剂检测技术和声学定量分析软件. 免疫组织化学采用链霉素亲生物素-过氧化物酶(S-P)法,通用型SP试剂盒、浓缩型DAB显色试剂盒及即用型鼠抗人原始造血细胞CD34单克隆抗体均购于北京中杉金桥生物技术公司。

1.2 方法

1.2.1 CEUS: 所有患者检查前禁食8 h以上,检查时采用仰卧位,首先饮用纯净水600-800 mL充盈胃腔后,对胃进行整体扫查,注意病灶部位的胃壁层次结构改变,判定病变浸润深度、范围及毗邻脏器情况,病灶数目、大小、回声特征. 选

择好病灶的最佳观察切面后进入造影状态,选择双幅显示模式,此时显示屏上左侧显示二维图像(基波图像),右侧几乎看不到病灶的灰阶图像,显示为黑屏(为造影图像),从左侧肘正中静脉以快速团注法注入声诺维混悬液2.4 mL,同时启动超声仪器内置的计时器,实时不间断地观察病灶的EI变化,造影全过程不少于5 min,造影全过程记录于超声仪内。

1.2.2 造影图像分析: 由两名医生对造影图像进行分析. 将感兴趣区(region of interest, ROI)分别放置于胃癌病灶及癌旁正常胃壁处,声学定量软件生成时间-强度曲线(time-intensity curve, TIC),记录曲线的峰值强度(peak intensity, PI)、基础强度(basic intensity, BI),并分别计算病灶处及癌旁胃壁处的EI, $EI(dB) = PI(dB) - BI(dB)$. 因胃肠蠕动等原因导致ROI偏离靶目标位置时,逐帧移动图像,相应的逐帧修正ROI放置的位置。

1.2.3 免疫组织化学MVD计数: 将手术切除组织制成蜡块,取胃癌病灶及癌旁正常胃壁进行切片,免疫组织化学抗CD34标记,计数肿瘤组织的MVD. MVD的计数方法采用Weidner^[3]的计数方法,先在100倍低倍镜下寻找新生血管最密集区域,即“热点”,然后在200倍高倍镜下观察染成棕色的单个细胞和细胞丛,并以此作为一个血管. 若管腔很大很长,单位面积内的血管数较少,属于特殊类型的血管,则采用Tanigawa等^[4]报道的改良法计算,即每40 μm 长度的此类血管计数为一个MVD值,分辨不清或染色模糊的细胞不计数. 结果判定在双盲法下进行。

统计学处理 采用SPSS13.0统计软件进行数据分析,计量资料以 $\text{mean} \pm SD$ 表示. 两样本均数比较采用 t 检验,两变量间的相关关系采用Spearman等级相关分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 CEUS曲线及MVD图像 ROI放置于胃癌病灶和癌旁正常胃组织处,可显示造影的TIC曲线(图1). 免疫组织化学染色: CD34阳性染色定位于血管内皮细胞,呈棕黄色,孤立的棕黄色血管内皮细胞或细胞簇代表一条单独的微血管(图2)。

2.2 胃癌病灶与癌旁正常胃壁的EI和MVD比较 37例患者胃癌组织的EI高于癌旁正常胃壁,组间差异有统计学意义($P < 0.01$). 胃癌病灶的MVD高于癌旁正常胃壁,组间差异有统计学意义($P < 0.01$, 表1)。

■相关报道

黄品同等报道胃癌超声造影的增强强度和微血管密度有相关性,可以术前评估胃癌的血流灌注状态,间接判定预后。

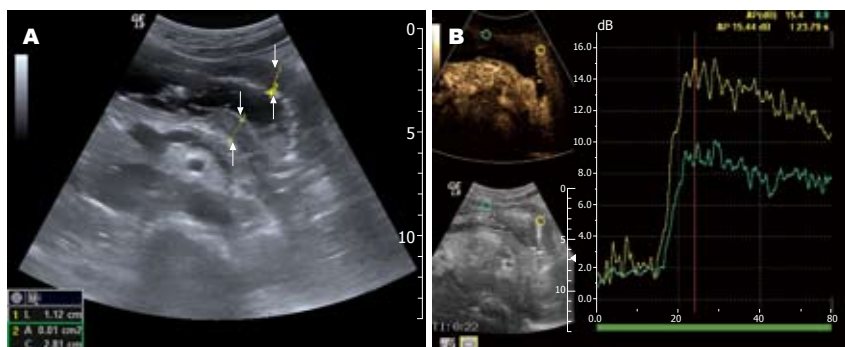


图 1 胃癌超声图像及超声造影图像。A: 胃癌超声图像, 白色箭头示胃癌病灶; B: 超声造影图像, 黄色示胃癌病灶及其TIC曲线, 蓝色示癌旁正常胃壁及其TIC曲线。

■创新盘点

本文通过术前进行胃癌超声造影检查, 并将造影增强强度和术后病理MVD结果进行相关性分析, 证实其相关性, 胃癌术前超声造影可以评估肿瘤的血流灌注状态, 反映肿瘤新生血管生成。

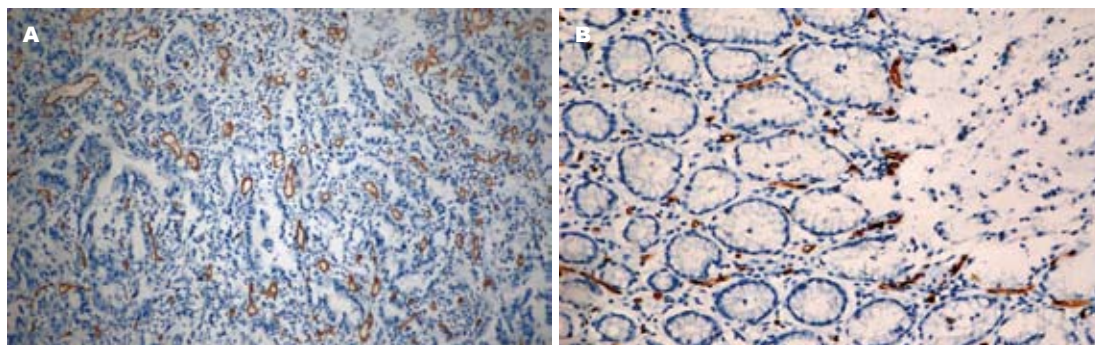


图 2 免疫组织化学MVD图(抗CD34免疫组织化学染色×200)。A: 胃癌病灶; B: 癌旁正常胃壁。

表 1 胃癌病灶与癌旁正常胃壁组的EI和MVD比较 ($n = 37$)

分组	EI(dB)	MVD(条/200高倍视野)
癌旁正常胃壁组	14.25 ± 2.55	21.09 ± 5.49
胃癌病灶组	19.46 ± 5.97^b	84.68 ± 37.99^b

^b $P < 0.01$ vs 癌旁正常胃壁组。

2.3 胃癌组织EI和MVD的相关性 胃癌组织的EI和MVD相关性的散点图(图3), 二者呈正相关($r = 0.77, P < 0.01$)。

3 讨论

胃癌同其他恶性肿瘤一样, 其主要的生物学特征之一是向周围组织浸润扩展的能力, 并能向远隔部位转移, 形成转移癌^[5,6]。术前评估胃癌的分期尤为重要, 临床多依赖增强CT、增强MRI或超声内镜^[7-9]。张艳华等^[10]报道体表超声可以判定胃癌的某些生物学行为, 依此为胃癌患者进行术前准确分期, 确定手术切除范围, 选择最佳治疗方案^[11,12], 为判定疗效及预后提供有价值信息。

普通的多普勒超声因为无法显示微血管, 无法评估肿瘤的血流灌注状态。使用新型CEUS剂声诺维和低机械指数成像技术可以敏感获得微泡所代表的纯血流信息, 实时评价病灶的大

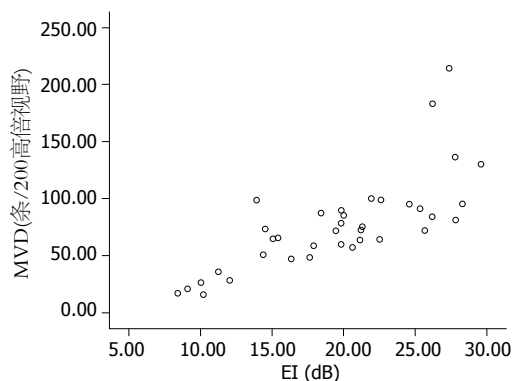


图 3 胃癌病灶EI和MVD的散点图。二者呈正相关, $r = 0.77, P < 0.01$ 。

血管和微血管的血流分布情况, 从而对病灶的血流状态做出诊断^[13,14]。CEUS为一动态过程, 可观察某一病灶造影剂进入及流出的全过程, 这个实时操作过程是其他影像学技术无法比拟的。CEUS剂声诺维是目前国内唯一准许临床应用的CEUS剂, 近年来广泛应用于临床, 黄丽萍等^[15]报道肝脏恶性肿瘤的CEUS增强表现与病理学类型及分化程度相关。

声诺维是真正的血池显像剂, 不会进入到血管外间隙中, 可准确反映病灶的血流动力学改变。本研究对37例胃癌患者进行CEUS检查, 分析胃癌病灶及癌旁正常胃壁的TIC曲线的EI, 造影剂声诺维的SF6气体微泡和红细胞一起运行,

■应用要点

本研究为术前判定胃癌病灶的血流灌注状态提供了信息,为术前判定胃癌分期、预后评价提供了实验依据,但因胃肠气体及胃肠蠕动对病灶显示的影响,应该继续研究,充分发挥优势,减少超声检查时的干扰。

气体微泡密集的区域结合仪器的多脉冲图像技术,显著提高了组织回声,表现为CEUS高增强区,由TIC曲线可以定量测量^[16],结果表明胃癌病灶的EI高于癌旁正常胃壁,组间差异有统计学意义($P<0.01$)。

胃癌是一类多基因疾病,癌基因的活化、抑癌基因的失活及许多血管生成因子与抑制因子的调节失衡,在血管新生中起关键作用^[17,18]。肿瘤MVD是反映肿瘤血管生成活性和强度的可靠指标,被认为是评价肿瘤血管生成的金标准,被认为是一种重要、独立的预后标志。MVD越高,肿瘤营养基础越好,肿瘤容易生长,研究显示新生血管较成熟血管更有穿透性,导致瘤细胞容易进入血循环,预后不佳^[19]。其所选取的血管内皮细胞标志物以CD34抗原特异性最高,通常被研究用做MVD的标志物。CD34分子是一种重糖化I型跨膜表面糖磷酸脂蛋白,相对分子质量约110 000 Da,在造血祖细胞,血管内皮细胞,胚胎纤维母细胞以及婴儿和成人纤维母细胞的某些细胞中选择表达,除karposi肉瘤和血管内皮细胞瘤等少数肿瘤外,绝大多数肿瘤实质细胞不表达CD34抗原,而肿瘤间质细胞中仅血管内皮细胞表达^[20],微血管染色呈棕黄色,染色密集区域位于癌巢及癌细胞密集区、癌灶边缘^[21]。胃癌治疗仍首选手术治疗,术前准确判定分期尤为重要^[22]。文献报道胃癌MVD与胃癌淋巴结转移和分期有关,MVD值还与胃癌浸润深度有关。通过研究MVD在胃癌中的表达,探讨他们与胃癌浸润、转移的相关性,可以为胃癌的病情判断提供依据^[23,24]。

肿瘤的血管生成是一个多因素作用、整体联动、动态变化的过程。受多种因子的调节,肿瘤血管的新生是促血管生成因子和血管生成抑制因子间失衡的结果。人表皮生长因子(vessel endothelium growth factor, VEGF)是肿瘤血管生成的重要促进因子,最近有很多研究针对这一因子进行研究,VEGF与肿瘤血管的生成密切相关,并且VEGF与肿瘤的TNM分期和分级有关^[25]。肿瘤生长具有血管依赖性,新生血管从宿主获取营养供给肿瘤,又通过血管向宿主输送瘤细胞,增强肿瘤病灶的远处转移能力。阻断新生血管形成过程的任何一步,将阻止肿瘤血管生成^[26,27]。最近许多研究证实了血管生成与胃癌侵袭性之间的联系,同时也有许多研究证实抑制血管生成能显著抑制肿瘤的生长及转移,文献报道VEGF阴性患者预后好于阳性者^[28],VEGF可用于评

估胃癌的抗血管肿瘤治疗,在胃癌的治疗实验中已初步显示出良好的应用前景^[29]。文献报道MVD与VEGF之间存在明显正相关性,所以胃癌MVD可以作为评估肿瘤血管生成抑制剂疗效的一个指标。

以往评价肿瘤血管生成多采用组织切片经免疫组织化学法检测肿瘤MVD,但是这些研究是通过活检或手术后获得标本,具有创伤性和不可重复性,且方法繁琐耗时,所得结果仅反映肿瘤较小区域的血管生成情况,无法动态观察,更无法观测功能及微血管循环情况。本文CEUS研究结果显示胃癌组织MVD高于癌旁正常胃壁,差异有统计学意义($P<0.01$),与文献报道结果相符^[30]。对37例胃癌组织进行抗CD34免疫组织化学染色,计数病灶的MVD值,并将其与CEUS TIC曲线的EI进行相关性分析,结果表明两者呈正相关($r = 0.77, P<0.01$)。因为声诺维是血池显像剂,不会进入到血管外间隙中,其SF6气体微泡密集的区域就是血管密集的区域,表现为CEUS的高增强区,同时说明造影微泡的数量和组织中新血管程度有关,肿瘤新生血管的出现改变了EI^[31],肿瘤MVD越大,肿瘤EI越明显,表现为造影TIC曲线EI越大。说明CEUS的定量指标EI可以很好地反映胃癌病灶的MVD情况。

CEUS增强原理不同于增强CT和MRI扫描。增强CT使用的小分子对比剂,可透过血管壁扩散,增强CT能反映肝脏肿瘤的血供特点,并可定量反映病灶的灌注量以及毛细血管通透性,增强MRI使用较广泛的也是小分子对比剂,他可以扩散入细胞外间隙中,而CEUS剂声诺维不会进入到血管外间隙中,可准确反映病灶的血流信息。有研究报道肿瘤MVD与增强CT的相关性,结果表明肿瘤螺旋CT同层动态扫描所获得的强化峰值及强化比值均与癌组织MVD之间呈正相关,并一定程度上反映VEGF表达水平。CEUS参数与VEGF表达水平的相关关系需进一步研究。

CEUS可实时观察病变区域造影剂进入及流出的全过程,从而对肿瘤的血流灌注做出诊断,其局限性在于一次注药只能观察某一个病灶的增强特点,这一点不如增强CT及增强MRI,我们认为各种影像学诊断方法应互为补充,共同为病变的诊断及鉴别诊断提供全面的信息。

总之,CEUS检查简便易行、可重复性好、无放射性损伤,可在术前、活体状态下动态评估胃癌的微血管生成情况,能很好地反映胃癌病灶的MVD,对进一步研究肿瘤的生物行为,

预测肿瘤的发生发展和判定疗效及预后, 均具有临床实用意义。

4 参考文献

- 秦斌, 张筱茵. 胃癌分子免疫学研究进展. 世界华人消化杂志 2009; 17: 115-119
- Qin LX, Tang ZY. The prognostic molecular markers in hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2002; 8: 385-392
- Weidner N. Intratumor microvessel density as a prognostic factor in cancer. *Am J Pathol* 1995; 147: 9-19
- Tanigawa N, Lu C, Mitsui T, Miura S. Quantitation of sinusoid-like vessels in hepatocellular carcinoma: its clinical and prognostic significance. *Hepatology* 1997; 26: 1216-1223
- 林瑶光, 张君红, 李佳荃. Flt-1、PDGFR和MVD的表达与胃癌浸润、转移的相关性. 世界华人消化杂志 2009; 17: 606-609
- 汤涛, 王国斌. 抑制血管生成与胃癌治疗的研究进展. 世界华人消化杂志 2007; 15: 433-439
- Wei WZ, Yu JP, Li J, Liu CS, Zheng XH. Evaluation of contrast-enhanced helical hydro-CT in staging gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 4592-4595
- Khushalani N. Cancer of the esophagus and stomach. *Mayo Clin Proc* 2008; 83: 712-722
- 贾业贵, 邓长生. 超声内镜对胃癌外科手术及内镜下黏膜可切除性的评价. 世界华人消化杂志 2009; 17: 1665-1668
- 张艳华, 郭存丽, 顾秀娟, 潘丽霞. 体表超声判定胃癌生物学行为的意义. 世界华人消化杂志 2006; 14: 2098-2101
- Liao SR, Dai Y, Huo L, Yan K, Zhang L, Zhang H, Gao W, Chen MH. Transabdominal ultrasonography in preoperative staging of gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 3399-3404
- Chen CY, Hsu JS, Wu DC, Kang WY, Hsieh JS, Jaw TS, Wu MT, Liu GC. Gastric cancer: preoperative local staging with 3D multi-detector row CT--correlation with surgical and histopathologic results. *Radiology* 2007; 242: 472-482
- Klein D, Jenett M, Gassel HJ, Sandstede J, Hahn D. Quantitative dynamic contrast-enhanced sonography of hepatic tumors. *Eur Radiol* 2004; 14: 1082-1091
- von Herbay A, Vogt C, Willers R, Häussinger D. Real-time imaging with the sonographic contrast agent SonoVue: differentiation between benign and malignant hepatic lesions. *J Ultrasound Med* 2004; 23: 1557-1568
- 黄丽萍, 解丽梅, 唐少珊, 刘守君. 实时超声造影对肝脏恶性肿瘤鉴别诊断的应用研究. 中国超声医学杂志 2007; 23: 134-136
- Shiyan L, Pintong H, Zongmin W, Fuguang H, Zhiqiang Z, Yan Y, Cosgrove D. The relationship between enhanced intensity and microvessel density of gastric carcinoma using double contrast-enhanced ultrasonography. *Ultrasound Med Biol* 2009; 35: 1086-1091
- Yokozaki H, Yasui W, Tahara E. Genetic and epigenetic changes in stomach cancer. *Int Rev Cytol* 2001; 204: 49-95
- 唐忠辉, 陈华生, 邹宗楷, 蔡韶滨, 苏海燕, 沈洪武, 吴文乔, 林莉, 王元亨. TFF3和CD147在不同胃黏膜病变中的表达及其与血管生成的关系. 世界华人消化杂志 2008; 16: 3631-3636
- 龙辉, 吴清明, 李欢. VEGF的表达及其微血管密度在胃癌组织中的意义. 世界华人消化杂志 2010; 18: 557-562
- Kimura H, Nakajima T, Kagawa K, Deguchi T, Kakusui M, Katagishi T, Okanoue T, Kashima K, Ashihara T. Angiogenesis in hepatocellular carcinoma as evaluated by CD34 immunohistochemistry. *Liver* 1998; 18: 14-19
- 路艳艳, 田宇彬, 魏良洲, 孔心涓, 赵清喜, 李玉军, 孙显路. TFF3在胃癌、癌前病变及胃腺瘤中的表达及其与血管生成的关系. 世界华人消化杂志 2009; 17: 3688-3692
- 陈凇, 李涛. 胃癌综合治疗现状与进展. 世界华人消化杂志 2008; 16: 571-574
- Zhao ZS, Zhou JL, Yao GY, Ru GQ, Ma J, Ruan J. Correlative studies on bFGF mRNA and MMP-9 mRNA expressions with microvascular density, progression, and prognosis of gastric carcinomas. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 3227-3233
- 赖铭裕, 廖晓霞, 林瑶光, 梁志海, 陈晖, 李素艳, 蒋敦科, 刘莹. 三叶因子1与胃癌发生发展过程中血管生成的关系. 世界华人消化杂志 2009; 17: 931-934
- 伏浩, 张煦, 王靖. 应用胃癌组织芯片研究RUNX3、VEGF与MVD的相关性及其意义. 世界华人消化杂志 2009; 17: 321-325
- Kerbel RS. Tumor angiogenesis. *N Engl J Med* 2008; 358: 2039-2049
- Harlozinska A. Progress in molecular mechanisms of tumor metastasis and angiogenesis. *Anticancer Res* 2005; 25: 3327-3333
- Saito H, Tsujitani S, Kondo A, Ikeguchi M, Maeta M, Kaibara N. Expression of vascular endothelial growth factor correlates with hematogenous recurrence in gastric carcinoma. *Surgery* 1999; 125: 195-201
- 付彦超, 张庆瑜. 胃癌血管生成及抗血管生成治疗的研究进展. 世界华人消化杂志 2008; 16: 2012-2018
- 黄品同, 杨勇明, 黄福光, 王亮, 王宗敏, 李世岩, 郭心璋. 胃癌超声双重造影增强强度与微血管密度的相关性研究. 中国超声医学杂志 2008; 24: 257-259
- Park YN, Kim YB, Yang KM, Park C. Increased expression of vascular endothelial growth factor and angiogenesis in the early stage of multistep hepatocarcinogenesis. *Arch Pathol Lab Med* 2000; 124: 1061-1065

■同行评价

本文内容新颖, 研究方法科学, 有一定的临床意义。

编辑 曹丽鸥 电编 何基才

胃MALT淋巴瘤的诊治进展

杨含腾, 关泉林, 袁文臻

■背景资料

胃MALT淋巴瘤为低度恶性的非霍奇金淋巴瘤, 具有低恶性、临床少见、误诊率高的特点。尽管胃MALT淋巴瘤发病率很低, 但是近十年来其发病率不断上升。随着对胃MALT淋巴瘤研究的深入, 其诊治理念也发生重大转变。

杨含腾, 关泉林, 袁文臻, 兰州大学第一医院肿瘤外科 甘肃省兰州市 730000

作者贡献分布: 本文综述由杨含腾与袁文臻完成; 关泉林审校。
通讯作者: 关泉林, 730000, 甘肃省兰州市, 兰州大学第一医院肿瘤外科。guanquanlin@163.com
电话: 0931-8625200-6740

收稿日期: 2010-03-24 修回日期: 2010-05-17

接受日期: 2010-05-25 在线出版日期: 2010-07-18

Advances in diagnosis and treatment of gastric MALT lymphoma

Han-Teng Yang, Quan-Lin Guan, Wen-Zhen Yuan

Han-Teng Yang, Quan-Lin Guan, Wen-Zhen Yuan, Department of Oncological Surgery, the First Hospital of Lanzhou University, Lanzhou 730000, Gansu Province, China
Correspondence to: Quan-Lin Guan, Department of Oncological Surgery, the First Hospital of Lanzhou University, Lanzhou 730000, Gansu Province, China. guanquanlin@163.com

Received: 2010-03-24 Revised: 2010-05-17

Accepted: 2010-05-25 Published online: 2010-07-18

Abstract

Gastric mucosa-associated lymphoid tissue (MALT) lymphoma is the most common extra-nodal B-cell lymphoma. The incidence of gastric MALT lymphoma has been gradually increasing over the past decade. In recent years, the better understanding of *Helicobacter pylori* infection has revolutionized the diagnosis and treatment of gastric MALT lymphoma. In this paper, we review the advances in the pathogenesis, diagnosis and treatment of gastric MALT lymphoma.

Key Words: Gastric mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma; Diagnosis; Treatment

Yang HT, Guan QL, Yuan WZ. Advances in diagnosis and treatment of gastric MALT lymphoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(20): 2114-2116

摘要

胃黏膜相关淋巴样组织(mucosa-associated lymphoid tissue, MALT)淋巴瘤是最常见的结外B细胞淋巴瘤, 近十年来发病率不断上升。随着对幽门螺杆菌(*H.pylori*)研究的深入, 胃

MALT淋巴瘤的诊治理念发生了重大转变。本文就胃MALT淋巴瘤的发病机制、诊断与治疗进展进行综述。

关键词: 胃MALT淋巴瘤; 诊断; 治疗

杨含腾, 关泉林, 袁文臻. 胃MALT淋巴瘤的诊治进展. 世界华人消化杂志 2010; 18(20): 2114-2116

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/2114.asp>

0 引言

1983年Isaacson和Wright首先提出了黏膜相关淋巴样组织(mucosa-associated lymphoid tissue, MALT)淋巴瘤的概念^[1], 他被认为是独立的一类独立的临床病理疾病, 其准确定义为: 在黏膜和腺体组织发生的, 具有边缘区B淋巴细胞分化和表型的结外B细胞淋巴瘤。2000年WHO分类将其作为独立的疾病类型, 命名为结外边缘区B细胞淋巴瘤(黏膜相关型)。胃是MALT淋巴瘤最常见的部位, 约占结外淋巴瘤的37%^[2]。尽管胃MALT淋巴瘤发病率很低, 但是近十年来其发病率不断上升^[3]。

1 发病机制

胃MALT淋巴瘤的发病机制尚不十分清楚。大量研究表明幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *H.pylori*)感染与胃MALT淋巴瘤的发生有较强的相关性, *H.pylori*是胃MALT淋巴瘤的主要发病因素^[4,5]。有研究指出, MALT淋巴瘤患者中*H.pylori*检出率为88.8%^[6], 且有研究指出77.5%的MALT淋巴瘤可以用根除*H.pylori*的方法治愈^[7], 这也说明了这一点。但*H.pylori*感染后, 只在部分患者中产生MALT淋巴瘤, 且有10%-40% MALT淋巴瘤没有明显的*H.pylori*感染^[8], 说明*H.pylori*感染并不是胃MALT淋巴瘤发生的唯一原因。有研究指出, *H.pylori*感染后通过两条主要途径导致胃MALT淋巴瘤的发生: 一条是*H.pylori*感染后通过炎症机制对胃上皮细胞的间接作用; 另一条是细菌通过蛋白调控机制和基因调控机制对胃上皮细胞的直接作用^[9]。亦有研

■同行评议者

刘冰熔, 教授, 黑龙江省哈尔滨医科大学附属第二临床医院消化内科

究认为*H.pylori*感染后MALT淋巴瘤的发生是宿主、环境、细菌三者共同作用的结果^[10]。总之,胃MALT淋巴瘤发病的详细机制还有待进一步的研究。

2 诊断

胃MALT淋巴瘤临床表现缺乏特异性,最初症状为模糊的上腹部不适、上腹部疼痛,随病变进展逐渐出现呕吐、胃肠道出血和体质量减轻等,另有部分患者无任何症状而在健康体检时检出^[11]。内镜表现也缺乏特异性,镜下病变主要在胃体(44.1%)和胃窦(29.4%),其中累及2个及其以上病变部位占61.8%,单一部位相对较少^[12]。可为巨大溃疡、大的隆起等恶性表现,也可黏膜糜烂、小结节、黏膜增厚等良性疾病表现^[13]。CT表现为多累及2个或3个部位的胃壁增厚,初期因黏膜完整胃壁呈分层强化,胃腔可扩张或无狭窄,CT易误诊为浸润型胃癌^[14]。由于MALT淋巴瘤临床表现和内镜及CT表现缺乏特异性,故早期诊断较为困难。有研究指出,约有1/3的MALT淋巴瘤诊断时已为进展期(\geq II期),且有9%的患者为IV期^[6],而MALT淋巴瘤的治疗与预后又与疾病的分期密切相关,因此早期诊断至关重要。胃镜检查是早期诊断胃MALT淋巴瘤的重要方法,有研究推荐对年龄 >45 岁的有消化系症状的人群应及时行胃镜检查^[15]。由于胃MALT淋巴瘤发生与治疗与*H.pylori*关系密切,推荐常规行胃镜检查和*H.pylori*检测。胃镜检查可发现胃肠道的病变;而该病的确诊必须依赖活检组织病理学检查,组织化学;快速尿素酶试验则可发现*H.pylori*感染的证据^[16]。研究表明,当内镜下胃MALT淋巴瘤表现为深大溃疡的时候,很难与胃癌相鉴别,内镜初次正确诊断的阳性率只有27%-29%,但对于该病变的恶性倾向可达到60%左右的正确判断率^[17]。故而内镜检查仍是确诊胃淋巴瘤的重要检查方法。通过提高内镜医生对淋巴瘤病变的认识,必要时辅以超声内镜的扫描,通过多取深取活检,再结合病理科的形态学表现及免疫组织化学的方法,胃淋巴瘤的术前确诊率有望进一步提高。合适的影像学检查,包括胸部、腹部和盆腔CT、超声内镜对诊断是有帮助的,在有条件的患者中可行骨髓活检^[18]。有研究指出, MALT淋巴瘤中t(11;18)的移位以及BCL-10突变基因的出现与抗*H.pylori*治疗的成败有密切关系^[2],因此在*H.pylori*阳性的患者中行FISH或PCR检测t(11;18)对于识别一些对抗生素疗法无效的患者

有重要意义。

3 治疗

以往,外科手术广泛用于早期局限性病变的治疗,并取得了良好的疗效,5年生存率约为80%^[19]。但是越来越多的证据研究表明了抗生素治疗胃MALT淋巴瘤的有效性,大约2/3的局限性胃MALT淋巴瘤在抗生素治疗清除*H.pylori*后感染后达到了肿瘤完全缓解^[20]。亦有研究指出,在对*H.pylori*根除治疗无效的患者中,放疗的疗效与手术相似^[21],高于化疗,因此保守治疗策略日益受到重视。随着对胃MALT淋巴瘤研究的深入,治疗理念已发生重大转变,对胃MALT淋巴瘤的治疗已形成一些共识。

2009年NCCN指南^[18]推荐:对于局限性的病例(I E期, *H.pylori*阳性),首先给予抗生素联合质子泵抑制剂治疗,肿瘤缓解可能是缓慢的,但除非出现了临床表现的明显恶化,否则治疗3 mo内不应复查胃镜。如果存在t(11;18), t(1;14), t(14;18)(q32;q21)易位,用抗生素治疗*H.pylori*感染可能无效,这些患者应考虑其他治疗。对病变侵及肌层或病变从胃肠道侵及邻近器官[分期为I E(T1或T3)或II E *H.pylori*阴性]的患者,尤其是存在t(11;18)、t(1;10)或t(14;18)(q32;q21)易位时,首选受累野照射(IFRT)。利妥昔单抗或化学免疫治疗是可供选择的其它治疗方案。对于播散性病变的患者(III或IV期),没有治疗指征的无症状患者,应据终末器官功能、或症状(如出血、早饱)、是否存在巨块型病变、疾病持续进展或患者意愿,来决定治疗。治疗可以包括单药化疗或联合化疗,或局部区域性放疗,仅在一些特殊情况下行手术治疗。虽然全胃切除能很好地控制疾病,但长期患病限制了手术切除的常规使用。

越来越多的证据表明,在抗生素治疗后出现远期复发,应该长期随访^[22]。多点活检进行组织学评价是必须的随访项目,在清除*H.pylori*治疗后3 mo应行内镜检查和活检,以后每年至少行2次内镜检查和活检。有研究表明,大部分患者的*H.pylori*复发在2年内发生,因此至少应随访2年以监测复发。对于一些带瘤而病情稳定的患者,观察是安全可行的,但需要每年1次的系统随访和仔细的内镜检查^[16]。

4 结论

胃MALT淋巴瘤为低度恶性的非霍奇金淋巴瘤,具有低恶性、临床少见、误诊率高的特点。其

■研发前沿

大约2/3的局限性胃MALT淋巴瘤在抗生素治疗清除*H.pylori*感染后达到了肿瘤完全缓解,亦有研究指出,在对*H.pylori*根除治疗无效的患者中,放疗的疗效与手术相似,高于化疗,因此保守治疗策略日益受到重视。

■相关报道

Todorovic等研究指出, MALT淋巴瘤中t(11;18)的易位及Bcl-10突变基因的出现与抗*H.pylori*治疗的成败有密切关系,因此在*H.pylori*阳性的患者中行FISH或PCR检测t(11;18)对于识别一些对抗生素疗法无效的患者有重要意义。

同行评价

本文结构合理,文献引用较新,有一定的可读性。

发生与*H.pylori*感染密切相关,胃镜是重要的检查方法,病理诊断是胃MALT淋巴瘤诊断的金标准。由于胃MALT淋巴瘤的治疗和预后与疾病分期密切相关,因此早期诊断至关重要,多点深层活检可提高诊断的阳性率,有条件的单位应对疑似淋巴瘤的活检标本常规行免疫组织化学检查。随着对胃MALT淋巴瘤研究的深入,治疗理念已发生重大转变,已达成一些共识。根除*H.pylori*已成为治疗MALT淋巴瘤的首选方法。只要对疾病做出正确的分期,根据分期采用合适的治疗方案,大部分患者不需手术治疗就可取得较好的疗效。胃MALT淋巴瘤治疗后还需进行长期随访,以及时发现肿瘤复发,采取适当的治疗手段,以进一步延长患者的生命,提高生活质量。但是,由于日益增加的*H.pylori*对抗生素的耐药,一线清除*H.pylori*在临床中已出现一些困难^[23], MALT淋巴瘤患者*H.pylori*的清除在未来会面对更多的挑战^[24],这留给了每一位医务工作者一个沉重的思考。

参考文献

- Isaacson P, Wright DH. Malignant lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue. A distinctive type of B-cell lymphoma. *Cancer* 1983; 52: 1410-1416
- Todorovic M, Balint B, Jevtic M, Suvajdzic N, Ceric A, Stamatovic D, Markovic O, Perunicic M, Marjanovic S, Krstic M. Primary gastric mucosa associated lymphoid tissue lymphoma: clinical data predicted treatment outcome. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 2388-2393
- Nakamura S, Matsumoto T, Iida M, Yao T, Tsuneyoshi M. Primary gastrointestinal lymphoma in Japan: a clinicopathologic analysis of 455 patients with special reference to its time trends. *Cancer* 2003; 97: 2462-2473
- Ferrucci PF, Zucca E. Primary gastric lymphoma pathogenesis and treatment: what has changed over the past 10 years? *Br J Haematol* 2007; 136: 521-538
- Andriani A, Zullo A, Di Raimondo F, Patti C, Tedeschi L, Recine U, Caruso L, Bonanno G, Chiarenza A, Lizzani G, Miedico A, Romanelli A, Costa A, Linea C, Marrone C, Mirto S, Mistretta A, Montalbano L, Restivo G, Vinci M, Bibas M, Hassan C, Stella F, Cottone M, Morini S. Clinical and endoscopic presentation of primary gastric lymphoma: a multicentre study. *Aliment Pharmacol Ther* 2006; 23: 721-726
- Zullo A, Hassan C, Andriani A, Cristofari F, Cardinale V, Spinelli GP, Tomao S, Morini S. Primary low-grade and high-grade gastric MALT-lymphoma presentation. *J Clin Gastroenterol* 2010; 44: 340-344
- Zullo A, Hassan C, Cristofari F, Andriani A, De Francesco V, Ierardi E, Tomao S, Stolte M, Morini S, Vaira D. Effects of *Helicobacter pylori* eradication on early stage gastric mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2010; 8: 105-110
- Ye H, Liu H, Raderer M, Chott A, Ruskone-Fourmesttraux A, Wotherspoon A, Dyer MJ, Chuang SS, Dogan A, Isaacson PG, Du MQ. High incidence of t(11;18)(q21;q21) in *Helicobacter pylori*-negative gastric MALT lymphoma. *Blood* 2003; 101: 2547-2550
- Ota H, Asano N, Yamauchi K, Akamatsu T. [Crucial roles of *Helicobacter pylori* infection in the pathogenesis of gastric cancer and gastric mucosa-associated lymphoid tissue (MALT) lymphoma] *Rinsho Byori* 2009; 57: 861-869
- Savio A. [The gastric MALT lymphoma. An unforeseen model for studying the pathogenesis of the lymphomas] *Recenti Prog Med* 2009; 100: 311-321
- Morgner A, Schmelz R, Thiede C, Stolte M, Miehlske S. Therapy of gastric mucosa associated lymphoid tissue lymphoma. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 3554-3566
- 谭东毅, 张国梁, 邹江, 布利民. 内镜检查对原发性胃恶性淋巴瘤诊断意义. *世界华人消化杂志* 2008; 16: 3332-3334
- Ahmad A, Govil Y, Frank BB. Gastric mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma. *Am J Gastroenterol* 2003; 98: 975-986
- 任小军, 章士正, 董旦君, 王丽华, 金重午. 原发性胃淋巴瘤的CT表现及误诊原因. *世界华人消化杂志* 2008; 16: 1807-1811
- Malfertheiner P, Megraud F, O'Morain C, Bazzoli F, El-Omar E, Graham D, Hunt R, Rokkas T, Vakil N, Kuipers EJ. Current concepts in the management of *Helicobacter pylori* infection: the Maastricht III Consensus Report. *Gut* 2007; 56: 772-781
- Zucca E, Dreyling M. Gastric marginal zone lymphoma of MALT type: ESMO clinical recommendations for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* 2009; 20 Suppl 4: 113-114
- 严瑾, 欧阳钦, 黄丽彬, 杨锦林. 原发性胃淋巴瘤内镜下表现及误诊分析. *世界华人消化杂志* 2007; 15: 1658-1661
- National Comprehensive Cancer Network. 非霍奇金淋巴瘤临床实践指南(中国版). NCCN online, 2009-02, cited 2010-07. Available from: www.NCCN.org
- 勇威本. 胃淋巴瘤的新认识呼唤改变传统的治疗策略. *世界临床药物* 2003; 24: 329-333
- Cohen SM, Petryk M, Varma M, Kozuch PS, Ames ED, Grossbard ML. Non-Hodgkin's lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue. *Oncologist* 2006; 11: 1100-1117
- Zullo A, Hassan C, Andriani A, Cristofari F, Bassanelli C, Spinelli GP, Tomao S, Morini S. Treatment of low-grade gastric MALT-lymphoma unresponsive to *Helicobacter pylori* therapy: a pooled-data analysis. *Med Oncol* 2010; 27: 291-295
- Wündisch T, Thiede C, Morgner A, Dempfle A, Günther A, Liu H, Ye H, Du MQ, Kim TD, Bayerdörffer E, Stolte M, Neubauer A. Long-term follow-up of gastric MALT lymphoma after *Helicobacter pylori* eradication. *J Clin Oncol* 2005; 23: 8018-8024
- Wenzhen Y, Kehu Y, Bin M, Yumin L, Quanlin G, Donghai W, Lijuan Y. Moxifloxacin-based triple therapy versus clarithromycin-based triple therapy for first-line treatment of *Helicobacter pylori* infection: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Intern Med* 2009; 48: 2069-2076
- Zullo A, Hassan C, Andriani A, Cristofari F, De Francesco V, Ierardi E, Tomao S, Morini S, Vaira D. Eradication therapy for *Helicobacter pylori* in patients with gastric MALT lymphoma: a pooled data analysis. *Am J Gastroenterol* 2009; 104: 1932-1937; quiz 1938

GP73与肝脏疾病关系的研究进展

李淑群, 陈 谦

李淑群, 陈谦, 桂林医学院附属医院肝胆外科 广西壮族自治区桂林市 541001
广西医疗卫生重点科研课题基金资助项目, No. 200883
作者贡献分布: 本文由李淑群综述, 陈谦审校。
通讯作者: 陈谦, 教授, 541001, 广西壮族自治区桂林市, 桂林医学院附属医院肝胆外科. qianchen98@yahoo.com
电话: 0773-2824373
收稿日期: 2010-04-09 修回日期: 2010-06-13
接受日期: 2010-06-22 在线出版日期: 2010-07-18

Advances in understanding the relationship between GP73 and hepatic diseases

Shu-Qun Li, Qian Chen

Shu-Qun Li, Qian Chen, Department of Hepatobiliary Surgery, the Affiliated Hospital of Guilin Medical College, Guilin 541001, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China
Supported by: the Key Research Project Foundation of Guangxi Health Department, No. 200883
Correspondence to: Professor Qian Chen, Department of Hepatobiliary Surgery, the Affiliated Hospital of Guilin Medical College, Guilin 541001, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China. qianchen98@yahoo.com
Received: 2010-04-09 Revised: 2010-06-13
Accepted: 2010-06-22 Published online: 2010-07-18

Abstract

Golgi protein-73 (GP73), a recently discovered Golgi glycoprotein localized on the membrane of the Golgi complex, is expressed in many types of human epithelial cells. In normal human liver, GP73 is highly expressed in biliary epithelial cells, but barely detectable in hepatocytes. However, GP73 expression has been found to be strongly up-regulated in hepatocytes and elevated in the serum in patients with liver diseases, especially those with hepatocellular carcinoma (HCC). Thus, GP73 is a candidate serum marker for the early detection of HCC.

Key Words: Golgi protein-73; Hepatocellular carcinoma; Early Diagnosis; Serum Marker

Li SQ, Chen Q. Advances in understanding the relationship between GP73 and hepatic diseases. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(20): 2117-2120

摘要

GP73(Golgi protein-73)是最近发现的一种

高尔基体膜蛋白, 在正常人体多种组织中表达. 在正常肝脏中胆管上皮细胞呈高表达, 而肝细胞中几乎不表达, 但在多种肝脏疾病尤其是肝细胞癌中显著表达, 且其血清中明显升高. 因此, GP73可能是早期诊断肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)的潜在血清肿瘤标志物.

关键词: 高尔基体蛋白73; 肝细胞癌; 早期诊断; 血清标志物

李淑群, 陈谦. GP73与肝脏疾病关系的研究进展. *世界华人消化杂志* 2010; 18(20): 2117-2120
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/2117.asp>

0 引言

肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)的增长速度之快已成为一个世界性难题, 其发病率在全球位居第4位, 总发患者数约56.4万^[1]. 在我国, 由于乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)携带者数量之庞大, 与此相关的HCC患者已占世界的55%左右, 其死亡率在恶性肿瘤中排第2位. 乙型肝炎、肝硬化及肝癌在医疗费用及社会负担中占有相当大的比重. 在过去相当长的时间里, 早期诊断HCC主要是依靠影像学手段及血清甲胎蛋白(alpha-fetoprotein, AFP), 但影像学检查对肿瘤体积较小者不易被发现; 临床上最常用的AFP也因其敏感性(39%-64%)不高并不令人满意^[2]. 近年来研究发现多种物质如AFP-L3、磷脂酰肌醇蛋白聚糖3(glypican-3, GPC3)及肿瘤生长因子β(tumor growth factor-β, TGF-β)等可用于早期诊断HCC^[3-10]. 其中高尔基体蛋白73(Golgi protein 73, GP73)被认为是最潜力的HCC血清标志物之一. 现将GP73的有关进展综述如下.

1 概述

GP73是Kladney等^[11]在研究成人巨细胞性肝炎(giant-cell hepatitis, GCH)病原学时首次被发现的一种相对分子质量为 7.3×10^4 Da的跨膜糖蛋白, 又称为II型高尔基体膜蛋白(Golgi

■背景资料

GP73是近年来发现的高尔基II膜蛋白, 在多种肝脏疾病中显著升高, 尤其是肝细胞癌中, 对GP73的进一步研究有助于进一步揭示其与肝脏疾病尤其是肝细胞癌之间的关系.

■同行评议者

陈光, 教授, 吉林大学第一医院消化器官外科

■研发前沿

国内外多研究中心对不同种族、不同地域及不同生活习惯的相对大样本研究均表明, GP73有助于早期诊断HCC. 但GP73的具体生物学特性、是否可用于监测HCC的疗效及复发、阻断其表达是否可达到治疗HCC的目的等均需进一步深入研究.

phosphoprotein 2, Golp2)和高尔基体膜蛋白 I (Golgi membrane protein I, Golm I). 业已证实, 编码GP73蛋白的基因位于第9号染色体, 全长共3 080个核苷酸, 编码区位于199-1 404 nt, 共编码402个氨基酸. GenBank目前已经公布了人类GP73序列共9条, 其长度和核苷酸序列都有不同.

