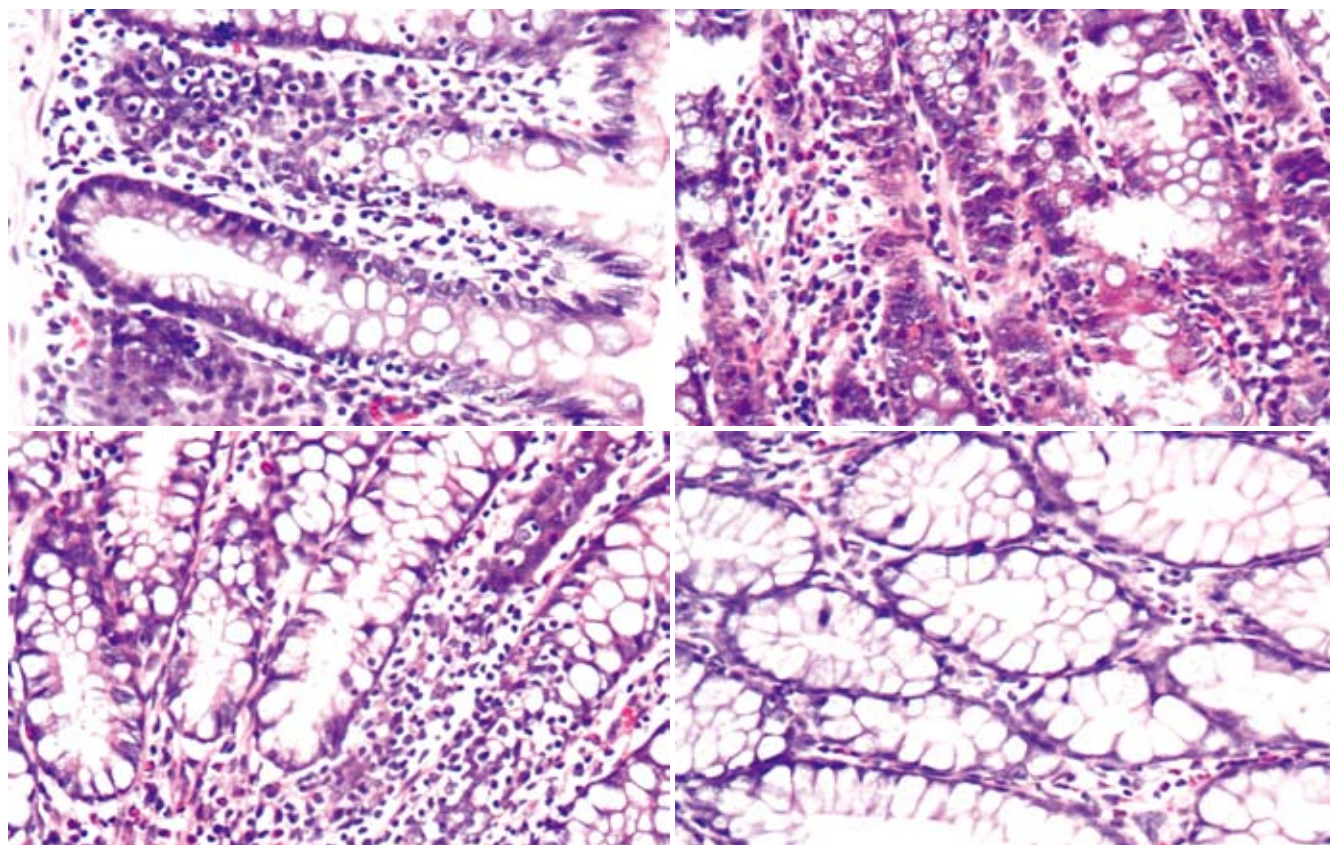


世界华人消化杂志®

WORLD CHINESE
JOURNAL OF DIGESTOLOGY

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

2010年8月8日 第18卷 第22期 (Volume 18 Number 22)



22 / 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

世界华人消化杂志®

编辑委员会

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
李璦教授
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8月8日 第18卷 第22期 (总第318期)

述 评

2291 骨髓间充质干细胞逆转肝纤维化的研究进展

徐静, 陈光

基础 研究

2296 肝癌组织NF- κ B表达及活化干预对肝癌细胞增殖的影响

邵苏吉, 姚登福, 沈俊俊, 吴玮, 姚宁华

2302 肝线粒体超微结构和自由基在大鼠肝再生过程中的变化

周运恒, 曹广亚, 袁斌, 焦炳华, 缪明永

2308 溃疡性结肠炎大鼠 β 2AR- β -arrestin2-NF- κ B信号转导通路及氧化苦参碱的干预作用

范恒, 廖奕, 陈小艳, 张丽娟, 刘星星, 钟敏, 唐庆

2317 JAK2、ERK1干扰对幽门螺杆菌毒素相关蛋白CagA调控胃泌素基因表达的影响

谢渊, 周建英, 赵艳, 汪苏, 陈娴

临床 研究

2322 CXCR4、MMP-2在食管鳞癌中的表达及其与淋巴结转移的关系

杜雅冰, 樊青霞

2327 TRX-1和STAT-3在原发性小肠恶性肿瘤中的表达及意义

牛桂军, 陈卓琳, 李西融, 唐澄海

文 献 综 述

2333 蛋白质组学在炎症性肠病研究中的应用

童明霞, 缪应雷

2339 Toll样受体与消化系统损伤的研究进展

叶惠惠, 张咏梅

2346 循环肿瘤细胞检测的临床应用

余锋, 张好, 施乐华, 殷正丰

2350 中药微球介入治疗肿瘤的研究进展

陈红宇, 王炎, 李琦

研究 快报

2355 胃溃疡大鼠在合募配穴针刺后胃组织的纳升级二维液相色谱

杨波, 严兴科

2359 早期肠内免疫营养对烫伤大鼠Peyer's结Th1/Th2细胞因子的影响

邓志云, 郭光华, 杨毅, 赵晓雷, 崔泉

临 床 经 验

2365 国产醋酸奥曲肽治疗食管胃底静脉曲张破裂出血的系统评价

杨拯, 李晓娇, 芮金海, 陈建敏, 荣成, 张晓

2370 MELD评分联合血浆内毒素、D-Dimer浓度对肝硬化失代偿期患者预后的判断

郑中伟, 童学成

2375 终末期肝病模型在评估肝硬化患者预后中的价值

崔春吉

2379 趋化因子CXCL8/CXCR1生物轴与结肠癌转移的关系

缪海江, 齐晓光

2384 腹壁无瘢痕腹腔镜直肠癌根治术的3种标本取出途径

王超, 王权, 曹雪源, 孙东辉

2387 胃肠道肿瘤患者外周血人类斯钙素基因的检测及其意义

张海蓉, 郝卫刚, 段丽平

病例报告	2392 横结肠深肌层脂肪瘤误诊为结肠恶性间质瘤1例 夏翠峰, 李强, 李云峰, 潘定国, 赵俊卿
附录	2394 《世界华人消化杂志》投稿须知 2399 2010年国内国际会议预告
志 谢	2400 志谢世界华人消化杂志编委
消 息	2295 <i>WJG</i> 成功通过评审被PMC收录 2307 《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》 2316 《世界华人消化杂志》外文字符标准 2326 《世界华人消化杂志》性质、刊登内容及目标 2345 2008年内科学类期刊总被引频次和影响因子排序 2354 《世界华人消化杂志》修回稿须知 2364 《世界华人消化杂志》出版流程 2378 2009年《世界华人消化杂志》编委审稿总结 2383 汤姆森-路透公布2009年 <i>WJG</i> 影响因子2.092 2386 《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》 2391 《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
封面故事	范恒, 廖奕, 陈小艳, 张丽娟, 刘星星, 钟敏, 唐庆. 溃疡性结肠炎大鼠 $\beta 2AR$ - β -arrestin2-NF- κB 信号转导通路及氧化苦参碱的干预作用. 世界华人消化杂志 2010; 18(22): 2308-2316 http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/2308.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>世界华人消化杂志</p> <p>Shijie Huaren Xiaohua Zazhi</p> <p>吴阶平 题写封面刊名 陈可冀 题写版权刊名 (旬刊)</p> <p>创 刊 1993-01-15 改 刊 1998-01-25 出 版 2010-08-08 原刊名 新消化病学杂志</p> <p>名誉总编辑 潘伯荣 总 编 辑 马连生 编辑部主任 李军亮</p> <p>期 刊 名 称 世界华人消化杂志 主 管 单 位 山西省科学技术厅 主 办 单 位 太原消化病研治中心</p>	<p>编辑 世界华人消化杂志编辑委员会 030001, 山西省太原市双塔西街77号 电话: 0351-4078656 E-mail: wcjd@wjgnet.com http://www.wjgnet.com</p> <p>出版 世界华人消化杂志编辑部 030001, 山西省太原市双塔西街77号 电话: 0351-4078656 E-mail: wcjd@wjgnet.com http://www.wjgnet.com</p> <p>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>
<p>中国标准连续出版物号 ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R</p>	<p>邮发代号 82-262 国外代号 M 4481</p>	<p>国内定价 每册56.00元 全年2016.00元 广告经营许可证 1401004000050</p>