已证实血浆中的可溶性GP73来源于高尔基体. 其富含酸性氨基酸, 氨基端为疏水末端, 主要位于高尔基体内, 构成跨膜区和信号肽切割位点. 羧基端位于高尔基体外, 包含有十四(烷)酰化连续序列(GLGNGRRS)、5个糖基化位点, 一个酸性结构域及一个卷曲螺旋结构, 但是到目前为止对这些结构的功能仍然不清^[11-20]. 其转录调控机可能与下列因素有关: (1)体内HBV的复制; (2)血液中雌激素及骨化三醇水平; (3)肝硬化(与病原学无关); (4)血液中干扰素(interferin- γ , IFN- γ)和肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor- α , TNF- α)含量; (5)机体内弗林含量的变化; (6)急慢性肝细胞损伤等^[16,21-25].

2 GP73与肝脏疾病之间的关系

GP73在多种组织中均有表达, 但强弱不等. 在小肠、结肠以及胃中呈高表达, 而在心脏中表达最少, 在肝、肾、脾、肺、子宫及睾丸表达很弱但能检出. 在正常肝脏组织, GP73主要表达于胆管上皮细胞, 而在肝细胞则无表达或表达很少, 但是在有HBV及腺病毒感染的肝组织中, 胆管细胞表达GP73改变不明显, 而肝细胞则呈高表达^[11,22,24,26].

2.1 GP73与肝良性疾病之间的关系 GP73的表达异常与肝脏多种疾病有关. 2000年Kladney等^[11,23]首先发现在受到病毒感染后, 肝炎性多核细胞株表达GP73剧增, GP73 mRNA以及其蛋白在受到腺病毒感染后的HepG2细胞中表达. 而未受到感染的正常肝细胞几乎不表达. 后来其进一步证实各型肝硬化组织中几乎所有肝细胞均表达, 结缔组织周边和肝硬化结节尤甚. 同时发现在转染了HBV并且大量复制的HepG2215细胞株中高表达GP73, 而胆管细胞则无明显改变. 转染了HBV但无复制和未转染HBV的Hep-G2T14.1和HepG2细胞株中均无GP73表达. 后来Iftikhar等^[25]证实这一结论并发现不同的病原学(HBV相关性肝炎、HCV相关性肝炎以及自身免疫性肝炎等)导致的肝炎患者中GP73的表达没有显著性差异, 随着病情的恢复, GP73表达水

平也逐渐下降, GP73的水平与疾病的发展阶段有关而与其评分无关.

Wright等^[27]比较了由Wilson病导致的肝损害和神经损害两组患者肝组织中GP73的表达情况, 结果阳性率明显不同(分别为79%和30%)并有统计学意义. 同时对缺失Wilson病基因的小鼠肝组织中GP73 mRNA的表达情况进行对比, 发现伴随着肝炎和肝硬化的发生, 其肝组织中GP73 mRNA水平明显升高, 但是在发生肝脏病变之前以及肝脏病变愈合之后虽然小鼠体内铜过量, 其组织中GP73 mRNA表达量均正常, 而痊愈后的肝硬化结节中GP73仍高, 由此得出在Wilson病肝细胞中GP73含量增高与铜超载无关, 主要是由肝脏的炎症、纤维化及发育不良所致.

2.2 GP73与HCC的关系 GP73的异常表达与肝细胞癌密切相关. Block等^[28]科研小组首先用HBV感染土拔鼠建立HCC模型, 应用糖蛋白组学手段分析了患有HCC组和正常组血清中的蛋白表达差异, 结果发现HCC组血清中出现一个明显增强的FcA2G2组分, 进一步分析发现其代表了GP73组分, 从而推测其可能是HCC的重要肿瘤标志物, 并在HCC患者中的到证实. 同年5月, Schwegler等^[29]应用表面增强激光吸收/电离飞行质谱(SELDI-TOF-MS)前瞻性分析了39例健康人、36例非肝硬化肝病患者、38例肝硬化患者以及57例HCC患者血清中蛋白表达差异, 并根据HCV阳性与否进一步分型, 结果提示肝病患者血清中蛋白表达水平与健康者明显不同, 且区分慢性丙型肝炎和丙型肝炎后肝癌的敏感性和特异性分别为61%和76%, 当与已知的血清标志物如AFP、DCP以及GPC3联合检测其敏感性和特异性可分别提高至75%和92%, 从而推测GP73有助于肝脏良恶性疾病的鉴别. 此后国外多项研究也证实HCC患者血清中GP73含量较其他疾病高且在HCC患者中, 且其敏感性较AFP高^[30,31].

国内Mao等^[32]用Western blot方法首先研究了25例HBV携带者, 24例HCC患者, 12例非肝病患者及99名健康人患者血清中GP73的量, 并且和血清中AFP含量进行比较, 发现肝癌患者血清中的GP73水平较乙肝携带者、非肝病患者及健康人显著提高, HBV携带者、非肝病患者及健康者之间没有显著性差异. 其诊断HCC的敏感性(76.9%)较AFP(48.6%)高且有统计学意义. 对HCC患者进行术后随访, 提示术后短期内(3-5 d)GP73水平没有下降, 而在术后的1.5-2

■相关报道

Mao等报道GP73在HCC患者血清中的表达明显高于其他肝良性疾病, 其诊断HCC的敏感性可达76.9%.

年其血清中GP73水平较术前明显下降。随后Gu等^[20]进行相对较大样本试验, 将29例HCC患者和其他肝病(57例乙型肝炎患者、69例肝硬化患者)及非肝脏疾病进行比较, 结果提示HCC患者血清中GP73水平远较其他肝病、其他非肝脏疾病及健康志愿者高, 以121 $\mu\text{g/L}$ 作为临界值, 其敏感性和特异性分别为72.4%和61.5%, 提出血清GP73可能作为诊断HCC的血清肿瘤标志物。此后多项研究亦证实GP73有助于早期诊断HCC^[33,34]。而谭龙益等^[15]通过克隆、表达及纯化GP73自制多克隆抗体, 建立双抗体夹心酶联免疫吸附法测定150例肝癌、120例其他肝病以及200名健康体检者血清中GP73水平, 得出的结论是其诊断肝癌的敏感性和特异性分别为44.5%和82.0%, 若将120例良性肝脏疾病患者加入对照组, 其敏感性和特异性分别降至43.3%和77.8%, 其敏感性和特异性与上述报道所有区别。同时应用免疫组化技术观察各组标本, 结果也证实正常肝组织中, 胆管细胞表达GP73水平较高, 而肝细胞表达水平很低。HCC患者肝组织标本中肝癌细胞表达GP73水平均增强, 且与血清学检测结果基本一致。

3 结论

HCC患者一旦发现基本上都为晚期。被公认为“金标准”的血清学指标AFP已在全球范围内广泛应用于普查、诊断、疗效判断及复发监测, 但其敏感性不高, 且有报道认为在其他疾病中亦有升高。GP73作为早期诊断HCC的潜在血清肿瘤标志物和我国肝癌高危人群的庞大基数, 使GP73研究对降低我国HCC病死率有着尤为重要的意义, 多项研究证实其在HCC患者血清中升高, 同时也有相关研究报道, 在其他疾病中也有升高, 如小细胞性肺癌、肾癌及前列腺癌等^[35-41], 使其特异性受到限制。目前对GP73的分子生物学特性尚知之甚少, 如其蛋白上各结构域的具体功能如何、通过何种调控使其表达量增加、通过何种机制剪切并使其转运至细胞膜外、GP73在肝细胞受到损害及HCC患者中升高的原因及机制是否相同、其表达量上升是否可促进肿瘤的发生与发展、是否可用于HCC患者疗效判断及复发监测、通过阻断其表达是否可达到治疗HCC的目的等均未明。其复杂性及研究的局限性离临床还很远, 实用性还有待进一步深入研究。

4 参考文献

- Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Murray T, Thun MJ. Cancer statistics, 2008. *CA Cancer J Clin* 2008; 58: 71-96
- 徐海峰, 杨华渝, 张宏冰, 毛一雷. 改变肝癌早期诊断和治疗现状的新肝癌血清标志物. *基础医学与临床* 2008; 28: 104-108
- 吴玮, 姚登福, 顾丽华, 樊翼伟, 陆秀凤, 李小花, 邱历伟, 吴信华. 亲和层析微柱法测定肝癌特异性AFP. *临床检验杂志* 2006; 24: 10-12
- Dong ZZ, Yao DF, Yao M, Qiu LW, Zong L, Wu W, Wu XH, Yao DB, Meng XY. Clinical impact of plasma TGF-beta1 and circulating TGF-beta1 mRNA in diagnosis of hepatocellular carcinoma. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2008; 7: 288-295
- Yoon SK. Recent advances in tumor markers of human hepatocellular carcinoma. *Intervirol* 2008; 51 Suppl 1: 34-41
- Porta C, De Amici M, Quaglini S, Paglino C, Tagliani F, Boncimino A, Moratti R, Corazza GR. Circulating interleukin-6 as a tumor marker for hepatocellular carcinoma. *Ann Oncol* 2008; 19: 353-358
- Zhou L, Liu J, Luo F. Serum tumor markers for detection of hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 1175-1181
- Khien VV, Mao HV, Chinh TT, Ha PT, Bang MH, Lac BV, Hop TV, Tuan NA, Don LV, Taketa K, Satomura S. Clinical evaluation of lentil lectin-reactive alpha-fetoprotein-L3 in histology-proven hepatocellular carcinoma. *Int J Biol Markers* 2001; 16: 105-111
- Leerapun A, Suravarapu SV, Bida JP, Clark RJ, Sanders EL, Mettler TA, Stadheim LM, Aderca I, Moser CD, Nagorney DM, LaRusso NF, de Groen PC, Menon KV, Lazaridis KN, Gores GJ, Charlton MR, Roberts RO, Thorneau TM, Katzmman JA, Roberts LR. The utility of Lens culinaris agglutinin-reactive alpha-fetoprotein in the diagnosis of hepatocellular carcinoma: evaluation in a United States referral population. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2007; 5: 394-402; quiz 267
- Montaser LM, Abbas OM, Saltah AM, Waked IA. Circulating AFP mRNA as a Possible Indicator of Hematogenous Spread of HCC Cells: A Possible Association with HBV Infection. *J Egypt Natl Canc Inst* 2007; 19: 48-60
- Kladney RD, Bulla GA, Guo L, Mason AL, Tollefson AE, Simon DJ, Koutoubi Z, Fimmel CJ. GP73, a novel Golgi-localized protein upregulated by viral infection. *Gene* 2000; 249: 53-65
- Puri S, Bachert C, Fimmel CJ, Linstedt AD. Cycling of early Golgi proteins via the cell surface and endosomes upon luminal pH disruption. *Traffic* 2002; 3: 641-653
- Natarajan R, Linstedt AD. A cycling cis-Golgi protein mediates endosome-to-Golgi traffic. *Mol Biol Cell* 2004; 15: 4798-4806
- Beard M, Satoh A, Shorter J, Warren G. A cryptic Rab1-binding site in the p115 tethering protein. *J Biol Chem* 2005; 280: 25840-25848
- 谭龙益, 陈洁, 王皓. 血清II型高尔基体膜蛋白与人类肝细胞癌的关系. *中华肝脏病杂志* 2009; 17: 288-291
- Norton PA, Comunale MA, Krakover J, Rodemich L, Pirog N, D'Amelio A, Philip R, Mehta AS, Block TM. N-linked glycosylation of the liver cancer biomarker GP73. *J Cell Biochem* 2008; 104: 136-149
- Bachert C, Fimmel C, Linstedt AD. Endosomal trafficking and proprotein convertase cleavage of cis Golgi protein GP73 produces marker for

■创新盘点

本文首次较全面地综述了有关GP73与肝脏疾病之间的关系, 尤其是与HCC之间的关系。

■同行评价

本文选题较新,思路清晰,对于肝细胞癌的早期诊断有一定的价值。

- 18 Moggs JG, Ashby J, Tinwell H, Lim FL, Moore DJ, Kimber I, Orphanides G. The need to decide if all estrogens are intrinsically similar. *Environ Health Perspect* 2004; 112: 1137-1142
- 19 Wang TT, Tavera-Mendoza LE, Laperriere D, Libby E, MacLeod NB, Nagai Y, Bourdeau V, Konstorum A, Lallemant B, Zhang R, Mader S, White JH. Large-scale in silico and microarray-based identification of direct 1,25-dihydroxyvitamin D3 target genes. *Mol Endocrinol* 2005; 19: 2685-2695
- 20 Gu Y, Chen W, Zhao Y, Chen L, Peng T. Quantitative analysis of elevated serum Golgi protein-73 expression in patients with liver diseases. *Ann Clin Biochem* 2009; 46: 38-43
- 21 谢红彬, 宫钰, 彭涛. 高尔基体驻膜糖蛋白GP73启动子克隆. *农业科学与技术(英文版)* 2008; 9: 39-42, 136
- 22 Wright LM, Yong S, Picken MM, Rockey D, Fimmel CJ. Decreased survival and hepato-renal pathology in mice with C-terminally truncated GP73 (GOLPH2). *Int J Clin Exp Pathol* 2009; 2: 34-47
- 23 Kladney RD, Cui X, Bulla GA, Brunt EM, Fimmel CJ. Expression of GP73, a resident Golgi membrane protein, in viral and nonviral liver disease. *Hepatology* 2002; 35: 1431-1440
- 24 Kladney RD, Tollefson AE, Wold WS, Fimmel CJ. Upregulation of the Golgi protein GP73 by adenovirus infection requires the E1A CtBP interaction domain. *Virology* 2002; 301: 236-246
- 25 Iftikhar R, Kladney RD, Havlioglu N, Schmitt-Gräff A, Gusmirovic I, Solomon H, Luxon BA, Bacon BR, Fimmel CJ. Disease- and cell-specific expression of GP73 in human liver disease. *Am J Gastroenterol* 2004; 99: 1087-1095
- 26 Maitra A, Thuluvath PJ. GP73 and liver disease: a (Golgi) complex enigma. *Am J Gastroenterol* 2004; 99: 1096-1098
- 27 Wright LM, Huster D, Lutsenko S, Wrba F, Ferenci P, Fimmel CJ. Hepatocyte GP73 expression in Wilson disease. *J Hepatol* 2009; 51: 557-564
- 28 Block TM, Comunale MA, Lowman M, Steel LF, Romano PR, Fimmel C, Tennant BC, London WT, Evans AA, Blumberg BS, Dwek RA, Mattu TS, Mehta AS. Use of targeted glycoproteomics to identify serum glycoproteins that correlate with liver cancer in woodchucks and humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102: 779-784
- 29 Schwegler EE, Cazares L, Steel LF, Adam BL, Johnson DA, Semmes OJ, Block TM, Marrero JA, Drake RR. SELDI-TOF MS profiling of serum for detection of the progression of chronic hepatitis C to hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2005; 41: 634-642
- 30 Marrero JA, Romano PR, Nikolaeva O, Steel L, Mehta A, Fimmel CJ, Comunale MA, D'Amelio A, Lok AS, Block TM. GP73, a resident Golgi glycoprotein, is a novel serum marker for hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 2005; 43: 1007-1012
- 31 Riener MO, Stenner F, Liewen H, Soll C, Breitenstein S, Pestalozzi BC, Samaras P, Probst-Hensch N, Hellerbrand C, Müllhaupt B, Clavien PA, Bahra M, Neuhaus P, Wild P, Fritzsche F, Moch H, Jochum W, Kristiansen G. Golgi phosphoprotein 2 (GOLPH2) expression in liver tumors and its value as a serum marker in hepatocellular carcinomas. *Hepatology* 2009; 49: 1602-1609
- 32 Mao YL, Yang HY, Xu HF, Sang XT, Lu X, Yang ZY, Zhang JC, Zhong SX, Huang JF, Zhang HB. [Significance of Golgi glycoprotein 73, a new tumor marker in diagnosis of hepatocellular carcinoma: a primary study] *Zhonghua Yixue Zazhi* 2008; 88: 948-951
- 33 Hu JS, Wu DW, Liang S, Miao XY. GP73, a resident Golgi glycoprotein, is sensibility and specificity for hepatocellular carcinoma of diagnosis in a hepatitis B-endemic Asian population. *Med Oncol* 2010; 27: 339-345
- 34 李利军, 李新丰, 王高峰. GP73联合AFP、VEGF检测对原发性肝癌的诊断价值. *世界华人消化杂志* 2009; 17: 3056-3060
- 35 Kristiansen G, Fritzsche FR, Wassermann K, Jäger C, Töls A, Lein M, Stephan C, Jung K, Pilarsky C, Dietel M, Moch H. GOLPH2 protein expression as a novel tissue biomarker for prostate cancer: implications for tissue-based diagnostics. *Br J Cancer* 2008; 99: 939-948
- 36 Varambally S, Laxman B, Mehra R, Cao Q, Dhanasekaran SM, Tomlins SA, Granger J, Vellaichamy A, Sreekumar A, Yu J, Gu W, Shen R, Ghosh D, Wright LM, Kladney RD, Kuefer R, Rubin MA, Fimmel CJ, Chinnaiyan AM. Golgi protein GOLM1 is a tissue and urine biomarker of prostate cancer. *Neoplasia* 2008; 10: 1285-1294
- 37 Katada T, Ishiguro H, Kimura M, Mitui A, Harata K, Ogawa R, Kuwabara Y. GP73 contributes to the sensitivity of cisplatin in esophageal cancer. *Esophagus* 2009; 6: 173-176
- 38 Fritzsche FR, Kristiansen G, Riener MO, Dietel M, Oelrich B. GOLPH2 expression may serve as diagnostic marker in seminomas. *BMC Urol* 2010; 10: 4
- 39 Rosell R, Lord RV, Taron M, Reguart N. DNA repair and cisplatin resistance in non-small-cell lung cancer. *Lung Cancer* 2002; 38: 217-227
- 40 Fritzsche FR, Riener MO, Dietel M, Moch H, Jung K, Kristiansen G. GOLPH2 expression in renal cell cancer. *BMC Urol* 2008; 8: 15
- 41 Wei S, Dunn TA, Isaacs WB, De Marzo AM, Luo J. GOLPH2 and MYO6: putative prostate cancer markers localized to the Golgi apparatus. *Prostate* 2008; 68: 1387-1395

编辑 李军亮 电编 何基才

腹腔镜手术治疗结直肠癌进展

龚涛, 王彤

龚涛, 王彤, 南京医科大学附属无锡市人民医院腔镜外科 江苏省无锡市 214023

作者贡献分布: 本文综述由龚涛完成, 王彤审核。

通讯作者: 王彤, 副教授, 214023, 江苏省无锡市, 南京医科大学附属无锡市人民医院腔镜外科. aanti@163.com

收稿日期: 2010-02-27 修回日期: 2010-06-05

接受日期: 2010-06-07 在线出版日期: 2010-07-18

Laparoscopic surgery for colorectal cancer

Tao Gong, Tong Wang

Tao Gong, Tong Wang, Department of Minimally Invasive Surgery, Wuxi People's Hospital Affiliated to Nanjing Medical University, Wuxi 214023, Jiangsu Province, China

Correspondence to: Associate Professor Tong Wang, Department of Minimally Invasive Surgery, Wuxi People's Hospital Affiliated to Nanjing Medical University, Wuxi 214023, Jiangsu Province, China. aanti@163.com

Received: 2010-02-27 Revised: 2010-06-05

Accepted: 2010-06-07 Published online: 2010-07-18

Abstract

Laparoscopic surgery as an alternative to traditional open surgery, has been accepted by an increasing number of surgeons and patients. In this paper, we review the advances in laparoscopic surgery for colorectal cancer and summarize its pros and cons by comparing with open surgery, including patient inclusion and exclusion, intraoperative outcomes, and short- and long-term outcomes. Furthermore, we provide an initial overview of the Da Vinci robotic system and the single-port laparoscopic surgery.

Key Words: Laparoscopy; Colorectal cancer; Da Vinci robotic system

Gong T, Wang T. Laparoscopic surgery for colorectal cancer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(20): 2121-2126

摘要

目前, 腹腔镜结直肠癌手术被越来越多的外科医师施行, 也被越来越多的患者所接受, 有替代传统开放结直肠癌手术的趋势。本文就腹腔镜结直肠癌手术的进展作一概述, 包括患者选择, 术中效益, 术后短期效益和长期效益, 比较

其与开放手术的优劣, 并初步介绍了达芬奇机器人系统及单孔法腹腔镜技术。

关键词: 腹腔镜; 结直肠癌; 达芬奇机器人系统

龚涛, 王彤. 腹腔镜手术治疗结直肠癌进展. *世界华人消化杂志* 2010; 18(20): 2121-2126

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/2121.asp>

0 引言

自从1985年Eric Mühe施行了第1例人腹腔镜胆囊切除术^[1], 腹腔镜技术已经被广泛用于外科的各个领域, 包括腹腔镜下阑尾切除术、脾切除术、肾切除术等。1991年, Jacobs等^[2]报道了腹腔镜下结肠手术治疗非癌性疾病, 如炎症性疾病、良性肿瘤、憩室等; 1993年, Guillon等^[3]报道了59例腹腔镜结直肠癌手术的初步经验并证明了其技术上的可行性。由于其明显地加快术后恢复及减少术后疼痛^[4,5], 腹腔镜结直肠癌手术已被作为传统开放手术的一种可选择的替代术式^[6,7]。然而, 因为许多因素诸如技术复杂性, 成本, 与肿瘤学的安全方面, 腹腔镜结直肠癌手术的发展较其他腹腔镜手术缓慢^[8]。以下对腹腔镜结直肠癌手术的进展作一综述。

1 腹腔镜结直肠癌手术患者的选择

Lim等^[9]在手术治疗的临床效果(clinical outcomes of surgical therapy, COST)中显示, 腹腔镜适用于2/3的原发性结直肠癌患者。Janson等^[10]通过结肠癌腹腔镜或开放切除术(colon cancer laparoscopic or open resection, COLOR)试验认为, 50%-60%的结肠癌患者可以选择腹腔镜手术。而Moloo等^[11]则认为使用COST或COLOR标准排除的结直肠癌患者除了中转开腹率较高之外, 短期和长期效果与纳入的患者无差异。

2 腹腔镜结直肠癌术中效益

2.1 手术时间与术中出血 Naitoh等^[12]在II/III期结直肠癌手术的研究中, 报道的平均手术时间为184 min, 平均估计失血量为53.5 mL。Gonzalez

■背景资料

1985年Eric Mühe施行了第1例人腹腔镜胆囊切除术, 腹腔镜技术已经被广泛用于外科的各个领域, 包括腹腔镜下阑尾切除术、脾切除术、肾切除术等。由于其明显地加快术后恢复及减少术后疼痛, 腹腔镜结直肠癌手术已被作为传统开放手术的一种可选择的替代术式。然而, 因为许多因素诸如技术复杂性, 成本, 与肿瘤学的安全方面, 腹腔镜结直肠癌手术的发展较其他腹腔镜手术缓慢。

■同行评议者

王凤山, 教授, 中国医科大学附属第一医院肝胆外科

■ 研发前沿

在严格掌握手术适应证的前提下,腹腔镜手术可安全地应用于治疗结肠直肠癌,其短期和长期治疗效果均能令人满意,而对腹腔镜手术价值的最终评价有待于大样本、高质量的随机对照试验的长期随访结果。

等^[13]报道的腹腔镜下复杂结直肠癌姑息性手术的平均手术时间为181 min \pm 22 min, 平均估计失血量为283 mL \pm 48 mL. Liang等^[14]报道腹腔镜内侧到外侧入路右半结肠根治性切除术的手术时间为192.6 min \pm 32.8 min, 同时报道了乙状结肠癌伴淋巴结转移的D3期清扫的手术时间为303.4 min \pm 35.2 min, 术中失血量为344.8 mL \pm 50.6 mL. Sotomayor等^[15]的研究显示手辅助腹腔镜结肠癌手术的平均手术时间为195 min. Vorob'ev等^[16]的研究中, 手辅助腹腔镜左半结肠切除的平均手术时间为181 min \pm 53 min, 术中出血92 mL \pm 65 mL. Mehta等^[17]的研究显示腹腔镜辅助结肠切除平均手术时间128.16 min. Miyajima^[18]报道腹腔镜直肠癌手术时间为237.0 min \pm 71.6 min, 平均失血量为165.0 mL \pm 163.8 mL. 在Mukai等^[19]的研究中, 对腹腔镜结肠癌与直肠癌的手术时间进行了比较, 腹腔镜结肠癌的平均手术时间为146 min, 平均失血量166.3 mL, 而腹腔镜直肠癌的平均手术时间为218 min, 平均失血量238.8 mL. 在结直肠癌伴转移病灶切除的研究中, Kim等^[20]报道结直肠癌伴肝转移的平均手术时间439 min, 估计总失血量为350 mL. Akiyoshi等报道结直肠癌伴肝转移的平均手术时间为446 min^[21], 估计总失血量为175 mL, 直肠癌伴肝转移的平均手术时间为517 min^[22], 估计总失血量为398 mL. Hewett等^[23]认为腹腔镜结肠癌的手术时间较开放手术要长, 而González等^[24]的研究表明腹腔镜全直肠系膜切除要比开放全直肠系膜切除的平均手术时间短(186.7 min与204.4 min, $P<0.007$). 因此, 腹腔镜结肠癌的手术时间要比腹腔镜直肠癌手术时间短, 失血量要少, 而在伴有转移灶同步切除的手术中, 手术时间与术中失血量均有所增加。

2.2 淋巴结清扫与切缘 Jayne等在传统与腹腔镜辅助结直肠癌手术(conventional versus laparoscopic assisted surgery in colorectal cancer, CLASICC)试验小组的研究中发现腹腔镜的肿瘤切缘阳性率更高, 但复发率并不比开放手术高^[25]. Fiscon等^[26]研究的腹腔镜结肠癌手术的淋巴结检出数达到16个. Jacob等^[27]的腹腔镜结肠癌研究中, 平均淋巴结检出数为10.1个 \pm 6个. Staudacher等^[28]在腹腔镜全直肠系膜切除术的研究中发现, 平均肿瘤和切缘距离为2.7 cm \pm 2 cm, 平均淋巴结检出数为14.4个 \pm 4.6个, 是安全可行的. 而在Ströhlein等^[29]对腹腔镜与开放直肠癌手术的研究中, 淋巴结检出数有统计学差异

(13.5 vs 16.9; $P=0.001$), 但复发率亦没有明显差异. Buunen等^[30]的1 076例随机临床试验显示腹腔镜与开放结肠癌手术的肿瘤切缘及淋巴结检出数相似, 同时Mirza等^[31]在233例非转移性结直肠癌手术的研究中也认为, 腹腔镜与开放手术的肿瘤切缘及淋巴结检出数相似. 可见, 腹腔镜结直肠癌手术的淋巴结清扫与肿瘤切缘距离是足够的, 可以安全执行^[25].

2.3 中转开腹与手术死亡率 Rotholtz等^[32]在对腹腔镜结直肠癌手术的中转因素的研究中发现, 400例接受腹腔镜手术的患者中有51例最终转开放手术, 其中年龄 >65 岁($OR=2.3$; 95%CI: 1.25-4.46), 执行低位前切除($OR=3.9$; 95%CI: 1.64-9.18), 有复杂的憩室炎($OR=3.9$; 95%CI: 1.64-9.18)均是中转的因素. Thorpe等^[33]的CLASICC试验研究发现, 488例腹腔镜手术, 143例(29.3%)转换为开放手术, 其中, 体质量较重的, 男性患者, 直肠癌患者, ASA(美国麻醉医师协会)III期或更大的肿瘤的扩散(包括浸润程度与远处转移)等均是独立的中转因素. Abraham等^[34]对单一外科医生的进行的365例择期结直肠癌切除术(219例结肠癌, 146例直肠癌)的分析中发现, 中转的独立因素是直肠癌手术($OR=3.12$)和BMI ≥ 28 ($OR=3.87$). 而在严格选择患者后, Ng等^[35]对腹腔镜直肠癌手术的回顾性分析中, 579例手术的中转率为5.4%. 因此, 选择合适的患者, 通过有经验的团队^[36]执行腹腔镜手术是有必要的. Mirza等^[31]在比较腹腔镜与开放结直肠癌手术的研究中, 围手术期的死亡率两者没有差异($P=0.644$). Abraham等^[34]对腹腔镜结直肠癌手术的短期效益的Meta分析中, 腹腔镜与开放手术的死亡率也没有显著性的差异(1.2% vs 1.1%, $P=0.787$). Hewett等的ALCCaS(Australasian Laparoscopic Colon Cancer Study)前瞻性随机临床试验发现, 腹腔镜结直肠癌手术死亡率与开放相比无统计学差异^[23], 腹腔镜手术是可行的, 安全的, 手术死亡率可与开放手术相比^[37].

3 腹腔镜结直肠癌术后短期效益

3.1 术后并发症 近年, 多项研究显示腹腔镜手术与开放手术的术后并发症无统计学差异^[23,38-43]. 但同时, Allardyce等^[44]研究发现, 年龄大于70岁的患者行腹腔镜结直肠癌手术的术后并发症发病率要比开放手术低($P=0.002$). Kennedy等^[45]的国家手术质量改进计划统计结果显示, 腹腔镜手术明显减少结肠切除术后并发症, 并有统

计学意义. Poon等^[46]对腹腔镜结直肠癌手术部位感染的研究中指出, 开放和腹腔镜结直肠癌切除术手术部位感染率分别为5.7%和2.7%. 腹腔镜手术具有减少术后肠粘连的潜在优势^[47], 还有较低的术后并发症发病率, 特别是感染性并发症^[48]. 在Mukai等^[19]对58例腹腔镜结肠癌手术与50例直肠癌手术的比较中, 前者的术后并发症为5例伤口感染(8.6%), 3例术后梗阻(5.2%), 和1例(1.7%)吻合口狭窄; 后者的术后并发症为6例伤口感染(12.0%), 3例术后梗阻(6.0%), 3例吻合口狭窄(6.4%), 3例吻合口瘘(8.6%), 相对地, 腹腔镜结肠癌较直肠癌术后并发症要少. 特别地, Sereno Tralbaldo等^[49]报道了腹腔镜手术后发生腹内疝这种罕见而危险的并发症, 是由于小肠通过术中造成的肠系膜缺损形成的. 在他的研究中, 436例行腹腔镜左侧结直肠癌切除术的患者有五名男性患者出现腹内疝并需要再次手术. 因此, 在高龄人群及某些术后并发症中, 腹腔镜手术要优于开放手术, 而在总术后并发症方面, 腹腔镜手术至少不逊色于开放手术.

3.2 术后恢复与住院天数 大量临床试验已经证实, 腹腔镜手术明显减少住院时间及加快术后恢复^[23,50,51]. Carli等^[52]的研究显示行腹腔镜结直肠癌手术的患者平均住院时间为3 d, 肠道功能恢复及饮食恢复都在术后36 h内. Lin等^[53]在对开放与腹腔镜手术的前瞻性研究中发现, 开放结肠切除术70例, 腹腔镜辅助结肠切除术99例, 开放组平均住院天数为9.3 d, 腹腔镜组为5.9 d($P<0.001$). Selvindos等^[54]的腹腔镜超低位前切除及结肠J-袋肛管吻合术研究显示, 术后平均住院7 d, 恢复流质饮食时间平均为2 d. 值得一提的是, 腹腔镜中转开腹与住院天数密切相关, 在Offodile等^[55]的研究中, 中转开腹的平均住院天数为8.8 d, 相对未中转的6.3 d($P<0.0001$). 另外, 行腹腔镜手术的患者术后疼痛及镇痛需求也比行开放的要低^[56].

4 腹腔镜结直肠癌术后远期效益

4.1 生存率与复发率 目前多项对腹腔镜手术的长期生存率的研究认为腹腔镜手术与开放手术无差异^[31,37,57]. Naitoh等^[12]对121例II/III期结直肠癌手术远期效益的研究显示, 总体5年生存率II期为95.7%, IIIA/B为84.1%, IIIC为70.0%. 同时5年无病生存率分别为75.6%, 80.1%和66.8%, 共18例复发(14.9%). Jayne等^[25]对794例(526例腹腔镜和268例开放)结直肠癌手术的

CLASICC试验中的3年随访结果显示, 与开放手术相比, 腹腔镜手术的3年总生存率有1.8%差异(95%CI: -5.2%-8.8%, $P=0.55$), 无病生存率差异-1.4%(95%CI: -9.5%-6.7%, $P=0.70$), 局部复发的差异-0.8%(95%CI: -5.7%-4.2%, $P=0.76$), 总体来说无统计学差异. 在Fleshman等^[58]的COST前瞻性随机对照试验中, 872例结肠癌患者随机分为接受腹腔镜辅助或开放结肠切除手术并进行中位数为7年的随访(5-10年), 5年无病生存率(开放68.4%, 腹腔镜69.2%, $P=0.94$), 总5年生存率(开放74.6%, 腹腔镜76.4%, $P=0.93$)2组相似. 总体复发率分别为(开放21.8%, 腹腔镜19.4%, $P=0.25$)2组亦无差异. Lacy等^[59]的回归分析表明, 腹腔镜辅助结肠手术可以降低肿瘤复发(HR = 0.47, 95%CI: 0.23-0.94), 与癌症有关的死亡原因(HR = 0.44, 95%CI: 0.21-0.92)和任何死亡原因(HR = 0.59, 95%CI: 0.35-0.98). Baća等^[60]在腹腔镜辅助右半结肠切除术的生存率的研究中建议将其作为首选方法. Ng等^[35]的579例腹腔镜直肠癌切除研究中, 根治性切除后7.4%的患者发生局部复发. 总的5年和10年生存率分别为70%和45.5%. 癌症相关的5和10年生存率为76%和56%. 也有研究表明腹腔镜直肠癌手术的长期生存率较开放的令人满意, 但无统计学意义^[29]. 总的来说, 腹腔镜结直肠癌手术的长期生存率是可以与开放手术相比较的, 并是一种安全, 有效的替代传统的手术治疗结直肠癌的方法^[31].

4.2 生活质量 术后性功能障碍是一个直肠癌患者的严重问题, 已有报道在腹腔镜直肠癌手术, 对男性膀胱和性功能造成影响^[61], Nitori等^[62]对腹腔镜与开腹治疗直肠癌术后男性性功能, 关于性欲, 勃起, 硬度, 射精和满意度进行了比较. LS和OS的各项评分和总评分无显著差异. 单因素分析, 肿瘤位置较低的性功能障碍较显著($P=0.0111$). 因此, 低位肿瘤的位置是唯一影响男性性功能的因素. 腹腔镜术中保留盆腔自主神经^[63], 并由经验丰富, 敬业的腹腔镜外科医生进行^[61], 可以最大限度地减轻术后性功能障碍.

5 腹腔镜结直肠癌手术新技术

5.1 达芬奇机器人系统 随着标准腹腔镜技术的日臻完善, 多种新技术已在逐渐发展. Choi等^[64]描述了达芬奇机器人应用在直肠癌手术的解剖过程和短期结果, 50例手术均成功完成, 无中转开腹, 短期的结果是可以接受的. 达芬奇机器人系统的优势在于克服了常规腹腔镜手术的一些

■ 相关报道

Choi等描述了达芬奇机器人应用在直肠癌手术的解剖过程和短期结果, 50例手术均成功完成, 无中转开腹, 短期的结果是可以接受的.

同行评价

本文引用数据详实,内容较全面,具有较好的可读性。

限制^[65],是一种安全有效的方法,与开放和腹腔镜手术的结果存在可比性^[66]。

5.2 单孔腹腔镜技术 单孔技术由于其术后疼痛更轻,美容效果更好,最近发展得很快,多种器械的发展例如Uni-X™(Pnavel systems, NJ, USA)和R-PortR(Advanced Surgical Concepts, Wicklow, Ireland)可以让更多的器械经1个孔插入脐,使得单孔腹腔镜手术变为可行^[67]。Remzi等^[68]报道了1例单孔腹腔镜乙状结肠癌切除术,总手术时间198 min。估计失血量为300 mL。住院时间为3 d。患者无术中或术后并发症。标本的病理检验显示:肿块大小5.0 cm×2.5 cm×2.5 cm,足够的手术切缘(10 cm和5.5 cm),14个区域淋巴结未见转移。未行手术后辅助化疗。手术后1年行结肠镜显示无明显肿瘤或息肉。腹部和盆腔的CT也没有发现任何复发或转移证据。单孔法腹腔镜手术可以很好地治疗良性病变,而且对情况较好的结直肠癌患者也同样适用,可以作为通向经自然腔道内镜手术(natural orifice transluminal endoscopic surgery, NOTES)的桥梁^[67]。

6 结论

随着腹腔镜手术的发展以及外科医生手术经验的累积,在严格掌握手术适应证的前提下,腹腔镜手术可安全地应用于治疗结直肠癌,其短期和长期治疗效果均能令人满意^[69],而对腹腔镜手术价值的最终评价有待于大样本、高质量的随机对照试验的长期随访结果。

7 参考文献

- Reynolds W Jr. The first laparoscopic cholecystectomy. *JLS* 2001; 5: 89-94
- Jacobs M, Verdeja JC, Goldstein HS. Minimally invasive colon resection (laparoscopic colectomy). *Surg Laparosc Endosc* 1991; 1: 144-150
- Guillou PJ, Darzi A, Monson JR. Experience with laparoscopic colorectal surgery for malignant disease. *Surg Oncol* 1993; 2 Suppl 1: 43-49
- Boller AM, Nelson H. Colon and rectal cancer: laparoscopic or open? *Clin Cancer Res* 2007; 13: 6894s-6896s
- Holt T, Paris B, Wietfeldt ED, Hassan I. Minimally invasive techniques in colon surgery. *Minerva Chir* 2008; 63: 115-125
- Martel G, Boushey RP, Marcello PW. Hand-assisted laparoscopic colorectal surgery: an evidence-based review. *Minerva Chir* 2008; 63: 373-383
- Kemp JA, Finlayson SR. Nationwide trends in laparoscopic colectomy from 2000 to 2004. *Surg Endosc* 2008; 22: 1181-1187
- Rosin D, Khaikin M, Zmora O. Minimally invasive approach to colorectal surgery. *Minerva Chir* 2008; 63: 127-149
- Lim SB, Choi HS, Jeong SY, Park JG. Feasibility of laparoscopic techniques as the surgical approach of choice for primary colorectal cancer: an analysis of 570 consecutive cases. *Surg Endosc* 2008; 22: 2588-2595
- Janson M, Edlund G, Kressner U, Lindholm E, Pahlman L, Skullman S, Anderberg B, Haglund E. Analysis of patient selection and external validity in the Swedish contribution to the COLOR trial. *Surg Endosc* 2009; 23: 1764-1769
- Moloo H, Sabri E, Wassif E, Haggag F, Poulin EC, Mamazza J, Boushey RP. Laparoscopic resection for colon cancer: would all patients benefit? *Dis Colon Rectum* 2008; 51: 173-180
- Naitoh T, Tsuchiya T, Honda H, Oikawa M, Saito Y, Hasegawa Y. Clinical outcome of the laparoscopic surgery for stage II and III colorectal cancer. *Surg Endosc* 2008; 22: 950-954
- Gonzalez R, Smith CD, Ritter EM, Mason E, Duncan T, Ramshaw BJ. Laparoscopic palliative surgery for complicated colorectal cancer. *Surg Endosc* 2005; 19: 43-46
- Liang JT, Lai HS, Lee PH. Laparoscopic medial-to-lateral approach for the curative resection of right-sided colon cancer. *Ann Surg Oncol* 2007; 14: 1878-1879
- Sotomayor RK, Arboleda B. Experience with hand assisted laparoscopic surgery of the colon. *Bol Asoc Med P R* 2008; 100: 13-18
- Vorob'ev GI, Shelygin IuA, Frolov SA, Shakhmatov DG. [The hand-assisted laparoscopic resections of colon's left parts] *Khirurgiia (Mosk)* 2007: 4-10
- Mehta PP, Griffin J, Ganta S, Rangraj M, Steichen F. Laparoscopic-assisted colon resections: long-term results and survival. *JLS* 2005; 9: 184-188
- Miyajima N. Short-term outcome of laparoscopic surgery for rectal cancer. *Keio J Med* 2008; 57: 150-154
- Mukai M, Kishima K, Tajima T, Hoshikawa T, Yazawa N, Fukumitsu H, Okada K, Ogoshi K, Makuuchi H. Efficacy of hybrid 2-port hand-assisted laparoscopic surgery (Mukai's operation) for patients with primary colorectal cancer. *Oncol Rep* 2009; 22: 893-899
- Kim SH, Lim SB, Ha YH, Han SS, Park SJ, Choi HS, Jeong SY. Laparoscopic-assisted combined colon and liver resection for primary colorectal cancer with synchronous liver metastases: initial experience. *World J Surg* 2008; 32: 2701-2706
- Akiyoshi T, Kuroyanagi H, Saiura A, Fujimoto Y, Koga R, Konishi T, Ueno M, Oya M, Seki M, Yamaguchi T. Simultaneous Resection of Colorectal Cancer and Synchronous Liver Metastases: Initial Experience of Laparoscopy for Colorectal Cancer Resection. *Dig Surg* 2010; 26: 471-475
- Akiyoshi T, Kuroyanagi H, Oya M, Saiura A, Ohyama S, Fujimoto Y, Ueno M, Koga R, Seki M, Hiki N, Fukunaga T, Konishi T, Fukuda M, Yamaguchi T. Laparoscopic rectal resection for primary rectal cancer combined with open upper major abdominal surgery: initial experience. *Hepatogastroenterology* 2009; 56: 571-574
- Hewett PJ, Allardyce RA, Bagshaw PF, Frampton CM, Frizelle FA, Rieger NA, Smith JS, Solomon MJ, Stephens JH, Stevenson AR. Short-term outcomes of the Australasian randomized clinical study comparing laparoscopic and conventional open surgical treatments for colon cancer: the ALCCAS