World Chinese Journal of Digestology

August 2010 Contents in Brief Volume 18 Number 22

EDITORIAL	2291 Advances in research of the reversal of liver fibrosis by transplantation of bone marrow mesenchymal stem cells <i>Xu J, Chen G</i>
BASIC RESEARCH	2296 Intervention of NF- κ B activation inhibits the growth of human hepatocellular carcinoma HepG2 cells <i>Shao SJ, Yao DF, Shen JJ, Wu W, Yao NH</i> 2302 Changes in mitochondrial ultrastructure and malondialdehyde level in regenerating liver tissue in rats <i>Zhou YH, Cao GY, Yuan B, Jiao BH, Miao MY</i> 2308 Oxymatrine attenuates ulcerative colitis by modulating the β 2AR- β -arrestin2-NF- κ B signaling pathway in rats <i>Fan H, Liao Y, Chen XY, Zhang LJ, Liu XX, Zhong M, Tang Q</i> 2317 RNA interference-mediated knockdown of JAK2 and ERK1 inhibits <i>Helicobacter pylori</i> CagA-induced gastrin up-regulation in gastric cancer cell lines AGS and SGC-7901 <i>Xie Y, Zhou JJ, Zhao Y, Wang S, Chen X</i>
CLINICAL RESEARCH	2322 Relationship between CXCR4 and MMP-2 expression and lymph node metastasis in esophageal squamous cell carcinoma <i>Du YB, Fan QX</i> 2327 Significance of TRX-1 and STAT-3 expression in primary malignant tumors of the small intestine <i>Niu GJ, Chen ZL, Li XR, Tang CH</i>
REVIEW	2333 Application of proteomics to the study of inflammatory bowel disease <i>Tong MX, Miao YL</i> 2339 Advances in understanding the relationship between Toll-like receptors and digestive system injury <i>Ye HH, Zhang YM</i> 2346 Detection of circulating tumor cells: recent progress in clinical applications <i>Yu F, Zhang Y, Shi LH, Yin ZF</i> 2350 Advances in research of microspheres containing Chinese medicine for interventional cancer therapy <i>Chen HY, Wang Y, Li Q</i>
RAPID COMMUNICATION	2355 Nano-2D-LC analysis of proteomic alterations in rats with gastric stress ulcer after acupuncture at He-Sea point and Front-Mu point of the stomach meridian <i>Yang B, Yan XK</i> 2359 Effect of early enteral immunonutrition on the secretion of TH1/TH2 cytokines in Peyer's patches of scalded rats <i>Deng ZY, Guo GH, Yang Y, Zhao XL, Cui Q</i>
CLINICAL PRACTICE	2365 Efficacy and safety of China-made acetic octreotide in the treatment of bleeding from esophageal varices: a systematic review <i>Yang Z, Li XJ, Guo JH, Chen JM, Rong C, Zhang X</i> 2370 Value of MELD score in combination with plasma endotoxin and D-dimer levels in the evaluation of the prognosis of patients with decompensated cirrhosis <i>Zheng ZW, Tong XC</i>