- trial. *Ann Surg* 2008; 248: 728-738
- 24 González QH, Rodríguez-Zentner HA, Moreno-Berber JM, Vergara-Fernández O, de León HT, López-R F, Jonguitud LA, Ramos R, Castañeda-Argáiz R. Laparoscopic vs. open total mesorectal excision for treatment of rectal cancer. *Rev Invest Clin* 2008; 60: 205-211
- 25 Jayne DG, Guillou PJ, Thorpe H, Quirke P, Copeland J, Smith AM, Heath RM, Brown JM. Randomized trial of laparoscopic-assisted resection of colorectal carcinoma: 3-year results of the UK MRC CLASICC Trial Group. *J Clin Oncol* 2007; 25: 3061-3068
- 26 Fiscon V, Frigo F, Migliorini G, Portale G, Lazzarini E. Laparoscopic colon resection by a single general surgeon in a community hospital: a review of 200 consecutive cases. *J Laparoendosc Adv Surg Tech A* 2009; 19: 13-17
- 27 Jacob BP, Salky B. Laparoscopic colectomy for colon adenocarcinoma: an 11-year retrospective review with 5-year survival rates. *Surg Endosc* 2005; 19: 643-649
- 28 Staudacher C, Di Palo S, Tamburini A, Vignali A, Orsenigo E. Total mesorectal excision (TME) with laparoscopic approach: 226 consecutive cases. *Surg Oncol* 2007; 16 Suppl 1: S113-S116
- 29 Ströhllein MA, Grützner KU, Jauch KW, Heiss MM. Comparison of laparoscopic vs. open access surgery in patients with rectal cancer: a prospective analysis. *Dis Colon Rectum* 2008; 51: 385-391
- 30 Buunen M, Veldkamp R, Hop WC, Kuhry E, Jeekel J, Haglind E, Pahlman L, Cuesta MA, Msika S, Morino M, Lacy A, Bonjer HJ. Survival after laparoscopic surgery versus open surgery for colon cancer: long-term outcome of a randomised clinical trial. *Lancet Oncol* 2009; 10: 44-52
- 31 Mirza MS, Longman RJ, Farrokhyar F, Sheffield JP, Kennedy RH. Long-term outcomes for laparoscopic versus open resection of nonmetastatic colorectal cancer. *J Laparoendosc Adv Surg Tech A* 2008; 18: 679-685
- 32 Rotholtz NA, Laporte M, Zanon G, Bun ME, Aued L, Lencinas S, Mezzadri NA, Pereyra L. Predictive factors for conversion in laparoscopic colorectal surgery. *Tech Coloproctol* 2008; 12: 27-31
- 33 Thorpe H, Jayne DG, Guillou PJ, Quirke P, Copeland J, Brown JM. Patient factors influencing conversion from laparoscopically assisted to open surgery for colorectal cancer. *Br J Surg* 2008; 95: 199-205
- 34 Abraham NS, Byrne CM, Young JM, Solomon MJ. Meta-analysis of non-randomized comparative studies of the short-term outcomes of laparoscopic resection for colorectal cancer. *ANZ J Surg* 2007; 77: 508-516
- 35 Ng KH, Ng DC, Cheung HY, Wong JC, Yau KK, Chung CC, Li MK. Laparoscopic resection for rectal cancers: lessons learned from 579 cases. *Ann Surg* 2009; 249: 82-86
- 36 Bianchi PP, Rosati R, Bona S, Rottoli M, Elmore U, Ceriani C, Malesci A, Montorsi M. Laparoscopic surgery in rectal cancer: a prospective analysis of patient survival and outcomes. *Dis Colon Rectum* 2007; 50: 2047-2053
- 37 Inomata M, Yasuda K, Shiraishi N, Kitano S. Clinical evidences of laparoscopic versus open surgery for colorectal cancer. *Jpn J Clin Oncol* 2009; 39: 471-477
- 38 Neudecker J, Klein F, Bittner R, Carus T, Stroux A, Schwenk W. Short-term outcomes from a prospective randomized trial comparing laparoscopic and open surgery for colorectal cancer. *Br J Surg* 2009; 96: 1458-1467
- 39 Poon JT, Law WL, Fan JK, Lo OS. Impact of the standardized medial-to-lateral approach on outcome of laparoscopic colorectal resection. *World J Surg* 2009; 33: 2177-2182
- 40 Bilimoria KY, Bentrem DJ, Nelson H, Stryker SJ, Stewart AK, Soper NJ, Russell TR, Ko CY. Use and outcomes of laparoscopic-assisted colectomy for cancer in the United States. *Arch Surg* 2008; 143: 832-839; discussion 839-840
- 41 Kube R, Ptok H, Steinert R, Sahm M, Schmidt U, Gastinger I, Lippert H. [Clinical value of laparoscopic surgery for colon cancer] *Chirurg* 2008; 79: 1145-1150
- 42 Kuhry E, Schwenk W, Gaupset R, Romild U, Bonjer J. Long-term outcome of laparoscopic surgery for colorectal cancer: a cochrane systematic review of randomised controlled trials. *Cancer Treat Rev* 2008; 34: 498-504
- 43 Hinojosa MW, Murrell ZA, Konyalian VR, Mills S, Nguyen NT, Stamos MJ. Comparison of laparoscopic vs open sigmoid colectomy for benign and malignant disease at academic medical centers. *J Gastrointest Surg* 2007; 11: 1423-1429; discussion 1429-1430
- 44 Allardyce RA, Bagshaw PF, Frampton CM, Frizelle FA, Hewett PJ, Rieger NA, Smith JS, Solomon MJ, Stevenson AR. Australasian Laparoscopic Colon Cancer Study shows that elderly patients may benefit from lower postoperative complication rates following laparoscopic versus open resection. *Br J Surg* 2010; 97: 86-91
- 45 Kennedy GD, Heise C, Rajamanickam V, Harms B, Foley EF. Laparoscopy decreases postoperative complication rates after abdominal colectomy: results from the national surgical quality improvement program. *Ann Surg* 2009; 249: 596-601
- 46 Poon JT, Law WL, Wong IW, Ching PT, Wong LM, Fan JK, Lo OS. Impact of laparoscopic colorectal resection on surgical site infection. *Ann Surg* 2009; 249: 77-81
- 47 Rosin D, Zmora O, Hoffman A, Khaikin M, Bar Zakai B, Munz Y, Shabtai M, Ayalon A. Low incidence of adhesion-related bowel obstruction after laparoscopic colorectal surgery. *J Laparoendosc Adv Surg Tech A* 2007; 17: 604-607
- 48 Bilimoria KY, Bentrem DJ, Merkow RP, Nelson H, Wang E, Ko CY, Soper NJ. Laparoscopic-assisted vs. open colectomy for cancer: comparison of short-term outcomes from 121 hospitals. *J Gastrointest Surg* 2008; 12: 2001-2009
- 49 Sereno Trbaldo S, Anvari M, Leroy J, Marescaux J. Prevalence of internal hernias after laparoscopic colonic surgery. *J Gastrointest Surg* 2009; 13: 1107-1110
- 50 Row D, Weiser MR. An update on laparoscopic resection for rectal cancer. *Cancer Control* 2010; 17: 16-24
- 51 Soop M, Nelson H. Is laparoscopic resection appropriate for colorectal adenocarcinoma? *Adv Surg* 2008; 42: 205-217
- 52 Carli F, Charlebois P, Baldini G, Cachero O, Stein B. An integrated multidisciplinary approach to implementation of a fast-track program for laparoscopic colorectal surgery. *Can J Anaesth* 2009;

- 56: 837-842
- 53 Lin JH, Whelan RL, Sakellarios NE, Cekic V, Forde KA, Bank J, Feingold DL. Prospective study of ambulation after open and laparoscopic colorectal resection. *Surg Innov* 2009; 16: 16-20
- 54 Selvindos PB, Ho YH. Multimedia article. Laparoscopic ultralow anterior resection with colonic J-pouch-anal anastomosis. *Dis Colon Rectum* 2008; 51: 1710-1711
- 55 Offodile AC 2nd, Lee SW, Yoo J, Whelan RL, Moradi D, Baxter R, Arnell TD, Nasar A, Sonoda T, Milsom JW, Feingold DL. Does prior abdominal surgery influence conversion rates and outcomes of laparoscopic right colectomy in patients with neoplasia? *Dis Colon Rectum* 2008; 51: 1669-1674
- 56 Chung CC, Ng DC, Tsang WW, Tang WL, Yau KK, Cheung HY, Wong JC, Li MK. Hand-assisted laparoscopic versus open right colectomy: a randomized controlled trial. *Ann Surg* 2007; 246: 728-733
- 57 McLeod R. Long-term results of laparoscopic-assisted colectomy are comparable to results after open colectomy. *Ann Surg* 2008; 248: 8-9
- 58 Fleshman J, Sargent DJ, Green E, Anvari M, Stryker SJ, Beart RW Jr, Hellinger M, Flanagan R Jr, Peters W, Nelson H. Laparoscopic colectomy for cancer is not inferior to open surgery based on 5-year data from the COST Study Group trial. *Ann Surg* 2007; 246: 655-662; discussion 662-664
- 59 Lacy AM, Delgado S, Castells A, Prins HA, Arroyo V, Ibarzabal A, Pique JM. The long-term results of a randomized clinical trial of laparoscopy-assisted versus open surgery for colon cancer. *Ann Surg* 2008; 248: 1-7
- 60 Baća I, Perko Z, Bokan I, Mimica Z, Petricević A, Druzijanić N, Situm M. Technique and survival after laparoscopically assisted right hemicolectomy. *Surg Endosc* 2005; 19: 650-655
- 61 Jones OM, Stevenson AR, Stitz RW, Lumley JW. Preservation of sexual and bladder function after laparoscopic rectal surgery. *Colorectal Dis* 2009; 11: 489-495
- 62 Nitori N, Hasegawa H, Ishii Y, Endo T, Kitajima M, Kitagawa Y. Sexual function in men with rectal and rectosigmoid cancer after laparoscopic and open surgery. *Hepatogastroenterology* 2008; 55: 1304-1307
- 63 Liang JT, Lai HS, Lee PH, Chang KJ. Laparoscopic pelvic autonomic nerve-preserving surgery for sigmoid colon cancer. *Ann Surg Oncol* 2008; 15: 1609-1616
- 64 Choi DJ, Kim SH, Lee PJ, Kim J, Woo SU. Single-stage totally robotic dissection for rectal cancer surgery: technique and short-term outcome in 50 consecutive patients. *Dis Colon Rectum* 2009; 52: 1824-1830
- 65 Spinoglio G, Summa M, Priora F, Quarati R, Testa S. Robotic colorectal surgery: first 50 cases experience. *Dis Colon Rectum* 2008; 51: 1627-1632
- 66 Luca F, Cenciarelli S, Valvo M, Pozzi S, Faso FL, Ravizza D, Zampino G, Sonzogni A, Biffi R. Full robotic left colon and rectal cancer resection: technique and early outcome. *Ann Surg Oncol* 2009; 16: 1274-1278
- 67 Rao PP, Bhagwat SM, Rane A, Rao PP. The feasibility of single port laparoscopic cholecystectomy: a pilot study of 20 cases. *HPB (Oxford)* 2008; 10: 336-340
- 68 Remzi FH, Kirat HT, Geisler DP. Laparoscopic single-port colectomy for sigmoid cancer. *Tech Coloproctol* 2009 Dec 2. [Epub ahead of print]
- 69 Lezoche E, Guerrieri M, De Sanctis A, Campagnacci R, Baldarelli M, Lezoche G, Paganini AM. Long-term results of laparoscopic versus open colorectal resections for cancer in 235 patients with a minimum follow-up of 5 years. *Surg Endosc* 2006; 20: 546-553

编辑 李军亮 电编 何基才

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2010年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

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

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

肿瘤进化学的研究新进展

吕晓光, 董卫国

吕晓光, 董卫国, 湖北省武汉市武汉大学人民医院消化内科
湖北省武汉市 430060

作者贡献分布: 本综述由吕晓光完成, 董卫国审校。

通讯作者: 董卫国, 教授, 430060, 湖北省武汉市, 武汉大学人民医院消化内科. dongwg66@yahoo.com.cn
电话: 027-88041911

收稿日期: 2010-04-21 修回日期: 2010-06-10

接受日期: 2010-06-22 在线出版日期: 2010-07-18

Advances in understanding tumor evolution

Xiao-Guang Lv, Wei-Guo Dong

Xiao-Guang Lv, Wei-Guo Dong, Department of Gastroenterology, Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan 430060, Hubei Province, China

Correspondence to: Professor Wei-Guo Dong, Department of Gastroenterology, Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan 430060, Hubei Province, China. dongwg66@yahoo.com.cn

Received: 2010-04-21 Revised: 2010-06-10

Accepted: 2010-06-22 Published online: 2010-07-18

Abstract

Tumor can be regarded as an “evolutionary” system. As biological individuals within an ecosystem, tumor cells have to undergo natural (artificial) selection, compete for space and resources, evade the immune system, and even “collaborate” with each other to disseminate and metastasize. Much research on tumor evolution has been performed in an interdisciplinary manner.

Key Words: Evolution; Tumor; Mutation; Selection; Ecology; Microenvironment

Lv XG, Dong WG. Advances in understanding tumor evolution. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(20): 2127-2131

摘要

肿瘤是一个“进化”的生物系统。肿瘤细胞如同自然界中的生物个体一样, 接受环境的选择, 并相互竞争生存空间和资源, 逃避免疫系统的捕杀, 甚至能相互“协作”从而成功发生播散和转移。目前肿瘤进化已逐渐发展成为一个涉及肿瘤生物学, 分子生物学, 遗传学, 生物进化学, 应用数学, 统计学等诸多领

域的交叉学科。

关键词: 进化; 肿瘤; 突变; 选择; 生态学; 微环境

吕晓光, 董卫国. 肿瘤进化学的研究新进展. *世界华人消化杂志* 2010; 18(20): 2127-2131

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/2127.asp>

0 引言

肿瘤可以被看成是机体某一细胞克隆在进化过程发生的疾病。虽然肿瘤进化并不是最近提出的, 但是目前人们并没有把进化的观念广泛的引入到肿瘤研究和临床治疗的研究当中。1976年Nowell^[1]首次提出肿瘤是一个进化的“生物体”。此后研究人员有意(或者无意)地采用进化的观念对肿瘤进行研究。Maley等^[2]通过对Barret's食管的研究证实: 癌前病变向肿瘤的转变是一个细胞种群适应自然选择的进化过程。Anderson等^[3]研究表明微环境的选择压力对肿瘤表型和形态学存在重大影响。2006年Merlo等^[4]正式提出肿瘤是一个独特的“生态系统”, 肿瘤的进展就是进化的过程, 并系统阐述了肿瘤进化的研究方法和方向。2009年Shah等^[5]通过对乳腺导管癌患者9年的基因组测序比对, 发现了该肿瘤基因组进化的规律。同年Brock等^[6]推测肿瘤进化存在另一种重要的推动力量: 非基因异质性。上述研究将肿瘤进化研究推向了一个新的高度。本文将从生物进化和生态学的角度, 回顾肿瘤细胞克隆的进化和生态学特点, 探讨肿瘤的发病机制, 找出其发生、进展和治疗中的关键环节。

1 肿瘤进化的基本要素

1.1 突变 突变即DNA序列的改变。最简单的突变是一种碱基变成了另外一种碱基, 具体有两种类型: 转换, 即嘧啶到嘧啶或嘌呤到嘌呤的替换; 颠换, 即嘧啶到嘌呤或嘌呤到嘧啶的替换。另外一个简单的突变是一个核苷酸或少量的核苷酸的插入和缺失。其他类型的突变引起DNA更大的改变, 如大范围的插入和缺失以及染色体结

■背景资料

肿瘤可以被看成是机体某一细胞克隆在进化过程发生的疾病。虽然肿瘤进化并不是最近提出的, 但是目前人们并没有把进化的观念广泛的引入到肿瘤研究和临床治疗的研究当中。

■同行评议者

曹秀峰, 教授, 南京医科大学附属南京第一医院肿瘤中心

■ 研发前沿

目前关于肿瘤进化领域尚处于起步阶段,还存在很多未解之谜:肿瘤中基因突变和表观遗传突变率如何?肿瘤进展过程中的关键突变是什么?细胞克隆扩增机制是什么,应该如何控制?目前的治疗方式对肿瘤细胞会产生怎样的选择效应?从进化的角度,应该采取哪些更加有效的治疗策略,使肿瘤细胞彻底“灭绝”,而不是进化得更加强大。

构的整体重排。此种变化可能由转座子的插入或者细胞基因重组过程中的异常作用所导致。转座子通常将数千个核苷酸的外源DNA插入到基因的编码序列或者调控序列中。

从遗传稳定性来看,要使后代细胞具有很好的存活机会,DNA必须进行基本不变的传递。如果生物体中的体细胞中的突变概率太高的话,这些细胞就不能执行预期功能。如肿瘤细胞就是因为掌管细胞周期的基因受损,导致细胞无法按照可控方式进行生长和分裂产生的。但是从物种进化的角度来看,如果遗传物质的继承具有绝对的忠实性,物种将失去驱动进化所需的基因变异,物种的进化也就不可能完成。

可遗传的突变是肿瘤进化过程所必需的。突变在肿瘤的进展中发挥着重要作用。肿瘤异质性的研究表明肿瘤细胞中存在广泛的基因及表观遗传学变异,而变异的程度可以预测肿瘤的进展^[7,8]。如Barret's食管癌前病变中的细胞克隆的基因多态性与罹患食管癌的风险相关^[7]。基因不稳定性所导致基因异质性是肿瘤的特性之一,并可以作为肿瘤的标志。

肿瘤细胞中基因突变十分普遍。Stoler等^[9]研究发现结肠癌细胞中至少发生了1 100个基因突变(包括非编码区)。尽管大部分基因改变对细胞种群而言是中性的,但是其中部分突变可以对细胞的生物学功能造成重要影响:如可以增加细胞克隆的生存优势,改变生物学特性;可以导致细胞生存能力下降,甚至死亡。突变的细胞之所以能够承受一定程度的有害突变,仍然保持生存、分裂的能力,可能与发生突变基因功能有关:基因组中大部分可能参与多细胞个体的构造和维持,其变异对肿瘤细胞生存和增殖能力进化没有太大影响^[10,11]。

肿瘤形成过程中细胞基因突变相关信息仍然存在很多未解之谜:肿瘤形成过程中突变的数量、首发部位尚不确定,突变的顺序如何,哪些是成瘤的关键突变?这些问题的解决对于肿瘤的预防,早期诊断,治疗可以提供重要的信息。

1.2 遗传漂变 基因漂变是指由小群体引起的基因频率增减甚至丢失的现象。在自然条件下,如果种群足够小,他所拥有的基因和基因型可以偏离原始种群很远。遗传漂变的结果是遗传多样性的丧失,纯合子的增加,杂合子的减少和缺失,细胞种群适合度的降低。其中奠基者效应、瓶颈效应是肿瘤细胞种群在转移和化疗后发生遗传漂变的主要形式。遗传漂变后的新的细胞种

群的遗传多态性分布状态可能和原有种群完全不同,导致生物学特性发生重大改变^[4]。

1.3 选择

1.3.1 自然选择:自然选择是对表型的选择,就是通过对具有不同表型(往往因他们具有不同的基因型)个体的筛选从而影响基因频率。自然选择是方向性的选择而不是随机的过程。这种筛选往往是通过个体的生死存亡来体现的,也就是不适合的个体不能生存,或者不能将自身携带的基因传承给下一代,从而影响基因频率。换言之,自然选择就是对有利的变异的保存和有害变异的排除。可遗传性变异是肿瘤细胞种群实现自然选择的先决条件。肿瘤中的细胞实现自然选择是由于基因突变产生了可遗传的变异,部分突变改变了肿瘤细胞适应环境的能力:适应或者被淘汰。肿瘤研究中一直存在一个有趣的现象:不同部位,不同类型的肿瘤细胞基因缺失及获得的种类都不一样。这一现象提示不同器官的选择压力和过程存在差异。肿瘤的自然选择过程存在着特殊的形式:只有在前一个基因损害发生之后,下一个基因突变才会发生,从而赋予肿瘤细胞某种性状。以Barret's食管为例,TP53的失活通常只有在CDKN2A失活发生后才会发生^[12]。可以说,食管癌细胞中CDKN2A失活这一事件就是自然选择的前提,体现了自然选择的方向性。这种基因依赖性自然选择也是基因突变存在规律性的原因,这为完善描述肿瘤基因事件的发展趋势提供了理论基础,为肿瘤的风险预测和诊断提供了依据^[13]。

1.3.2 人工选择:人工选择即在人为制造的选择压力下(化疗和放疗)具有耐药、耐放射线性状的肿瘤细胞得以保存,而使放化疗敏感的细胞消亡的过程。传统的人工选择是通过人工方法改良生物的性状和培育新品种的过程,具有人类主观的意愿;但是肿瘤治疗导致的人工选择恰恰是人们不愿意看到的。由于人工选择的存在,肿瘤的化疗常常由于耐药细胞克隆的存在(或产生)而失败。例如肺癌细胞的EGFR点突变导致其对anilinoquinazoline EGFR抑制因子的耐药性^[14]。BCR-ABL某个氨基酸改变导致了慢性骨髓白细胞对imatinib耐药^[15]。胸腺嘧啶合酶基因的扩增可以导致结肠癌细胞对5-氟尿嘧啶耐药^[16]。基因突变在人工选择之前已经存在还是由其诱导后发生这一问题尚存争议。在一个经典的关于生物进化的细菌实验中,研究者将某一细菌种群暴露在某种人为的选择压力之下,

观察是否可以诱发新的突变或者筛选出已经存在突变的细胞克隆. 结果发现在人为设置的环境选择中某些已经存在突变的细胞克隆存活了下来^[17]. 这条在细菌实验中发现的规律同样适用于肿瘤: 可以解释肿瘤治疗过程中耐药性的问题. 研究表明在采用Glivec治疗之前, 慢性粒细胞性白血病患者体内就已经存在Glivec耐药表型的细胞^[18]. 目前临床医师已经从进化的角度探索出了一些化疗策略, 希望能够解决耐药问题, 其中包括: 联合药物治疗, 扶持疗法(削弱肿瘤细胞生存能力和提升良性细胞之间的竞争优势), 选择疗法(通过人为选择压力使对化疗药物敏感、基因稳定型的细胞克隆生存下来, 淘汰耐药的细胞克隆). 在上述方案中只有多药物联合治疗方被应用于临床实践^[19]. 研究人员根据肿瘤进化理论进行的临床药物试验: 比较两种不同的化疗方案: 间断性给药和持续给药, 观察肿瘤细胞克隆之间竞争状态, 评估不同方案的疗效. 试验结果证明持续给药方案效果更佳. 从生态学来看, 大剂量间断给药时肿瘤细胞克隆的生存能力要高于小剂量持续给药时的水平, 因此后一种方案可能疗效更佳^[20-22].

2 生态

生态系统中的物种存在着复杂的社会关系和相互影响. 研究发现肿瘤“生态系统”中细胞克隆之间同样存在着竞争、捕食、寄生等特殊的关系.

2.1 竞争 肿瘤细胞克隆之间的竞争对象主要是资源, 具体形式为细胞克隆之间通过某种因子对对方造成不良的影响, 提升自己的竞争优势^[23]. 研究者在小鼠的肿瘤种植实验发现在临近部位的肿瘤对彼此存在着抑制作用, 该实验为肿瘤细胞中竞争关系的存在提供了依据^[24]. 让人意外的是: 肿瘤中还存在更加明显、独特的竞争形式: 某细胞克隆可以激活宿主免疫系统清除“竞争对手”, 从而达到独霸资源的目的. 通过以Lotka-Volterra竞争方程为基础建立的致癌模型, 肿瘤像恐龙一样“灭绝”需要达到以下条件: 减少组织所能供养的肿瘤细胞的数量, 降低肿瘤细胞对正常细胞的不良的竞争性影响, 增强正常细胞对肿瘤细胞的竞争性限制作用. 上述内容同样有望作为评估化疗疗效的科学指标^[25-27].

2.2 捕食 生态系统的物种中存在着一种特殊关系: 食物链. 捕食者捕杀猎物获得食物. 肿瘤和

宿主免疫系统之间的关系与之类似.

肿瘤细胞通过各种方式逃脱免疫系统的“捕杀”, 例如下调主要组织相容性复合物^[28]. 肿瘤免疫逃避机制的复杂性表明: 除非肿瘤基因异质性水平较低, 否则对肿瘤患者实行有限的免疫治疗不可能取得很好的效果. 虽然死亡的肿瘤细胞裂解可以导致抗原递呈细胞活化使T淋巴细胞克隆扩增(这与自然生态系统不同: 自然界中捕食者会随着猎物灭绝而消亡), 但是单纯依靠T淋巴细胞来清除肿瘤细胞是不可能的.

我们根据种群的瓶颈效应(原先的种群因某种因素急剧减少, 只剩下少量的个体后引起的基因漂变). 重新研究肿瘤治疗后存在少量病变残留的问题. 如果活化的淋巴细胞和肿瘤细胞也像食物链一样保持着此消彼长的动态平衡, 那么我们可以人为改变上述平衡的水平: 通过刺激免疫系统使活化的T淋巴细胞长时间保持着一个较大的数量直至肿瘤被彻底消灭.

2.3 寄生 寄生者并不对宿主的生命造成威胁, 但是可以通过占用宿主的养分而获得最佳的生存状态. 目前尚没有证据证明肿瘤中的细胞克隆存在着寄生关系. 但是实验证明确实存在着不劳而获者“免费”享用着邻居们提供的资源, 例如肿瘤细胞可以激活成纤维母细胞释放生长因子, 刺激新的血管生成, 促进生长因子的释放, 促进细胞外基质的分解, 从而为自己营造一个良好的生活环境^[29]. 这种处于寄生状态的肿瘤细胞克隆就像病毒和细菌一样不劳而获.

2.4 共栖 肿瘤细胞同样存在着“和平共处, 共同进步”的友好关系. Miller等^[24]研究发现某突变细胞克隆与另一细胞克隆之间存在共生关系-相互增强对方的生存能力: 前者可以赋予后者转移的能力. Axelrod等^[30]发现肿瘤细胞克隆可以通过分泌相关因子使得对方的生存能力得以增强, 使对方不需要发生突变来达到上述目的. 目前研究人员发现在人类肿瘤上皮细胞和活化的成纤维母细胞存在共栖关系-两者相互配合, 使得对方生存优势得以增强, 从而实现共同进化^[31,32].

3 环境

肿瘤微环境由肿瘤细胞和其周围的纤维母细胞、上皮细胞、固有及特异性免疫细胞、肿瘤血管和淋巴管结构的组成细胞、组织特异性的间叶细胞及他们的表达产物、代谢物质等成分构成, 是肿瘤发生、生长的局部环境.

■ 相关报道

2006年Merlo等正式提出肿瘤是一个独特的“生态系统”, 肿瘤的进展就是进化的过程, 并系统阐述了肿瘤进化的研究方法和方向. 2009年Shah等通过对乳腺导管癌患者9年的基因组测序比对, 发现了该肿瘤基因组进化的规律. 同年Brock等推测肿瘤进化存在另一种重要的推动力量: 非基因异质性.

■创新盘点

本文从生物进化和生态学的角度,回顾肿瘤细胞克隆的进化和生态学特点,探讨肿瘤的发病机制,找出其发生、进展和治疗中的关键环节。

微环境对细胞的分化和肿瘤的转归具有重要的影响^[33]。例如,将畸胎瘤细胞置于鼠的囊胚泡中便可以抑制其致癌表型^[34]。在肝细胞生长因子(hepatocyte growth factor, HGF)、转化生长因子(transforming growth factor beta1, TGF β 1)过表达而使基质活化的微环境中,哺乳动物的某些正常上皮细胞有可能进展为恶性肿瘤^[35]。增加成纤维母细胞的HGF、基质细胞衍生因子-1(stoma cells derived factor1, SDF1)的表达水平对小鼠的上皮肿瘤的进展有促进作用^[36,37]。上述实验表明调节微环境有望成为肿瘤防控的新的方向。

4 结论

目前关于肿瘤进化领域尚处于起步阶段,还存在很多未解之谜:肿瘤中基因突变和表观遗传突变率如何?肿瘤进展过程中的关键突变是什么?细胞克隆扩增机制是什么,应该如何控制?目前的治疗方式对肿瘤细胞会产生怎样的选择效应?从进化的角度,应该采取哪些更加有效的治疗策略,使肿瘤细胞彻底“灭绝”,而不是进化得更加强大?随着肿瘤进化学相关研究思想和方法的引入,消化系肿瘤的防治也将进入一个崭新的阶段。例如Barrett's食管、胃腺瘤性息肉、溃疡性结肠炎等癌变过程中的基因突变发生率对于肿瘤的风险评估的意义如何;其中关键的突变基因的敲除或抑制是否对肿瘤起到预防作用?我们目前应该采取哪些更加符合进化学的治疗策略从而取得更好的疗效。

5 参考文献

- Nowell PC. The clonal evolution of tumor cell populations. *Science* 1976; 194: 23-28
- Maley CC, Reid BJ. Natural selection in neoplastic progression of Barrett's esophagus. *Semin Cancer Biol* 2005; 15: 474-483
- Anderson AR, Weaver AM, Cummings PT, Quaranta V. Tumor morphology and phenotypic evolution driven by selective pressure from the microenvironment. *Cell* 2006; 127: 905-915
- Merlo LM, Pepper JW, Reid BJ, Maley CC. Cancer as an evolutionary and ecological process. *Nat Rev Cancer* 2006; 6: 924-935
- Shah SP, Morin RD, Khattra J, Prentice L, Pugh T, Burleigh A, Delaney A, Gelmon K, Guliany R, Senz J, Steidl C, Holt RA, Jones S, Sun M, Leung G, Moore R, Severson T, Taylor GA, Teschendorff AE, Tse K, Turashvili G, Varhol R, Warren RL, Watson P, Zhao Y, Caldas C, Huntsman D, Hirst M, Marra MA, Aparicio S. Mutational evolution in a lobular breast tumour profiled at single nucleotide resolution. *Nature* 2009; 461: 809-813
- Brock A, Chang H, Huang S. Non-genetic heterogeneity--a mutation-independent driving force for the somatic evolution of tumours. *Nat Rev Genet* 2009; 10: 336-342
- Maley CC, Galipeau PC, Finley JC, Wongsurawat VJ, Li X, Sanchez CA, Paulson TG, Blount PL, Risques RA, Rabinovitch PS, Reid BJ. Genetic clonal diversity predicts progression to esophageal adenocarcinoma. *Nat Genet* 2006; 38: 468-473
- Roth MJ, Hu N, Emmert-Buck MR, Wang QH, Dawsey SM, Li G, Guo WJ, Zhang YZ, Taylor PR. Genetic progression and heterogeneity associated with the development of esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Res* 2001; 61: 4098-4104
- Stoler DL, Chen N, Basik M, Kahlenberg MS, Rodriguez-Bigas MA, Petrelli NJ, Anderson GR. The onset and extent of genomic instability in sporadic colorectal tumor progression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96: 15121-15126
- Frank SA, Nowak MA. Problems of somatic mutation and cancer. *Bioessays* 2004; 26: 291-299
- Rajagopalan H, Nowak MA, Vogelstein B, Lengauer C. The significance of unstable chromosomes in colorectal cancer. *Nat Rev Cancer* 2003; 3: 695-701
- Maley CC, Galipeau PC, Li X, Sanchez CA, Paulson TG, Reid BJ. Selectively advantageous mutations and hitchhikers in neoplasms: p16 lesions are selected in Barrett's esophagus. *Cancer Res* 2004; 64: 3414-3427
- Desper R, Jiang F, Kallioniemi OP, Moch H, Papadimitriou CH, Schaffer AA. Inferring tree models for oncogenesis from comparative genome hybridization data. *J Comput Biol* 1999; 6: 37-51
- Kobayashi S, Boggon TJ, Dayaram T, Jänne PA, Kocher O, Meyerson M, Johnson BE, Eck MJ, Tenen DG, Halmos B. EGFR mutation and resistance of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *N Engl J Med* 2005; 352: 786-792
- Gorre ME, Mohammed M, Ellwood K, Hsu N, Paquette R, Rao PN, Sawyers CL. Clinical resistance to STI-571 cancer therapy caused by BCR-ABL gene mutation or amplification. *Science* 2001; 293: 876-880
- Wang TL, Diaz LA Jr, Romans K, Bardelli A, Saha S, Galizia G, Choti M, Donehower R, Parmigiani G, Shih IeM, Iacobuzio-Donahue C, Kinzler KW, Vogelstein B, Lengauer C, Velculescu VE. Digital karyotyping identifies thymidylate synthase amplification as a mechanism of resistance to 5-fluorouracil in metastatic colorectal cancer patients. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101: 3089-3094
- Luria SE, Delbrück M. Mutations of Bacteria from Virus Sensitivity to Virus Resistance. *Genetics* 1943; 28: 491-511
- Roche-Lestienne C, Preudhomme C. Mutations in the ABL kinase domain pre-exist the onset of imatinib treatment. *Semin Hematol* 2003; 40: 80-82
- Chabner BA, Roberts TG Jr. Timeline: Chemotherapy and the war on cancer. *Nat Rev Cancer* 2005; 5: 65-72
- Suiter AM, Bänziger O, Dean AM. Fitness consequences of a regulatory polymorphism in a seasonal environment. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100: 12782-12786
- Kim JJ, Tannock IF. Repopulation of cancer cells during therapy: an important cause of treatment failure. *Nat Rev Cancer* 2005; 5: 516-525
- Kern W, Estey EH. High-dose cytosine arabinoside in the treatment of acute myeloid leukemia: Review

- of three randomized trials. *Cancer* 2006; 107: 116-124
- 23 Guba M, Cernaianu G, Koehl G, Geissler EK, Jauch KW, Anthuber M, Falk W, Steinbauer M. A primary tumor promotes dormancy of solitary tumor cells before inhibiting angiogenesis. *Cancer Res* 2001; 61: 5575-5579
- 24 Miller BE, Miller FR, Leith J, Heppner GH. Growth interaction in vivo between tumor subpopulations derived from a single mouse mammary tumor. *Cancer Res* 1980; 40: 3977-3981
- 25 Gatenby RA, Vincent TL. Application of quantitative models from population biology and evolutionary game theory to tumor therapeutic strategies. *Mol Cancer Ther* 2003; 2: 919-927
- 26 Bach LA, Bentzen SM, Alsner J, Christiansen FB. An evolutionary-game model of tumour-cell interactions: possible relevance to gene therapy. *Eur J Cancer* 2001; 37: 2116-2120
- 27 Nagy JD. Competition and natural selection in a mathematical model of cancer. *Bull Math Biol* 2004; 66: 663-687
- 28 Rundhaug JE. Matrix metalloproteinases and angiogenesis. *J Cell Mol Med* 2005; 9: 267-285
- 29 Seliger B. Strategies of tumor immune evasion. *BioDrugs* 2005; 19: 347-354
- 30 Axelrod R, Axelrod DE, Pienta KJ. Evolution of cooperation among tumor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103: 13474-13479
- 31 Mueller MM, Fusenig NE. Friends or foes - bipolar effects of the tumour stroma in cancer. *Nat Rev Cancer* 2004; 4: 839-849
- 32 Fukino K, Shen L, Matsumoto S, Morrison CD, Mutter GL, Eng C. Combined total genome loss of heterozygosity scan of breast cancer stroma and epithelium reveals multiplicity of stromal targets. *Cancer Res* 2004; 64: 7231-7236
- 33 Kenny PA, Bissell MJ. Tumor reversion: correction of malignant behavior by microenvironmental cues. *Int J Cancer* 2003; 107: 688-695
- 34 Mintz B, Illmensee K. Normal genetically mosaic mice produced from malignant teratocarcinoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1975; 72: 3585-3589
- 35 Kuperwasser C, Chavarria T, Wu M, Magrane G, Gray JW, Carey L, Richardson A, Weinberg RA. Reconstruction of functionally normal and malignant human breast tissues in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101: 4966-4971
- 36 Bhowmick NA, Chytil A, Plieth D, Gorska AE, Dumont N, Shappell S, Washington MK, Neilson EG, Moses HL. TGF-beta signaling in fibroblasts modulates the oncogenic potential of adjacent epithelia. *Science* 2004; 303: 848-851
- 37 Orimo A, Gupta PB, Sgroi DC, Arenzana-Seisdedos F, Delaunay T, Naeem R, Carey VJ, Richardson AL, Weinberg RA. Stromal fibroblasts present in invasive human breast carcinomas promote tumor growth and angiogenesis through elevated SDF-1/CXCL12 secretion. *Cell* 2005; 121: 335-348

■同行评价

本综述内容较全面,有一定的新颖性。

编辑 曹丽鸥 电编 何基才

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2010年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

2009年《世界华人消化杂志》编委审稿总结

本刊讯 《世界华人消化杂志》(*World Chinese Journal of Digestology*, *WCJD*)编辑委员会共计400人,全部为副教授及副主任医师以上。*WCJD*编委会审稿费结算工作于次年01-05开始。本次统计为2008-01-01/2009-12-31编委审稿费用,共计40 850元,数据以稿件审回日期为准。*WCJD*共计审稿1 418篇,其中送审专家377位,共计送审次数2 094次,成功审回次数1 634,成功率78.03%。其中审稿次数排前三位的为:西安交通大学医学院第二附属医院感染科党双锁教授和福建医科大学附属协和医院消化内科王小众教授并列第一位,各17篇;南京医科大学附属南京第一医院肿瘤中心曹秀峰教授第二位,16篇;中国医科大学附属第一医院消化内科王炳元教授和苏州大学附属第一医院消化科陈卫昌教授并列第三位,各15篇。

*WCJD*编辑部感谢各位编委2009年对*WCJD*工作的支持,同时希望各位编委更加积极主动的配合我们今后的工作。审稿费已经通过邮局汇款,如有审稿费未收到或者审稿稿件有误差,请各位编委与编辑部联系,联系电话:010-85381892,联系人:李军亮。(编辑部主任:李军亮 2010-04-20)

LNAzyme抑制HCV 5'端非编码区内源性核糖体进入位点基因表达

张梁, 邓益斌

■背景资料

反义核酸技术, 包括反义寡核苷酸技术、核酶技术等, 已被证明是研究、治疗病毒感染性疾病、遗传性疾病、肿瘤等多种疾病的行之有效的行之有效的手段之一, 可通过针对在疾病发生、发展过程中发挥重要作用的生长因子、受体、关键酶、原癌基因、抑癌基因或凋亡相关基因, 通过导入的外源DNA或RNA短序列, 特异性地进行结合、封闭或调节其功能及产物表达, 从而达到治疗目的。

■同行评议者

邹小明, 教授, 哈尔滨医科大学附属第二医院普外科

张梁, 邓益斌, 广西右江民族医学院附属医院医学检验中心
广西壮族自治区百色市 533000

广西教育厅课题基金资助项目, No. 200911MS187

作者贡献分布: 该实验由邓益斌设计; 实验过程由张梁与邓益斌共同完成; 实验研究所需经费由邓益斌提供; 数据分析由邓益斌完成; 论文写作由张梁完成, 邓益斌审核。

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

enbin0776@sina.com

电话: 0776-2840703

收稿日期: 2010-04-15 修回日期: 2010-06-17

接受日期: 2010-06-22 在线出版日期: 2010-07-18

LNAzyme targeting the HCV internal ribosome entry site inhibits HCV RNA expression in HepG2.9706 cells

Liang Zhang, Yi-Bin Deng

Liang Zhang, Yi-Bin Deng, Center for Medical Laboratory Sciences, the Affiliated Hospital of Youjiang Medical College for Nationalities, Baise 533000, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China

Supported by: the Project Foundation of Guangxi Education Department, No. 200911MS187

Correspondence to: Yi-Bin Deng, Center for Medical Laboratory Sciences, the Affiliated Hospital of Youjiang Medical College for Nationalities, Baise 533000, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China. enbin0776@sina.com

Received: 2010-04-15 Revised: 2010-06-17

Accepted: 2010-06-22 Published online: 2010-07-18

Abstract

AIM: To investigate the inhibitory effects of LNAzyme targeting the hepatitis C virus (HCV) internal ribosome entry site (IRES) on HCV RNA expression in HepG2.9706 cells.

METHODS: The sequences encoding DNAzyme, thiolmodified DNAzyme and LNAzyme directing against the HBV IRES (located in the 5' non-coding region) were designed and synthesized. The following experimental groups were set up: Lipofectamine-DNAzyme group, Lipofectamine-S-DNAzyme group, Lipofectamine-LNAzyme group, blank control group, empty Lipofectamine group, DNAzyme group, and random DNAzyme group. On days 1, 3, 5 and 7

after transfection, the expression of HCV RNA and luciferase gene in HepG2.9706 cells was detected.

RESULTS: Significant down-regulation of HCV RNA and luciferase gene expression was noted in the Lipofectamine-DNAzyme, Lipofectamine-S-DNAzyme and Lipofectamine-LNAzyme groups when compared with other groups (all $P < 0.05$). The reduced rates of HCV RNA expression in the above three groups were 28.10%, 35.25% and 44.58%, respectively. The reduced rates of luciferase gene expression were 31.18%, 40.69% and 52.33%, respectively. LNAzyme did not exert cytotoxicity in HepG2.9706 cells.

CONCLUSION: LNAzyme has a significant inhibitory effect on HCV RNA expression in HepG2.9706 cells. The inhibitory effect of LNAzyme on HCV RNA expression is stronger than that of thiolmodified DNAzyme.