	<p>2375 Value of model for end-stage liver disease in assessment of the prognosis of patients with cirrhosis <i>Cui CJ</i></p> <p>2379 Role of CXCL8/CXCR1 in the metastasis of human colon cancer <i>Miao HJ, Qi XG</i></p> <p>2384 Three routes for specimen extraction during scarless laparoscopic radical rectal cancer surgery <i>Wang C, Wang Q, Cao XY, Sun DH</i></p> <p>2387 Clinical significance of detection of stanniocalcin 1 expression in peripheral blood of patients with gastrointestinal cancer <i>Zhang HR, Hao WG, Duan LP</i></p>
CASE REPORT	<p>2392 Deep muscular lipoma of the transverse colon misdiagnosed as malignant stromal tumor: a report of one case <i>Xia CF, Li Q, Li YF, Pan DG, Zhao JQ</i></p>
APPENDIX	<p>2394 Instructions to authors of World Chinese Journal of Digestology</p> <p>2399 Meeting events calendar in 2010</p>
ACKNOWLEDGMENT	<p>2400 Acknowledgments to reviewers of World Chinese Journal of Digestology</p>
COVER	<p><i>Fan H, Liao Y, Chen XY, Zhang LJ, Liu XX, Zhong M, Tang Q.</i> Oxymatrine attenuates ulcerative colitis by modulating the β2AR-β-arrestin2-NF-κB signaling pathway in rats. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2010; 18(22): 2308-2316 http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/2308.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 August 8, 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: wjgd@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: wjgd@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*

骨髓间充质干细胞逆转肝纤维化的研究进展

徐静, 陈光

徐静, 陈光, 吉林大学第一医院普通外科 吉林省长春市 130021

陈光, 教授, 主任医师, 主要从事胰腺癌及消化系统肿瘤的治疗研究. 作者贡献分布: 本综述由徐静完成; 陈光审校.

通讯作者: 陈光, 教授, 主任医师, 130021, 吉林省长春市, 吉林大学第一医院普通外科, cg9293@sina.com

收稿日期: 2010-05-26 修回日期: 2010-07-08

接受日期: 2010-07-12 在线出版日期: 2010-08-08

Advances in research of the reversal of liver fibrosis by transplantation of bone marrow mesenchymal stem cells

Jing Xu, Guang Chen

Jing Xu, Guang Chen, Department of General Surgery, the First Hospital of Jilin University, Changchun 130021, Jilin Province, China

Correspondence to: Professor Guang Chen, Department of General Surgery, the First Hospital of Jilin University, Changchun 130021, Jilin Province, China. cg9293@sina.com

Received: 2010-05-26 Revised: 2010-07-08

Accepted: 2010-07-12 Published online: 2010-08-08

Abstract

Bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) are a group of stem cells capable of multilineage differentiation. Under given conditions, BMSCs can differentiate into a variety of cells, such as osteoblasts, chondrocytes, adipocytes, neuron-like cells and hepatocytes. In recent years, numerous studies have shown that BMSCs can not only inhibit and reduce liver fibrosis but also induce immunosuppression and immune tolerance. Therefore, transplantation of BMSCs can be used to treat end-stage liver disease.

Key Words: Bone marrow mesenchymal stem cell; Liver fibrosis; Cell transplantation

Xu J, Chen G. Advances in research of the reversal of liver fibrosis by transplantation of bone marrow mesenchymal stem cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(22): 2291-2295

摘要

骨髓间充质干细胞是一种来源于骨髓基质的具有多向分化能力的干细胞, 在特定条件下,

可以分化为骨细胞、软骨细胞、脂肪细胞、神经元样细胞及肝细胞等. 近年研究表明, 骨髓间充质干细胞能抑制和减轻肝纤维化, 并且具有免疫抑制和诱导免疫耐受的作用. 因此, 在细胞移植治疗终末期肝病方面具有广阔的临床应用前景.