Key Words: LNAzyme; Hepatitis C virus; Hepatitis C; Antisense oligonucleotide; Gene therapy

Zhang L, Deng YB. LNAzyme targeting the HCV internal ribosome entry site inhibits HCV RNA expression in HepG2.9706 cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(20): 2132-2136

摘要

目的: 观察针对丙型肝炎病毒(HCV)5'非编码区(NCR)内源性核糖体进入位点(IRES)的锁核酸核酶对HepG2.9706细胞中HCV RNA表达的抑制作用。

方法: 设计合成针对HCV 5'-NCR区IRES位点的DNAzyme、硫代修饰DNAzyme及LNAzyme。实验设对照组与实验组。对照组包括空白对照组、脂质体对照组、无关DNAzyme对照组、裸DNAzyme对照组。实验组包括脂质体-DNAzyme组、脂质体-硫代修饰DNAzyme组、脂质体-LNAzyme组。观察用药后1、3、5、7 d时, 对HepG2.9706细胞的

HCV RNA及荧光素酶基因表达的抑制效应。

结果: 脂质体包裹的DNAzyme、硫代修饰DNAzyme及LNAzyme对HCV RNA表达均有抑制作用, 平均抑制率分别为28.10%、35.25%和44.58%。对荧光素酶基因表达也有抑制作用, 平均抑制率分别为31.18%、40.69%和52.33%。与对照组比较均有显著性差异($P<0.05$)。对HepG2.9706细胞未见明显细胞毒性作用。

结论: LNAzyme对HepG2.9706细胞内HCV RNA的表达具有显著抑制作用, 且优于硫代修饰的DNAzyme, 是一类特异的高效抗HCV分子药物。

关键词: 锁核酸核酶; 丙型肝炎病毒; 丙型肝炎; 反义核酸; 基因治疗

张梁, 邓益斌. LNAzyme抑制HCV 5'端非编码区内源性核糖体进入位点基因表达. 世界华人消化杂志 2010; 18(20): 2132-2136

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/2132.asp>

0 引言

丙型肝炎是丙型肝炎病毒(hepatitis C virus, HCV)感染引起的一种慢性化率极高的传染性病毒性肝炎, 常发展为肝硬化及肝细胞癌, 对人类健康造成重大危害^[1]。目前对该病毒尚缺乏特异有效的防治方法, 常规的干扰素疗法效果不甚理想且易反复, 因此, 探索专一、高效的新型抗HCV药物或疗法具有重要意义。HCV是黄病毒家族中的一员, 是一条长约9.6 kb的正链RNA, 包括一个开放读码框和两侧的5', 3'非编码区(non-coding region, NCR)。其中, 5'-NCR是HCV最保守的区域之一, 是病毒复制所必需的元件, 且含有内源性核糖体进入位点(internal ribosome entry site, IRES), 在病毒复制和翻译调控中有重要作用, 是病毒基因组中唯一的翻译起始位点, 故是基因治疗的理想靶位。

锁核酸核酶(LNAzyme)是在脱氧核酶(DNAzyme)的2个结合臂上引入1个或多个锁核酸单体构建而成的新型核酸酶^[2]。锁核酸(locked nucleic acid, LNA)是一种新型的带双环状结构的寡核苷酸衍生物, 结构中核酸的2'-O, 4'-C位通过不同的缩水作用形成的刚性结构, 具有稳定性好、分子杂交能力强、抗核酸酶降解能力强和无毒性等优势^[3-10]。LNA的引入极大增加了LNAzyme与底物RNA的杂交亲和力, 增

强了切割反应的酶促活力, 使LNAzyme较相应的DNAzyme切割效率明显提高。我们前期的研究表明, 针对HBV S基因的反义LNA能有效抑制HBV的表达^[11,12]。因此, 本研究针对HCV 5'-NCR区IRES位点设计合成LNAzyme, 以HepG2.9706为对象, 观察LNAzyme对HCV复制与表达的抑制作用, 旨在为丙型肝炎治疗寻找专一性强、高效的新型分子药物。

1 材料和方法

1.1 材料 HepG2.9706细胞是一种转染有质粒pHCV-neo的转基因HepG2细胞, 含荧光素酶基因^[4], 由中国人民解放军广州军区空军医院刘光泽博士惠赠, 本室常规培养于含G418(380 ITI1)、100 mL/L胎牛血清的DMEM培养基中, 37 °C、50 mL/L CO₂条件下5-6 d传代1次; DMEM培养基、G418等购自Gibco公司; 胎牛血清购自杭州四季清公司; Lipofectamine™ 2000购自Invitrogen公司; TRIzol RNA提取试剂盒购于Gibco公司; 荧光定量PCR检测HCV RNA试剂盒购于深圳匹基公司; 化学发光试剂盒(Bright-Glo™ 荧光素酶分析系统)购自Promega公司; 采用Victor™ Wallac 1420多标记检测仪测定荧光强度。

1.2 方法

1.2.1 DNAzyme与LNAzyme的设计与合成: 针对HCV 5'-NCR区IRES位点(245-265 nt)分别设计合成以下几段序列: (1)DNAzyme, 序列为: 5'-GACTGCTAGCGGCTAGCTACAACGACGAGTAGTGTC-3'; (2)硫代DNAzyme, 在DNAzyme基础上对5'端前5个碱基及3'端前5个碱基进行硫代修饰, 序列为5'-GACTGCTAGCGGCTAGCTACAACGACGAGTAGTGTC-3'; (3)LNAzyme, 在DNAzyme的2个结合臂上分别引入2个LNA单体, 序列为5'-GACTGCTAGCGGCTAGCTACAACGACGAGTAGTGTC-3'; (4)无关DNAzyme对照序列, 即5'-TCCAGAGGAAGGGCTAGCTACAACGATTGCATACAGC-3'。其中, GGCTAGCTACAACGA为DNAzyme的催化活性序列, 其两侧为特异性核苷酸识别结合靶序列; 下划线碱基为硫代或LNA修饰。以上各序列经BLAST排除与人同源后由美国Genelink公司合成修饰并纯化。

1.2.2 脂质体包裹LNAzyme的制备: 脂质体与反义LNAzyme按1:10比例充分混匀(1 μg LNAzyme+10 μL脂质体), 室温下静置1 h后, 即

■ 研发前沿

反义核酸技术作为分子生物学的新型抗基因技术, 目前不仅广泛应用于生理学、病理学、药理学等学科的基础研究, 而且已成为药物发展的新兴策略。在反义核酸技术基础上发展起来的反基因技术, 即三螺旋构象寡核苷酸技术(TFO)是目前研究的热点, 目前亟待解决的问题一是没有一种满意的肝靶向性核酸药物载体, 另外就是缺乏特异性抗病毒药物。

■创新盘点

锁核酸(LNA)是一种新兴环状核苷酸衍生物,具有分子杂交能力强、抗核酸酶降解能力等特性,本实验基于前期研究基础上,在脱氧核酶分子的双臂上各引入2个LNA分子,从而增加了LNAzyme与底物RNA的杂交亲和力,同时,增强了切割反应的酶促活力。

表 1 各组核酶对HepG2.9706细胞HCV RNA表达的影响 (mean \pm SD, $\times 10^5$ copies/mL, $n = 6$)

分组	用药前	用药后			
		1 d	3 d	5 d	7 d
空白对照	1.57 \pm 0.45	1.52 \pm 0.49	1.55 \pm 0.51	1.60 \pm 0.48	1.56 \pm 0.47
脂质体对照	1.62 \pm 0.43	1.58 \pm 0.44	1.61 \pm 0.47	1.55 \pm 0.45	1.60 \pm 0.42
无关DNAzyme对照	1.54 \pm 0.46	1.57 \pm 0.41	1.60 \pm 0.45	1.58 \pm 0.44	1.53 \pm 0.48
裸DNAzyme对照	1.61 \pm 0.42	1.56 \pm 0.44	1.54 \pm 0.46	1.51 \pm 0.42	1.52 \pm 0.45
lipo-DNAzyme	1.65 \pm 0.48 ^a	1.25 \pm 0.42 ^a	1.11 \pm 0.45 ^a	0.91 \pm 0.43 ^a	0.71 \pm 0.46 ^a
lipo-S-DNAzyme	1.62 \pm 0.44 ^{ac}	1.08 \pm 0.43 ^{ac}	0.93 \pm 0.48 ^{ac}	0.81 \pm 0.45 ^{ac}	0.63 \pm 0.41 ^{ac}
lipo-LNAzyme	1.66 \pm 0.47 ^{acbe}	0.96 \pm 0.39 ^{acbe}	0.73 \pm 0.46 ^{acbe}	0.64 \pm 0.42 ^{acbe}	0.35 \pm 0.44 ^{acbe}

^a $P < 0.05$ vs 各对照组; ^c $P < 0.05$ vs lipo-DNAzyme组; ^e $P < 0.05$ vs lipo-S-DNAzyme组。

形成稳定的脂质体-LNAzyme混合物。

1.2.3 实验分组与脂质体转染: 本实验设对照组和实验组。对照组包括空白对照组、脂质体对照组、无关DNAzyme对照组、裸DNAzyme对照组。实验组包括脂质体-DNAzyme组(lipo-DNAzyme)、脂质体-硫代修饰DNAzyme组(lipo-S-DNAzyme)、脂质体-LNAzyme组(lipo-LNAzyme)。将HepG2.9706细胞按 1×10^5 细胞/mL接种于96孔培养板, 每孔100 μ L, 共设定7个组, 每组各设6个复孔, 待细胞贴壁后吸取培养上清液(-20 $^{\circ}$ C保存), 分别在每组每孔中一次性加入含LNAzyme或DNAzyme量为10 μ mol/L的DMEM混合液1 mL, 分别于1、3、5、7 d收集各孔培养上清液500 μ L, 保存于-20 $^{\circ}$ C待测。

1.2.4 培养上清液HCV RNA含量检测: 采用荧光定量PCR法。具体操作如下: (1)RNA提取: 取培养上清液100 μ L, 直接加TRIzol试剂1 mL, 轻摇, 室温静置5 min; 加氯仿0.2 mL, 振荡15 s, 室温静置3 min, 4 $^{\circ}$ C, 12 000 r/min离心15 min; 取上清液, 加0.5 mL异丙醇, 室温静置10 min, 4 $^{\circ}$ C, 12 000 r/min离心15 min; 弃上清液, 加入75%焦碳酸二乙酯乙醇溶液1 mL, 4 $^{\circ}$ C, 7 500 r/min离心15 min; 弃上清液, 室温干燥5 min, 溶于焦碳酸二乙酯无菌水中。(2)逆转录: 逆转录液24.5 μ L和逆转录酶0.5 μ L, 轻混匀, 离心5 s, 37 $^{\circ}$ C保温60 min; 95 $^{\circ}$ C变性5 min, 离心5 s, 冰上保存备用。(3)PCR扩增: 反应体系为逆转录产物2.5 μ L, PCR反应液22.3 μ L, Taq酶0.2 μ L; 反应条件为37 $^{\circ}$ C 3 min, 92 $^{\circ}$ C 1 min, 60 $^{\circ}$ C 30 s, 40个循环。由计算机软件自动分析所收集的荧光信号并计算出定量结果, 采用计算对数平均值的方法计算cDNA平均拷贝数。

1.2.5 培养细胞内荧光强度检测: 分别于基因转

染后1、3、5、7 d终止培养, 将培养板平衡至室温, 向每孔中加入经室温平衡后的荧光素酶发光试剂100 μ L, 轻轻摇匀2 min以使细胞完全裂解, 立即应用多标记检测仪的荧光测定功能检测1 s发光强度, 输出值以CPS表示。

1.2.6 LNAzyme对细胞的毒性检测: 采用MTT比色法检测LNAzyme对细胞代谢活性的影响。

统计学处理 所有数据均采用mean \pm SD表示, 应用SPSS13.0统计软件处理, 组间比较采用重复测量设计方差分析的LSD检验, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。抑制率(%) = (用药前N-用药后N)/用药前N $\times 100\%$ 或(对照组N-实验组N)/对照组N $\times 100\%$ 。参照文献[13]: 抑制率 $< 15.0\%$ 为无效; 15.0%-30.0%为轻度有效; 30.0%-50.0%为中度有效; $> 50\%$ 为显著有效。

2 结果

2.1 LNAzyme对HCV RNA表达的影响 加入核酶药物后, 各实验组对HCV RNA的表达均显示出较强的抑制作用(均 $P < 0.05$), lipo-DNAzyme、lipo-S-DNAzyme和lipo-LNAzyme的平均抑制率分别为28.10%、35.25%和44.58%。与用药前比较, HCV RNA的表达量也下降较明显, 用药后1、3、5、7 d的平均下降率分别为15.53%、19.52%、23.69%和29.91%(表1)。

2.2 LNAzyme对培养细胞荧光素酶基因表达的影响 加入核酶药物后, 各实验组对细胞荧光素酶基因的表达均显示出较强的抑制作用(均 $P < 0.05$), lipo-DNAzyme、lipo-S-DNAzyme和lipo-LNAzyme的平均抑制率分别为31.18%、40.69%和52.33%(表2)。

2.3 LNAzyme对细胞的毒性 用药7 d后, 采用MTT比色法测定各组A值, lipo-DNAzyme、lipo-

表 2 药物作用后各组核酶对HepG2.9706细胞荧光素酶基因表达的影响 (mean \pm SD, CPS, $n = 6$)

分组	1 d	3 d	5 d	7 d
空白对照	4 971 \pm 297	4 958 \pm 290	4 966 \pm 281	4 973 \pm 279
脂质体对照	4 896 \pm 291	4 905 \pm 285	4 897 \pm 275	4 912 \pm 287
无关DNAzyme对照	4 925 \pm 289	4 898 \pm 279	4 901 \pm 281	4 891 \pm 278
裸DNAzyme对照	4 776 \pm 261	4 539 \pm 248	4 431 \pm 271	4 273 \pm 267
lipo-DNAzyme	4 272 \pm 241 ^a	3 568 \pm 257 ^a	3 022 \pm 269 ^a	2 405 \pm 244 ^a
lipo-S-DNAzyme	3 701 \pm 232 ^{ac}	3 042 \pm 265 ^{ac}	2 437 \pm 246 ^{ac}	2 254 \pm 258 ^{ac}
lipo-LNAzyme	3 458 \pm 151 ^{ac}	2 651 \pm 156 ^{ac}	2 054 \pm 178 ^{ac}	1 027 \pm 162 ^{ac}

^a $P < 0.05$ vs 各对照组; ^c $P < 0.05$ vs lipo-DNAzyme组; ^a $P < 0.05$ vs lipo-S-DNAzyme组。

S-DNAzyme和lipo-LNAzyme组的 A 值分别为 1.16 ± 0.04 、 1.16 ± 0.04 和 1.14 ± 0.04 , 与空白对照组的 1.20 ± 0.04 比较均无差异, 表明LNAzyme脂质体混合物对细胞代谢无影响。

3 讨论

反义技术是近年来基因治疗研究的热点之一, 有望成为分子水平治疗各种疾病新的突破口。DNAzyme是继核酶(Ribozyme)之后人们对酶认识的又一次重大飞跃。与核酶相比, DNAzyme具有抗降解性强、结构简单、催化效率高等优点。对底物的切割作用方面, DNAzyme比核酶有更显著的位点专一性和序列特异性。LNAzyme是DNAzyme的一种衍生物, 是一种经过锁核酸(locked nucleic acid, LNA)修饰的DNAzyme, 即在DNAzyme的两条结合臂上嵌入一个或多个LNA单体。由于LNA具有其他寡核苷酸无可比拟的优势, LNA的引入大大增强了DNAzyme与底物的杂交亲和力, 增强了切割反应的酶促活力, 也增强了DNAzyme的抗核酸酶降解能力, 因此, LNAzyme的出现使以寡核苷酸为基础的反义核酸治疗又上了一个新台阶。

HepG2.9706细胞是将一种转基因细胞, 是将pHCV-Luc所含HCV-5'NCR-C RNA基因与luc的融合基因片段克隆于含neo基因(G418抗性基因)的pCl-neo载体上, 获得了既能在真核细胞内表达荧光素酶活性, 又具有G418抗性的质粒pHCV-neo^[14]。HepG2.9706细胞的主要特点是检测简单省时, 通过检测荧光素酶基因表达活性和(或)HCV RNA表达活性, 即可初步了解HCV 5'-NCR RNA基因起始区受封闭的程度。

本研究结果显示, 针对HCV保守区域5'-NCR IRES位点设计合成寡聚DNAzyme, 并以阳离子脂质体为载药体系, 在HepG2.9706细

胞内均能有效抑制HCV RNA的表达(均 $P < 0.05$), 其中, LNAzyme的抑制作用最强, 平均抑制率可达44.58%, 而且, 随用药时间延长, 抑制率呈增高趋势, 用药7 d后, 平均抑制率达29.91%。荧光素酶基因表达抑制试验结果也显示, LNAzyme对荧光素酶基因表达的抑制作用也较其他DNAzyme强($P < 0.05$), 平均抑制率可达52.33%。此外, MTT比色结果表明, LNAzyme脂质体混合物对细胞代谢基本无影响($P > 0.05$)。

虽然本研究结果显示LNAzyme对HCV RNA和荧光素酶基因的表达均有较高的抑制率(与其他核酶比较, 均 $P < 0.05$), 但从理论上讲, 此抑制率仍不够理想, 这可能与多方面因素有关, 特别是底物的二级结构和更高级结构及LNAzyme本身的二级结构。这些二级结构可掩盖一些酶切位点, 甚至不同程度地影响到酶的活性。关于这些影响因素, 还有待于进一步研究。尽管如此, LNAzyme仍有望成为感染性疾病、恶性肿瘤等疾病基因治疗的新型反义核酸药物。

4 参考文献

- 1 Suriawinata A, Thung SN. Hepatitis C virus and malignancy. *Hepatol Res* 2007; 37: 397-401
- 2 Machwe A, Lozada EM, Xiao L, Orren DK. Competition between the DNA unwinding and strand pairing activities of the Werner and Bloom syndrome proteins. *BMC Mol Biol* 2006; 7: 1
- 3 Braasch DA, Corey DR. Locked nucleic acid (LNA): fine-tuning the recognition of DNA and RNA. *Chem Biol* 2001; 8: 1-7
- 4 Wengel J, Petersen M, Frieden M, Koch T. Chemistry of locked nucleic acids (LNA): Design, synthesis, and bio-physical properties. *Lett Pept Sci* 2003; 10: 237-253
- 5 Inohara H, Obika S, Imanishi T. 2',4'-BNA derivatives bearing an unnatural nucleobase: synthesis and application to triplex-forming oligonucleotides. *Nucleic Acids Symp Ser (Oxf)* 2004: 63-64
- 6 Braasch DA, Liu Y, Corey DR. Antisense inhibition of gene expression in cells by oligonucleotides incorporating locked nucleic acids: effect of mRNA target sequence and chimera design. *Nucleic Acids*

■同行评价

本文选题新颖, 设计合理, 结果可靠, 有较好的学术价值。

- Res 2002; 30: 5160-5167
- 7 Rapozzi V, Cogoi S, Xodo LE. Antisense locked nucleic acids efficiently suppress BCR/ABL and induce cell growth decline and apoptosis in leukemic cells. *Mol Cancer Ther* 2006; 5: 1683-1692
- 8 Swayze EE, Siwkowski AM, Wancewicz EV, Migawa MT, Wyrzykiewicz TK, Hung G, Monia BP, Bennett CF. Antisense oligonucleotides containing locked nucleic acid improve potency but cause significant hepatotoxicity in animals. *Nucleic Acids Res* 2007; 35: 687-700
- 9 Elmén J, Thonberg H, Ljungberg K, Frieden M, Westergaard M, Xu Y, Wahren B, Liang Z, Ørum H, Koch T, Wahlestedt C. Locked nucleic acid (LNA) mediated improvements in siRNA stability and functionality. *Nucleic Acids Res* 2005; 33: 439-447
- 10 Castoldi M, Schmidt S, Benes V, Noerholm M, Kulozik AE, Hentze MW, Muckenthaler MU. A sensitive array for microRNA expression profiling (miChip) based on locked nucleic acids (LNA). *RNA* 2006; 12: 913-920
- 11 邓益斌, 农乐根, 王燕菲. HBV S基因的反义锁核酸对乙型肝炎转基因小鼠HBV复制和表达的影响. *世界华人消化杂志* 2009; 17: 2338-2445
- 12 邓益斌, 农乐根, 黄伟, 王燕菲. 乙型肝炎病毒S/C基因位点反义锁核酸在小鼠体内抗病毒疗效研究. *中华肝脏病杂志* 2009; 17: 900-904
- 13 Lim YS, Suh DJ. Current antiviral therapy for chronic hepatitis B. *J Korean Med Sci* 2004; 19: 489-494
- 14 王小红, 王升启, 管伟, 毛秉智. 丙型肝炎病毒5'NCR转基因细胞模型及在反义核酸药物筛选和评价中的应用. *自然科学进展* 2001; 11: 434-439

编辑 曹丽鸥 电编 何基才

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2010年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

《世界华人消化杂志》性质、刊登内容及目标

本刊讯 《世界华人消化杂志(国际标准刊号ISSN 1009-3079, 国内统一刊号CN 14-1260/R, Shijie Huaren Xiaohua Zazhi/World Chinese Journal of Digestology)》, 是一本由来自国内23个省、市、自治区、特别行政区的496位胃肠病学和肝病学专家支持的开放存取的同行评议的旬刊杂志, 旨在推广国内各地的胃肠病学和肝病领域临床实践和基础研究相结合的最具有临床意义的原创性及各类评论性的文章, 使其成为一种公众资源, 同时科学家、医生、患者和学生可以通过这样一个不受限制的平台来免费获取全文, 了解其领域的所有的关键的进展, 更重要的是这些进展会为本领域的医务工作者和研究者服务, 为他们的患者及基础研究提供进一步的帮助。

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

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

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

色素放大内镜诊断癌前病变和早期胃癌196例

庄丽维, 王立国, 付宜利

庄丽维, 哈尔滨工业大学机电学院, 哈尔滨医科大学附属第四医院消化内科 黑龙江省哈尔滨市150001
王立国, 哈尔滨医科大学附属第四医院消化内科 黑龙江省哈尔滨市150001

付宜利, 哈尔滨工业大学机电学院 黑龙江省哈尔滨市 150001
作者贡献分布: 此课题由庄丽维与付宜利共同设计, 庄丽维负责操作完成病例搜集, 并分析数据; 本文撰写由王立国完成。

通讯作者: 付宜利, 教授, 150001, 黑龙江省哈尔滨市南岗区西大直街92号, 哈尔滨工业大学机电学院. meylfu@hit.edu.cn

收稿日期: 2010-03-28 修回日期: 2010-05-26

接受日期: 2010-06-02 在线出版日期: 2010-07-18

Magnification chromoendoscopy for the diagnosis of gastric precancerous lesions and early gastric cancer: an analysis of 196 cases

Li-Wei Zhuang, Li-Guo Wang, Yi-Li Fu

Li-Wei Zhuang, School of Mechatronics Engineering, Harbin Institute of Technology; Department of Gastroenterology, the Fourth Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150001, Heilongjiang Province, China

Li-Guo Wang, Department of Gastroenterology, the Fourth Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150001, Heilongjiang Province, China

Yi-Li Fu, School of Mechatronics Engineering, Harbin Institute of Technology, Harbin 150001, Heilongjiang Province, China

Correspondence to: Professor Yi-Li Fu, School of Mechatronics Engineering, Harbin Institute of Technology, 92 Xidazhi Street, Nangang District, Harbin 150001, Heilongjiang Province, China. meylfu@hit.edu.cn

Received: 2010-03-28 Revised: 2010-05-26

Accepted: 2010-06-02 Published online: 2010-07-18

Abstract

AIM: To evaluate the feasibility and accuracy of magnification chromoendoscopy in the diagnosis of gastric atrophy, intestinal metaplasia (IM), atypical hyperplasia and early gastric cancer.

METHODS: One hundred and ninety-six patients were examined by magnification chromoendoscopy to observe the changes in gastric pits and microvessels. The classification criteria were then developed for the diagnosis of precancerous lesions and early gastric cancer. Histopathological examination of gastric mucosal specimens from these patients was also performed.

RESULTS: Of the 196 patients, 46 were diagnosed with superficial gastritis, 76 with gastric atrophy, 37 with atrophy and IM, 36 with atrophy and dysplasia, and 1 with early gastric cancer. The diagnostic coincidence rates between magnification chromoendoscopy and pathological examination for gastric atrophy, atrophy with IM, and atrophy with dysplasia were 84.2%, 81.1% and 72.2%, respectively. The total detection rate of precancerous lesions by magnification chromoendoscopy was 80.5%.

CONCLUSION: Magnification chromoendoscopy has a high diagnostic value for gastric precancerous lesions and early gastric cancer.

Key Words: Magnification chromoendoscopy; Pit pattern; Microvessel; Precancerous lesion; Early gastric cancer

Zhuang LW, Wang LG, Fu YL. Magnification chromoendoscopy for the diagnosis of gastric precancerous lesions and early gastric cancer: an analysis of 196 cases. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(20): 2141-2145

摘要

目的: 确定胃黏膜萎缩、肠上皮化生(intestinal metaplasia, IM)、异型增生及早期胃癌的放大内镜下形态学特征, 探讨色素放大内镜对上述病变诊断的可行性和准确性。

方法: 应用日本FUJINON EG-590ZW型放大内镜对196例患者进行检查及0.3%靛胭脂染色, 观察胃小凹及微血管的改变, 总结放大内镜对癌前病变和早期胃癌的诊断分型, 与相应部位活检所获得的196个病变组织的病理组织学检查结果进行比较分析。

结果: 196例患者, 经病理证实, 浅表性胃炎46例, 胃黏膜萎缩76例, 萎缩伴IM 37例, 萎缩伴异型增生36例, 早期胃癌1例; 放大内镜与病理检查对胃黏膜萎缩、萎缩伴IM、萎缩伴异型增生诊断符合率分别为84.2%, 81.1%, 72.2%。对癌前病变的总检出率放大内镜为80.5%。

结论: 放大内镜对癌前病变和早期胃癌有较

■背景资料

胃黏膜萎缩、肠上皮化生、异型增生是重要的癌前病变, 不经阻断可发展为早期胃癌。早期胃癌术后10年存活率90%以上, 如何发现癌前病变和早期胃癌, 是近年来消化领域研究的热点问题。色素放大内镜作为一种新型诊断用内镜, 可清晰地发现胃黏膜微细结构胃小凹及微小血管等形态的改变, 提高了癌前病变及早期胃癌的镜下检出率。

■同行评议者

刘改芳, 主任医师, 河北医科大学第三医院消化内科

■ 研发前沿

目前国内外对于放大内镜下胃黏膜微细结构的研究较多,但关于胃小凹及微血管的分型还没有形成统一的标准,而关于癌前病变和早期胃癌的放大内镜下特征也没有形成共识意见,尤其是微血管的改变对早期胃癌的诊断,有待于进一步去研究。

高的诊断价值。

关键词: 色素放大内镜; 小凹形态; 微血管; 癌前病变; 早期胃癌

庄丽维, 王立国, 付宜利. 色素放大内镜诊断癌前病变和早期胃癌196例. 世界华人消化杂志 2010; 18(20): 2141-2145

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/2141.asp>

0 引言

胃黏膜萎缩伴肠上皮化生(intestinal metaplasia, IM)和异型增生被认为胃癌的癌前病变,中重度异型增生逐步被纳入内镜下治疗的适应证。近年来,随着电子放大内镜的出现及不断完善和发展,可以更为清晰地发现胃黏膜表面的微细结构胃小凹及微小血管等形态的改变,结合黏膜染色,提高了癌前病变及早期胃癌的镜下检出率。本研究利用放大内镜结合黏膜染色观察196例胃病患者胃黏膜胃小凹及微血管形态的改变,并结合病理,总结不同病变时胃黏膜微细结构形态学变化特点,探讨放大内镜对癌前病变和早期胃癌的诊断价值。

1 材料和方法

1.1 材料 2008-12/2009-06哈尔滨医科大学附属第四医院门诊及住院患者518例进行放大内镜检查,选取196例普通内镜下表现为黏膜充血、糜烂、萎缩、粗糙、隆起或凹陷等改变的患者进行病变区域放大内镜观察,必要时黏膜染色。

1.2 方法

1.2.1 操作: 应用日本FUJINON EG-590ZW变焦放大胃镜,最大可变焦135倍,由同一位资深内镜专家操作,先行常规检查,发现可疑病变放大观察,必要时靛胭脂黏膜染色,留取标本送病理。

1.2.2 诊断标准: 胃小凹的分型参考Sakaki等^[1]的分型方法,分为五型,A型:圆点状;B型:短小棒状;C型:树枝状或条纹状;D型:斑片状或网格状;E型:绒毛状。依据Nakayoshi等^[2]和刘变英等^[3]关于微血管的分型我们将其分为4型,I型:未见黏膜微血管;II型:海星状;III型:细网状或螺旋状;IV型:不规则或粗大新生血管。

2 结果

2.1 胃黏膜微细结构及其与组织病理学关系 196例患者,经病理证实,浅表性胃炎46例,胃黏膜萎缩76例,萎缩伴IM37例,萎缩伴异型增生36例,早期胃癌1例;放大内镜下胃小凹A型0例,B



图1 胃黏膜萎缩呈C型胃小凹稀疏、粗大发白,白区增多可见条带状小凹消失区。

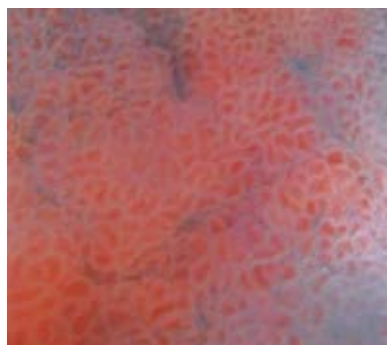


图2 肠上皮化生小凹呈网格状、绒毛样外观,靛胭脂染色后更明显。

型44例,C型52例,D型32例,E型68例(表1);微血管形态我们的观察中I型120例,II型75例,IV型1例。放大内镜与病理检查对胃黏膜萎缩、萎缩伴IM、萎缩伴异型增生诊断符合率分别为84.2%, 81.1%, 72.2%。对癌前病变的总检出率放大内镜为80.5%(表2)。

2.2 癌前病变和早期胃癌的放大内镜下特征 色素放大内镜下萎缩性胃炎主要表现为C型胃小凹,呈枝条状,小凹延长,迂曲,稀疏,粗大,可见白区增多,白区内小凹结构紊乱数量减少,甚至消失,微血管不可见(图1);IM表现为D、E型小凹,呈斑片状、绒毛状外观,指头样突起,靛胭脂染色后绒毛样外观更为明显(图2);异型增生表现为D、E型小凹,绒毛样外观指头样突起最具特征,可伴有小凹开口模糊不清,大小不一,形状不规则,结构紊乱,重度异型增生,可见紊乱的微血管(图3);早期胃癌多为E型胃小凹,绒毛样外观,小凹开口模糊不清,变小,形状不规则,排列紊乱,周边可见新生粗大的微血管,排列紊乱(图4)。

3 讨论

正常胃黏膜的微细结构包括胃小凹和微血管,关于胃小凹和微血管的分型方法很多,目前还没有统一的标准,目前胃小凹得到较多承认的是Sakaki等^[1]的四型分类方法,本研究参考文献报道及结合我们的观察将胃小凹分为五型,A型:

表 1 不同胃黏膜小凹形态和组织病理学关系

小凹类型	癌前病变						合计
	慢性浅表性胃炎	胃黏膜萎缩	萎缩伴IM	萎缩伴轻中度异型增生	萎缩伴重度异型增生	早期胃癌	
A型	0	0	0	0	0	0	0
B型	40	2	2	0	0	0	44
C型	4	38	6	2	2	0	52
D型	2	20	6	4	0	0	32
E型	0	16	23	22	6	1	68

IM: 肠上皮化生.

表 2 放大内镜与病理诊断符合情况

诊断方法	癌前病变					
	慢性浅表性胃炎	胃黏膜萎缩	萎缩伴IM	萎缩伴轻中度异型增生	萎缩伴重度异型增生	早期胃癌
放大内镜	46	64	30	20	6	1
病理诊断	46	76	37	28	8	1

IM: 肠上皮化生.

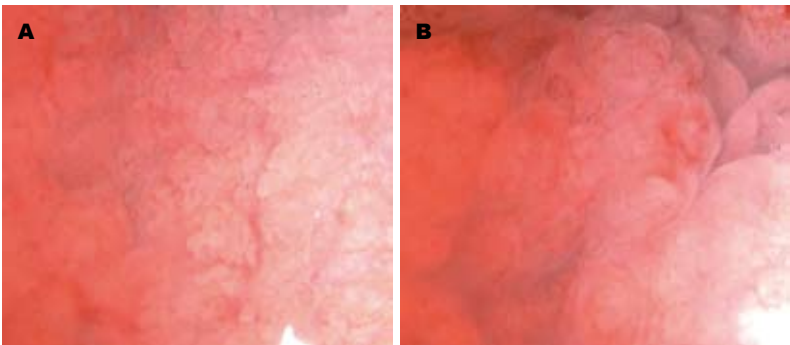


图 3 异型增生小凹特点. A: 小凹模糊不清, 绒毛样外观, 指头样突起; B: 小凹模糊不清, 可见散在微血管, 排列紊乱.

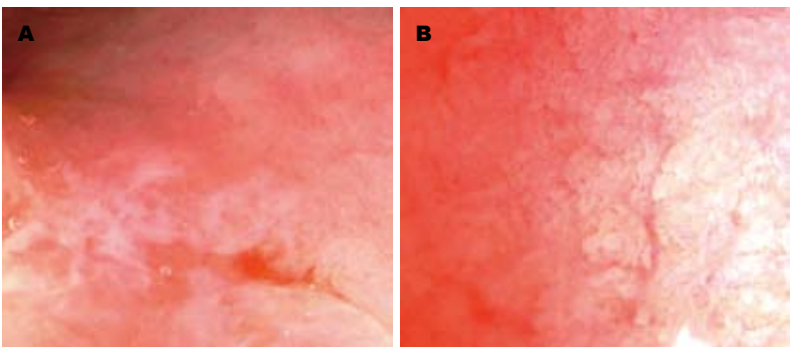


图 4 早期胃癌放大内镜下特点. A: 普通内镜下胃窦大弯胃角对侧 0.8 cm 浅凹陷, 不规则; B: 高倍放大可见胃小凹绒毛样外观, 开口模糊不清, 周围可见新生的排列紊乱的毛细血管.

圆点状; B型: 短小棒状; C型: 枝条样; D型: 斑片状或网格状; E型: 绒毛状小凹、指头样突起. 在观察的196个部位中A型0例, B型44例, C型52例, D型32例, E型68例. 我们认为A型胃小凹主要出现在正常或慢性浅表性胃炎患者胃黏膜中, 而B型胃小凹主要出现在胃窦黏膜, A、B两型为正常胃黏膜的小凹形态, 在本组病例中A、B两型40(46)例, 病理结果也证实了这一点. 而C、D、

E型则为病变处胃黏膜小凹形态, 当胃黏膜出现炎症、水肿、萎缩、肠化等病变时, 由于小凹及表面上皮增生化生使小凹扩大延长迂曲及相互连接, 从而从原来的A、B型逐渐演变为C、D、E型. 而关于微血管的分型Nakayoshi等^[2]将其分为4型, I型: 未见黏膜微血管; II型: 海星状; III型: 细网状或螺旋状; IV型: 不规则或粗大新生血管. 我们的观察发现: I型120例, 多见于

■相关报道
Sakaki等将胃小凹分为四型: 点状, 短小棒状, 树枝、条纹状, 斑片状或网格状. 并认为胃腺的分布决定了不同部位小凹的形态特点. Nakayoshi等将微血管分为4型, I型: 未见黏膜微血管; II型: 海星状; III型: 细网状或螺旋状; IV型: 不规则或粗大新生血管. Niwa等认为小凹变小、形态不一、呈不规则树枝状以及出现形态不规则的肿瘤血管为早期胃癌的特征.

■创新盘点

本文在前人研究基础上,结合作者的观察和体会,描述了色素放大内镜下胃小凹和微血管的形态学改变,以及癌前病变和早期胃癌的放大内镜下形态学特征,尤其是微血管的改变对诊断上述病变的重要价值,并证明靛胭脂是较好的胃肠道黏膜染色剂。

幽门螺杆菌阳性患者;II型,75例,多见于正常胃黏膜及良性病变患者;IV型,1例,见于早期胃癌组织。正常胃黏膜的微血管在高倍放大内镜下表现为细网状或螺旋状,而在早期胃癌组织中,由于其血供特别丰富,可以观察到新生的、粗大的、排列紊乱的微血管,放大内镜下微血管形态的观察对早期胃癌的诊断意义特别重大。由于我们对早期胃癌的观察例数不够,对微血管形态的认识不够深刻,有待于进一步的加大样本研究。

胃黏膜萎缩,IM及异型增生是重要的癌前病变,不经阻断可发展为早期胃癌,因此早期发现这些癌前病变显得很重要。

胃黏膜萎缩早期普通内镜很难发现,我们通过放大内镜观察到萎缩主要表现为胃小凹稀疏、粗大、增宽、减少甚至消失,我们总结C型小凹为胃黏膜萎缩的特征性改变,经统计放大内镜同病理诊断的符合率为84.2%,放大内镜对胃黏膜萎缩的诊断明显优于普通内镜。当胃黏膜萎缩时,微血管不可见。国内有学者研究^[4,5]认为IM的放大内镜下表现为绒毛状、斑片状和粗条纹状,其中绒毛状最具特征,亚甲蓝着色,表现为指头样突起,类似肠绒毛。而我们的研究也证实了色素放大内镜下IM小凹主要呈D、E两型,经统计放大内镜对IM诊断的病理符合率分别为81.1%,放大内镜诊断肠化的准确率明显高于普通内镜。而且我们还发现经靛胭脂染色后绒毛样小凹的立体感仍然很强烈。靛胭脂染料为一种对比染色剂,不被胃黏膜吸收,非常安全。目前多数研究^[6]认为肠型化生与胃癌的发生有较高的相关性,肠化亚型对预测胃癌发生危险性价值有限,更强调重视肠化范围,范围越广,发生胃癌的危险性越高。因此认识IM的黏膜形态特点及确定肠化范围对发现癌前病变和早期胃癌都很有价值。胃黏膜的异型增生是重要的胃癌前病变,具有较高的癌变倾向,萎缩严重的黏膜多伴有肠化或异型增生,这两种病变的小凹特点一直是国内外研究的重点和热点。普通内镜下观察,异型增生可表现为隆起、平坦或凹陷性病变,通常边界清晰。国外Dinis-Ribeiro等^[7]报道了异型增生的胃黏膜在放大内镜下可见细微结构消失,小凹形态不清。国内有些学者^[8]认为异型增生多伴有肠化的存在,因此放大内镜下观察具有肠化小凹的特点,如斑片状、网格状和绒毛样小凹,但也有其自身的特点,尤其是中重度异型增生。而黄永辉等^[9,10]的研究表

明放大内镜诊断异型增生的敏感性、特异性和准确性分别为91.52%、94.41%和94.01%,达到了很高的标准。我们的研究表明异型增生主要表现为最具特征的E型绒毛样胃小凹,小凹大小不一、形状不规则、排列紊乱、有些腺管开口的小凹模糊不清,隐约可见微血管模糊不清、排列不规则、结构紊乱。病变组织同周围组织边界清晰,周边多伴重度萎缩或IM表现,呈C、D型小凹。我们认为异型增生是胃黏膜重度萎缩、肠化向早期胃癌过度的重要阶段,具有萎缩、肠化和早期胃癌的特征。本研究病理共诊断了36例萎缩伴异型增生,其中萎缩伴轻中度异型增生28例,萎缩伴重度异型增生8例,放大内镜诊断了26例,放大内镜同病理诊断的符合率为72.2%。放大内镜对癌前病变的检出率达80.5%。

色素放大内镜诊断早期胃癌国内外研究较多,大多数学者^[11-13]认为早期胃癌的放大内镜下表现为小凹大小不一、形状不规则、排列紊乱,斑片状、绒毛样外观,局部有集合静脉和真毛细血管网的消失以及有大小、形状、分布不规则的肿瘤血管出现,尤其是新生肿瘤血管的出现被认为是具有特征性的表现。袁海峰等^[14]认为绒毛状小凹和小凹结构模糊不清、消失或伴异常增生毛细血管形成提示着IM及异型增生癌前病变甚至早期胃癌的出现。本研究检出早期胃癌1例,普通内镜下表现不规则岛状发红区域,平坦型,周边组织可见结节样增生,经放大内镜结合染色后观察发现胃小凹呈绒毛样外观,腺管开口处小凹大小不等、形状不规则、排列较紊乱,与周边组织分界清晰,可见D、E型小凹,开口模糊不清,考虑为IM和异型增生。病变组织周围观察到集合静脉和真毛细血管网消失,出现了新生的粗大紊乱微血管,后经病理证实为胃早期腺癌。由于本研究病例数较少,对早期胃癌的特点了解还不够,但我们认为,胃小凹的多形性及排列紊乱、开口模糊以及集合静脉和真毛细血管消失,代之周边新生粗大微血管的出现为早期胃癌比较有特征性的表现。

总之,放大内镜诊断胃黏膜微小病变是消化内镜领域的一个全新课题,我们的研究也表明他对胃黏膜萎缩、IM、异型增生与早期胃癌均有很大诊断价值。靛胭脂这种黏膜对比染色剂因其方便、实用、清晰、无不良反应,在胃部疾病的研究中有很大的应用价值。但我们应该看到,由于没有统一的胃小凹和微血管的分

型方法以及诊断疾病的标准指南, 很多问题, 特别是癌前病变和早期胃癌的放大内镜下形态特点, 尤其是微血管的形态特点, 均有待于进一步深入研究。

4 参考文献

- 1 Sakaki N, Iida Y, Okazaki Y, Kawamura S, Takemoto T. Magnifying endoscopic observation of the gastric mucosa, particularly in patients with atrophic gastritis. *Endoscopy* 1978; 10: 269-274
- 2 Nakayoshi T, Tajiri H, Matsuda K, Kaise M, Ikegami M, Sasaki H. Magnifying endoscopy combined with narrow band imaging system for early gastric cancer: correlation of vascular pattern with histopathology (including video). *Endoscopy* 2004; 36: 1080-1084
- 3 刘变英, 王颖, 雷宇峰, 李小会, 范东俊, 杨嫦娥, 李改英. 放大胃镜下微血管改变对早期胃癌的诊断价值. *临床医药实践* 2008; 17: 669-670
- 4 陈磊, 杨建民, 李向红, 余新, 房殿春. 放大内镜下胃病患者胃黏膜微细结构改变及其临床病理意义. *中华消化内镜杂志* 2003; 23: 83-87
- 5 陈磊, 房殿春, 李向红, 彭贵勇, 杨仕明, 郭德玉. 放大色素内镜诊断早期胃癌及其癌前病变. *解放军医学杂志* 2005; 30: 807-809
- 6 王邦茂, 赵晓志. 不同亚型胃黏膜肠化生组织在美蓝放大内镜下的黏膜微细结构特点. *中国消化内镜杂志* 2008; 2: 31-35
- 7 Dinis-Ribeiro M, da Costa-Pereira A, Lopes C, Lara-Santos L, Guilherme M, Moreira-Dias L, Lomba-Viana H, Ribeiro A, Santos C, Soares J, Mesquita N, Silva R, Lomba-Viana R. Magnification chromoendoscopy for the diagnosis of gastric intestinal metaplasia and dysplasia. *Gastrointest Endosc* 2003; 57: 498-504
- 8 范玉林, 杨建民, 刘海峰, 郭德玉, 李向红, 顾莎. 放大内镜对萎缩性胃炎诊断价值的前瞻性研究. *中国内镜杂志* 2004; 10: 40-44
- 9 黄永辉, 周丽雅, 林三仁, 金珠, 刘建军, 丁士刚, 夏志伟, 段丽萍, 常红. 放大内镜下胃小凹形态学分类及其临床病理意义. *中国内镜杂志* 2004; 10: 14-16, 19
- 10 黄永辉, 周丽雅, 林三仁, 金珠, 刘建军, 丁士刚, 夏志伟, 段丽萍, 常红. 胃黏膜萎缩、肠上皮化生及异型增生的放大内镜表现及诊断价值. *中华消化内镜杂志* 2005; 22: 231-235
- 11 Yao K, Oishi T, Matsui T, Yao T, Iwashita A. Novel magnified endoscopic findings of microvascular architecture in intramucosal gastric cancer. *Gastrointest Endosc* 2002; 56: 279-284
- 12 Otsuka Y, Niwa Y, Ohmiya N, Ando N, Ohashi A, Hirooka Y, Goto H. Usefulness of magnifying endoscopy in the diagnosis of early gastric cancer. *Endoscopy* 2004; 36: 165-169
- 13 Yagi K, Aruga Y, Nakamura A, Sekine A, Umezu H. The study of dynamic chemical magnifying endoscopy in gastric neoplasia. *Gastrointest Endosc* 2005; 62: 963-969
- 14 袁海峰, 唐少波, 黄适, 奚锦要. 放大色素内镜在胃黏膜癌前病变诊断中的价值. *世界华人消化杂志* 2008; 16: 2052-2055

■同行评价

本文选题新颖实用, 严谨科学, 资料齐全, 表达清晰, 具有较好的学术价值。

编辑 李军亮 电编 何基才

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2010年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

汤姆森-路透公布 2009 年 *WJG* 影响因子 2.092

本刊讯 根据2010-06-18汤姆森-路透发布的2009年度期刊引证报告, *World Journal of Gastroenterology*(*WJG*)(中文刊名《世界胃肠病学杂志》)影响因子为2.092, 论文总被引次数12 740次, 特征因子0.05832, 分别位于65种国际胃肠肝病学期刊的第33位, 8位和5位。

与2008年的影响因子(2.081), 总被引次数(10 822次), 特征因子(0.05006)相比, *WJG*在2009年国际胃肠肝病学期刊中的排名分别增加了7个百分点, 4个百分点和3个百分点。(WJG编辑部主任: 程剑侠 2010-06-18)

老年早期胃癌临床及内镜诊断124例

刘婧, 张子其, 陈孝, 付永和, 张钰

刘婧, 张子其, 陈孝, 付永和, 张钰, 中国人民解放军总医院南楼消化内镜诊疗科 北京市 100853

作者贡献分布: 此课题由刘婧设计; 研究过程由刘婧、张子其、陈孝、付永和及张钰操作完成; 资料、数据收集、整理分析由刘婧、张子其及陈孝完成; 本论文写作由刘婧完成。

通讯作者: 刘婧, 副主任医师, 100853, 北京市复兴路28号, 中国人民解放军总医院南楼消化内镜诊疗科. liujing7376@sohu.com
电话: 010-66876256 传真: 010-66935470

收稿日期: 2010-03-28 修回日期: 2010-05-27

接受日期: 2010-06-02 在线出版日期: 2010-07-18

Gastrosopic and clinical diagnosis of early gastric cancer in elderly patients: an analysis of 124 cases

Jing Liu, Zi-Qi Zhang, Xiao Chen, Yong-He Fu, Yu Zhang

Jing Liu, Zi-Qi Zhang, Xiao Chen, Yong-He Fu, Yu Zhang, Department of Digestive Endoscopy, Chinese PLA General Hospital, Beijing 100853, China

Correspondence to: Jing Liu, Department of Digestive Endoscopy, Chinese PLA General Hospital, Beijing 100853, China. liujing7376@sohu.com

Received: 2010-03-28 Revised: 2010-05-27

Accepted: 2010-06-02 Published online: 2010-07-18

Abstract

AIM: To investigate the clinicopathologic characteristics of early gastric cancer (EGC) in elderly patients.

METHODS: The clinical data for 124 elderly patients who were endoscopically diagnosed with EGC from May 1985 to December 2009 were retrospectively analyzed.

RESULTS: The mean age of these patients was 72.1 years. Elderly EGC patients usually had non-specific symptoms and physical signs. The tumors, most of which belonged to type IIb and IIc, were mainly located in the gastric sinus. Tumor diameter was usually less than 2 cm. Adenocarcinoma was the most common pathological type. Lymph node metastasis was noted in 3.2% (4/124) of patients.

CONCLUSION: There are usually no typical symptoms in elderly EGC patients. Mass screen-

ing by gastroscopy in combination with pathological examination is the most effective method to find EGC in elderly patients.

Key Words: Early gastric cancer; Endoscopy; Pathology

Liu J, Zhang ZQ, Chen X, Fu YH, Zhang Y. Gastrosopic and clinical diagnosis of early gastric cancer in elderly patients: an analysis of 124 cases. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(20): 2137-2140

摘要

目的: 分析老年人早期胃癌(early gastric cancer, EGC)的临床病理特征。

方法: 回顾分析1985-05/2008-06我科经胃镜诊断明确的老年EGC患者124例的临床及病理资料。

结果: 124例患者中, 平均年龄72.1岁, 症状体征缺乏特异性。EGC主要病灶分布于胃窦, 肉眼分型多为IIb、IIc型, 直径多<2 cm, 病理分型以腺癌为主, 多局限于黏膜层, 淋巴结转移率为3.2%(4/124)。

结论: 老年EGC临床症状不典型, 内镜普查并结合病理分析是发现老年EGC并指导治疗的有效方法。

关键词: 早期胃癌; 内镜; 病理特征

刘婧, 张子其, 陈孝, 付永和, 张钰. 老年早期胃癌临床及内镜诊断124例. *世界华人消化杂志* 2010; 18(20): 2137-2140
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/2137.asp>

0 引言

胃癌是我国主要恶性肿瘤之一, 其死亡率居恶性肿瘤死亡率的首位^[1,2]。要提高胃癌患者的生存率, 关键在于早期诊断, 早期胃癌(early gastric carcinoma, EGC)定义为肿瘤的浸润局限于黏膜或黏膜下层, 不论病灶大小不管有无淋巴结转移。内镜检查是诊断EGC的主要手段。本文对我科确诊的124例老年EGC作回顾性分析, 旨在探

■背景资料

胃癌是我国主要恶性肿瘤之一, 其死亡率居恶性肿瘤死亡率的首位。要提高胃癌患者的生存率, 关键在于早期诊断, 内镜检查是诊断早期胃癌的主要手段。

■同行评议者

傅春彬, 主任医师, 吉化集团公司总医院一院消化内科

■研发前沿

如何坚持老年人群中的胃镜普查随诊,加强对EGC镜下表现的认识和鉴别,进而提高老年人群早期胃癌的检出率是亟待研究的问题。

讨老年人临床、内镜及病理特点,以提高EGC诊断水平。

1 材料和方法

1.1 材料 1985-05/2009-12, 我科胃镜检查共检出55岁以上老年EGC患者124例, 其中男119例, 女5例, 年龄55-91(平均年龄72.1)岁。

1.2 方法 对这124例老年EGC患者的临床表现、内镜所见、病理等结果作一回顾性分析。

2 结果

2.1 临床表现 本组病例有明确症状者仅31例(25%), 其中中上腹痛7例, 烧心反酸1例, 23例主诉上腹部不适感同时伴有腹胀、嗝气、消瘦等非特异性症状。便潜血阳性5例(4.0%), CEA升高待查1例, 85例(68.5%)患者无明显症状, 主要是查体发现。胃息肉切除术后复查2例, 所有病例均无腹部阳性体征。

2.2 病变部位 本组病理EGC的好发部位为胃窦, 其次是胃体。其中贲门21例(16.9%), 胃底5例(4.0%), 胃体26例(20.9%), 胃窦49例(39.5%), 胃角13例(10.5%), 残胃4例(3.2%), 多灶6例(4.8%)。

2.3 内镜下分型 按日本内镜协会早期胃癌的肉眼形态分为3型如下: I型(隆起型), II型(浅表型), 又分为IIa型(浅表隆起型)、IIb型(浅表平坦型)、IIc型(浅表凹陷型), III型(凹陷型), 此外介于两者之间的混合型, 本组大体分型以IIb、IIc型为主, 约占72.6%。其中I型6例(4.8%), IIa型13例(10.5%), IIb型42例(33.9%), IIc型48例(38.7%), IIa+IIc型6例(4.8%), I+IIc型5例(4.0%), III型4例(3.2%)。

2.4 病灶大小 EGC病灶为0.5-5 cm, <0.5 cm为微小胃癌, 0.6-1 cm为小胃癌, 本组以直径<5 mm的微小胃癌最多, 占38.7%(表1)。

2.5 病理类型 根据内镜下活检病理结果124例EGC以腺癌居多, 共69例占 55.6%, 其中重度不典型增生伴灶性癌变48例(38.4%, 表2)。

2.6 浸润深度 侵及黏膜下层22例, 脉管内癌栓6例, 淋巴结转移4例, 9例术后复发(表3)。

3 讨论

胃癌是我国最常见的恶性肿瘤之一, 其发病率通常在10/10万。要提高胃癌患者的生存率关键在于早期诊断及治疗。而EGC仅仅侵犯胃黏膜层或黏膜下层, 浸润范围小, 其临床表现常与胃炎、胃溃疡等症状相似, 多无特异性, 部分患

表 1 EGC病灶大小

肿瘤直径(mm)	n(%)
≤5	48(38.7)
5-10	36(29.0)
11-20	25(20.2)
>20	9(7.3)
多发	6(4.8)

表 2 EGC病理类型

病理类型	n(%)
重度不典型增生伴灶性癌变	50(40.3)
高分化腺癌	38(30.6)
中分化腺癌	14(11.3)
低分化腺癌	12(9.7)
印戒细胞癌	6(4.8)
腺瘤癌变	4(3.2)

表 3 EGC浸润深度与淋巴结转移及病灶大小

早期胃癌 浸润深度	脉管内癌栓	淋巴结转移		早期胃癌直径(mm)			
		有	无	<5	5-10	11-20	>20
黏膜层(102)	1	0	101	47	30	24	1
黏膜下层(22)	5	4	18	1	6	1	14

者缺乏症状, 尤其老年人所占比例更高^[3-6]。我院Zhang等^[7]对3 048例老年人进行直接胃镜临床筛查, EGC检出率可达63.00%(58/92), 并且占无症状胃癌患者的74.14%(43/51)。因此给早期诊断带来很大困难。近年来随着高分辨电子内镜的普及, 色素染色内镜、共聚焦内镜及超声内镜等的应用, EGC的检出率有了明显提高, 日本EGC的检出率已达50.0%左右^[8-10]。而我国EGC的检出率仅为4.0%-10.0%^[11,12]。本文老年人EGC有明确上腹痛、腹胀症状的仅31例(25%), 而无明显不适主诉, 仅因常规查体发现的85例(68.5%), 故对临床上出现上腹痛、腹胀、乏力、食欲不振、吞咽不适等应放宽内镜检查指征, 尤其是老年人, 内镜普查和定期的随诊十分必要^[13-15]。

内镜操作者的经验是正确判断的关键, 我国对EGC的内镜下分型多采用日本分型, 本组病例分型以IIc居多(46.0%)。I型和III型比较容易认识, 但识别II型有一定难度, 而在病变早期, 往往表现为表浅的充血、变色、粗糙、有报道EGC的大体类型与预后关系密切, 而其组织学

■相关报道

Zhang等对3 048例老年人进行直接胃镜临床筛查, 早期胃癌检出率可达63.00%(58/92), 并且占无症状胃癌患者的74.14%(43/51)。

类型与预后无明显关系^[16-18]。故临床上对平坦型病变应特别注意。凹陷型病变较容易发现和咬取活检,而平坦型EGC容易遗漏,这与内镜诊断水平高低、与内镜医师的操作技术、诊断经验有着密切关系^[19,20],EGC好发于胃窦,应仔细观察,对于胃窦、胃角的小片状充血、粗糙、糜烂质脆黏膜等可疑病灶要求做多活点活检,并强调活检取材要点和准确方法,这也是诊断EGC的关键^[21,22]。贲门及胃底处因位置较高,胃镜检查及活检需要一定技术,容易漏诊,应详查。

日本学者认为影响EGC生存率的重要因素是淋巴结转移情况,黏膜下癌淋巴结转移率高,预后相对差^[23,24]。肿瘤直径大、浸润黏膜下层、分化程度差是EGC淋巴结转移的独立危险因素^[25]。本研究结果显示:黏膜内癌102例(82.3%),黏膜下癌22例(17.7%),淋巴结转移率分别为0%和18.2%。

组织学检查是诊断EGC的金标准^[26]。目前认为,慢性萎缩性胃炎、胃溃疡及胃息肉等是癌前疾病,是一个临床概念,而胃黏膜上皮的肠化生和异形增生,认为是癌前病变,他是一种病理学概念。有资料证明,伴有中度或重度不典型增生者发展为胃癌的可能性为36%和80%^[27]。因此必须对癌前疾病和癌前病变的患者进行定期内镜及病理随访检查和检测,尤其对萎缩性胃炎、胃溃疡、胃息肉等伴不同程度肠化生或异性增生者,应列为高危人群,进行定期追踪随访,主要是病理随访检测^[17,28]。有研究对EGC患者未行手术切除治疗进行严格随访,发现由EGC进展为晚期胃癌(advanced gastric carcinoma, AGC)的中心时间大约37 mo,说明整个EGC阶段可持续数年,这为临床胃癌的检出提供了回旋余地,所以要坚持定期随访复查^[29]。我们在普查随访中发现病灶<0.5 cm黏膜层病灶少有淋巴结转移,治疗后5年复发率为0。

在老年人群中开展内镜普查及随访加强对EGC镜下表现的认识和鉴别并对镜下可疑病灶多点取材,能够提高老年人群EGC的检出率和诊断率。由于坚持了老年人群的内镜普查,EGC都在较小的病灶时被发现,淋巴转移率低,预后好。

4 参考文献

- Hartgrink HH, Jansen EP, van Grieken NC, van de Velde CJ. Gastric cancer. *Lancet* 2009; 374: 477-490
- Yu JX. [Familiar gastric cancer: case report and systematic review of the Chinese literature] *Zhonghua Yixue Zazhi* 2008; 88: 2789-2791
- Leung WK, Wu MS, Kakugawa Y, Kim JJ, Yeoh KG,

- Goh KL, Wu KC, Wu DC, Sollano J, Kachintorn U, Gotoda T, Lin JT, You WC, Ng EK, Sung JJ. Screening for gastric cancer in Asia: current evidence and practice. *Lancet Oncol* 2008; 9: 279-287
- Arai T, Takubo K. Clinicopathological and molecular characteristics of gastric and colorectal carcinomas in the elderly. *Pathol Int* 2007; 57: 303-314
- Sugano K. Gastric cancer: pathogenesis, screening, and treatment. *Gastrointest Endosc Clin N Am* 2008; 18: 513-522, ix
- Fock KM, Talley N, Moayyedi P, Hunt R, Azuma T, Sugano K, Xiao SD, Lam SK, Goh KL, Chiba T, Uemura N, Kim JG, Kim N, Ang TL, Mahachai V, Mitchell H, Rani AA, Liou JM, Vilaichone RK, Sollano J. Asia-Pacific consensus guidelines on gastric cancer prevention. *J Gastroenterol Hepatol* 2008; 23: 351-365
- Zhang Z, Wan J, Zhu C, Wang M, Zhao D, Fu Y, Zhang J, Wang Y, Wu B. Direct gastroscopy for detecting gastric cancer in the elderly. *Chin Med J (Engl)* 2002; 115: 117-118
- Moore MA, Sobue T. Cancer research and control activities in Japan: contributions to international efforts. *Asian Pac J Cancer Prev* 2009; 10: 183-200
- Yasuda K. Early gastric cancer: diagnosis, treatment techniques and outcomes. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2006; 18: 839-845
- Tashiro A, Sano M, Kinameri K, Fujita K, Takeuchi Y. Comparing mass screening techniques for gastric cancer in Japan. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 4873-4874
- Yang L, Parkin DM, Whelan S, Zhang S, Chen Y, Lu F, Li L. Statistics on cancer in China: cancer registration in 2002. *Eur J Cancer Prev* 2005; 14: 329-335
- Tan YK, Fielding JW. Early diagnosis of early gastric cancer. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2006; 18: 821-829
- Maconi G, Manes G, Porro GB. Role of symptoms in diagnosis and outcome of gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 1149-1155
- Yoshida S, Kozu T, Gotoda T, Saito D. Detection and treatment of early cancer in high-risk populations. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2006; 20: 745-765
- Yeoh KG. How do we improve outcomes for gastric cancer? *J Gastroenterol Hepatol* 2007; 22: 970-972
- Kunisaki C, Takahashi M, Nagahori Y, Fukushima T, Makino H, Takagawa R, Kosaka T, Ono HA, Akiyama H, Moriwaki Y, Nakano A. Risk factors for lymph node metastasis in histologically poorly differentiated type early gastric cancer. *Endoscopy* 2009; 41: 498-503
- Okabayashi T, Kobayashi M, Nishimori I, Sugimoto T, Namikawa T, Onishi S, Hanazaki K. Clinicopathological features and medical management of early gastric cancer. *Am J Surg* 2008; 195: 229-232
- Lazăr D, Tăban S, Demă A, Cornianu M, Goldiș A, Rațiu I, Sporea I. Gastric cancer: the correlation between the clinicopathological factors and patients' survival (I). *Rom J Morphol Embryol* 2009; 50: 41-50
- Yao K, Iwashita A, Tanabe H, Nagahama T, Matsui T, Ueki T, Sou S, Kikuchi Y, Yorioka M. Novel zoom endoscopy technique for diagnosis of small flat gastric cancer: a prospective, blind study. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2007; 5: 869-878
- Sano T, Hollowood A. Early gastric cancer: diagnosis and less invasive treatments. *Scand J Surg* 2006; 95: 249-255
- Qian JZ, Zhao K, Li SL, Xu HM. [Clinicopathological

■应用要点

在老年人群中开展内镜普查及随访,提高老年人群EGC的检出率和诊断率,进而提高早期胃癌的治愈率及胃癌患者的生存率,与胃癌患者的生活质量密切相关。

■同行评价

本文内容科学, 数据详实可靠, 对临床及内镜工作人员有较好的指导意义。

- analysis of 250 patients with early-stage gastric cancer] *Zhonghua Weichang Waiké Zazhi* 2010; 13: 103-105
- 22 Guarner J, Herrera-Goepfert R, Mohar A, Smith C, Schofield A, Halperin D, Sanchez L, Parsonnet J. Diagnostic yield of gastric biopsy specimens when screening for preneoplastic lesions. *Hum Pathol* 2003; 34: 28-31
- 23 Saito H, Osaki T, Murakami D, Sakamoto T, Kanaji S, Ohro S, Tatebe S, Tsujitani S, Ikeguchi M. Recurrence in early gastric cancer--presence of micrometastasis in lymph node of node negative early gastric cancer patient with recurrence. *Hepatogastroenterology* 2007; 54: 620-624
- 24 Saka M, Katai H, Fukagawa T, Nijjar R, Sano T. Recurrence in early gastric cancer with lymph node metastasis. *Gastric Cancer* 2008; 11: 214-218
- 25 Otsuji E, Kuriu Y, Ichikawa D, Ochiai T, Okamoto K, Yamagishi H. Prediction of lymph node metastasis by size of early gastric carcinoma. *Hepatogastroenterology* 2007; 54: 602-605
- 26 Moreira H, Pinto-de-Sousa J, Carneiro F, Cardoso de Oliveira M, Pimenta A. Early onset gastric cancer no longer presents as an advanced disease with ominous prognosis. *Dig Surg* 2009; 26: 215-221
- 27 Klinge U, Ackermann D, Lynen-Jansen P, Mertens PR. The risk to develop a recurrence of a gastric cancer-is it independent of time? *Langenbecks Arch Surg* 2008; 393: 149-155
- 28 Testino G. Gastric precancerous changes: carcinogenesis, clinical behaviour immunophenotype study and surveillance. *Panminerva Med* 2006; 48: 109-118
- 29 Goto O, Fujishiro M, Kodashima S, Ono S, Omata M. Is it possible to predict the procedural time of endoscopic submucosal dissection for early gastric cancer? *J Gastroenterol Hepatol* 2009; 24: 379-383

编辑 曹丽鸥 电编 何基才

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2010年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

《世界华人消化杂志》正文要求

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

穴位注射并中药腹部热敷对腹部术后胃肠功能的影响

陈月琴, 任迎彬, 谢秀霞

■背景资料

胃肠道功能障碍是腹部外科手术常见并发症, 其病因和发病机制复杂, 目前, 临床上多采用禁食、胃肠减压、早期活动等方法治疗, 治疗时间长且疗效不理想。因此, 探讨其发病机制, 寻找一种有效的预防方法, 对预防腹部术后并发症、尽快恢复胃肠功能, 有着极其重要的作用。

陈月琴, 漯河医学高等专科学校 河南省漯河市 462002
任迎彬, 漯河医学高等专科学校三附院 河南省漯河市 462002
谢秀霞, 漯河医学高等专科学校二附院 河南省漯河市 462300
通讯作者: 陈月琴, 副教授, 硕士, 462002, 河南省漯河市, 漯河医学高等专科学校. chenylhyz@163.com
电话: 0395-2964518
收稿日期: 2010-03-30 修回日期: 2010-05-28
接受日期: 2010-06-02 在线出版日期: 2010-07-18

Effect of acupuncture point injection and abdominal hot fomentation with Chinese medicine on gastrointestinal function in patients after abdominal surgery

Yue-Qin Chen, Ying-Bin Ren, Xiu-Xia Xie

Yue-Qin Chen, Luohe Medical College, Luohe 462002, Henan Province, China
Ying-Bin Ren, the Third Affiliated Hospital of Luohe Medical College, Luohe 462002, Henan Province, China
Xiu-Xia Xie, the Second Affiliated Hospital of Luohe Medical College, Luohe 462002, Henan Province, China
Correspondence to: Associate Professor Yue-Qin Chen, Luohe Medical College, Luohe 462002, Henan Province, China. chenylhyz@163.com
Received: 2010-03-30 Revised: 2010-05-28
Accepted: 2010-06-02 Published online: 2010-07-18

Abstract

AIM: To investigate the effect of injection of vitamin B₁ into Zusanli point and abdominal hot fomentation with common fennel on gastrointestinal function in patients after abdominal surgery.

METHODS: A total of 146 patients, including 46 undergoing total gastrectomy for stomach cancer, 32 undergoing subtotal gastrectomy for gastroduodenal ulcer, and 39 undergoing radical resection for colon cancer, were included in the study. These patients were randomly divided into treatment group and control group. The control group was given routine treatment, while the treatment group underwent injection of vitamin B₁ into Zusanli point and abdominal hot fomentation with common fennel on the basis of routine treatment. The time to first bowel sounds, time to first flatus, time to defecation,

and volume of drained gastric juice were observed from day 1 after surgery. The concentration of serum motilin (MTL) was determined before surgery, and on days 1 and 5 after surgery.

RESULTS: The time to first bowel sounds ($t = 11.325, P < 0.01$), time to first flatus ($t = 21.277, P < 0.01$), and time to defecation ($t = 20.632, P < 0.01$) were significantly improved in the treatment group compared with the control group. On day 5, the volume of drained gastric juice was significantly lower in the treatment group than in the control group ($t = 15.833, P < 0.01$). No statistical differences were noted in MTL concentrations before surgery and on day 1 after surgery between the control group and treatment group (both $P > 0.05$). However, serum MTL concentration on day 5 was significantly higher in the treatment group than in the control group ($t = 4.2636, P < 0.01$).

CONCLUSION: Injection of vitamin B₁ into Zusanli point and abdominal hot fomentation with common fennel can strengthen gastrointestinal motility, accelerate the recovery of gastrointestinal functions, and stimulate MTL release in patients after abdominal surgery.

Key Words: Acupuncture point injection; Hot fomentation; Abdominal surgery; Gastrointestinal function; Motilin

Chen YQ, Ren YB, Xie XX. Effect of acupuncture point injection and abdominal hot fomentation with Chinese medicine on gastrointestinal function in patients after abdominal surgery. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(20): 2146-2149

摘要

目的: 探讨足三里穴位注射VitB₁并腹部小茴香热敷对腹部术后胃肠功能的影响。

方法: 将46例胃癌根治术、32例胃十二指肠溃疡行胃大部切除术、39例结肠癌根治术患者, 分别随机分为治疗组和对照组。对照组, 予以术后常规处理。治疗组, 在对照组治疗基础上, 采用足三里穴位注射VitB₁和腹部小茴香

■同行评议者

唐文富, 副教授, 四川大学华西医院中西医结合科

热敷. 术后第1天开始, 观察患者术后肠鸣音恢复时间, 首次肛门排气、排便时间; 测定胃液引流量; 测定术前及术后第1天、术后第5天血清胃动素(motilin, MTL)浓度.

结果: 患者术后胃肠功能恢复情况: 治疗组与对照组相比, 肠鸣音出现时间($t = 11.325$, $P < 0.01$)、首次肛门排气时间($t = 21.277$, $P < 0.01$)和排便时间($t = 20.632$, $P < 0.01$)均明显提早, 差异有统计学意义. 胃液引流量: 术后第5天均减少, 治疗组引流量明显减少, 与对照组比较差异有统计学意义($t = 15.833$, $P < 0.01$). 血清MTL浓度: 术前及术后第1天两组患者之间MTL比较均无统计学意义($P > 0.05$); 术后第5天治疗组MTL水平上升, 与对照组比较, 差异有统计学意义($t = 4.2636$, $P < 0.01$).

结论: 足三里穴位注射VitB₁伴腹部小茴香热敷能增强腹部术后胃肠动力, 加快胃肠功能恢复, 并促进机体释放MTL.

关键词: 穴位注射; 腹部热敷; 腹部术后; 胃肠功能; 胃动素

陈月琴, 任迎彬, 谢秀霞. 穴位注射并中药腹部热敷对腹部术后胃肠功能的影响. 世界华人消化杂志 2010; 18(20): 2146-2149

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/2146.asp>

0 引言

手术后胃肠功能障碍是腹部外科常见的并发症, 尤其是胃肠疾病手术后更为常见. 腹部手术后, 由于麻醉药物的应用、手术刺激、切口疼痛等诸多因素, 致胃肠道功能受到抑制, 以肠鸣音消失、肛门停止排便排气、腹胀、呕吐等为主要表现, 若持续时间过长, 则会引起胃肠功能紊乱, 甚至引起严重的腹胀, 重度腹胀不仅使患者极感不适, 还可以使胃肠道吻合口及腹壁切口张力增加而影响愈合, 且可使膈肌抬高和运动受限影响呼吸. 随着时间的延长, 肠粘连、肠源性感染、吻合口漏等并发症的发生率也相应升高. 其重要性及严重后果已引起临床医疗护理工作者的普遍重视. 目前, 临床对腹部术后胃肠功能障碍的主要治疗方法有: 西医的口服和静脉用药, 中医的内服中药法、穴位按摩和针灸, 此外还有禁食、胃肠减压、早期锻炼等. 但是, 往往是在出现了症状, 并且发展到一定程度才进行治疗, 且方法单一, 口服药物治疗还受到禁食、胃肠减压等诸多限制, 效果不尽满意. 我们对腹部术后患者采用足三里穴位注射VitB₁和腹部

小茴香热敷, 以观察其对腹部手术后胃肠功能的影响, 以期探讨出有效的预防和治疗方案.

1 材料和方法

1.1 材料 选择2007-09/2009-11普外住院患者146例进行研究. 入组标准: (1)胃癌拟接受根治术、采用全身麻醉的患者; (2)胃十二指肠溃疡拟接受胃大部切除术、采用连续硬外麻醉的患者; (3)结肠癌拟接受根治术、采用连续硬外麻醉的患者; (4)年龄18-80岁. 排除标准: (1)年龄<18岁, >80岁; (2)合并肝、肾、胃肠、造血系统等其他严重疾病的患者; (3)术后发生严重并发症需二次手术者; (4)不能坚持治疗全过程的患者. 根据上述标准入选有效病例117例.

1.2 方法

1.2.1 分组: 运用前瞻、随机、对照的研究方法, 将46例胃癌根治术患者(毕I术式)、32例胃十二指肠溃疡行胃大部切除术患者(毕II术式)、39例结肠癌根治术患者, 按手术种类、入院时间随机分为治疗组和对照组. 两组患者年龄、性别、手术方式、手术时间、麻醉方式、麻醉时间比较, 经统计学检验, 差异均无统计学意义($P > 0.05$).

1.2.2 治疗: 对照组: 术后进行腹部外科常规治疗和护理: 补液、禁食、胃肠减压、早期活动等. 治疗组: 在对照组常规治疗和护理的基础上, (1)足三里穴位注射VitB₁: 术后2 h内开始给予VitB₁ 100 mg双侧足三里穴位注射, qd, 共5 d. 方法是协助患者屈膝呈直角, 体位舒适, 由外膝眼(犊鼻)往下四横指, 距胫骨约一横指处定位足三里穴^[1], 局部消毒皮肤, 用5 mL注射器抽取2 mL VitB₁, 以持笔式刺入皮肤约1.5寸, 使患者有强烈的酸、胀、麻、沉等局部感觉, 并回抽无回血时注入药液. (2)小茴香热敷腹部: 取小茴香300 g炒热, 用棉布袋包裹, 温度以患者无局部烧灼感、温热舒适为度, 将药袋置于患者上腹部(中脘)、脐部(神阙穴、天枢)紧贴皮肤, 进行热敷, 术后6 h开始, 30 min/次, Bid, 共5 d.

1.2.3 疗效观察: 术后每2 h用听诊器听诊肠鸣音恢复情况, 询问患者肛门是否排气. 观察记录术后首次肠鸣音恢复时间、首次肛门排气和排便时间, 将治疗组和对照组的结果进行比较. 记录术后每天胃液引流量进行对比观察. 分别于术前、术后第1天、术后第5天清晨7点空腹, 穿刺抽取静脉血2 mL, 置入事先备好的抗凝管中, 摇匀. 送漯河医学高等专科学校第一附属医院放

■ 相关报道

Sumida等报道, 胃肠道功能障碍可能与中枢神经系统、自主神经系统、肠肌间神经丛、胃肠道平滑肌等的功能障碍有关; 刘满君等报道胃动素是促进胃肠道运动的激素. 高巍等报道: 针刺足三里能促使脑垂体分泌SP、B2EP、VIP等多种脑肠肽, 促进胃肠道平滑肌运动. 现代研究也表明足三里穴是治疗胃肠疾病的主要腧穴, 对胃肠蠕动及消化液分泌起有益的调整作用.

■ 创新盘点

本文运用足三里穴位注射VitB₁并腹部小茴香热敷对腹部术后胃肠功能障碍进行早期干预, 无禁食及胃肠减压的顾及, 胃肠功能恢复快, 更重要的是通过早期干预, 把中医治胃病的思想方略, 应用到术后胃肠道功能障碍的预防之中.

■应用要点

胃肠道运动障碍病理生理的复杂性和在疾病发生发展过程中的重要性已引起临床医疗护理工作者的重视,本文运用足三里穴位注射VitB₁并腹部小茴香热敷早期干预,能增强腹部术后胃肠动力,加快胃肠功能恢复,并促进机体释放MTL,对腹部术后胃肠功能障碍起到良好的预防作用。

表 1 治疗组与对照组胃肠功能比较 (h, mean ± SD)

分组	n	肠鸣音出现时间	首次肛门排气时间	排便时间
治疗组	58	30.46 ± 5.26	51.65 ± 4.55	71.68 ± 6.07
对照组	59	41.59 ± 5.37	69.22 ± 4.386	93.91 ± 5.57
t值		11.325	21.277	20.632
P值		<0.01	<0.01	<0.01

免实验室,采用放射免疫法测定胃动素,由专业技术人员严格测定。

统计学处理 所有数据输入计算机,用SPSS 12.0软件包进行统计分析。计量资料以mean ± SD表示,比较采用t检验。

2 结果

2.1 治疗组与对照组胃肠功能比较 患者术后肠鸣音出现时间、首次肛门排气、排便时间比较,治疗组与对照组之间均有显著性差异($P < 0.01$, 表1)。

2.2 治疗组与对照组术后胃液引流量比较 患者术后治疗组与对照组胃液引流量比较(表2),术后第1天胃液引流量治疗组与对照组比较无明显差别,差异无统计学意义($P > 0.05$),术后第5天胃液引流量均减少,治疗组引流量明显减少,与对照组比较差异有统计学意义($t = 15.833, P < 0.01$)。

2.3 治疗组与对照组不同时间MTL水平比较 患者不同时间MTL水平测定结果比较(表3),两组患者之间MTL在术前及术后第1天比较均无统计学意义($P > 0.05$)。术后第5天治疗组MTL水平上升,与对照组比较,差异有统计学意义($t = 4.2636, P < 0.01$)。

3 讨论

胃肠道功能障碍是腹部外科手术后常见的手术并发症,其病因及发病机制复杂,涉及多种发病因素。一般认为可能与中枢神经系统(central nervous system, GNS)、自主神经系统(autonomic nervous system, ANS)、肠肌间神经丛、胃肠道平滑肌等每一水平或相互之间的功能障碍有关^[2,3]。腹部手术后患者,由于术中麻醉作用、胃肠显露、手术操作及腹腔感染的影响,使胃肠功能暂时受到抑制。临床上以肠鸣音恢复、肛门排气,患者无腹胀、呕吐等不适为胃肠功能恢复的标志^[4]。MTL是促进胃肠道运动的激素,MTL的生理作用主要是影响胃肠道的运动,在消化期间,MTL呈周期性释放,引起胃和上部小肠产

表 2 治疗组与对照组术后胃液引流量比较 (mL, mean ± SD)

分组	n	术后第1天	术后第5天
治疗组	58	1 542.11 ± 596.66	107.26 ± 45.92
对照组	59	1 658.25 ± 611.78	559.64 ± 214.34
t值		1.0394	15.833
P值		>0.05	<0.01

生消化期综合肌电III相并诱发胃强烈收缩^[5]和小肠明显的分节运动,食管下括约肌的紧张性收缩可防止胃内容物返流入食管同时增强结肠和胆囊运动^[6],他可能是唯一作用于消化期间而与进食无关的激素,参与胃肠运动的调控,影响着术后胃肠功能的恢复,也是近年来用于判断胃肠道动力情况的重要指标^[7]。

中医理论认为经络是人体运行气血的通道,其内属脏腑、外络肢节、沟通内外、贯串上下,将内部的脏腑和外部的各组织器官连成一个有机的整体,使人体内部的功能保持相对的协调和平衡。足三里穴属阳明经脉,是四大总穴之首,具有和胃健脾、扶正培元、开降气机的功效,优对胃肠道有双向调节作用。针刺足三里能促使脑垂体分泌SP、B2EP、VIP等多种脑肠肽,促进胃肠道平滑肌运动^[8]。现代研究也表明足三里穴是治疗胃肠疾病的主要腧穴,对胃肠蠕动及消化液分泌起有益的调整作用^[9]。针刺足三里能够提高血浆胃动素的含量而影响消化间期的胃肠运动^[10]。VitB₁能抑制胆碱酯酶的活性,减少乙酰胆碱水解,兴奋胃肠道平滑肌。经足三里穴位注射VitB₁结合了穴、针、药三者之功效,通过腧穴-经络-脏腑的特殊作用,达到促进腹部手术后胃肠功能恢复的目的。

中医认为“脾胃为后天之本,气血生化之源”,胃肠以通为用,以降为顺。手术后腹胀是因为手术本身的创伤,多为元气大伤,气血双亏,致气不能推动肠蠕动所致^[11]。小茴香有增强肠道收缩作用及促进肠的蠕动作用^[12]。上腹的中脘穴,健脾胃,助消化,补中气,安神等,对胃肠

表 3 治疗组与对照组不同时间MTL水平比较 (ng/L, mean ± SD)

分组	n	术前	术后第1天	术后第5天
治疗组	58	271.23 ± 60.22	172.46 ± 55.10	270.65 ± 51.35
对照组	59	260.59 ± 59.37	175.36 ± 57.27	231.39 ± 48.19
t值		0.2386	0.2803	4.2636
P值		>0.05	>0.05	<0.01

■同行评价

本文设计合理, 解决了外科临床实践中一个常见而棘手的难题, 具有一定的实用价值。

功能有调理作用, 刺激之可促进胃肠运动。天枢穴位于人体中腹部, 肚脐向左右三指宽处^[13], 有调畅气机、去除积滞、行气消胀的作用。神阙穴位于脐中央, 脐为经络之总枢, 经气之汇海, 冲、任、督三脉“同源而三歧”, 皆交汇于脐。再者, 脐部角质层薄, 皮下无脂肪组织, 屏障功能最差, 皮下两侧分布丰富的毛细血管^[14-16]。热敷有利于药物渗透, 加之小茴香有芳香走窜之功效, 使血管扩张, 刺激肠壁引起收缩, 促进肠蠕动恢复。小茴香热敷上腹部穴位, 使药之气味透过皮肤, 经脉达到温经通络, 行气活血的作用。热敷可刺激局部毛细血管, 改善微循环和营养供应; 穴位热敷起到了穴位刺激、药物局部吸收双重作用, 从而加速肠蠕动, 促使肛门排气。

本研究结果表明: 足三里穴位注射VitB₁伴腹部小茴香热敷能有效地缩短肠鸣音出现及肛门排气时间, 加快胃肠功能恢复, 并促进机体释放MTL, 促进腹部术后胃肠动力的恢复。且术后穴位治疗和中药外敷又无禁食及胃肠减压的顾及, 更重要的是通过早期干预, 把中医治胃病的思想方略, 应用到术后胃肠道功能障碍的预防之中。

4 参考文献

- 1 伦新. 单穴防病治病妙用. 第1版. 北京: 人民卫生出版社, 2006: 410
- 2 Sumida K, Nimura Y, Yasui A, Miyachi M, Shibata Y, Kobayashi I. Influence of vagal pyloric branches on gastric acid secretion and gastrointestinal motility in patients following a pylorus preserving pancreatoduodenectomy. *Hepatogastroenterology* 1999; 46: 336-342
- 3 Tsukamoto M, Enjoji A, Ura K, Kanematsu T. Preserved extrinsic neural connection between gallbladder and residual stomach is essential to prevent dysmotility of gallbladder after distal gastrectomy. *Neurogastroenterol Motil* 2000; 12: 23-31
- 4 赵丽萍, 罗涛, 何自力. 经足三里穴位注射维生素B1对腹部手术后胃肠功能恢复的影响. *中国现代医学杂志* 2008; 18: 2698-2700
- 5 Jonsson BH, Hellström PM. Motilin- and neuropeptide Y-like immunoreactivity in a psychophysiological stress experiment on patients with functional dyspepsia. *Integr Physiol Behav Sci* 2000; 35: 256-265
- 6 张超贤, 秦咏梅, 韩宇. 扶正理气合剂对实验性功能消化不良大鼠胃排空和胃动素的影响. *世界华人消化杂志* 2008; 16: 751-754
- 7 刘满君, 葛建立, 贾利辉, 马云龙. 足三里贴膏对腹部术后胃肠肽类激素影响及临床疗效研究. *四川中医* 2008; 26: 105-107
- 8 高巍, 黄裕新, 陈洪, 赵宁侠, 王庆莉, 秦明, 张洪新. 电针足三里对大鼠垂体和外周血中脑肠肽含量的影响. *第四军医大学学报* 2001; 22: 2023-2025
- 9 唐晓文. 足三里穴位注射治疗食管贲门癌术后胃功能性排空障碍. *山东中医杂志* 2008; 27: 32-33
- 10 任婷婷. 针刺足三里、中脘穴对胃粘膜损伤家兔模型血清胃泌素和血浆胃动素含量的影响. *中医药信息* 2007; 24: 48-49
- 11 黄宁静, 李小斌, 刘春萍, 胡兴莲. 小茴香热敷促进腹部手术后肛门排气的效果研究. *实用医技杂志* 2008; 15: 2463-2464
- 12 柯永建. 小茴香的药物现代研究. *海峡药学* 2009; 21: 101-103
- 13 陈茶花, 兰淑云, 朱茹英, 付文英, 胡苏秀. 指压天枢穴与热敷脐治疗阿托品致肠麻痹的观察. *护士进修杂志* 2009; 24: 179-180
- 14 赵秋月, 徐利仙, 曹芬利. 神阙穴大黄贴敷促进胆囊切除术后肠蠕动效果观察. *护理与康复* 2004; 3: 421
- 15 查保国, 刘敏, 王智勇, 王美华. 五磨脐贴促进腹部手术患者胃肠功能恢复及对血管活性肠肽的影响. *上海中医药杂志* 2008; 42: 29-31
- 16 宋春辉, 李桂, 崔树星, 贾凤新, 巴英伟, 刘洪亮. 中药敷脐疗法对经腹术后患者胃肠功能恢复及T细胞亚群变化的影响. *辽宁中医药大学学报* 2008; 10: 5-6

编辑 曹丽鸥 电编 何基才

促胃肠动力药物对Oddi括约肌压力的影响

石 刚, 吴硕东, 刘 波, 孙 巍, 张小博, 孔 静

■背景资料

近20年文献, 对于SO功能的研究非常有限, 大部分停留在解剖学水平, SO既作为上消化系统整体一部分, 又有其自身独特的功能, 但其具体运动机制, 目前还不明确, 开展这类研究非常必要, 尤其胃肠动力药物在改变胃肠动力同时, 会对SO有什么样的影响, 更应该受到关注, 并进行相关作用机制的研究。

石刚, 刘波, 孙巍, 沈阳市第四人民医院肝胆外科 沈阳市胆石疾病诊治中心 辽宁省沈阳市 110020

吴硕东, 张小博, 孔静, 中国医科大学盛京医院普外科 辽宁省沈阳市 110036

作者贡献分布: 此课题由石刚与吴硕东设计; 研究过程由石刚与吴硕东操作完成; 病例选择及分析工具由刘波与孙巍提供; 数据分析由石刚与孔静完成; 本论文写作由石刚与吴硕东完成。

通讯作者: 石刚, 主治医师, 110020, 辽宁省沈阳市皇姑区黄河南大街20号, 沈阳市第四人民医院肝胆外科, 沈阳市胆石疾病诊治中心。tenoutten@yahoo.com.cn

电话: 024-26227005

收稿日期: 2010-03-07 修回日期: 2010-05-22

接受日期: 2010-05-25 在线出版日期: 2010-07-18

Effects of gastrokinetic agents on human sphincter of Oddi motility

Gang Shi, Shuo-Dong Wu, Bo Liu, Wei Sun,
Xiao-Bo Zhang, Jing Kong

Gang Shi, Bo Liu, Wei Sun, Department of Hepatobiliary Surgery, Shenyang the Fourth Hospital of People; Center for Diagnosis and Treatment of Gallstone Disease in Shenyang, Shenyang 110020, Liaoning Province, China

Shuo-Dong Wu, Xiao-Bo Zhang, Jing Kong, Department of General Surgery, Shengjing Hospital of China Medical University, Shenyang 110036, Liaoning Province, China

Correspondence to: Gang Shi, Department of Hepatobiliary Surgery, Shenyang the Fourth Hospital of People; Center for Diagnosis and Treatment of Gallstone Disease in Shenyang, 20 Huanghe South Avenue, Huanggu District, Shenyang 110020, Liaoning Province, China. tenoutten@yahoo.com.cn

Received: 2010-03-07 Revised: 2010-05-22

Accepted: 2010-05-25 Published online: 2010-07-18

Abstract

AIM: To observe the effects of domperidone, mosapride and tegaserod on the motility of human sphincter of Oddi (SO) and to analyze potential mechanisms involved.

METHODS: Thirty-two patients with T-tube drainage after choledochotomy were randomly divided into three groups: domperidone group, mosapride group and tegaserod group. The pressure of the SO was measured with a choledochofiberscope via T-tube fistula. Agents were given sublingually. Basic pressure of the SO (SOBP), amplitude of the SO (SOCA), duration of phasic contractions (SOD), duodenal pressure (DP), and common bile duct pressure (CBDP)

were recorded and analyzed.

RESULTS: SOBP and SOCA decreased markedly not only in the domperidone group (10.30 ± 4.99 vs 6.40 ± 3.66 ; 110.52 ± 37.80 vs 68.67 ± 41.02 ; both $P < 0.05$) but also in the mosapride group (2.56 ± 13.02 vs 6.00 ± 5.74 ; 83.44 ± 46.16 vs 52.48 ± 44.19 ; both $P < 0.05$). SOBP and SOCA did not change after tegaserod intake. No significant changes in SOF, SOD and CBDP were noted in all the groups.

CONCLUSION: Both domperidone and mosapride at clinical doses decrease SOBP and SOCA and inhibit SO motility, while tegaserod at clinical dose does not affect SO motility.