关键词: 骨髓间充质干细胞; 肝纤维化; 细胞移植

徐静, 陈光. 骨髓间充质干细胞逆转肝纤维化的研究进展. *世界华人消化杂志* 2010; 18(22): 2291-2295

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/2291.asp>

0 引言

肝硬化在我国发病率很高, 是由各种慢性肝损伤引起的, 其最主要的病理学特征是进行性肝纤维化. 多年以来人们一直都认为肝纤维化及肝硬化过程是不可逆的, 肝移植是治疗终末期肝硬化的唯一方法^[1], 但由于肝源紧张、操作复杂、费用昂贵及移植后免疫排斥反应等, 使得这一治疗方法很难得到推广^[2,3]. 近年来, 研究表明肝纤维化过程是可以逆转的^[4-11], 且骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs)移植在逆转肝纤维化方面的作用已经得到证实, 有望为肝纤维化、肝硬化的治疗带来新手段. 间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)是一类具有自我更新能力和多向分化潜能的干细胞, 由于骨髓来源的MSCs易于取材, 未涉及伦理, 而广泛应用于肝纤维化逆转的实验研究, 我们就BMSCs移植在肝纤维化逆转中取得的相关进展作一综述.

1 肝纤维化发生的细胞分子机制

肝纤维化以细胞外基质(extracellular matrix, ECM)的过量积聚为特征, 如 I、III、IV、V 型胶原、层粘连蛋白和弹性蛋白. 在纤维化的肝脏中, ECM不仅产生的量增多, 而且构成也发生改变, I 型胶原占据主导地位. 肝星状细胞(hepatic stellate cell, HSC)是 I 型胶原的主要来源, 肝损伤时, 处于静止状态的HSC迅速活化,

■背景资料

肝硬化在我国发病率很高, 因条件所限, 肝移植很难得到推广. 骨髓间充质干细胞能分化成肝细胞, 并且具有抗纤维化及免疫抑制作用, 有望为终末期肝病治疗带来新的手段.

■同行评议者

王钦红, 副教授, 美国杜克大学医学院肿瘤生物系

■ 研发前沿

骨髓间充质干细胞逆转肝纤维化的分子机制是当前研究的热点。

转化为肌成纤维样细胞并表达细胞骨架蛋白 α -SMA及结合蛋白, 这些细胞具有很强的增生能力, 并且能够产生大量I型胶原^[12]。除了HSC以外, 其他一些细胞也参与胶原的合成, 如门静脉周围的以及骨髓源性的成纤维细胞和纤维细胞^[12,13]。凋亡的肝细胞、肝内定居的Kupffer细胞以及炎症细胞也促使肝纤维化的发生, 他们通过释放活性氧簇及产生促纤维化细胞因子(如TNF- α 、成纤维细胞生长因子和TGF- β 1等)促使HSC的活化和I型胶原的产生。活化的HSC上调黏附分子的表达和释放促炎症反应细胞因子(如IL-6、IL-8、单核细胞趋化蛋白-1等), 进一步促使炎症细胞在损伤肝脏的聚集。另外, HSC产生金属蛋白酶组织抑制剂(tissue inhibitor of metalloproteinases, TIMP), TIMP能抑制基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMP), 而MMP的作用是降解ECM, 因此活化的HSC大量增殖, 使胶原和其他ECM的合成与降解失衡^[14], 从而导致胶原在肝脏的沉积, 胶原的进行性积累会引起肝脏结构和功能的紊乱, 并最终发展成肝硬化。

近年一些对肝纤维化动物模型的实验研究表明, 肝纤维化可以被逆转^[12,15]。祛除引起肝损伤的因素, 如病毒、酒精、缺血和药物等, 不仅能抑制肝纤维化的发展, 而且能使其消退^[16]。总之, 肝纤维化的消退与促纤维化及促炎症反应细胞因子水平的下降和活化HSC的凋亡有关^[17,18]。

2 BMSCs的生物学特性

2.1 多向分化潜能 MSCs是来源于中胚层的一类具有多向分化能力的干细胞, 大量体外实验证明, 在不同诱导条件下, MSCs不仅可以向多种中胚层来源的组织细胞分化, 如成骨细胞、软骨细胞、脂肪细胞、心肌细胞等, 还可以向外胚层和内胚层来源的神经样细胞和肝细胞样细胞分化^[19]。Lange等^[20]研究证明, MSCs在体内外均可分化为肝实质细胞, 而MSCs所处微环境对其分化为肝细胞起着重要作用。Sato等^[21]将人MSCs种植到慢性丙烯醇损伤的大鼠肝脏, 免疫组织化学观察到在MSCs移植的受体鼠肝内有人肝细胞特有的甲胎蛋白(alpha-fetoprotein, AFP)、ALB、CK19、CK18及AGPR的表达, 逆转录-聚合酶链反应发现有AFP和ALB的mRNA表达, 表明人MSCs能在适当微环境下诱导分化为肝细胞。国内有学者^[22]将人MSCs植入肝切除大鼠体内, 发现大鼠术后肝组织内有人AFP及特