Key Words: Sphincter of Oddi; Domperidone; Mosapride; Tegaserod; Pressure

Shi G, Wu SD, Liu B, Sun W, Zhang XB, Kong J. Effects of gastrokinetic agents on human sphincter of Oddi motility. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(20): 2150-2154

摘要

目的: 观察在消化间期, 常规剂量的多潘立酮、莫沙必利、替加色罗对Oddi括约肌(sphincter of Oddi, SO)运动功能的影响。

方法: 胆道探查术后留有T型管患者32例, 进行前瞻性病例对照研究, 采用抽签法随机分为潘利酮组、莫沙必利组、替加色罗组, 测量用药前后的十二指肠压(DP)、SO基础压(SOBP)、收缩波幅(SOCA)、收缩频率(SOF)、收缩间期(SOD)及胆总管压(CBDP)。

结果: 舌下含服多潘立酮后SOBP明显降低(10.30 ± 4.99 vs 6.40 ± 3.66 , $P < 0.05$), SOCA明显降低(110.52 ± 37.80 vs 68.67 ± 41.02 , $P < 0.05$); 舌下含服莫沙必利后SOBP和SOCA明显降低(2.56 ± 13.02 vs 6.00 ± 5.74 ; 83.44 ± 46.16 vs 52.48 ± 44.19 , 均 $P < 0.05$); 舌下含服替加色罗后, SOCA、SOBP无明显变化。应用各药物后, SOF、SOD及CBDP均无明显变化。

结论: 常规剂量的多潘立酮、莫沙必利对SO运

■同行评议者

宋振顺, 教授, 中国人民解放军第四军医大学西京医院肝胆外科

动功能具有抑制作用, 引起Oddi松弛; 常规剂量的替加色罗可能对SO运动功能无明显影响。

关键词: Oddi括约肌; 多潘立酮; 莫沙必利; 替加色罗; 压力

石刚, 吴硕东, 刘波, 孙巍, 张小博, 孔静. 促胃肠动力药物对Oddi括约肌压力的影响. 世界华人消化杂志 2010; 18(20): 2150-2154

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/2150.asp>

0 引言

Oddi括约肌(sphincter of Oddi, SO)是胆道系统的重要结构, 随着研究的深入认为, SO在消化系统所扮演的角色越来越受到重视, 但相关的解剖学研究较多, 功能性研究非常罕见。目前最新的观点认为, SO在消化系中的功能有其他消化系组成共性的部分, 同时也存在着其个性的功能。在探讨胃肠动力药物对消化系功能影响的时候, 其对SO功能的影响, 也不容忽略。本研究通过前瞻性病例对照研究观察消化间期, 通过舌下含服的给药途径, 多潘立酮、莫沙必利、替加色罗三种临床常用促胃肠动力药对SO压力的影响, 并探讨其可能的作用机制。

1 材料和方法

1.1 材料 本研究选取2007-02/2009-10入住院治疗的胆总管结石患者32例进行研究, 其中男10例, 女22例, 平均年龄56.72(36-82)岁, 采用抽签法随机分为3组: 多潘立酮组($n = 10$), 莫沙必利组($n = 12$), 替加色罗组($n = 10$)。全部患者均为胆囊切除、胆总管探查取石及T型管引流后4-14 wk, 平均为手术后10 wk, 入院进行胆道镜检查, 以决定是否拔除T管, 如有残石, 需同时进行取石。所有患者均在检查前充分告知, 并签署知情同意书, 因为胆道镜检查及测压是拔除T管前常规检查项目, 三种胃肠动力药物为临床常用药物及常规剂量, 因此不存在伦理问题。测压器械为PC polygram HR高分辨、多通道胃肠功能测定仪及相应测压软件, 三通道测压导管, 低顺应性水灌注系统, 氮气泵及PENTEX LX-750p纤维胆道镜。三通道测压导管长2 m, 直径1.7 mm, 末端有三个侧孔, 相隔2 mm, 每孔开口于不同方向。多潘立酮, 莫沙必利, 替加色罗均采用舌下含服的给药方式。

1.2 方法

1.2.1 测压: 受试者检查前2 d不使用任何药物, 测

压前禁食水8 h。设置电脑测压系统参数, 氮气压力为40 kPa, 水流速度为0.5 mL/min, 连接测压导管, 拔除T型管并经T型管窦道导入胆道镜, 观察乳头是否蠕动良好、有无狭窄、纤维化及结石, 所有入选的测压患者乳头均活动良好, 无器质性疾病, 无狭窄、纤维化及结石。全部患者行胆道镜探查取石后, 由胆道镜侧孔插入测压导管, 直视下经乳头达十二指肠, 稳定30 s后测压, 为十二指肠压(duodenal pressure, DP); 拖动导管至SO部, 直视结合电脑出现时相波可明确导管处于SO内, 为Oddi括约肌基础压(basic pressure of the sphincter of Oddi, SOBP); 将导管拽至胆总管内进行测压为胆总管压胆总管压(common bile duct pressure, CBDP)。然后对第1组10例患者给予舌下含服多潘立酮5 mg, 10 min和20 min后重复上述过程进行测压并储存压力曲线; 第2组12例患者同上行第1次测压后, 给予舌下含服莫沙必利5 mg, 10 min和20 min再行测压并储存压力曲线; 对第3组10例患者同上行第1次测压后, 给予替加色罗12 mg, 10 min后行第2次测压, 20 min后行第3次测压。

1.2.2 观察参数: 观察参数包括SOBP、收缩波幅(amplitude of the sphincter of Oddi, SOCA)、收缩频率(the frequency of SO, SOF)、收缩间期(duration of phasic contractions, SOD)及CBDP, DP作为零点。

统计学处理 结果以mean±SD表示, 采用给药前后自身对照研究, 样本均数间比较使用组内配对 t 检验, $P < 0.05$ 被认为有显著差异。

2 结果

2.1 多潘立酮对SO运动功能的影响 舌下含服多潘立酮10 min后与给药前相对比SOBP下降了4.95%, SOCA下降了12.05%, 与给药前相对比, 统计学上均无显著差异($P > 0.05$)。舌下含服多潘立酮20 min后SOBP下降了37.81%, 与给药前相对比, 统计学上有显著差异($P < 0.05$); 舌下含服多潘立酮20 min后SOCA下降了37.86%, 与给药前相对比, 统计学上有显著差异($P < 0.05$)。SOF、SOD及CBDP未见明显改变(表1)。

2.2 莫沙必利对SO运动功能的影响 舌下含服莫沙必利10 min后与给药前相对比SOBP下降了9.55%, 与给药前相对比, 统计学上无显著差异($P > 0.05$)。舌下含服莫沙必利20 min后SOBP下降了52.22%, 与给药前相对比, 统计学上有显著差异($P < 0.05$); 舌下含服莫沙必利10 min后SOCA

■ 研发前沿

Tankurt等通过在体人胆囊及离体荷兰猪胆囊肌条的实验证明, 多潘立酮可引起在体人胆囊收缩, 但其对SO的运动影响却没有相应的报道。

■相关报道

Baker等在澳大利亚负鼠实验中证明,各种剂量的西沙必利对SO运动的波幅和频率均产生抑制作用,导致SO松弛,这种抑制作用是剂量依赖性的。

表 1 多潘立酮对SO运动功能的影响 ($n = 10$)

	用药前	10 min	20 min
SOBP(mmHg)	10.30 ± 4.99	9.79 ± 13.47	6.40 ± 3.66 ^a
SOCa(mmHg)	110.52 ± 37.80	97.20 ± 59.96	68.67 ± 41.02 ^a
SOD(mmHg)	6.21 ± 0.97	6.12 ± 1.60	6.52 ± 1.99
SOF(次/分)	6.84 ± 2.43	8.03 ± 6.52	8.86 ± 7.56
CBDP(mmHg)	5.78 ± 6.59	5.38 ± 2.23	4.34 ± 4.75

^a $P < 0.05$ vs 同指标用药前。

表 2 莫沙必利对SO运动功能的影响 ($n = 12$)

	用药前	10 min	20 min
SOBP(mmHg)	12.56 ± 13.02	11.36 ± 6.70	6.00 ± 5.74 ^a
SOCa(mmHg)	83.44 ± 46.16	45.06 ± 31.32 ^a	52.48 ± 44.19
SOD(mmHg)	6.47 ± 2.46	5.58 ± 1.20	5.77 ± 1.40
SOF(次/分)	7.13 ± 3.21	6.33 ± 3.07	5.74 ± 2.41
CBDP(mmHg)	3.92 ± 3.58	1.74 ± 1.77	1.95 ± 3.43

^a $P < 0.05$ vs 同指标用药前。

表 3 替加色罗对SO运动功能的影响 ($n = 10$)

	用药前	10 min	20 min
SOBP(mmHg)	8.11 ± 4.08	9.44 ± 5.25	9.23 ± 21.97
SOCa(mmHg)	74.62 ± 26.06	71.74 ± 37.63	58.54 ± 37.19
SOD(mmHg)	5.96 ± 2.34	5.99 ± 1.64	5.48 ± 136
SOF(次/分)	6.55 ± 2.49	6.07 ± 3.31	5.88 ± 1.47
CBDP(mmHg)	2.99 ± 3.71	3.36 ± 2.98	4.07 ± 5.27

下降了46.0%,与给药前相对比,统计学上有显著差异($P < 0.05$)。舌下含服莫沙比利20 min后SOCa下降了37.1%,与给药前相对比,统计学上有显著差异($P < 0.05$)。SOF、SOD及CBDP未见明显改变(表2)。

2.3 替加色罗对SO运动功能的影响 舌下含服替加色罗10 min及20 min后,与给药前相对比,统计学上无显著差异($P > 0.05$)。SOBP、SOCa、SOF、SOD及CBDP均无明显改变(表3)。

3 讨论

在消化间期,SO运动分为4期,Ⅰ相对静止期、Ⅱ不规则间歇运动期、Ⅲ短暂的高振幅的收缩期、Ⅳ收缩期与相对静止期开始的阶段。SO有两种运动形式:自发性紧张性收缩及节律性收缩,调节着胆、胰液流动的阻力,从而调控着胆汁、胰液的流动及胆囊的充盈。直接内镜测压

是目前公认的SO压力检测的“金标准”,为创伤性检查,并发症发生率高,患者痛苦大^[1]。我们采用的经T型管瘘管胆道镜SO测压法,为顺行插管检测SO压力,其痛苦小、安全性高、鲜有并发症发生、相对技术难度较低,并将胆道镜探查、取石、碎石及测压同时完成,易于为临床医生和患者所接受。我们研究中的32例患者全部插管测压成功,无一例并发症出现,对于SO狭窄的患者,可行内镜下乳头切开术(endoscopic sphincterotomy, EST)术解除狭窄,降低了结石再发生率。我们在压力测定中,在同一测压中心、同一操作者采用干预前后自身对照研究SO的运动功能,最大限度的减少了偏倚,提高了测定指标的精确度。

多潘立酮为外周多巴胺受体阻滞剂,通过增加胃窦及十二指肠的蠕动幅度和频率,胃的收缩和蠕动加强,胃排空加速。与D2受体

(dopamine 2 receptor), 特别是胃肠道多巴胺受体亲和力较强, 无胆碱能活性, 不受阿托品的抑制作用. Tankurt等^[2]通过在体人胆囊及离体荷兰猪胆囊肌条的实验证明, 多潘立酮可引起在体人胆囊收缩, 但其对SO的运动影响却没有相应的报道. Marzio等^[3]研究发现, 在人类, 多巴胺可能是通过改变肽类激素水平, 从而影响消化间期胃肠运动的. 多巴胺可引起血浆胃动素水平显著升高, 生长抑素水平没有变化. 多潘立酮引起SOBP、SOCA减低, 导致SO松弛可能是非胆碱能非肾上腺素能机制.

莫沙必利为5-HT₄受体激动剂, 没有D₂受体拮抗作用, 与中枢神经原突触膜上的多巴胺D₂, A₁, 5-HT₁, 5-HT₂受体无亲和力, 尽管莫沙必利的结构也是与西沙必利相似的苯甲酰胺类, 但没有与西沙必利相似的导致尖端扭转性室性心动过速的电生理特征^[4]. 目前还没有莫沙必利对SO运动影响的报道. Baker等^[5]在澳大利亚负鼠实验中证明, 各种剂量的西沙必利对SO运动的波幅和频率均产生抑制作用, 导致SO松弛, 这种抑制作用是剂量依赖性的. 应用西沙必利舌下含服, 经T管窦道内镜行SO压力测定, 进行服药前后SO压力变化的随机临床对照试验. 结果显示, 给药后与给药前相对比, SO基础压力及收缩幅度较给药前明显减低, 西沙必利对人SO运动有抑制作用^[6]. 与西沙必利化学结构相似, 莫沙必利同样引起SO松弛, 莫沙必利可能与西沙必利有着相同或相似的作用机制. 莫沙必利对SO的运动影响是通过非胆碱能非肾上腺素能机制, 与体内多种激素的释放有关. 药物或激素作用于不同的受体或神经元可能导致括约肌不同的舒缩运动, 使括约肌表现为紧张或松弛. 莫沙必利为5-HT₄受体激动剂, 激活5-HT₄受体, 使胆碱能神经元释放乙酰胆碱, 进而诱导平滑肌收缩. 而莫沙必利同时可能诱导胆囊收缩素(cholecystokinin, CCK), P物质(substance P, SP)、生长激素、降钙素基因相关肽等激素的分泌, 这些激素作用于非胆碱能非肾上腺素能神经元, 通过神经-肌接头, 从而引起肌肉收缩幅度减低, SO松弛. 因此, 莫沙必利对SO的影响可能同时存在两面性: 抑制和促进. 由于其抑制方面的因素占主导地位, 因此, 最终其运动表现为减弱.

替加色罗为5-HT₄受体的部分激动剂, 对人的5-HT₄受体具有较高的亲和力, 对5-HT₁受体有中等度亲和力, 对5-HT₃受体无亲和力. 可激活5-HT₄受体触发其他神经递质如降钙素基因

相关肽的释放. Fisher等^[7]对健康女性和患有肠易激惹综合征的女性口服马来酸替加色罗后, 消化期及消化间期SO功能状态进行了评估. 通过高灵敏度彩超观察胆囊最大排空实时的肝总管及胆总管内径变化来间接反映SO功能状态. 结果显示, 在胆囊排空的同时, 肝总管及胆总管内径、胆囊排胆分数、排胆率、排胆周期、空腹胆囊容积、餐后胆囊容积及胆囊最大排空均没有变化. 马来酸替加色罗也没有改变餐前和餐后60 min血清CCK水平. 从而认为, 马来酸替加色罗并没有收缩SO, 引起胆汁向十二指肠排空受阻, 从而增加胆道压力, 导致肝总管及胆总管内径增粗. 本研究通过舌下含服替加色罗观察给药后10 min及20 min SO的压力变化, 没有观察到SO的运动改变. 但替加色罗的血药峰浓度时间为50 min, 常规的给药剂量, 并且在10 min及20 min测压, 我们得出阴性结果, 是否因为未达到引起SO功能改变的足够的血药浓度? 或是测压时间过早, SO运动改变过小, 没有足够的灵敏度测得压力变化? 这需要进行进一步的动物实验或者临床实验来论证.

在对SO运动的研究中, 消化间期十二指肠移行性复合运动(migrate motor complex, MMC)与SO运动的相关性应充分考虑, 尤其在研究胃肠动力药物对SO运动影响时. 脱离十二指肠MMC去孤立的探讨SO运动, 是片面的. 该类药物促进胃肠动力的同时导致SO运动功能的改变应该是其主要机制. 有研究表明^[8], SO运动I期、II期收缩较规律, 受十二指肠运动影响较小; III期的SO运动与十二指肠MMC呈明显的相关性, 这种相关性为: 在消化间期, 十二指肠的III期MMC与SO的III期运动相呈时相性一致, SO保持着节律性的张力性舒缩运动, 进食后, 十二指肠MMC增强, SO相应松弛. 我们认为, 虽然是在消化间期给予多潘立酮、莫沙必利, 但其引起的胃十二指肠MMC增强与进食状态下的胃十二指肠MMC相类似, 导致SO松弛, 更有利于胆汁向十二指肠排泌. 同时十二指肠运动的增强引起血浆CCK、SP等激素反馈性升高, CCK是SO运动的一个重要的神经体液调节素, CCK的升高会引起SO的松弛. 在今后的试验中, 如果能在SO测压同时观察胃十二指肠运动的电生理变化及进行离体SO肌条运动试验等, 可能进一步揭示胃肠动力药物对SO的作用机制.

■同行评价

本文内容详实, 数据可靠, 对深入探讨胃动力药的机制有一定的意义.

4 参考文献

- 1 Toouli J. Sphincter of Oddi: Function, dysfunction, and its management. *J Gastroenterol Hepatol* 2009; 24 Suppl 3: S57-S62
- 2 Tankurt E, Apaydin S, Ellidokuz E, Igci E, Guven H, Simsek I, Gonen O. The prokinetic effect of domperidone in gallbladder—not upon dopaminergic receptors. *Pharmacol Res* 1996; 34: 153-156
- 3 Marzio L, DiFelice F, Laico MG, Imbimbo B, Lapenna D, Cuccurullo F. Gallbladder hypokinesia and normal gastric emptying of liquids in patients with dyspeptic symptoms. A double-blind placebo-controlled clinical trial with cisapride. *Dig Dis Sci* 1992; 37: 262-267
- 4 Jung IS, Kim JH, Lee HY, Park H, Lee SI. Endoscopic evaluation of gastric emptying and effect of mosapride citrate on gastric emptying. *Yonsei Med J* 2010; 51: 33-38
- 5 Baker RA, Saccone GT, Toouli J. Cisapride inhibits motility of the sphincter of Oddi in the Australian possum. *Dig Dis Sci* 1990; 35: 711-715
- 6 von Kiedrowski R, Huijghebaert S, Raedsch R. Mechanisms of cisapride affecting gallbladder motility. *Dig Dis Sci* 2001; 46: 939-944
- 7 Fisher RS, Thistle J, Lembo A, Novick J, O'Kane P, Chey WD, Beglinger C, Rueegg P, Shi V, Dogra A, Luo D, Earnest DL. Tegaserod does not alter fasting or meal-induced biliary tract motility. *Am J Gastroenterol* 2004; 99: 1342-1349
- 8 王洪江. Oddi括约肌收缩运动与十二指肠MMC相关性的实验研究. *中国应用生理学杂志* 2004; 20: 357-369

编辑 李军亮 电编 何基才

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2010年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

《世界华人消化杂志》修回稿须知

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

1 修回稿信件

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

2 稿件修改

来稿经同行专家审查后,认为内容需要修改、补充或删除时,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;逾期寄回的,作重新投稿处理。

3 版权

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

骨髓CD34+细胞在肝硬化患者中的表达及意义

刘拉羊, 王顺达, 党双锁, 程延安, 周芙玲, 高宁, 贾晓黎, 张欣

刘拉羊, 王顺达, 党双锁, 程延安, 高宁, 贾晓黎, 张欣, 西安交通大学医学院第二附属医院感染科 陕西省西安市 710004
周芙玲, 西安交通大学医学院第二附属医院血液科 陕西省西安市 710004

国家自然科学基金资助项目, No. 30670961

作者贡献分布: 刘拉羊与王顺达对此文所作贡献均等; 此课题由党双锁与刘拉羊设计; 研究过程由刘拉羊、王顺达、党双锁、程延安、周芙玲、高宁、贾晓黎及张欣操作完成; 研究所用试剂和分析工具由党双锁提供; 数据分析由王顺达完成; 本论文写作由党双锁与王顺达完成。

通讯作者: 党双锁, 教授, 博士生导师, 710004, 陕西省西安市, 西安交通大学医学院第二附属医院感染科, dang212@126.com
收稿日期: 2010-02-26 修回日期: 2010-05-17

接受日期: 2010-05-25 在线出版日期: 2010-07-18

Significance of bone marrow CD34+ cell levels in cirrhotic patients

La-Yang Liu, Shun-Da Wang, Shuang-Suo Dang, Yan-An Cheng, Fu-Ling Zhou, Ning Gao, Xiao-Li Jia, Xin Zhang

La-Yang Liu, Shun-Da Wang, Shuang-Suo Dang, Yan-An Cheng, Ning Gao, Xiao-Li Jia, Xin Zhang, Department of Infectious Diseases, the Second Affiliated Hospital of Medical School of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710004, Shaanxi Province, China

Fu-Ling Zhou, Department of Hematology, the Second Affiliated Hospital of Medical School of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710004, Shaanxi Province, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30670961

Correspondence to: Professor Shuang-Suo Dang, Department of Infectious Diseases, the Second Affiliated Hospital of Medical school of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710004, Shaanxi Province, China. dang212@126.com

Received: 2010-02-26 Revised: 2010-05-17

Accepted: 2010-05-25 Published online: 2010-07-18

Abstract

AIM: To analyze the significance of bone marrow CD34+ levels in cirrhotic patients.

METHODS: Bone marrow fluid was obtained from 31 cirrhotic patients and 15 healthy controls. The percentage of bone marrow CD34+ cells among mononuclear cells was detected by flow cytometry.

RESULTS: The percentage of bone marrow CD34+ cells among mononuclear cells was significantly higher in cirrhotic patients than in

normal controls (6.30% vs 1.87%, $t = 3.906$, $P < 0.05$). The percentages of bone marrow CD34+ cells were not significantly different among patients with Child-Pugh A, B, and C cirrhosis ($7.01 \pm 2.1\%$, $4.58 \pm 2.56\%$ and $7.72 \pm 1.49\%$, $F = 3.586$, $P > 0.05$).

CONCLUSION: The levels of bone marrow CD34+ cells increase in cirrhotic patients. Liver function grade is not correlated with bone marrow CD34+ cell levels in cirrhotic patients. Increased bone marrow CD34+ cells may contribute to the pathogenesis of cirrhosis.

Key Words: Cirrhosis; CD34+ haemopoietic stem cell; Child-Pugh classification

Liu LY, Wang SD, Dang SS, Cheng YA, Zhou FL, Gao N, Jia XL, Zhang X. Significance of bone marrow CD34+ cell levels in cirrhotic patients. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(20): 2155-2158

摘要

目的: 探讨肝硬化患者骨髓CD34+造血干细胞的表达及意义。

方法: 行骨髓穿刺术, 收集31例肝硬化患者和15例健康对照的骨髓液, 流式细胞仪检测骨髓液CD34+细胞占单个核细胞比例, 并比较随肝脏储备功能不同的Child A、Child B、Child C级患者, 其骨髓CD34+细胞表达水平是否存在差异。

结果: 肝硬化患者和健康对照组骨髓CD34+细胞占单个核细胞的比例分别为6.30%和1.87%, 差异有统计学意义($t = 3.906$, $P < 0.05$)。随肝脏储备功能不同的Child A、Child B、Child C级患者, 其骨髓CD34+细胞表达率分别为 $7.01\% \pm 2.1\%$ 、 $4.58\% \pm 2.56\%$ 、 $7.72\% \pm 1.49\%$, 三者之间差异无统计学意义($F = 3.586$, $P > 0.05$)。

结论: 肝硬化患者骨髓CD34+干细胞细胞增加, 随肝功能Child-Pugh分级不同CD34+干细胞表达无差异, CD34+增加可能对肝硬化的病情有积极的作用。

关键词: 肝硬化; CD34+造血干细胞; Child-Pugh

■背景资料

肝硬化处于失代偿期时, 并发的脾功能亢进症(hypersplenism, 简称脾亢)和血细胞减少互为因素, 相互影响, 是造成病情进展加快、加重的重要原因。探讨肝硬化外周血细胞减少的成分对于阐明失代偿期肝硬化的发生机制意义重大。

■同行评议者

钱林学, 教授, 首都医科大学附属北京友谊医院内科

■研发前沿

CD34+细胞数可作为骨髓造血干/祖细胞数量检测的可靠指标。本文试图通过流式细胞仪检测肝硬化患者骨髓液CD34+细胞数的变化,初步研究肝硬化时骨髓的造血干细胞的状况对外周血细胞变化的影响。

■相关报道

Yao等报道CD34抗原是人们普遍认同的造血干/祖细胞的代表性表面标志。

分级

刘拉羊, 王顺达, 党双锁, 程延安, 周笑玲, 高宁, 贾晓黎, 张欣. 骨髓CD34+细胞在肝硬化患者中的表达及意义. 世界华人消化杂志 2010; 18(20): 2155-2158

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/2155.asp>

0 引言

造血干细胞具有极高的自我更新能力, 多向分化重建长期造血的潜能以及修复组织损伤的能力. 因这些特殊的生物学特性, 造血干细胞在体内的表达对于处于病态的机体起着重要的作用. 肝硬化(hepatic cirrhosis)是多种慢性肝病的共同结果, 肝硬化病理情况下, 一方面表现为外周血三系细胞降低, 通常以血小板减少为主; 另一方面表现为肝脏肝细胞、胆管细胞受损. 因此, 本研究检测在肝硬化病理情况下骨髓CD34+细胞的表达并探讨其意义.

1 材料和方法

1.1 材料 31例肝硬化患者均系在西安交通大学医学院第二附属医院肝病治疗中心住院的患者, 其中女14例, 男17例. 15例对照组来源于无血液系统疾病及肝脏疾病患者群, 男9例, 女6例. 肝硬化患者均符合1995年全国第5次传染病和寄生虫病会议修订《病毒性肝炎防治》方案中肝硬化诊断标准. 排除非肝硬化原因引起的脾大、外周血减少症的患者, 如Budd-Chiari综合征、白血病等. 主要仪器和试剂: 流式细胞仪FACS Calibur(美国BD公司生产)、离心机(上海仪器厂生产)、肝功能生化检测仪(日立7170型全自动生化分析仪); CD34单克隆抗体、异硫氰酸荧光素标记CD34蛋白抗体(CD34/FITC)(北京博奥森生物技术有限公司)、红细胞裂解液(杭州博日科技有限公司)、PBS液等.

1.2 方法

1.2.1 肝硬化肝脏损害严重程度: 应用Child-Pugh分级积分评估. 按肝性脑病、腹水、总胆红素、白蛋白、凝血酶原时间进行评分. A级5-6分, 肝功能较好, 为12例; B级7-9分, 肝功能中等, 为11例; C级10-15分, 肝功能损害严重, 为8例.

1.2.2 流式细胞仪检测骨髓液CD34+的表达: 所有患者取髂后上棘为穿刺点进行骨髓穿刺术抽取骨髓血3 mL, 骨髓液用肝素抗凝, 肝素钠用量为100 kU/L. FITC标记的CD34+单克隆抗体10 μ L加入100 μ L骨髓液. 样本置于常温下孵化30 min, 然后加入2 mL红细胞裂解液常温下反应10 min,

1 000 r/min离心后弃废液, PBS液洗细胞2次, 上机检测.

统计学处理 所有数据分析均应用SPSS17.0统计软件分析. 所得数据以mean \pm SD表示, 率的比较采用独立样本 t 检验; 多个率的比较采用单因素方差分析, $P<0.05$ 认为有统计学意义.

2 结果

2.1 肝炎肝硬化患者骨髓液CD34+细胞占单个核细胞的百分数 按照Milan法FITC染色检测肝炎肝硬化患者骨髓液CD34+细胞占单个核细胞的百分数, 流式细胞仪检测结果如图1所示.

2.2 肝硬化组与对照组骨髓液CD34+细胞占单个核细胞比例 骨髓液CD34+细胞占单个核细胞的比例在肝炎肝硬化组和对照组分别是1.87% \pm 0.53%和6.30% \pm 2.48%($t=3.906$, $P<0.01$).

2.3 不同肝功能状态下骨髓液CD34+细胞占单个核细胞比例 对于肝硬化组, 在按Child-Pugh分级的A级、B级、C级三组中骨髓CD34+细胞占单个核细胞的比例分别是7.01% \pm 2.10%、4.58% \pm 2.56%和7.72% \pm 1.49%($F=3.586$, $P>0.05$).

3 讨论

造血干细胞是人体造血组织中能自我更新, 又能分化产生各系血细胞的一类细胞, 同时具有多向分化和修复组织损伤的能力. CD34抗原是人们普遍认同的造血干/祖细胞的代表性表面标志^[2]. 肝硬化作为临床一种常见的由不同病因引起的慢性、进行性、弥漫性肝病, 是多种慢性肝病的共同结果, 肝硬化失代偿期, 通常血小板计数减少^[3]为主的外周血细胞减少. 同时, 肝硬化长时间的慢性肝损伤使得肝脏细胞和胆管细胞大量受损, 试验室检查表现为肝功能减低.

本课题研究表明, 在肝硬化时, 骨髓CD34+造血干细胞在单个核细胞的比例约为6.30%, 而正常人为1.87%. 这与文献所报道^[4]的正常人骨髓低密度单个核细胞中CD34+细胞所占的比例(1%-4%)一致, 肝硬化组与对照组之间的差异有统计学意义($P<0.05$). 可见, 与正常人比较肝硬化病理情况下骨髓CD34+细胞的数量是增加的.

骨髓内CD34+干细胞是多潜能造血干细胞, 他能够自我更新, 并且能分化成外周血中的所有细胞, 包括红细胞, 血小板, 中性粒细胞, 嗜酸/碱性粒细胞, 单核细胞和淋巴细胞^[5]. 外周血细胞受损时, 机体必须不断地产生各类血细胞来补充丢失的细胞, 才能维持外周血细胞的相对

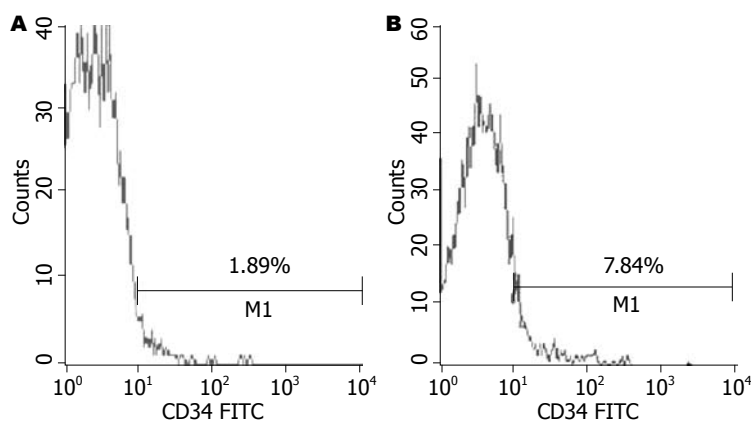


图 1 流式细胞仪检测骨髓液单个核细胞CD34表达. 从对照组和肝硬化患者骨髓液中分离出单个核细胞, 与CD34抗体孵育后用流式细胞仪检测CD34表达. A: 对照组1例患者的流式细胞仪直方图, 显示CD34+细胞占单个核细胞的比例是1.89%; B: 肝硬化组1例患者的流式细胞仪直方图, 显示CD34+细胞占单个核细胞的比例是7.84%.

■创新盘点

本文首次研究发现在肝硬化时骨髓CD34+造血干细胞在单个核细胞的比例约为6.30%, 而正常人为1.87%. 提示肝硬化的情况下骨髓CD34+细胞的数量较正常人是增加的.

恒定, 满足机体生理需要. 目前认为, 所有血细胞都来源于造血干细胞. 因此, 造血干细胞与血液疾病关系密切. CD34+细胞计数可用于临床上骨髓或外周血干细胞移植所采集干细胞数量的估计, 对于造血功能重建的预测以及评价骨髓造血情况有重要作用. Soligo等和Oriani等检测骨髓增生异常综合征(myelodysplastic syndrome, MDS)患者骨髓单个核细胞(BMMNC)中CD34+细胞比例发现, MDS-RA患者CD34+表达率无明显变化, 而MDS-RAEB患者中明显增高, 从而认为CD34+细胞的检测可能作为MDS预后的一个重要价值指标^[6,7]. 肝硬化时外周血细胞减少, 而骨髓造血干细胞表达增加, 是否是由于外周血的减少而引起造血细胞增加并发育成血细胞从而补充肝硬化时受损的血细胞并不清楚. 但肝硬化状态下外周血细胞的祖细胞处于增生状态, 这时有利于补充外周血细胞的丢失. 因此, 肝硬化造血干细胞增加对补充外周血细胞有积极作用. 干细胞的另一重要特征是修复损伤组织的能力. 当组织受损时, 造血干细胞可以分化为相应的细胞来修复受损组织. 肝硬化病理情况下肝脏受损, 造血干细胞可分化为非造血谱系细胞, 例如肝卵圆细胞(hepatic oval cells, HOCs)、肝细胞和胆管细胞^[8-10]从而修复受损肝脏. 造血干细胞修复肝脏, 首先是造血干细胞被SDF-1/CXCR4由骨髓动员到外周血, 由外周血到达受损肝脏^[11,12]. 无论肝脏再生的机制如何, 造血干细胞向受损的肝脏移动起着重要的作用^[13]. 因此, 我们猜测肝硬化时骨髓CD34+造血干细胞增加正是由于外周血细胞减少以及肝脏受损后造血干细胞受到动员后引起的.

但是我们发现随着肝功能Child-Pugh分级不同, 肝功能为A级、B级、C级的患者, 其骨髓CD34+细胞在单个核细胞所占的比例分别为7.01%、4.58%、7.72%, 三者之间差异无统计学

意义($P>0.05$). 这说明随着肝脏损伤程度不同, 骨髓CD34+细胞的表达无明显改变. 这也意味着随着肝硬化患者外周血细胞减少的加重和肝脏损害程度的加重, 骨髓CD34+细胞的数目并没有更加增多, 骨髓对于外周血细胞减少和肝脏损害的代偿能力受到了限制. 而至于A、B、C三级患者其骨髓CD34+细胞水平没有明显差异的原因, 值得进一步的研究.

肝硬化失代偿期, 一方面, 肝细胞大量受损; 另一方面, 外周血细胞减少. 此时骨髓造血干细胞可能参与了的外周血细胞减少的补偿以及受损的肝脏的修复. 因此, 肝硬化时骨髓CD34+造血干细胞表达增加对机体的恢复有积极的作用. 然而, 肝硬化患者虽有机体干细胞自我修复能力, 但由于引起肝硬化的病因未解除, 骨髓CD34+造血干细胞表达不再进一步增加, 最终肝硬化多数患者病情会进一步进展.

4 参考文献

- 1 党双锁. 肝硬化失代偿期外周血细胞减少成因机制. 世界华人消化杂志 2007; 15: 2861-2864
- 2 Yao CL, Chu IM, Hsieh TB, Hwang SM. A systematic strategy to optimize ex vivo expansion medium for human hematopoietic stem cells derived from umbilical cord blood mononuclear cells. *Exp Hematol* 2004; 32: 720-727
- 3 Toghiani PJ, Green S. Splenic influences on the blood in chronic liver disease. *Q J Med* 1979; 48: 613-625
- 4 Silvestri F, Banavali S, Baccarani M, Preisler HD. The CD34 hemopoietic progenitor cell associated antigen: biology and clinical applications. *Haematologica* 1992; 77: 265-273
- 5 Shizuru JA, Negrin RS, Weissman IL. Hematopoietic stem and progenitor cells: clinical and preclinical regeneration of the hematolymphoid system. *Annu Rev Med* 2005; 56: 509-538
- 6 Soligo DA, Oriani A, Annaloro C, Cortelezzi A, Calori R, Pozzoli E, Nosella D, Orazi A, Deliliers GL. CD34 immunohistochemistry of bone marrow biopsies: prognostic significance in primary myelodysplastic syndromes. *Am J Hematol* 1994; 46: 9-17
- 7 Oriani A, Annaloro C, Soligo D, Pozzoli E,

■应用要点

本实验研究发现在肝硬化这种病理状态下, 骨髓的造血干细胞也出现了代偿性增生, 检测CD34+对于判断骨髓的增生状态有意义. 对于在肝硬化时造血干细胞受何种因素调控的机制有待进一步研究.

■同行评价

本文选题较新, 设计合理, 对临床医师有较好的参考价值。

- Cortelezzi A, Lambertenghi Delilieri G. Bone marrow histology and CD34 immunostaining in the prognostic evaluation of primary myelodysplastic syndromes. *Br J Haematol* 1996; 92: 360-364
- 8 Petersen BE, Bowen WC, Patrene KD, Mars WM, Sullivan AK, Murase N, Boggs SS, Greenberger JS, Goff JP. Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. *Science* 1999; 284: 1168-1170
- 9 Alison MR, Poulson R, Jeffery R, Dhillon AP, Quaglia A, Jacob J, Novelli M, Prentice G, Williamson J, Wright NA. Hepatocytes from non-hepatic adult stem cells. *Nature* 2000; 406: 257
- 10 Theise ND, Nimmakayalu M, Gardner R, Illei PB, Morgan G, Teperman L, Henegariu O, Krause DS. Liver from bone marrow in humans. *Hepatology* 2000; 32: 11-16
- 11 Lapidot T, Petit I. Current understanding of stem cell mobilization: the roles of chemokines, proteolytic enzymes, adhesion molecules, cytokines, and stromal cells. *Exp Hematol* 2002; 30: 973-981
- 12 Petit I, Szyper-Kravitz M, Nagler A, Lahav M, Peled A, Habler L, Ponomaryov T, Taichman RS, Arenzana-Seisdedos F, Fujii N, Sandbank J, Zipori D, Lapidot T. G-CSF induces stem cell mobilization by decreasing bone marrow SDF-1 and up-regulating CXCR4. *Nat Immunol* 2002; 3: 687-694
- 13 Dalakas E, Newsome PN, Harrison DJ, Plevris JN. Hematopoietic stem cell trafficking in liver injury. *FASEB J* 2005; 19: 1225-1231

编辑 曹丽鸥 电编 何基才

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2010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^[1]报告……,潘伯荣等^[2-5]认为……;PCR方法敏感性高^[6-7]。文献序号作正文叙述时,用与正文同号的数字并排,如本实验方法见文献[8]。所引参考文献必须以近2-3年SCIE, PubMed,《中国科技论文统计源期刊》和《中文核心期刊要目总览》收录的学术类期刊为准,通常应只引用与其观点或数据密切相关的国内外期刊中的最新文献,包括世界华人消化杂志(<http://www.wjgnet.com/1009-3079/index.jsp>)和World Journal of Gastroenterology(<http://www.wjgnet.com/1007-9327/index.jsp>)。期刊: 序号, 作者(列出全体作者), 文题, 刊名, 年, 卷, 起页-止页, PMID编号; 书籍: 序号, 作者(列出全部), 书名, 卷次, 版次, 出版地, 出版社, 年, 起页-止页。

蛋白酶激活受体-2在原发性肝癌组织中的表达

海鸥, 谢立群, 李 轩, 郑艳敏, 周 静

海鸥, 武警北京总队医院 北京市 100027
谢立群, 李轩, 郑艳敏, 周静, 武警医学院附属医院消化内科
天津市 300162
武警医学院博士启动基金资助项目, No. WBS 2007-1
作者贡献分布: 此课题由谢立群设计; 研究过程由海鸥操作完成; 研究所用试剂由郑艳敏与周静负责购买; 数据分析由海鸥与李轩完成; 本论文写作由海鸥完成。
通讯作者: 谢立群, 副教授, 博士, 硕士生导师, 300162, 天津市, 武警医学院附属医院消化内科. xieliquan66@hotmail.com
收稿日期: 2010-03-25 修回日期: 2010-06-04
接受日期: 2010-06-07 在线出版日期: 2010-07-18

Expression of proteinase-activated receptor-2 in primary hepatic carcinoma

Ou Hai, Li-Qun Xie, Xuan Li, Yan-Min Zheng, Jing Zhou

Ou Hai, Beijing Corps Hospital of Chinese People's Armed Police Forces, Beijing 100027, China
Li-Qun Xie, Xuan Li, Yan-Min Zheng, Jing Zhou, Department of Gastroenterology, the Affiliated Hospital of Medical College of Chinese People's Armed Police Forces, Tianjin 300162, China
Supported by: the Initiate Doctor Foundation of Armed Police Medical college, No. WBS 2007-1
Correspondence to: Associated Professor Li-Qun Xie, Department of Gastroenterology, the Affiliated Hospital of Medical College of Chinese People's Armed Police Force, Tianjin 300162, China. xieliquan66@hotmail.com
Received: 2010-03-25 Revised: 2010-06-04
Accepted: 2010-06-07 Published online: 2010-07-18

Abstract

AIM: To investigate the expression of proteinase-activated receptor-2 (PAR-2) protein in primary hepatic carcinoma (PHC) and to evaluate its clinical value.

METHODS: Immunohistochemistry and immunofluorescence were used to examine the expression of PAR-2 protein in cancer tissue and cancer-adjacent normal tissue from 41 patients with PHC.

RESULTS: The expression pattern of PAR-2 protein was different between cancer tissue and cancer-adjacent normal tissue. Perinuclear cytoplasmic staining was noted in normal tissue, while cancer tissue showed diffuse cytoplasmic staining. PAR-2 labeling index was significantly

higher in cancer tissue than in normal tissue (92.67 ± 8.53 vs 57.52 ± 7.31 , $P < 0.05$). Although PAR-2 labeling index was higher in hepatocarcinoma than in cholangiocarcinoma, no statistical significance was observed in PAR-2 labeling index between them (141.05 ± 18.36 vs 112.10 ± 10.05 , $P > 0.05$). PAR-2 labeling index was significantly higher in patients with cancer metastasis than in those without cancer metastasis (167.83 ± 8.91 vs 73.25 ± 4.05 , $P < 0.05$).

CONCLUSION: PAR-2 is over-expressed in PHC. PAR-2 expression is closely related with the development and progression of PHC.

Key Words: Primary hepatic carcinoma; Proteinase-activated receptor-2; Receptor; Immunohistochemistry; Immunofluorescence

Hai O, Xie LQ, Li X, Zheng YM, Zhou J. Expression of proteinase-activated receptor-2 in primary hepatic carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(20): 2159-2162

摘要

目的: 研究蛋白酶激活受体-2(PAR-2)在原发性肝癌(PHC)中的蛋白表达水平, 并探讨其临床价值。

方法: 采用免疫组织化学和免疫荧光技术检测41例PHC患者癌组织和癌旁正常组织中PAR-2的蛋白表达水平。

结果: PAR-2在PHC组织及癌旁正常组织中均有不同程度的表达, 癌旁组织主要表现为核周胞质染色, 而肝癌组织呈弥漫性胞质染色。PHC与癌旁组织的表达差异具有显著性意义(92.67 ± 8.53 vs 57.52 ± 7.31 , $P < 0.05$); 不同组织学类型的肝癌表达不均衡, 肝细胞癌高于胆管细胞癌, 但差异无统计学意义(141.05 ± 18.36 vs 112.10 ± 10.05 , $P > 0.05$); 肿瘤转移者高于无转移者, 差异有统计学意义(167.83 ± 8.91 vs 73.25 ± 4.05 , $P < 0.05$)。

结论: PAR-2在PHC中高表达; PAR-2的表达与PHC的发生和发展密切相关。

■背景资料

PAR-2与消化系统肿瘤的关系备受关注。新近发现, PAR-2与肿瘤的增殖、生长、转移具有密切关系, 关于PAR-2对肿瘤的影响作用及其分子机制的研究也越来越, 并取得了新的进展。

■同行评议者

黄志勇, 教授, 华中科技大学同济医院普外科

■研究前沿

PAR-2在肿瘤的增殖、生长、转移中起着关键作用,基于对PAR-2相关的肿瘤治疗新靶点必将成为新的研究热点.

关键词: 原发性肝癌; 蛋白酶激活受体-2; 受体; 免疫组织化学; 免疫荧光

海鹰, 谢立群, 李轩, 郑艳敏, 周静. 蛋白酶激活受体-2在原发性肝癌组织中的表达. 世界华人消化杂志 2010; 18(20): 2159-2162

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/2159.asp>

0 引言

蛋白酶激活受体-2(proteinase activated receptor-2, PAR-2)是与G蛋白相偶联, 含有7个跨膜单位的蛋白酶激活受体家族成员之一, 其复杂多样的生理作用, 独特的激活与灭活方式, 以及在消化系统中的广泛分布, 特别是PAR-2与消化系肿瘤的关系备受关注. 基础研究证实PAR-2与恶性肿瘤的增殖、侵袭转移密切相关. 本实验旨在对PAR-2在原发性肝癌(primary hepatic carcinoma, PHC)及癌旁组织中的表达态势进行研究, 以期明确PAR-2表达特点及与PHC临床病理因素的关系.

1 材料和方法

1.1 材料 标本取自本院肝胆外科2000-2006年肝癌手术后存档的组织石蜡标本41例, 设为肝癌组; 同一标本距肿瘤边缘5 cm以外的肝脏组织设为对照组. 全部病例包括病史、症状指征、胸部X线检查、CT、部分病例经MRI进一步明确诊断. 均经病理证实. 根据1987年国际抗癌联盟(UICC)的肝癌TMN分期方案, 41例中, I期3例, II期9例, III期13例, IV期16例; 依据细胞分型, 肝细胞癌39例, 胆管细胞癌2例, 其中男36例, 女5例, 平均年龄(57.6 ± 3.0)岁, 所有患者术前均未进行任何抗肿瘤治疗. 羊多抗PAR-2(C-17): sc-8205为Santa Cruz公司产品, 购于北京中杉生物技术有限公司; FITC标记抗体、链霉菌抗生物素蛋白-过氧化物酶(SP)免疫组织化学试剂盒、3, 3'-二氨基联苯胺(DAB)显色试剂, 购于福州迈新生物技术开发有限公司.

1.2 方法

1.2.1 标本处理: 41例肝癌手术切除标本. 10%甲醛固定, 石蜡包埋, 常规切片和染色.

1.2.2 免疫组织化学染色: 切片常规脱蜡至水化, PBS液洗; 枸橼酸盐进行热抗原修复12 min; 0.3% H_2O_2 封闭内源性过氧化物酶10 min, 双蒸水清洗; 5%-10%正常山羊血清封闭; 滴加1:50 PAR-2羊多抗, 4℃冰箱过夜, PBS液洗; 滴加生物素标记二抗工作液, 室温孵育10 min, PBS液洗; 滴加辣

根酶标记链霉卵白素工作液, 室温孵育10 min, PBS液洗; 滴加新鲜配置的DAB显色液, 室温下显色, 显微镜下控制显色时间(3-5 min), 蒸馏水洗; 苏木素复染、脱水、透明、中性树胶封片. 用PBS代替一抗作为阴性对照, 以已知的阳性反应组织作阳性对照.

1.2.3 免疫荧光染色: 4 μm 厚石蜡切片, 经脱蜡、水化、热抗原修复、0.3% H_2O_2 封闭内源性过氧化物酶、血清封闭; 滴加一抗, 4℃冰箱过夜, PBS液洗; 滴加FITC荧光标记的二抗孵育(稀释比例1:10), 荧光显微镜观察PAR-2在组织中的表达.

1.2.4 结果判定: PAR-2阳性判定标准为免疫染色阳性物质呈棕黄色, 高倍镜下着色区呈颗粒状或弥漫性, 着色主要定位于胞质中, 胞核内有少量表达, 肿瘤间质未见表达. 用计算机图像分析系统随机选择等面积内(重复3次), 计数癌和癌旁组织PAR-2阳性细胞数, 用标记指数(labeling index, LI)百分比表示.

统计学处理 实验数据采用SPSS11.5统计软件处理, 测定值以 $\text{mean} \pm \text{SD}$ 表示, 成组资料均数比较采用 t 检验, 检验水准 $\alpha = 0.05$, 并进行双侧检验. $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义.