异性序列Alu-sx的表达, 提示人MSCs在大鼠体内不但已经向肝细胞分化, 并且发挥一定功能。

2.2 低免疫原性 MSCs不仅具有多向分化潜能, 还具有低免疫原性、免疫抑制及诱导免疫耐受的作用。有报道表明^[23,24], MSCs表达组织相容性复合物I而缺乏组织相容性复合物II, 免疫原性较弱。Uccelli等^[25]研究发现, BMSCs表面只表达少量HLA-I类抗原, 不表达HLA-II类抗原, 这种表达模式并不会随着细胞的分化成熟而明显改变, 同时激活T淋巴细胞所必需的协同刺激分子, 这些特性减少了BMSCs移植以后免疫排斥反应和相关并发症的发生。此外, BMSCs可以通过旁分泌作用抑制B淋巴细胞和T淋巴细胞的增殖, 激活T淋巴细胞的凋亡从而起到免疫抑制作用^[26,27]。Bartholomew等^[28]给狒狒静脉注射BMSCs, 发现这样可使异体移植的皮瓣存活期明显延长, 证明BMSCs具有诱导免疫耐受作用。MSCs的多向分化潜能及免疫学特性, 再加上取材方便, 易于分离、培养、纯化和扩增, 为其移植治疗肝纤维化提供了很大可能性。

3 BMSCs在逆转肝纤维化中的研究

3.1 MSCs逆转肝纤维化的实验研究 骨髓组织中至少存在造血干细胞及MSCs两种不同类型的干细胞, 为证实哪种细胞在逆转肝纤维化方面起作用, Yamamoto等^[29]利用Live-8抗体将骨髓干细胞分为Live-8阳性细胞及Live-8阴性细胞两个亚群, 其中阳性细胞是造血干细胞, 而阴性细胞是非造血干细胞, 因为Live-8抗体是一种单克隆抗体, 他可以通过特定的细胞表面标志物来识别骨髓造血干细胞。Sakaida等^[30]研究表明, 将骨髓干细胞植入CCl₄诱导的肝纤维化小鼠体内, 发现Live-8阴性亚群的骨髓干细胞能够增强表达MMP, 使肝纤维化明显减轻, 而Live-8阳性细胞在对肝纤维化不起任何作用。另外, Terai等^[31]通过GFP/CCl₄模型研究发现, Live-8阴性细胞能更有效的植入纤维化的肝组织中并且向肝细胞分化, 表明Live-8阴性亚群的骨髓干细胞(非造血干细胞, 可能是MSCs)能够逆转肝纤维化。

Fang等^[32]研究发现, MSCs移植可以通过减少炎症反应、胶原沉积和组织重塑来修复损伤的心肝肺, 这表明, MSCs不仅能修复急性损伤的组织, 而且具有减轻慢性纤维化的作用。Abdel Aziz等^[33]将雄鼠MSCs注入到CCl₄诱导的肝纤维化雌鼠尾静脉中, 通过对雌鼠肝组织的组织病理学特征、肝功指标[丙氨酸氨基转移

酶(alanine aminotransferase, ALT)和血清白蛋白(albumin, ALB)]、I型胶原基因的表达以及羟基脯氨酸含量的检测,证实MSCs具有抑制肝纤维化过程的作用。Oyagi等^[34]将MSCs与肝细胞生长因子(hepatocyte growth factor, HGF)一起培养后,植入CCl₄诱导的肝损伤小鼠体内,结果发现,小鼠的ALB恢复正常,转氨酶活性及肝纤维化明显受到抑制,而将没和HGF一起培养的MSCs植入肝损伤的小鼠体内,不会出现上述结果。该实验发现,HGF可以诱导MSCs分化成肝细胞样细胞,并具有部分肝细胞的功能,还可以增加MSCs植入受体小鼠肝内的数量。