2 结果

2.1 PAR-2 抗体免疫组织化学结果 肝癌组织(图1A)和癌旁正常组织(图1B)中均可见PAR-2表达的阳性细胞, 棕黄色颗粒集中于胞质中; 肝癌组织呈弥漫性胞质染色, 癌旁正常组织巢状分布, 阳性表达减低, 呈核周胞质染色. PHC组织阳性细胞百分比为 92.67 ± 8.53 , 癌旁阳性细胞百分比为 57.52 ± 7.31 , 两组均数差异有统计学意义($t = 8.5891, P < 0.05$). PAR-2在患者不同年龄、性别、肝癌分型以及淋巴结转移中表达情况的比较结果见表1, PAR-2表达与不同患者年龄、性别、肿瘤病理分型无关($P > 0.05$), 但与淋巴结转移密切相关, 差异有统计学意义($P < 0.05$).

2.2 免疫荧光法检测PAR-2表达 荧光显微镜下观察PAR-2在癌旁正常组织中绿色荧光染色较弱(图2A); 肝癌组织中荧光染色明显增强(图2B).

3 讨论

蛋白酶激活受体(proteinase activated receptors, PARs)是与G蛋白相偶联、含有7个跨膜单位的受体家族成员, 现已发现PAR-1、PAR-2、PAR-3、PAR-4四种亚型^[1]. 人类编码PAR-2的基因位于5q13染色体, 其中编码人类以及小鼠

■相关报道
越来越多的研究表明, 在众多的肿瘤细胞中都有PAR-2表达, 且强度高于正常组织细胞, 学者们认为激活的PAR-2很可能通过下游的信号通路促进了肿瘤的增殖和转移。

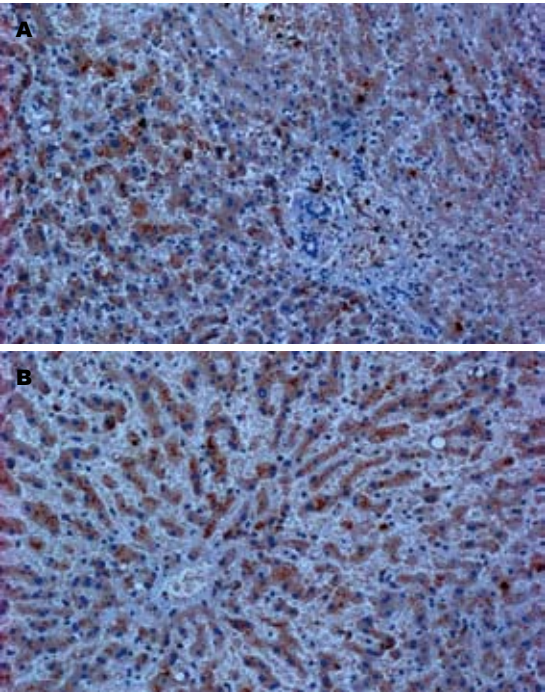


图 1 PAR-2抗体免疫组织化学结果(SP×200). A: 原发性肝癌组织呈弥漫性胞质染色; B: 癌旁组织中呈核周胞质染色.

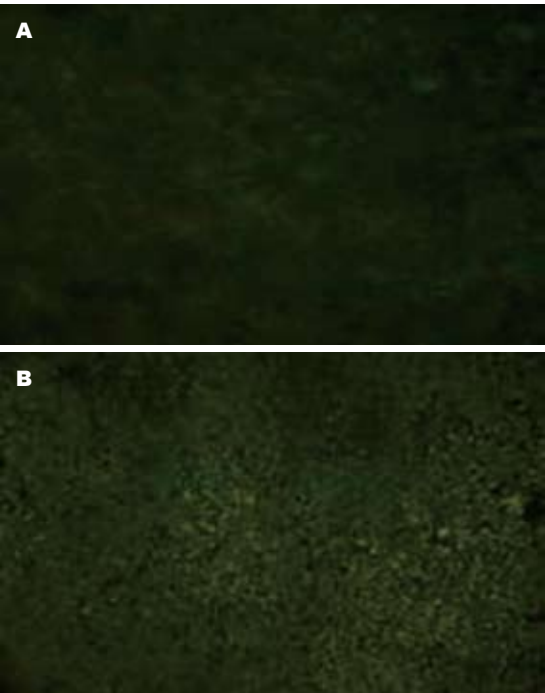


图 2 PAR-2在肝癌及癌旁组织中的表达(免疫荧光染色×200). A: 癌旁组织中呈弱表达; B: 肝癌组织中表达增强.

PAR-2的基因结构相似, 均为双外显子. 在蛋白水平, PAR-2是开放阅读框编码397个氨基酸的跨膜蛋白, 与小鼠PAR-2的同源性为83%, 与大鼠PAR-2的同源性为85%. 在分子水平, 这类受体均由细胞外区(N-末端和细胞外袢)、跨膜区(7个跨膜螺旋)及细胞内区(细胞内袢和C-末端)

表 1 不同临床特征肝癌患者PAR-2的表达结果比较(mean±SD)		
分类	n	PAR-2标记指数(LI%)
性别		
男	36	101.23±8.60
女	5	76.54±4.65
年龄(岁)		
<50	19	87.63±6.25
≥50	22	92.32±7.55
病理分型		
肝细胞肝癌	39	141.05±18.36
胆管细胞癌	2	112.10±10.05
淋巴结转移		
有	16	167.83±8.91 ^a
无	25	73.25±4.05

^aP<0.05 vs 无淋巴结转移.

组成. 含7个跨膜螺旋是该类受体的共同结构特点. C-末端与受体失敏(desensitization)和信号转导有关; N-末端含有相应受体的蛋白酶裂解位点, 同时细胞外袢2在PAR-2激活中也起到关键作用^[2]. PAR-2作为胰蛋白酶、类胰蛋白酶、凝血因子VIIa、Xa和其他未知蛋白水解酶的受体, 易暴露于能使其激活的蛋白酶中, 是许多消化系腺体外分泌的直接调控者, 影响消化功能, 与消化系疾病关系密切, 是一类具有正负多功能的细胞因子受体, 可被人工合成的5-6个外源性氨基酸合成肽裂解, 激活后可产生多种生物学效应. 这类人工合成的小分子多肽被称为PAR-2激动剂. 通过对人工合成多肽氨基端和羧基端的结构修饰, 现已设计合成多种PAR-2激动剂(PAR-2-activated peptide, PAR-2-AP), 主要包括NH₂-SLIGKV和tc-LIGRLO, 已被广泛应用于各项研究, 他们能够在体内外重复相应配体的所有作用, 部分结果已在PAR-2基因敲除的小鼠中得到证实^[3]. PAR-2广泛分布于消化系统各种组织和细胞, 其中包括肿瘤细胞. 实验证实PAR-2的生物活性与肿瘤的发生发展密切相关, 具有促进炎症、抑制肿瘤细胞凋亡、促进肿瘤血管生长、增强肿瘤细胞侵袭能力等作用^[4-8]. 我们前期体外实验将设计合成的PAR-2激动剂(2f-LIGRLO-NH₂)作用于肝脏肿瘤细胞(HepG2), 发现PAR-2高表达的肿瘤细胞, 其细胞生长能力增强, 不仅能够促进凋亡抑制、增强促血管内皮细胞迁移能力, 而且能够明显增强基质金属蛋白酶-2(matrix metalloproteinase-2, MMP-2)、表皮生长因子受体(epidermal growth factor

■同行评价

本文选题较新, 结果可靠, 对研究PAR-2在肝癌组织上的表达及与肝癌患者临床病例特征的关系有重要意义。

receptor, EGFR)、血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)等多种参与肿瘤生长及血管生成的相关因子表达. 应用PAR-2拮抗剂(LRGILS-NH₂)则抑制肿瘤细胞的生长和转移.

镜下观察发现PHC组织中PAR-2阳性细胞表达量及表达强度高于癌旁正常组织. 说明PAR-2蛋白表达与PHC存在密切联系. 不同组织学类型的肝癌表达不均衡, 肝细胞癌略高于胆管细胞癌, 两者差异并无统计学意义, 然而PAR-2表达水平有随原发瘤分化程度高而阳性表达减低的趋势, 可能与不同细胞分型PHC的不同生物学特性、发展机制以及不同的信号通路有关; 分化较好的癌细胞与正常的肝脏细胞相似, PAR-2表达量少; 分化较差的癌细胞异型性明显, 常有巨核瘤细胞出现, PAR-2着色很强. 此外, 肿瘤细胞远处转移者显著高于无转移者. 进一步从不同角度证实了PAR-2对恶性肿瘤发生和进展的推动作用. 推测其促进机制可能在于: (1)胰蛋白酶裂解后激活PAR-2, 使细胞内Ca²⁺动员, 转活表皮生长因子受体(EGFR), 进而激活经典ras依赖的ERK1/2通路, ERK1/2移位于细胞核并激活核蛋白, 引起DNA复制、细胞增殖效应^[9]; (2)胰蛋白酶激活PAR-2促进蛋白激酶C(PKC)依赖的MAP激酶级联反应, 促进Ca²⁺活动和肿瘤细胞的有丝分裂^[10]; (3)PAR-2激活后与TF共同作用特异性上调IL-8的表达, 导致细胞迁移效果明显增强^[11]; (4)PAR-2激活后可诱导Jun激活区域凝集蛋白1(Jun activation domain-binding protein 1, Jab1)的蛋白修饰作用, 使细胞骨架成份在细胞内重新分布, 以致膜表达蛋白被降解进入胞质^[12]. PAR-2表达和在细胞内定位异常是否意味着肿瘤的恶性程度更高、侵袭力更强, 也更加容易出现淋巴结转移, 这一定论需要更为深入的探索. 上述依据有力的证实PAR-2与恶性肿瘤的侵袭转移密切相关, 因此, 对PAR-2的研究有助于筛选出一类新的有临床应用价值的肿瘤学标志物, 并有可能成为肿瘤

治疗的新靶点.

4 参考文献

- 1 Kawabata A. [Physiological functions of protease-activated receptor-2] *Nippon Yakurigaku Zasshi* 2003; 121: 411-420
- 2 Cottrell GS, Amadesi S, Schmidlin F, Bunnett N. Protease-activated receptor 2: activation, signalling and function. *Biochem Soc Trans* 2003; 31: 1191-1197
- 3 Vergnolle N. Clinical relevance of proteinase activated receptors (pars) in the gut. *Gut* 2005; 54: 867-874
- 4 Steinhoff M, Buddenkotte J, Shpacovitch V, Rattenholl A, Moormann C, Vergnolle N, Luger TA, Hollenberg MD. Proteinase-activated receptors: transducers of proteinase-mediated signaling in inflammation and immune response. *Endocr Rev* 2005; 26: 1-43
- 5 Ossovskaya VS, Bunnett NW. Protease-activated receptors: contribution to physiology and disease. *Physiol Rev* 2004; 84: 579-621
- 6 胡新红, 周红, 王婷. 蛋白酶激活受体1和2在结肠癌细胞的表达及其作用初探. *江苏大学学报(医学版)* 2007; 17: 23-27
- 7 Jahan I, Fujimoto J, Alam SM, Sato E, Sakaguchi H, Tamaya T. Role of protease activated receptor-2 in tumor advancement of ovarian cancers. *Ann Oncol* 2007; 18: 1506-1512
- 8 Caruso R, Pallone F, Fina D, Gioia V, Peluso I, Caprioli F, Stolfi C, Perfetti A, Spagnoli LG, Palmieri G, Macdonald TT, Monteleone G. Protease-activated receptor-2 activation in gastric cancer cells promotes epidermal growth factor receptor trans-activation and proliferation. *Am J Pathol* 2006; 169: 268-278
- 9 DeFea KA, Zalevsky J, Thoma MS, Déry O, Mullins RD, Bunnett NW. beta-arrestin-dependent endocytosis of proteinase-activated receptor 2 is required for intracellular targeting of activated ERK1/2. *J Cell Biol* 2000; 148: 1267-1281
- 10 van der Merwe JQ, Moreau F, MacNaughton WK. Protease-activated receptor-2 stimulates intestinal epithelial chloride transport through activation of PLC and selective PKC isoforms. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2009; 296: G1258-G1266
- 11 Schaffner F, Ruf W. Tissue factor and PAR2 signaling in the tumor microenvironment. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2009; 29: 1999-2004
- 12 Luo W, Wang Y, Hanck T, Stricker R, Reiser G. Jab1, a novel protease-activated receptor-2 (PAR-2)-interacting protein, is involved in PAR-2-induced activation of activator protein-1. *J Biol Chem* 2006; 281: 7927-7936

编辑 曹丽鸥 电编 何基才

腹腔镜解剖性肝切除术治疗肝癌16例

王 恺, 徐 智, 黄明文, 罗志强, 方 路, 姜思源, 邹书兵

王恺, 徐智, 黄明文, 罗志强, 方路, 姜思源, 邹书兵, 南昌大学第二附属医院肝胆外科 江西省南昌市 330006
江西省卫生厅科技计划基金资助项目, No. 20043055
作者贡献分布: 王恺与黄明文对此文所作贡献均等; 此课题由黄明文、王恺及徐智共同设计; 研究过程由黄明文、王恺、徐智、罗志强、方路、姜思源及邹书兵操作完成; 数据分析由王恺与徐智完成; 本论文写作由王恺、徐智及黄明文完成。
通讯作者: 黄明文, 副主任医师, 副教授, 330006, 江西省南昌市, 南昌大学第二附属医院肝胆外科. neswk@163.com
收稿日期: 2010-03-05 修回日期: 2010-05-13
接受日期: 2010-05-18 在线出版日期: 2010-07-18

Total laparoscopic anatomical hepatectomy for primary liver cancer: a report of 16 cases

Kai Wang, Zhi Xu, Ming-Wen Huang, Zhi-Qiang Luo, Lu Fang, Si-Yuan Lou, Shu-Bing Zou

Kai Wang, Zhi Xu, Ming-Wen Huang, Zhi-Qiang Luo, Lu Fang, Si-Yuan Lou, Shu-Bing Zou, Department of Hepatobiliary Surgery, the Second Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang 330006, Jiangxi Province, China

Supported by: the Science and Technology Program Foundation of Health Department of Jiangxi Province, No. 20043055

Correspondence to: Associate Professor Ming-Wen Huang, Department of Hepatobiliary Surgery, the Second Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang 330006, Jiangxi Province, China. neswk@163.com

Received: 2010-03-05 Revised: 2010-05-13

Accepted: 2010-05-18 Published online: 2010-07-18

Abstract

AIM: To evaluate the efficacy and safety of total laparoscopic anatomical hepatectomy in the management of primary liver cancer.

METHODS: The clinical data for 16 primary liver cancer patients who underwent total laparoscopic anatomical hepatectomy were analyzed retrospectively.

RESULTS: The operation was successful in all the 16 patients, including 5 undergoing total laparoscopic anatomical left hemihepatectomy and 11 undergoing total laparoscopic anatomical left lateral sectionectomy. The operation time ranged from 90-125 min and the intraoperative blood loss from 50-400 mL. The mean postoperative hospitalization was 7.7 d. No complications

occurred in all cases.

CONCLUSION: Total laparoscopic anatomical hepatectomy is a safe and effective treatment for primary liver cancer.

Key Words: Laparoscopy; Hepatectomy; Primary liver cancer

Wang K, Xu Z, Huang MW, Luo ZQ, Fang L, Lou SY, Zou SB. Total laparoscopic anatomical hepatectomy for primary liver cancer: a report of 16 cases. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(20): 2163-2165

摘要

目的: 探讨完全腹腔镜解剖性肝切除术在原发性肝癌治疗中的作用。

方法: 回顾性分析本单位16例行完全腹腔镜解剖性肝切除手术治疗原发性肝癌的临床资料。

结果: 16例均顺利完成手术。11例行腹腔镜Ⅱ、Ⅲ段肝切除术, 5例行左半肝切除术。手术时间90-125 min, 出血量50-400 mL。平均住院时间7.7 d。无并发症。

结论: 完全腹腔镜解剖性肝脏切除术是原发性肝癌治疗中安全有效的术式。

关键词: 腹腔镜; 肝脏切除术; 原发性肝癌

王恺, 徐智, 黄明文, 罗志强, 方路, 姜思源, 邹书兵. 腹腔镜解剖性肝切除术治疗肝癌16例. *世界华人消化杂志* 2010; 18(20): 2163-2165

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/2163.asp>

0 引言

腹腔镜肝切除术(laparoscopic hepatectomy, LH)是过去十余年肝脏外科手术方法的重要进展之一, 目前应用于越来越多肝脏良、恶性疾病的手术治疗当中。在国内一些医院也相继开展了LH, 但绝大部分病例依然局限在肝脏边缘的局部切除。大多数学者认为, 与每年数万例的开腹肝切除手术相比, LH尤其是完全腹腔镜下的解剖性肝脏切除目前仍被认为是一项难度高、风

■背景资料

腹腔镜肝切除相对于传统开腹肝切除的优势明显, 也越来越受到重视: (1)腹壁切口小, 损伤小, 术后生活质量明显提高; (2)术后疼痛减轻, 有利于早期活动, 缩短住院时间; (3)腹腔镜术后对机体的免疫功能损害开腹手术轻, 有利于早期开展复制治疗。随着技术的不断进步和成熟, 特别是近几年的发展, 腹腔镜肝切除是适应证逐渐扩大, 由最初的小块、良性病灶、边缘性的逐渐扩展到大块、中心性、恶性疾病。

■同行评议者

崔云甫, 教授, 哈尔滨医科大学第二附属医院普外科

■研发前沿

目前腹腔镜肝切除应用较多的是位于Couinaud II、III、IV、V、VI段病灶,此部位的病灶较容易暴露,手术过程也较顺利。其中左外侧叶解剖性肝切除可能成为腹腔镜肝切除的金标准。对于位于肝脏尾状叶、肝膈面的上面及后面的病灶切除,实施腹腔镜肝切除仍较困难。

■创新盘点

本研究采用的解剖性肝切除方法目前被认为是肝癌根治性切除的主要方法,能够最大限度保证切缘阴性,避免经门静脉的肝内转移。在腹腔镜肝切除过程中,采用经肝内Glisson系统阻断目标肝段血流,能减少术中出血,有效保护肝功能。

险大的手术^[1]。2007-12/2009-11我科开展了完全腹腔镜解剖性肝切除术35例,其中16例为原发性肝癌,效果满意,取得一定的经验,现在报道如下。

1 材料和方法

1.1 材料 本组患者共16例,男14例,女2例,年龄41-62(平均年龄58)岁,均具有乙型肝炎病史或长期乙型肝炎病毒携带史。16例经术前影像学检查(CT或MRI)均发现肝脏占位,肿块位于II、II段11例,位于II、IV段5例,病灶直径3.0-5.2 cm。甲胎蛋白>400 μg/L 11例,>200 μg/L 3例,2例正常。术前均诊断原发性肝癌。Child分级为A级10例,B级6例,无明显手术禁忌。

1.2 方法 采用全身麻醉,脐部戳孔置入30度腹腔镜及器械,其余戳孔根据病灶部位位于上腹部适当位置置入,同时兼顾术后需行腹腔引流管的引出。

1.2.1 完全腹腔镜解剖性肝脏II、III段切除:切断肝脏周围韧带,游离肝左叶;控制入肝血流:早期我们采用解剖第一肝门,预置乳胶带方法。近来我们将第II、III段肝门解剖显露段肝蒂,用钛夹予以夹闭。解剖第二肝门,控制出肝血流:第二肝门处,腹腔镜下解剖分离出肝左静脉的主干,并用12 mm钛夹夹闭;按左外侧叶肝段的解剖学标志划定预切线后,用超声刀离断肝实质,对于直径大于2 mm的肝内管道,切断前需用钛夹夹闭。最后用钛夹在肝内夹闭、切断肝左静脉的主干或分支;切除病肝后冲洗肝创面,电灼止血,肝断面喷洒医用生物蛋白胶;常规放置腹腔引流管1根,由腹部左侧穿刺孔引出并固,切除标本装入标本袋,将剑突下或脐下缘戳孔扩大到3-5 cm后取出。

1.2.2 完全腹腔镜左半肝切除术:超声刀切断肝脏周围韧带,游离肝左叶;解剖第一肝门分离出肝左动脉、左肝管和门静脉左支,镜下分别结扎或钛夹夹闭;在接近第二肝门处,分离出左肝静脉,腔镜下用钛夹夹闭,或镜下将其缝扎。肝实质及断面处理同II、III段切除。切除标本装入标本袋,将剑突下或脐下缘戳孔扩大到5-7 cm后取出。置引流管于网膜孔引流,经右侧平脐戳孔引出体外。在肝断面附近置引流管,经左侧平脐戳孔引出体外,结束手术。

2 结果

2.1 手术情况 16例患者手术过程均顺利,其中11例行腹腔镜II、III段切除,5例行腹腔镜左半

肝切除,无中转开腹及延长小切口,手术时间90-125 min,出血量50-400 mL,未发生不能控制的出血,术中未输血制品。术后病理报告均为肝细胞性肝癌。

2.2 术后恢复及随访情况 术后第1天即进饮食和下床活动,术后3-5 d拔除腹腔引流管,患者恢复顺利,无并发症,切口愈合良好,平均住院7.7 d。随访2-24 mo,尚未发现复发或死亡病例。

3 讨论

多个临床资料均认为腹腔镜肝切除术能降低术中出血量及输血需求,同时能减少住院时间,进食时间提前,术后疼痛减轻以及由术后疼痛所致对镇痛药物的需求也降低^[2,4]。目前已有临床资料的Meta分析及系统性综述初步证明了腹腔镜肝切除术在治疗肝脏良、恶性疾病中的良好效果^[5,6]。

但与肝脏的良性疾病不同,肝癌不能像良性疾病可以紧贴病灶来切除,肝癌的切缘要求干净,否则,极易复发。而腹腔镜下无法用手来触摸以确定肿瘤的边界,不容易达到根治性切除。另外还有诸如在肝癌手术时的切口或戳孔种植、气体栓塞等可能存在的缺点,仍有学者对腹腔镜肝切除在肝癌治疗中的应用持保留意见^[7]。但我们的资料显示,腹腔镜肝切除手术的肝癌患者术后恢复较快,住院时间短,而且短期随访结果令人鼓舞。

根据复习文献及我们的临床体会,目前我们主要对于肿瘤局限于左侧肝脏,包膜完整或肿块无破裂的患者施行腹腔镜肝切除术。与右肝相比,左半肝位置表浅,血流控制较易,腹腔镜左肝切除手术难度较腹腔镜右肝切除术要小。因此,在开展完全腹腔镜下肝脏切除的初期,我们首选施行肝脏II、III、IV段的切除。

腹腔镜肝癌切除手术首先必须严格把握腹腔镜肝癌切除手术适应证。术者应从影像学资料中判断是否符合手术适应证及肝脏切除的范围,按要求切缘需距肿瘤1-2 cm。手术时,须先由脐缘下切口置入套管和腹腔镜进行探查,根据病灶的具体情况,术中可明确是否符合手术适应证。如有不符合适应证的需及时中转开腹。

由于无法使用开腹肝脏切除术的血流控制技术,出血是腹腔镜肝切除术中最难解决的问题。因此控制出血是手术成功的关键。游离肝脏是手术的第一步,充分游离可以保障即使有出血等突发情况,也能方便及时的进行妥善处理。我们在手术中主要采用了腹腔镜下区域性肝血

流阻断技术. (1)阻断入肝血流: 本组中有5例行解剖性左半肝切除, 分离解剖出肝左动脉、左肝管和门静脉左支并予以夹闭或结扎. 本组另有11例左肝Ⅱ、Ⅲ段切除, 开展初期我们使用乳胶带行第一肝门阻断, 取得良好效果. 近来, 我们进行Ⅱ、Ⅲ段Glisson蒂的解剖显露, 对其进行夹闭, 有效地控制了手术区域肝断面的出血, 同时又避免了非手术区域肝组织的缺血损伤, 较好的保护了肝脏功能. 有作者报道使用腹腔镜肝门阻断器, 能简化手术过程, 缩短手术时间^[8]. (2)阻断出肝血流: 在接近第二肝门处, 腔镜下分离、夹闭左肝静脉.

由于气腹的原因, 若术中肿瘤破溃, 将易使肿瘤细胞在腹腔中播散. 因此, 手术动作切忌粗暴, 务必轻柔. 若术中暴露困难, 腔镜下操作易出现肿瘤破裂, 将给患者带来更大伤害, 此时中转开腹是明智的选择.

完全腹腔镜下肝切除已经是一种安全、有效的手术方法, 同时也是腹腔镜肝切除发展的最终方向. 但其手术方法复杂, 需要特殊的腹腔镜器械, 而且由于腹腔镜下难以应用开腹肝切除的技巧及经验, 因此对于开展腹腔镜下腹腔实质性器官手术经验少的单位来说在技术上要求较高. 根据我们的经验^[9], 对于初次开展该项技术的单位及手术者宜从腹腔镜辅助肝切除术开始, 逐渐熟悉镜下肝脏解剖及切肝技术.

完全腹腔镜手术能充分体现腹腔镜手术的创伤小、恢复快的优点, 是手术治疗原发性肝癌安全有效的方法.

4 参考文献

- 1 刘荣, 胡明根. 腹腔镜肝段切除的难点与对策. 中国普外基础与临床杂志 2007; 14: 510-511
- 2 Koffron AJ, Auffenberg G, Kung R, Abecassis M. Evaluation of 300 minimally invasive liver resections at a single institution: less is more. *Ann Surg* 2007; 246: 385-392; discussion 392-394
- 3 Kokkalera U, Ghellai A, Vandermeer TJ. Laparoscopic hepatic caudate lobectomy. *J Laparoendosc Adv Surg Tech A* 2007; 17: 36-38
- 4 刘荣, 胡明根, 赵向前, 董家鸿, 黄志强. 完全腹腔镜肝切除的临床应用价值(附123例经验总结). 腹腔镜外科杂志 2006; 11: 479-481
- 5 Belli G, Fantini C, D'Agostino A, Cioffi L, Langella S, Russolillo N, Belli A. Laparoscopic versus open liver resection for hepatocellular carcinoma in patients with histologically proven cirrhosis: short- and middle-term results. *Surg Endosc* 2007; 21: 2004-2011
- 6 Simillis C, Constantinides VA, Tekkis PP, Darzi A, Lovegrove R, Jiao L, Antoniou A. Laparoscopic versus open hepatic resections for benign and malignant neoplasms--a meta-analysis. *Surgery* 2007; 141: 203-211
- 7 Gagner M, Rogula T, Selzer D. Laparoscopic liver resection: benefits and controversies. *Surg Clin North Am* 2004; 84: 451-462
- 8 江文枢, 卢榜裕, 蔡小勇, 陆文奇, 黄飞, 刘祖军, 靳小建. 腹腔镜左半肝切除术28例报告. 中国实用外科杂志 2008; 28: 128-129
- 9 黄明文, 刘大仁, 郭林泉, 罗志强, 殷香保, 邹书兵, 邵江华. 腹腔镜下肝部分切除术10例报告. 江西医学院学报 2008; 48: 63-65

■同行评价

本文资料详实完整, 结果可信, 有一定的临床意义.

编辑 李军亮 电编 何基才

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2010年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

《2009年版中国科技期刊引证报告》(核心版)发布 《世界华人消化杂志》2008年影响因子 0.547

本刊讯 中国科学技术信息研究所发布2008年《世界华人消化杂志》的总被引频次为2 480, 位居1 868种中国科技论文统计源期刊的第100位, 41种内科学类期刊的第6位. 2008年《世界华人消化杂志》的影响因子为0.547, 41种内科学类期刊的第17位. 大家最为关注的是《2009年版中国科技期刊引证报告》(核心版)中新增一个综合评价指标, 即综合评价总分, 该指标根据科学计量学原理, 系统性地综合考虑被评价期刊的各影响力指标(总被引频次、影响因子、他引率、基金论文比、引文率等)在其所在学科中的相对位置, 并按照一定的权重系数将这些指标进行综合集成, 对期刊进行综合评价. 《世界华人消化杂志》总分为49.5, 在41种内科学类期刊中排名第8位, 在1 868种中国科技期刊排名第341位. (编辑部主任: 李军亮 2010-01-08)

肝胆恶性肿瘤皮肤转移8例

刘 博, 黄晓强, 王 敬, 董家鸿, 黄志强

■背景资料

恶性肿瘤皮肤转移可见于血液或淋巴管途径的自然转移,也可以见于穿刺或手术后的种植转移。自然途径的皮肤转移是肿瘤的晚期表现,皮肤种植转移是肿瘤有创诊断和治疗的严重迟发并发症。

刘博, 黄晓强, 王敬, 董家鸿, 黄志强, 中国人民解放军总医院肝胆外科 北京市 100853

作者贡献分布: 此课题刘博、黄晓强、王敬、董家鸿及黄志强设计; 研究过程和随访由刘博操作完成; 本论文写作由刘博完成。

通讯作者: 刘博, 副主任医师, 副教授, 硕士生导师, 100853, 北京市, 中国人民解放军总医院肝胆外科. jnliubo@sohu.com

电话: 010-66935569

收稿日期: 2010-03-12 修回日期: 2010-06-10

接受日期: 2010-06-22 在线出版日期: 2010-07-18

Hepatobiliary malignancies with cutaneous metastases: an analysis of 8 cases

Bo Liu, Xiao-Qiang Huang, Jing Wang, Jia-Hong Dong, Zhi-Qiang Huang

Bo Liu, Xiao-Qiang Huang, Jing Wang, Jia-Hong Dong, Zhi-Qiang Huang, Department of Hepatobiliary Surgery, Chinese PLA General Hospital, Beijing 100853, China

Correspondence to: Associate Professor Bo Liu, Department of Hepatobiliary Surgery, Chinese PLA General Hospital, Beijing 100853, China. jnliubo@sohu.com

Received: 2010-03-12 Revised: 2010-06-10

Accepted: 2010-06-22 Published online: 2010-07-18

Abstract

AIM: To analyze the clinical characteristics and therapeutic outcomes of 8 cases of hepatobiliary malignancies with cutaneous metastases.

METHODS: From June 2006 to June 2009, eight patients with cutaneous metastases from hepatobiliary malignancies were treated at our hospital. By retrospectively reviewing the clinical data for these patients, the clinical characteristics, treatment and prognosis of this disease were summarized.

RESULTS: One patient with hepatocellular carcinoma (HCC) presenting as obstructive jaundice caused by bile duct tumor thrombi developed cutaneous metastasis at the port site 20 mo after percutaneous transhepatic biliary drainage (PTBD). The patient had survived 16 mo after resection of the port-site tumor and showed no recurrence. One HCC patient developed tumor at the incision site 9 mo after abdominal exploration. After the skin and liver tumors were excised, the patients survived 8 mo. One patient

with combined HCC and cholangiocellular carcinoma developed multiple cutaneous metastases of cholangiocellular carcinoma and survived 8 mo. Two patients with cholangiocarcinoma and solitary nodular cutaneous metastasis received skin tumor excision and survived 8 and 10 mo, respectively. Of three patients with cholangiocarcinoma and multiple cutaneous metastases, one received chemotherapy and survived 6 mo, and the other 2 refused any treatment and survived 3 and 4 mo, respectively.

CONCLUSION: Puncture and operation procedures should be improved to avoid seeding metastasis. In patients with hepatobiliary malignancies, solitary nodular cutaneous metastasis has a better prognosis, while multiple cutaneous metastases have a worse prognosis.

Key Words: Hepatobiliary malignancy; Cutaneous; Metastasis

Liu B, Huang XQ, Wang J, Dong JH, Huang ZQ. Hepatobiliary malignancies with cutaneous metastases: an analysis of 8 cases. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(20): 2166-2170

摘要

目的: 分析8例肝胆恶性肿瘤皮肤转移的临床特点及治疗效果。

方法: 回顾分析我院2006-06/2009-06肝细胞癌2例、混合型肝细胞癌和胆管细胞癌1例及胆管癌5例皮肤转移的临床表现和治疗情况及预后。

结果: 1例肝细胞癌胆管癌栓并黄疸, 经皮经肝胆道引流后20 mo皮肤穿刺点种植性转移, 皮肤肿瘤切除后已经存活16 mo无复发; 1例肝细胞癌剖腹探查后9 mo切口皮下发现肿瘤, 行肝脏左叶切除和切口肿瘤切除后存活8 mo; 1例混合型肝细胞癌和胆管细胞癌手术切除后4 mo多发皮肤转移结节病理检查为胆管细胞癌, 化疗后存活3 mo; 2例胆管癌皮肤单发转移, 切除后存活8 mo和10 mo; 3例胆管癌皮肤多发转移患者1例接受化疗存活6 mo, 2例放弃

■同行评议者

孙殿兴, 主任医师, 白求恩国际和平医院肝病科; 吴泰璜, 教授, 山东省立医院肝胆外科

治疗, 分别存活3 mo和4 mo.

结论: 为尽量避免肝胆肿瘤种植转移应改进穿刺和切口保护技术; 肝胆肿瘤单发皮肤转移可手术治疗并有较好效果, 多发皮肤转移应综合治疗, 提高生活质量.

关键词: 肝胆肿瘤; 皮肤; 转移

刘博, 黄晓强, 王敬, 董家鸿, 黄志强. 肝胆恶性肿瘤皮肤转移8例. 世界华人消化杂志 2010; 18(20): 2166-2170
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/2166.asp>

0 引言

肝胆恶性肿瘤皮肤转移临床少见. 中国人民解放军总医院肝胆外科2006-06/2009-06收治肝胆恶性肿瘤皮肤转移患者8例, 我们对其临床资料和预后进行了分析.

1 材料和方法

1.1 材料 8例肝胆恶性肿瘤皮肤转移患者均为男性, 年龄34-73(平均59)岁. 原发肝胆肿瘤病理检查2例为肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC), 1例混合型HCC和胆管细胞癌, 5例胆管癌. HCC皮肤转移组织行Hepa-1染色, 胆管癌皮肤转移组织行特异性CK19染色证实其来源.

1.2 方法 每3 mo对所有8例肝胆恶性肿瘤皮肤转移患者进行定期随访, 详细记录患者存活情况和死亡时间.

2 结果

1例HCC胆管癌栓合并梗阻性黄疸, 等待肝移植期间行经皮经肝胆道引流(percutaneous transhepatic biliary drainage, PTBD), 术后20 mo皮肤穿刺点发现类圆形结节1 cm×1 cm(图1), 皮肤肿瘤切除后已经存活16 mo, 无复发; 1例HCC在当地医院剖腹探查因出血仅取病理9 mo后发现切口皮下肿瘤2.5 cm×2.5 cm(图2), 行肝脏左叶切除和切口肿瘤切除后存活8 mo; 1例为混合型HCC和胆管细胞癌, 行右后叶肝脏切除后4 mo发现多发皮肤转移, 皮肤结节细针穿刺病理检查为胆管细胞癌, 化疗后存活3 mo; 1例肝门部胆管癌行根治切除手术后2 mo发现双肺、头皮和上肢皮肤多发转移, 放弃治疗存活3 mo; 1例肝门部胆管癌就诊时发现颈部单发皮肤肿瘤2 cm×2 cm, 手术切除后存活10 mo; 1例肝门部胆管癌就诊时发现右大腿单发皮肤肿瘤3 cm×2 cm(图3), 行肝门部肿瘤放疗和皮肤转移瘤切除

后存活8 mo; 1例远端肝外胆管癌就诊时CT检查发现腹壁多发皮肤肿瘤, 胆肠吻合及化疗后存活6 mo; 1例远端肝外胆管癌手术后6 mo出现肺转移和多发皮肤转移, 放弃治疗存活4 mo. 8例患者临床资料详见表1.

3 讨论

肿瘤细胞可以经过血液等自然途径转移到皮肤, 也可以经穿刺孔道和切口发生脱落细胞种植转移, 即医源性转移. 自然途径的皮肤转移是肿瘤的晚期表现^[1-3], Krathen等^[4]总结20 380例内脏恶性肿瘤发生皮肤转移的比例为5.3%, 多数生存期不足12 mo. Hu等^[5]统计12 146例恶性肿瘤患者发生皮肤转移124例, 占1.02%. 其中1189例HCC有4例发生皮肤转移, 仅占0.34%, 说明在自然转移途径下肝癌发生皮肤转移并不常见^[6-10]. 但随着肝癌有创检查和治疗的增加, 医源性的肝癌皮肤种植转移病例明显增多^[11-16]. Stigliano等^[11]总结1983-2007年99篇文献报道179例HCC种植转移病例, 多为活检、无水酒精注射和射频消融后种植转移, 发生率分别为2.29%(0%-11%)、1.4%(1.15%-1.85%)和0.61%(0%-5.56%). 本组1例肝癌接受穿刺胆道引流后20 mo穿刺点发现皮肤种植转移, 文献报道多见胆管癌、胰腺癌、十二指肠癌和胆囊癌PTBD后穿刺种植^[17-20], HCC经PTBD穿刺点种植转移实属罕见, 检索文献未见报道. 为了减少穿刺和引流引起种植转移的发生, 在肝胆肿瘤诊断治疗中要严格掌握有创检查治疗指征, 改良穿刺技术. 应尽量采取超声造影、强化CT和核磁共振等非侵袭性的诊断技术, 尽量避免穿刺活检, 穿刺进行PTBD和微波射频等治疗时应改进穿刺技术, 建议使用套管, 拔出穿刺针和引流管后局部皮肤和皮下应该更仔细地擦拭和消毒, 减少肿瘤细胞的穿刺口残留. Liu等^[21]认为腹腔镜下或开腹活检和穿刺治疗肝癌可以明显减少种植转移的机会. 另1例肝癌患者手术后9 mo发现切口种植. 为减少切口种植, 肝癌切除术中应严格无瘤操作. 在手术过程中常易发生肝癌组织破裂细胞脱落, 成为种植转移的潜在危险. 使用切口保护膜可以有效保护切口, 术后蒸馏水冲洗腹腔对术后种植转移的发生有一定的预防作用. 临床医生在对肿瘤患者随访时应注意穿刺点和手术切口的检查, 尽早发现可能的皮肤种植肿瘤. 第1例患者腹壁穿刺点种植转移灶切除后存活已经超过16 mo, 局部无复发, 第2例切

■研发前沿

肝胆恶性肿瘤皮肤转移的生物学和病理学行为特点值得深入研究.

■相关报道

Krathen等总结20 380例内脏恶性肿瘤发生皮肤转移的比例为5.3%。Hu等统计1986-2006年20年间12 146例恶性肿瘤患者发生皮肤转移124例,占1.02%。常见皮肤转移前五位肿瘤是乳腺癌、肺癌、口腔癌、大肠癌和胃癌。按照病理类型分析腺癌皮肤转移率最高占1.46%,鳞癌为0.69%,肝细胞癌为0.34%,移行细胞癌为0.23%。

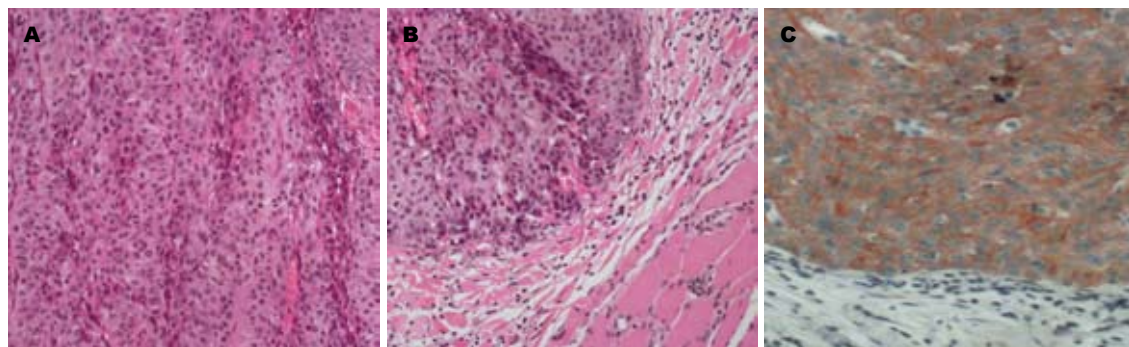


图1 第1例患者肝癌原发灶和皮肤种植肿瘤细胞形态及Hepa-1染色。A: 肝癌原发灶细胞形态, 显示肿瘤细胞为中低分化HCC(HE $\times 100$); B: 穿刺点皮肤种植肿瘤细胞形态, 与HCC形态基本一致, 右下方为皮下结缔组织和骨骼肌(HE $\times 100$); C: 穿刺点皮肤肿瘤细胞Hepa-1染色阳性, 证实为HCC来源(HE $\times 200$)。

表1 8例肝胆恶性肿瘤皮肤转移临床资料

患者	性别	年龄 (岁)	原发灶 治疗方式	病理类型	皮肤转移 部位(单、多发)	皮肤转移 治疗方式	t_1	t_2
1	男	59	肝移植	中低分化HCC	PTBD穿刺点	手术切除	20	>16
2	男	68	左叶肝脏切除	中分化HCC	腹壁切口	手术切除	9	8
3	男	44	右后叶肝脏切除	混合型HCC胆管细胞癌	头皮、右下肢	化疗	4	3
4	男	65	肝门胆管癌根治	中分化胆管癌	头皮、左上肢	放弃	2	3
5	男	34	肝门胆管癌根治	低分化胆管癌	颈部, 单发	手术切除	0	10
6	男	73	肝门胆管癌活检、放疗	中分化胆管癌	右大腿, 单发	手术切除	0	8
7	男	59	胆肠吻合	中低分化胆管癌	腹壁, 多发	化疗	0	6
8	男	67	胆管癌根治	中分化胆管癌	胸壁、腹壁	放弃	6	4

t_1 : 原发病确诊至皮肤转移时间(mo); t_2 : 皮肤转移后生存时间(mo)。

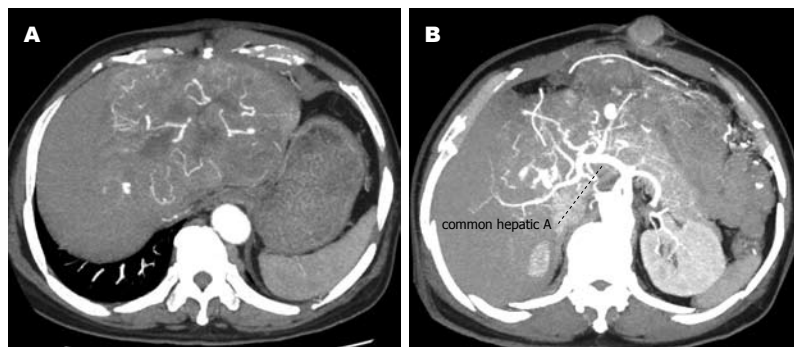


图2 第2例患者原发性肝癌和腹壁切口肿瘤CT表现。A: 肝左叶见12 cm \times 10 cm动脉期增强肿瘤; B: 腹壁见2.5 cm \times 2.5 cm动脉期增强结节。

口种植患者手术后存活8 mo, 局部无复发, 死于肺转移。说明种植转移及时发现仍可取得较好治疗效果。

1例混合HCC和胆管细胞癌与5例胆管癌为通过血液等自然途径发生皮肤转移, 说明胆管癌的浸润和转移具有其自身的特点, 胆管癌比HCC更易发生自然途径的皮肤转移, 这与Hu等^[5]按照病理类型分析腺癌皮肤转移率最高占1.46%, HCC为0.34%, 两者相差4倍的特点相符。Singal等^[22]统计136例胆管癌平均生存期27.3 mo; 本组6例自然途径转移的胆管癌自确诊到发

现皮肤转移的时间为0-6 mo。平均生存时间5.7 mo, 与文献报道平均生存7.5 mo基本一致^[3-5], 证实胆管癌皮肤转移后生存期明显缩短^[23-25]。其中2例以胆管癌原发病临床就诊时即发现皮肤转移, 文献更有以皮肤转移结节和溃疡为胆管癌首发症状的报道^[26], 提示我们在胆管癌患者就诊和随访时注意皮肤检查, 尽可能早地发现皮肤转移, 争取更早地治疗。本组2例胆管癌皮肤单发转移患者, 手术切除后分别生存8 mo和10 mo; 而4例皮肤多发转移胆管癌患者有3例合并肺部转移失去手术机会, 接受化疗2例并未显现明显

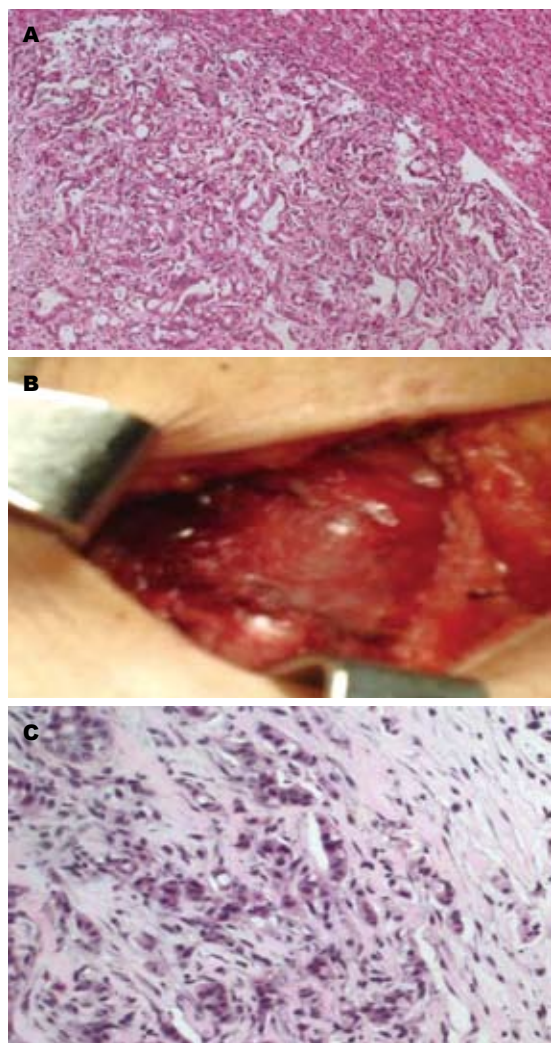


图3 第6例患者肝门部胆管癌细胞形态和腿部转移瘤大体及细胞学形态。A: 肝门部胆管癌原发灶细胞形态, 右上角为肝组织(HE × 100); B: 患者右大腿皮肤转移肿瘤(3 cm × 2 cm); C: 右大腿皮肤转移肿瘤细胞形态, 与原发灶基本一致, 右侧为皮下疏松结缔组织(HE × 100)。

效果, 生存期均不超过6 mo, 胆管癌多发皮肤转移治疗更加困难, 预后更差。

如何更早地发现肝癌和胆管癌经自然途径的皮肤转移和预防穿刺手术引起的种植性皮肤转移, 进一步提高患者生存期和生存质量, 值得更深入研究。

4 参考文献

- 1 Nashan D, Müller ML, Braun-Falco M, Reichenberger S, Szeimies RM, Bruckner-Tuderman L. Cutaneous metastases of visceral tumours: a review. *J Cancer Res Clin Oncol* 2009; 135: 1-14
- 2 Thiers BH, Sahn RE, Callen JP. Cutaneous manifestations of internal malignancy. *CA Cancer J Clin* 2009; 59: 73-98
- 3 Kleyn CE, Lai-Cheong JE, Bell HK. Cutaneous manifestations of internal malignancy: diagnosis and management. *Am J Clin Dermatol* 2006; 7: 71-84
- 4 Krathen RA, Orengo IF, Rosen T. Cutaneous metastasis:

- a meta-analysis of data. *South Med J* 2003; 96: 164-167
- 5 Hu SC, Chen GS, Lu YW, Wu CS, Lan CC. Cutaneous metastases from different internal malignancies: a clinical and prognostic appraisal. *J Eur Acad Dermatol Venerol* 2008; 22: 735-740
- 6 Magaña M, Gomez LM. Skin metastasis from hepatocarcinoma. *Am J Dermatopathol* 2009; 31: 502-505
- 7 Al-Mashat FM. Hepatocellular carcinoma with cutaneous metastasis. *Saudi Med J* 2004; 25: 370-372
- 8 Royer MC, Rush WL, Lupton GP. Hepatocellular carcinoma presenting as a precocious cutaneous metastasis. *Am J Dermatopathol* 2008; 30: 77-80
- 9 Amador A, Monforte NG, Bejarano N, Martí J, Artigau E, Navarro S, Fuster J. Cutaneous metastasis from hepatocellular carcinoma as the first clinical sign. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 2007; 14: 328-330
- 10 Nggada HA, Ajayi NA. Cutaneous metastasis from hepatocellular carcinoma: a rare presentation and review of the literature. *Afr J Med Med Sci* 2006; 35: 181-182
- 11 Stigliano R, Marelli L, Yu D, Davies N, Patch D, Burroughs AK. Seeding following percutaneous diagnostic and therapeutic approaches for hepatocellular carcinoma. What is the risk and the outcome? Seeding risk for percutaneous approach of HCC. *Cancer Treat Rev* 2007; 33: 437-447
- 12 Perkins JD. Seeding risk following percutaneous approach to hepatocellular carcinoma. *Liver Transpl* 2007; 13: 1603
- 13 Tung WC, Huang YJ, Leung SW, Kuo FY, Tung HD, Wang JH, Hung CH, Lee CM, Changchien CS, Yeh SA, Sun LM, Huang EY, Hsu HC, Wang CJ, Lu SN. Incidence of needle tract seeding and responses of soft tissue metastasis by hepatocellular carcinoma postradiotherapy. *Liver Int* 2007; 27: 192-200
- 14 Chang S, Kim SH, Lim HK, Kim SH, Lee WJ, Choi D, Kim YS, Rhim H. Needle tract implantation after percutaneous interventional procedures in hepatocellular carcinomas: lessons learned from a 10-year experience. *Korean J Radiol* 2008; 9: 268-274
- 15 Onodera H, Oikawa M, Abe M, Chida N, Kimura S, Satake K, Motojima T, Goto Y. Cutaneous seeding of hepatocellular carcinoma after fine-needle aspiration biopsy. *J Ultrasound Med* 1987; 6: 273-275
- 16 Koffi E, Moutardier V, Sauvanet A, Noun R, Fléjou JF, Belghiti J. Wound recurrence after resection of hepatocellular carcinoma. *Liver Transpl Surg* 1996; 2: 301-303
- 17 Bloom RA, Gordon RL, Manny Y, Engelberg M. Seeding of cholangiocarcinoma along T-tube tracts. *Gastrointest Radiol* 1984; 9: 167-169
- 18 Balzani A, Clerico R, Schwartz RA, Panetta S, Panetta C, Skroza N, Innocenzi D, Calvieri S. Cutaneous implantation metastasis of cholangiocarcinoma after percutaneous transhepatic biliary drainage. *Acta Dermatovenerol Croat* 2005; 13: 118-121
- 19 St Peter SD, Nguyen CC, Mulligan DC, Moss AA. Subcutaneous metastasis at a surgical drain site after the resection of pancreatic cancer. *Int J Gastrointest Cancer* 2003; 33: 111-115
- 20 Yamakawa T, Itoh S, Hirokawa K, Miyoshi T, Katoh K, Iizumi S, Kawabata K. Seeding of gallbladder carcinoma along the tract after percutaneous transhepatic choledochoscopy. *Am J Gastroenterol* 1983; 78: 649-651
- 21 Liu SY, Lee KF, Lai PB. Needle track seeding: a real

同行评价

本文分析了8例肝胆恶性肿瘤皮肤转移的临床资料, 并对国内外相关报道进行了较详细的综合归纳, 对指导临床有一定的意义。

- hazard after percutaneous radiofrequency ablation for colorectal liver metastasis. *World J Gastroenterol* 2009; 15: 1653-1655
- 22 Singal AG, Rakoski MO, Salgia R, Pelletier S, Welling TH, Fontana RJ, Lok AS, Marrero JA. The clinical presentation and prognostic factors for intrahepatic and extrahepatic cholangiocarcinoma in a tertiary care centre. *Aliment Pharmacol Ther* 2010; 31: 625-633
- 23 Lee BK, Seo YH, Lee NH, Joo SY, Ko HM. [Cholangiocarcinoma with distant cutaneous metastases] *Korean J Gastroenterol* 2009; 54: 342-345
- 24 Lu CI, Wong WR, Hong HS. Distant cutaneous metastases of cholangiocarcinoma: report of two cases of a previously unreported condition. *J Am Acad Dermatol* 2004; 51: S108-S111
- 25 Yanagi T, Matsumura T, Yoshizaki N. Cholangiocarcinoma with skin metastases. *J Am Acad Dermatol* 2007; 56: S58-S60
- 26 Dogan G, Karıncaoglu Y, Karıncaoglu M, Aydin NE. Scalp ulcer as first sign of cholangiocarcinoma. *Am J Clin Dermatol* 2006; 7: 387-389

编辑 李军亮 电编 何基才

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2010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, CN 14-1260/R)是一份同行评议性和开放获取(open access, OA)的旬刊,每月8、18、28号按时出版。具体出版流程介绍如下:

第一步 作者提交稿件: 作者在线提交稿件(<http://www.baishideng.com/wcjd/ch/index.aspx>), 提交稿件中出现问题可以发送E-mail至submission@wjgnet.com咨询, 编务将在1个工作日内回复。

第二步 审稿: 送审编辑对所有来稿进行课题查新, 并进行学术不端检测, 对不能通过预审的稿件直接退稿, 通过预审的稿件送交同行评议专家进行评议。编辑部主任每周一组织定稿会, 评估审稿人意见, 对评审意见较高, 文章达到本刊发表要求的稿件送交总编辑签发拟接受, 对不能达到本刊发表要求的稿件退稿。

第三步 编辑、修改稿件: 科学编辑严格根据编辑规范要求编辑文章, 包括全文格式、题目、摘要、图表科学性和参考文献; 同时给出退修意见送作者修改。作者修改稿件中遇到问题可以发送E-mail至责任科学编辑, 责任科学编辑在1个工作日内回复。为保证文章审稿意见公平公正, 本刊对每一篇文章均增加该篇文章的同行评议者和同行评论, 同时配有背景资料、研发前沿、相关报道、创新盘点、应用要点和名词解释, 供非专业人士阅读了解该领域的最新科研成果。

第四步 录用稿件: 作者将稿件修回后, 编辑部主任组织第2次定稿会, 评估作者修回稿件质量。对修改不合格的稿件通知作者重修或退稿, 对修改合格的稿件送总编辑终审, 合格后发正式录用通知。稿件正式录用后, 编务通知作者缴纳出版费, 出版费缴纳后编辑部安排生产, 并挂号将缴费发票寄出。

第五步 排版制作: 电子编辑对稿件基本情况进行核对, 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, 包括原始文章、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》保证每篇文章从投稿到刊出4 mo内完成。(编辑部主任: 李军亮 2010-01-18)

多发性内分泌腺瘤病 I 型1例

朱磊, 唐彤丹, 赵钢

朱磊, 赵钢, 大连医科大学附属第一医院消化科 辽宁省大连市 116011

唐彤丹, 大连市中心医院急诊科 辽宁省大连市 116033

作者贡献分布: 临床资料收集由朱磊完成, 论文撰写、文献检索由朱磊与唐彤丹完成, 赵钢负责论文修改和审阅。

通讯作者: 朱磊, 主治医师, 116011, 辽宁省大连市, 大连医科大学附属第一医院消化科. trulain@sohu.com

收稿日期: 2010-03-09 修回日期: 2010-06-05

接受日期: 2010-06-07 在线出版日期: 2010-07-18

Diagnosis and treatment of multiple endocrine neoplasia type 1: a report of one case

Lei Zhu, Tong-Dan Tang, Gang Zhao

Lei Zhu, Gang Zhao, Department of Hepatogastroenterology, the First Affiliated Hospital of Dalian Medical University, Dalian 116011, Liaoning Province, China

Tong-Dan Tang, Department of Emergency Medicine, Dalian Municipal Central Hospital, Dalian 116011, Liaoning Province, China

Correspondence to: Lei Zhu, Department of Hepatogastroenterology, the First Affiliated Hospital of Dalian Medical University, Dalian 116011, Liaoning Province, China. trulain@sohu.com

Received: 2010-03-09 Revised: 2010-06-05

Accepted: 2010-06-07 Published online: 2010-07-18

Abstract

We report a case of multiple endocrine neoplasia type 1 presenting as recurrent watery diarrhea, refractory hypokalemia and metabolic acidosis. We analyzed the diagnosis and treatment of this disease to raise awareness of pancreatic endocrine tumors and multiple endocrine neoplasia.

Key Words: Watery diarrhea; Vasoactive intestinal peptide tumor; Multiple endocrine neoplasia

Zhu L, Tang TD, Zhao G. Diagnosis and treatment of multiple endocrine neoplasia type 1: a report of one case. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(20): 2171-2173

摘要

通过对1例表现为反复水样泻、顽固性低钾血症、代谢性酸中毒病例的诊治分析, 提高对胰腺内分泌肿瘤以及多发性内分泌腺瘤病的认识。

关键词: 水样泻; 胰血管活性肠肽瘤; 多发性内分泌腺瘤病

朱磊, 唐彤丹, 赵钢. 多发性内分泌腺瘤病 I 型1例. *世界华人消化杂志* 2010; 18(20): 2171-2173

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/2171.asp>

0 引言

多发性内分泌腺瘤病(multiple endocrine neoplasia, MEN)是指患者身上同时或相继发生两种或两种以上内分泌腺瘤病, 是一种常染色体显性遗传性疾病, 发病率为1/3万-1/5万^[1]. Wermer于1953年首先报道1例胰岛素瘤合并难治性消化性溃疡患者, 故MEN1型又称为Wermer综合征^[2]. 目前认为, MEN1型发病机制主要是由于 $men1$ 基因突变所致^[3]. 本文分析表现为反复水样泻、顽固性低钾血症、代谢性酸中毒患者的诊治过程, 以期提高对胰腺内分泌肿瘤以及MEN的认识。

1 病例报告

男, 79岁. 因“反复腹泻6 mo”于2009-02-19就诊于大连医科大学附属第一医院消化科. 患者6 mo前出现腹泻, 水样泻, 每日数十次, 无黏液脓血, 伴有恶心、呕吐, 上腹隐痛, 腹胀, 无发热, 时有下肢骨痛, 服用蒙脱石、洛哌丁胺、小檗碱等药物效果差. 既往皮下脂肪瘤病史10年, 冠心病病史8年, 行2次经皮冠状动脉介入治疗植入支架5枚. 入院查体: 体温35.5℃, 血压120/80 mmHg, 脉搏84次/分, 精神萎靡, 无力状, 体型消瘦, 皮肤干燥, 颧部潮红. 甲状腺II度大, 左叶可触及直径约2 cm质韧结节, 腹软, 可触及多个皮下质软肿物, 直径2-4 cm, 无压痛反跳痛, 肝脾肋下未触及, 肠鸣音6次/分. 血白细胞 $10.68 \times 10^9/L$, 红细胞 $5.3 \times 10^{12}/L$, 血小板 $218 \times 10^9/L$. 便常规示水样稀便. 血糖6.8 mmol/L. 血电解质: 钾2.57 mmol/L, 钙3.18 mmol/L, 磷0.38 mmol/L, 钠27 mmol/L, 氯90 mmol/L. 血碱性磷酸酶182 mmol/L. 动脉血气分析: pH7.133, HCO_3^- 12.3 mmol/L,

■背景资料

胰腺内分泌肿瘤是一种少见的肿瘤, 大多数胰腺内分泌肿瘤可以分泌多种胃肠激素, 如胰腺血管活性肠肽瘤可以分泌大量的血管活性肠肽, 而产生水样泻、低钾等表现. 另外, 胰腺内分泌肿瘤常作为多发性内分泌腺瘤病的一部分而与甲状腺旁腺、垂体或肾上腺腺瘤合并存在。

■同行评议者

李旭, 副教授, 广东省广州市南方医院急诊科

■应用要点

手术切除是治疗胰VIPoma的最有效方法,对不能切除的患者,使用生长抑素有较好的疗效。



图1 胰腺钩突占位病变。

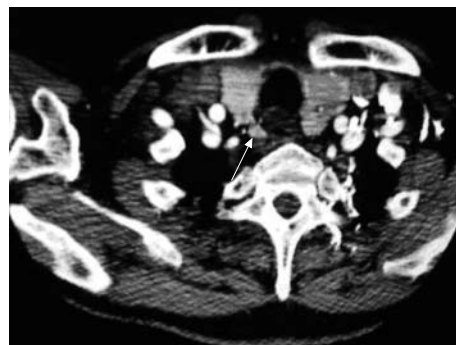


图2 颈部CT示甲状旁腺占位病变。

PaO₂ 94.40 mmHg, BE -16.2 mmol/L. 胃镜: 慢性萎缩性胃炎. 结肠镜未见异常. 全腹CT示胰头钩突部占位病变(图1), 肾上腺无异常, 左肾盏结石. 根据患者有长期反复水样泻、低钾血症、代谢性酸中毒、胰腺占位病变, 而且便常规、胃肠镜等检查无特殊异常发现, 诊断考虑胰血管活性肠肽瘤(vasoactive intestinal peptidesecreting tumor, VIPoma), 入院后给予皮下注射奥曲肽后腹泻停止, 大便成形, 状态明显好转, 复查血钾正常, 代谢性酸中毒纠正等治疗效果也支持此诊断. 患者有下肢骨痛, 血碱性磷酸酶升高, 左肾盏结石, 入院时血钙升高, 血磷下降, 再查血清甲状旁腺激素(PTH)85 ng/L升高, 甲状腺CT示左叶1.7 cm×2.2 cm病灶, 结节性甲状腺肿; 右叶后方0.6 cm×0.8 cm结节灶, 甲状旁腺腺瘤(图2), 诊断原发性甲状旁腺功能亢进症, 甲状旁腺腺瘤. 结合临床诊断胰VIPoma以及患有皮下脂肪瘤, 考虑诊断多发性内分泌腺瘤病1型.

2 讨论

胰VIPoma是一种非常少见的胰腺内分泌肿瘤, 系由胰岛非β细胞(D1细胞)分泌大量的血管活性肠肽(vasoactive intestinal peptide, VIP)而引起的顽固性水样泻, 以及低钾血症, 常伴有胃酸减少或无胃酸, 故又称水样泻、低钾、无或低胃酸综合征(watery diarrhea, hypokalemia, achlorhydria/hypochlorhydria syndrome, WDHA/WDHH综合征), 又称胰性霍乱^[4]. 胰VIPoma最先由Verner和Morrison首次报道, 故又称Verner-Morrison综合征. 胰VIPoma临床并不多见, 占胰腺内分泌肿瘤的5%, 仅次于胰岛素瘤和胃泌素瘤^[5]. 除了水样泻、低钾、低胃酸三个特征性表现外, 胰VIPoma还可表现有面部潮红、糖尿病或糖耐量异常、代谢性酸中毒、体质量下降等^[6]. 血清VIP水平、胰腺影像学检查、手术切

除病理以及免疫组织化学检查可以确诊该病. 胰VIPoma应与胃泌素瘤、胰高血糖素瘤、降钙素瘤等鉴别. 手术切除是治疗胰VIPoma的最有效方法, 对不能切除的患者, 使用生长抑素有较好疗效. 对于恶性胰VIPoma, 还可以使用链脲酶素等进行化学治疗^[7]. 本例患者有水样泻、低钾血症、消瘦、面部潮红、代谢性酸中毒、糖耐量异常等诸多表现, 胃镜示萎缩性胃炎, 便常规无黏液脓血, 肠镜无异常, 腹部CT示胰腺钩突占位病变, 而且奥曲肽治疗明显有效, 无胃泌素瘤等其他胰腺内分泌肿瘤的依据, 诸多方面均支持临床诊断胰VIPoma.

患者血钙水平达3.18 mmol/L, 同时有骨痛、左肾结石、碱性磷酸酶升高等临床表现, 测定血PTH水平升高, 甲状腺增强CT扫描, 发现有甲状旁腺腺瘤, 诊断合并甲状旁腺功能亢进. 患者同时有皮下多发脂肪瘤, 我们最终诊断该患者为MEN 1型.

MEN1型主要表现为甲状旁腺腺瘤、胃肠胰肿瘤、垂体前叶瘤和肾上腺腺瘤, 其中甲旁亢最为常见^[8]. 胃肠胰内分泌肿瘤占MEN1型的第2位, 以胃泌素瘤、胰岛素瘤居多, 其余的包括胰高血糖素瘤、胰VIPoma^[9]和无功能瘤. 然而查阅国内文献未见有包括胰VIPoma在内的MEN1型的病例报道. 我院报道此例患者同时存在胰VIPoma、甲状旁腺腺瘤以及脂肪瘤甚是少见. 在进行家系调查时, 患者的女儿亦患有多发皮下脂肪瘤, 在MEN1型的家族成员中, 出现皮下脂肪瘤的比例较高, 此表现有助于对这些个体进行筛查, 以明确携带MEN1缺陷基因者^[10]. 针对MEN1型的治疗, 建议切除病变腺瘤, 但是该患者年龄较大, 一般状态差, 家人暂时拒绝胰腺占位以及甲状旁腺腺瘤切除术, 目前患者以及家庭成员正在随访调查中.

3 参考文献

- 1 李小英. 多发性内分泌腺瘤病. 中国实用内科杂志 2006; 26: 1763-1766
- 2 Wermer P. Genetic aspects of adenomatosis of endocrine glands. *Am J Med* 1954; 16: 363-371
- 3 Shen HC, He M, Powell A, Adem A, Lorang D, Heller C, Grover AC, Ylaya K, Hewitt SM, Marx SJ, Spiegel AM, Libutti SK. Recapitulation of pancreatic neuroendocrine tumors in human multiple endocrine neoplasia type I syndrome via Pdx1-directed inactivation of Men1. *Cancer Res* 2009; 69: 1858-1866
- 4 李江涛, 彭淑龢, 刘颖斌, 方河清, 吴育连, 王新保, 唐喆, 钱浩然, 纪成. 胰血管活性肠肽瘤一例报告并国内文献复习. 中华外科杂志 2004; 42: 524-527
- 5 何永清, 张立忠. 胰腺血管活性肠肽瘤12例国内资料分析. 中国实用外科杂志 1994; 14: 474-477
- 6 刘春英, 韩建平, 沈维红. 血管活性肠肽瘤一例. 中华消化杂志 1998; 18: 203
- 7 狄忠民, 杨卫平, 蔡伟耀, 陈曦, 吴增斌. 胰血管活性肠肽瘤的诊断和治疗. 中国实用外科杂志 2002; 22: 55-57
- 8 王鸥, 邢小平, 孟迅吾, 夏维波, 李梅, 胡莹莹, 刘怀成, 余卫, 管珩, 朱预, 刘彤华. MEN患者甲状旁腺功能亢进症的临床表现. 中华内分泌代谢杂志 2004; 20: 296-299
- 9 Namihira Y, Achord JL, Subramony C. Multiple endocrine neoplasia, type 1, with pancreatic cholera. *Am J Gastroenterol* 1987; 82: 794-797
- 10 叶任高, 陆再英. 内科学. 第6版. 北京: 人民卫生出版社, 2004: 772-773

■同行评价

本文资料完整, 分析深入, 对临床医师有较好的借鉴意义.

编辑 曹丽鸥 电编 何基才

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2010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)

《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, 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-RCCS权威、核心期刊排行榜与指南》和中国知识资源总库收录。2008年度《世界华人消化杂志》总被引频次为2480, 位居内科学类41种期刊的第6位; 影响因子为0.547, 位居内科医学类41种期刊的第17位。《世界华人消化杂志》即年指标0.059, 他引率0.79, 地区分布数29, 基金论文比0.340, 国际论文比0.00, 学科影响指标0.59, 综合评价总分49.5, 位居内科学类41种期刊的第8位。

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

2.4 计量单位 采用国际单位制并遵照有关国家

标准, GB3100-3102-93量和单位. 原来的“分子量”应改为物质的相对分子质量. 如30 kD改为 M_r 30 000或30 kDa(M大写斜体, r小写正体, 下角标); “原子量”应改为相对原子质量, 即 A_r (A大写斜体, r小写正体, 下角标); 也可采用原子质量, 其单位是u(小写正体). 计量单位在+、-及-后列出. 在±前后均要列出, 如37.6 °C ± 1.2 °C, 45.6岁 ± 24岁, 56.4 d ± 0.5 d. 3.56 ± 0.27 pg/ml应为3.56 ng/L ± 0.27 ng/L. BP用kPa(mmHg), RBC数用 1×10^{12} /L, WBC数用 1×10^9 /L, WBC构成比用0.00表示, Hb用g/L. M_r 明确的体内物质以nmol/L或mmol/L表示, 不明确者用g/L表示. 1 M硫酸, 改为1 mol/L硫酸, 1 N硫酸, 改为0.5 mol/L硫酸. 长10 cm, 宽6 cm, 高4 cm, 应写成10 cm × 6 cm × 4 cm. 生化指标一律采用法定计量单位表示, 例如, 血液中的总蛋白、清蛋白、球蛋白、脂蛋白、血红蛋白、总脂用g/L, 免疫球蛋白用mg/L; 葡萄糖、钾、尿素、尿素氮、CO₂结合力、乳酸、磷酸、胆固醇、胆固醇酯、三酰甘油、钠、钙、镁、非蛋白氮、氯化物; 胆红素、蛋白结合碘、肌酸、肌酐、铁、铅、抗坏血酸、尿胆元、氨、维生素A、维生素E、维生素B1、维生素B2、维生素B6、尿酸; 氢化可的松(皮质醇)、肾上腺素、汞、孕酮、甲状腺素、睾酮、叶酸用nmol/L; 胰岛素、雌二醇、促肾上腺皮质激素、维生素B12用pmol/L. 年龄的单位有日龄、周龄、月龄和岁. 例如, 1秒, 1 s; 2分钟, 2 min; 3小时, 3 h; 4天, 4 d; 5周, 5 wk; 6月, 6 mo; 雌性♀, 雄性♂, 酶活性国际单位IU = 16.67 nkat, 对数log, 紫外uv, 百分比%, 升L, 尽量把 1×10^{-3} g与 5×10^{-7} g之类改成1 mg与0.5 mg, hr改成h, 重量γ改成mg, 长度m改成mm. 国际代号不用于无数字的文句中, 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% CO₂, 50 mL/L CO₂; 1 : 1 000肾上腺素, 1 g/L肾上腺素; 胃黏膜含促胃液素36.8 pg/mg, 改为胃黏膜蛋白含促胃液素36.8 ng/g; 10%葡萄糖改为560 mmol/L或100 g/L葡萄糖; 45 ppm = 45×10^{-6} ; 离心的旋转频率(原称转速)用r/min, 超速者用g; 药物剂量若按体质量计算, 一律以“/kg”表示.

《世界华人消化杂志》为中国科技论文统计源核心期刊(2009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: 010-85381901, 传真: 010-85381893, 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 χ^2 ; (4)样本的相关系数用英文小写 r ; (5)自由度用希文小写 ν ; (6)样本数用英文小写 n ; (7)概率用英文斜体大写 P . 在统计学处理中在文字叙述时平均数 \pm 标准差表示为 $\text{mean} \pm \text{SD}$, 平均数 \pm 标准误为 $\text{mean} \pm \text{SE}$. 统计学显著性用 $^aP < 0.05$, $^bP < 0.01$ ($P > 0.05$ 不注). 如同一表中另有一套 P 值, 则 $^cP < 0.05$, $^dP < 0.01$; 第三套为 $^eP < 0.05$, $^fP < 0.01$ 等.

2.6 数字用法 遵照国家标准GB/T 15835-1995出版物上数字用法的规定, 作为汉语词素者采用汉字数字, 如二氧化碳、十二指肠、三倍体、四联球菌、五四运动、星期六等. 统计学数字采用阿拉伯数字, 如1000-1500 kg, 3.5 mmol/L \pm 0.5 mmol/L等. 测量的数据不能超过其测量仪器的精密度, 例如6347意指6000分之一的精密度. 任何一个数字, 只允许最后一位有误差, 前面的位数不应有误差. 在一组数字中的 $\text{mean} \pm \text{SD}$ 应考虑到个体的变差, 一般以SD的1/3来定位数, 例如3614.5 g \pm 420.8 g, SD的1/3达一百多g, 平均数波动在百位数, 故应写成3.6 kg \pm 0.4 kg, 过多的位数并无意义. 又如8.4 cm \pm 0.27 cm, 其SD/3 = 0.09 cm, 达小数点后第2位, 故平均数也应补到小数点后第2位. 有效位数以后的数字是无效的, 应该舍. 末尾数字, 小于5则舍, 大于5则进, 如恰等于5, 则前一位数逢奇则进, 逢偶(包括“0”)且5之后全为0则舍. 末尾时只可1次完成, 不得多次完成. 例如23.48, 若不要小数点, 则应成23, 而不应该23.48 \rightarrow 23.5 \rightarrow 24. 年月日采用全数字表达法, 请按国家标准GB/T 7408-94书写. 如1985年4月12日, 可写作1985-04-12; 1985年4月, 写作1985-04; 从1985年4月12日23时20分50秒起至1985年6月25日10时30分止, 写作1985-04-12 T23:20:50/1985-06-25 T10:30:00; 从1985年4月12日起至1985年6月15日止, 写作1985-04-12/06-16, 上午8时写作08:00, 下午4时半写作16:30. 百分数的有效位数根据分母来定: 分母 ≤ 100 , 百分数到个位; $101 \leq \text{分母} \leq 1000$, 百分数到小数点后1位; 余类推. 小数点前后的阿拉伯数字, 每3位间空1/4阿拉伯数字距离, 如1486800.475 65. 完整的阿拉伯数字不移行!

2.7 标点符号 遵照国家标准GB/T 15834-1995标点符号用法的要求, 本刊论文中的句号都采用黑圆点; 数字间的起止号采用“-”字线, 并列的汉语词间用顿号分开, 而并列的外文词、阿拉伯数字、外文缩略词及汉语拼音字母拼写词间改用逗号分开, 参考文献中作者间一律用逗号

分开; 表示终了的标点符号, 如句号、逗号、顿号、分号、括号及书名号的后一半, 通常不用于一行之首; 而表示开头的标点符号, 如括号及书名号的前一半, 不宜用于一行之末. 标点符号通常占一格, 如顿号、逗号、分号、句号等; 破折号应占两格; 英文连字符只占一个英文字符的宽度, 不宜过长, 如5-FU. 外文字符下划一横线表示用斜体, 两横线表示用小写, 三横线表示用大写, 波纹线表示用黑体.

3 稿件格式

3.1 题名 简明确切地反映论文的特定内容, 鲜明而有特色, 阿拉伯数字不宜开头, 不用副题名, 一般20个字. 避免用“的研究”或“的观察”等非特定词.

3.2 作者 论文作者的署名, 按照国际医学杂志编辑委员会(ICMJE, International Committee of Medical Journal Editors)作者资格标准执行. 作者标准为: (1)对研究的理念和设计、数据的获得、分析和解读做出重大贡献; (2)起草文章, 并对文章的重要的知识内容进行批评性修改; (3)接受对准备发表文章的最后一稿. 作者应符合条件1, 2, 3, 对研究工作有贡献的其他人可放入志谢中. 作者署名的次序按贡献大小排列, 多作者时姓名间用逗号, 如是单名, 则在姓与名之间空1格(正文和参考文献中不空格). 《世界华人消化杂志》要求所有署名人写清楚自己对文章的贡献. 世界华人消化杂志不设置共同第一作者和共同通信作者.

3.3 单位 作者后写单位的全称空1格后再写省市及邮政编码. 格式如: 张旭晨, 梅立新, 承德医学院病理教研室 河北省承德市 067000

3.4 第一作者简介 格式如: 张旭晨, 1994年北京中医药大学硕士, 讲师. 主要从事消化系统疾病的病理研究.

3.5 作者贡献分布 格式如: 陈湘川与庞丽娟对此文所作贡献两均等; 此课题由陈湘川、庞丽娟、陈玲、杨兰、张金芳、齐妍及李洪安设计; 研究过程由陈玲、杨兰、张金芳、蒋金芳、杨磊、李锋及曹秀峰操作完成; 研究所用新试剂及分析工具由曹秀峰提供; 数据分析由陈湘川、杨兰及庞丽娟完成; 本论文写作由陈湘川、庞丽娟及李洪安完成.

3.6 同行评议者 为了确保刊出文章的质量, 本刊即将开始实行接受稿件的同行评议公开策略, 将同行评议者姓名, 职称, 机构的名称与文章一同在脚注出版. 格式如: 房静远, 教授, 上海交通

大学医学院附属医院仁济医院,上海市消化疾病研究所。

3.7 基金资助项目 格式如: 国家自然科学基金资助项目, No. 30224801

3.8 通讯作者 格式如: 通讯作者: 黄缘, 教授, 330006, 江西省南昌市民德路1号, 南昌大学第二附属医院消化内科, 江西省分子医学重点实验室. huang9815@yahoo.com

电话: 0351-4078656 传真: 0351-4086337

收稿日期: 修回日期:

3.9 英文摘要

题名 文章的题名应言简意赅, 方便检索, 英文题名以不超过10个实词为宜, 应与中文题名一致。

作者 作者姓名汉语拼音拼写法规定为: 先名, 后姓; 首字母大写, 双名之间用半字线“-”分开, 多作者时姓名间加逗号。格式如: “潘伯荣”的汉语拼写法为“Bo-Rong Pan”。

单位 先写作者, 后写单位的全称及省市邮政编码。例如: Xu-Chen Zhang, Li-Xin Mei, Department of Pathology, Chengde Medical College, Chengde 067000, Hebei Province, China

基金资助项目 格式如: Supported by National Natural Science Foundation of China, No.30224801

通讯作者 格式如: Correspondence to: Dr. Lian-Sheng Ma, Taiyuan Research and Treatment Center for Digestive Diseases, 77 Shuangta Xijie, Taiyuan 030001, Shanxi Province, China. wcjd@wjgnet.com

收稿及修回日期 格式如: Received: Revised:

摘要 包括目的、方法、结果、结论, 书写要求与中文摘要一致。

3.10 中文摘要 必须在300字左右, 内容应包括目的(应阐明研究的背景和设想、目的), 方法(必须包括材料或对象。应描述课题的基本设计, 双盲、单盲还是开放性, 使用什么方法, 如何进行分组和对照, 数据的精确程度。研究对象选择条件与标准是否遵循随机化、齐同化的原则, 对照组匹配的特征。如研究对象是患者, 应阐明其临床表现, 诊断标准。如何筛选分组, 有多少例进行过随访, 有多少例因出现不良反应而中途停止研究), 结果(应列出主要结果, 包括主要数据, 有什么新发现, 说明其价值和局限, 叙述要真实、准确、具体, 所列数据经用何种统计学方法处理; 应给出结果的置信区间和统计学显著性检验的确切值; 概率写 P , 后应写出相应显著性检验值), 结论(全文总结, 准确无误的观点及价值)。

3.11 正文标题层次 0引言; 1 材料和方法, 1.1 材

料, 1.2 方法; 2 结果; 3 讨论; 4 参考文献。序号一律左顶格写, 后空1格写标题; 2级标题后空1格接正文。正文内序号连排用(1), (2), (3)。以下逐条陈述。

0 引言 应包括该研究的目的和该研究与其他相关研究的关系。

1 材料和方法 应尽量简短, 但应让其他有经验的研究者能够重复该实验。对新的方法应该详细描述, 以前发表过的方法引用参考文献即可, 有关文献中或试剂手册中的方法的改进仅描述改进之处即可。

2 结果 实验结果应合理采用图表和文字表示, 在结果中应避免讨论。

3 讨论 要简明, 应集中对所得的结果做出解释而不是重复叙述, 也不应是大量文献的回顾。

图表的数量要精选。表应有表序和表题, 并有足够具有自明性的信息, 使读者不查阅正文即可理解该表的内容。表内每一栏均应有表头, 表内非公知通用缩写应在表注中说明, 表格一律使用三线表(不用竖线), 在正文中该出现的地方应注出。图应有图序、图题和图注, 以使其容易被读者理解, 所有的图应在正文中该出现的地方注出。同一个主题内容的彩色图、黑白图、线条图, 统一用一个注解分别叙述。如图1 萎缩性胃炎治疗前后病理变化。A: …; B: …; C: …; D: …; E: …; F: …; G: …。曲线图可按●、○、■、□、▲、△顺序使用标准的符号。统计学显著性用: ^a $P<0.05$, ^b $P<0.01$ ($P>0.05$ 不注)。如同一表中另有一套 P 值, 则^c $P<0.05$, ^d $P<0.01$; 第3套为^e $P<0.05$, ^f $P<0.01$ 。 P 值后注明何种检验及其具体数字, 如 $P<0.01$, $t = 4.56$ vs 对照组等, 注在表的左下方。表内采用阿拉伯数字, 共同的计量单位符号应注在表的右上方, 表内个位数、小数点、±、-应上下对齐。“空白”表示无此项或未测, “-”代表阴性未发现, 不能用同左、同上等。表图勿与正文内容重复。表图的标目尽量用 t/min , $c/(\text{mol/L})$, p/kPa , V/mL , $t/^\circ\text{C}$ 表达。黑白图请附黑白照片, 并考入磁盘内; 彩色图请提供冲洗的彩色照片, 请不要提供计算机打印的照片。彩色图片大小 $7.5\text{ cm}\times 4.5\text{ cm}$, 必须使用双面胶条粘贴在正文内, 不能使用浆糊粘贴。

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

《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。

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,则在论述的句末右上角注角码号。如马连生^[1]报告……,潘伯荣等^[2-5]认为……;PCR方法敏感性高^[6-7]。文献序号作正文叙述时,用与正文同号的数字并排,如本实验方法见文献[8]。所引参考文献必须以近2-3年SCIE, PubMed,《中国科技论文统计源期刊》和《中文核心期刊要目总览》收录的学术类期刊为准,通常应只引用与其观点或数据密切相关的国内外期刊中的最新文献。期刊:序号,作者(列出全体作者),文题,刊名,年,卷,起页-止页,PMID和DOI编号;书籍:序号,作者(列出全部),书名,卷次,版次,出版地,出版社,年,起页-止页。

5 网络版的发表前链接 本刊即将开始实行网络版的每篇文章上都有该文发表前纪录的链接,包括首次提交的稿件,同行评议人报告,作者给审稿人回信和作者修回稿,以PDF格式上传。读者可以针对论文、审稿意见和作者的修改情况发表意见,指出问题与不足;作者也可以随时修改完善自己发表的论文,使文章的发表成为一个编者、同行评议者、读者、作者互动的动态过程。

4 写作格式实例

4.1 述评写作格式实例

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

4.2 研究原著写作格式实例

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

4.3 焦点论坛写作格式实例

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

4.4 文献综述写作格式实例

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

4.5 研究快报写作格式实例

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

4.6 临床经验写作格式实例

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

4.7 病例报告写作格式实例

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

5 投稿方式

接受在线投稿,不接受其他方式的投稿,如E-mail、打印稿。在线投稿网址: <http://www.baishideng.com/wcjd/ch/index.aspx>。无法在线提交的通过submission@wjgnet.com, 电话: 010-8538-1892, 传真: 010-8538-1893寻求帮助。投

稿须知下载网址<http://www.wjgnet.com/1009-3079/tgxz.pdf>。审稿过程平均时间需要14-28 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处理费及发表费,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: 010-8538-1892

传真: 010-8538-1893

E-mail: wcjd@wjgnet.com

<http://www.wjgnet.com>

2010年国内国际会议预告

2010-08-18/21

第二十一届世界癌症大会

会议地点: 深圳市

联系方式: bgs@caca.sina.net

2010-08-19/22

第二十二次全国中西医结合消化学术会议

会议地点: 苏州市

联系方式: szzyy88@163.com

2010-09-01

中华医学会第十次全国消化系疾病学术会议

会议地点: 成都市

联系方式: <http://www.csgd.org.cn/2010/>

2010-09-01

第二次肝纤维化、肝硬化学术会议

会议地点: 太原市

联系方式: lijuyi@cma.org.cn

2010-09-08/12

第九届全国介入放射学学术大会

会议地点: 广州市

联系方式: csir2010@163.com

2010-09-09/11

中华医学会第十一次全国感染病学术会议

会议地点: 重庆市

联系方式: infectioncma@163.com

2010-09-10/12

第四届国际肝病学会年会

会议地点: 加拿大, 蒙特利尔

联系方式: info@ilca-online.org

2010-09-15/17

临床实验室生物安全管理研讨会

会议地点: 长春市

电子邮箱: jianchengxu@yeah.net

2010-09-16/19

第十三届全国临床肿瘤学大会暨2010年CSCO学术年会

会议地点: 北京市

联系方式: <http://reg.cSCO.org.cn/reg2010/>

2010-09-21/25

肝脏疾病病理基础及治疗进展

会议地点: 西安市

联系方式: 029-85323924

2010-10-12/16

无创性肝纤维化诊断及常见肝病新进展学习班

会议地点: 南京市

联系方式: 025-80864021

2010-10-23/27

第十八届欧盟胃肠病周

会议地点: 西班牙, 巴塞罗那

联系方式: <http://uegw10.uegf.org/>

2010-10-28/30

中华医学会第十次全国消化系疾病学术会议

会议地点: 成都市

yjliu@cma.org.cn

2010-11-12/15

内镜黏膜下剥离术(ESD)及其并发症防治学习班

会议地点: 哈尔滨市

联系方式: liubingrong@medmail.com.cn

2010-11-17/20

中华医学会糖尿病学分会第十四次全国学术会议

会议地点: 苏州市

联系方式: fredfeng@cma.org.cn

2010-11-17/21

消化及消化内镜前沿理论和技术学习班

会议地点: 南京市

联系方式: 025-80004616

2010-11-18/21

第十四届全国胆道外科学术会议暨2010中国国际肝胆外科论坛

会议地点: 上海市

联系方式: ncbs_cifhbs@126.com

2010-12-02/06

第九届广东省消化内镜学术年会

会议地点: 广州市

联系方式: 020-61641541

2010-12-03/06

肿瘤多学科综合诊治新概念学术研讨会

会议地点: 三亚市

电子邮箱: wetogether@126.com

2010-12-26/30

肝胆疾病-肝功能衰竭治疗新理念

会议地点: 南京市

联系方式: 025-83106666-66866

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!

戴冬秋 教授

中国医科大学附属第一医院肿瘤外科

党双锁 教授

西安交通大学第二医院感染科

杜群 副研究员

广州中医药大学脾胃研究所药理室

高国全 教授

中山大学中山医学院生化系

巩鹏 教授

大连医科大学附属第一医院普外二科

顾岩 教授

上海交通大学医学院附属上海第九人民医院外科

关玉盘 教授

首都医科大学附属北京朝阳医院消化科

洪天配 教授

北京大学第三医院内分泌科

江米足 教授

浙江大学医学院附属儿童医院儿科

李华 副教授

中山大学附属第三医院肝脏外科

李奇林 教授

南方医科大学珠江医院急诊部

刘连新 教授

哈尔滨医科大学第一临床医学院普通外科三病房

刘占举 教授

同济大学附属第十人民医院胃肠内科

龙学颖 副主任医师

中南大学湘雅医院放射科

马红 主任医师

首都医科大学附属北京友谊医院肝病中心

欧希龙 副教授

东南大学中大医院消化科

朴云峰 教授

吉林大学第一临床医院消化科

沈洪 教授

南京中医药大学附属医院江苏省中医院消化科

沈薇 教授

重庆医科大学附属第二医院消化内科

谭德明 教授

中南大学湘雅医院感染病科

王蒙 副教授

中国人民解放军第二军医大学附属东方肝胆外科医院肝外综合治疗一科

王小众 教授

福建医科大学附属协和医院消化内科

魏睦新 教授

南京医科大学第一附属医院中西医结合科

肖文华 主任医师

中国人民解放军总医院第一附属医院肿瘤科

徐庆 教授

桂林医学院药理教研室

宣世英 教授

山东省青岛市市立医院肝病内科

喻荣彬 副教授

南京医科大学公共卫生学院流行病与卫生统计学系

张小晋 主任医师

北京积水潭医院消化内科

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

周素芳 教授

广西医科大学科技处