Terai等^[35]报道,9例肝硬化患者从周围静脉输注自体骨髓细胞,移植24 wk后,ALB、总蛋白水平及Child-Pugh分级均明显改善($P<0.05$),且未观察到任何不良反应。近年,国内有学者^[36]利用自体骨髓干细胞肝内移植治疗36例失代偿期肝硬化患者,结果发现,移植术后2、3 mo,ALT、TB和PT均较术前明显改善($P<0.05$),而ALB直到术后3 mo才明显好转($P<0.05$)。移植术后2 mo,腹水减轻的占70.8%(17/24),乏力好转的占83.9%(26/31),食欲改善的占90.3%(28/31)。移植术中和术后,未见明显不良反应和并发症发生。可见自体BMSCs移植可以作为肝硬化肝纤维化治疗的一种新方法。

3.2 MSCs逆转肝纤维化的机制 MSCs逆转肝纤维化的具体机制尚不明确,可能与以下几个方面有关:(1)MSCs分化成肝细胞,修复损伤的肝组织:在肝纤维化特别是肝硬化时,有大量肝细胞坏死,因此补充正常功能的肝细胞可以修复损伤的肝组织。许多研究表明,MSCs在体内外均可分化为肝细胞^[32,37-39]。(2)MSCs抑制HSC的活化,促使HSC的凋亡,减少ECM的生成:HSC是ECM的主要来源,肝损伤时,HSC的活化是肝硬化肝纤维化发生发展的中心环节。Zhao等^[40]研究发现,在体外将MSCs与HSC共培养能够增加G₀期HSC数量,减少S期HSC数量。由此推断,MSCs能抑制HSC的活化。Shi等^[41]研究发现,MSCs能诱导HSC凋亡,MSCs诱导HSC凋亡的效应依赖于两者间的比值以及MSCs分泌的各种可溶性细胞因子的表达。MSCs诱导HSC凋亡是通过分泌各种细胞因子(例如NGF、HGF等)激活JNK途径实现的。另外研究还发现通过抗体中和阻断MSCs分泌的TGF- β 1,可以增强MSCs促HSC凋亡的效应。这是因为TGF- β 1能够促纤维化形成,在刺激HSC

活化和增生中具有重要作用,其抑制凋亡的效应部分是由Fas配体表达减少介导的^[30],他还能抑制HGF的表达^[42]。(3)MSCs分泌细胞因子/生长因子:MSCs能够分泌多种细胞因子及生长因子,如HGF、NGF、TGF- β 、ILs、TNF- α 等^[41,43-45]。Oyagi等^[34]研究发现,MSCs和CCl₄诱导的损伤肝细胞一起培养时,分泌的HGF明显增多,表明MSCs可能从损伤的肝细胞中接受某些信号,受信号调节分泌HGF。HGF不仅能诱导MSCs分化成肝细胞,还抑制TGF- β 1产生,阻止肝细胞凋亡及肝脏纤维化^[46-48]。另有报道称,活化的HSC分泌的IL-6,能够诱导MSCs分泌IL-10,表明MSCs在肝脏的微环境中能够对HSC做出动态反应。此外,MSCs还分泌TNF- α ,阻断MSCs分泌IL-10,TNF- α 还阻断了MSCs抑制HSC增生和胶原合成^[45]。(4)MSCs表达MMP,降解ECM:MMP有较强的降解ECM作用^[49],研究表明骨髓干细胞植入CCl₄诱导的肝硬化小鼠体内,可使小鼠的肝功改善,死亡率降低,这与骨髓干细胞增强表达MMPs,特别是MMP-9,降解胶原纤维,肝纤维化减轻有关^[39]。(5)MSCs分化为肝卵原细胞,促进肝修复再生:研究表明^[50],在肝严重受损时,肝细胞增殖受阻,肝卵原细胞能增殖分化为肝细胞,是肝修复的主要手段。Oh等^[51]通过2-AAF/部分肝切除诱导的肝再生大鼠模型发现,部分肝卵原细胞来源于骨髓干细胞,并且能够分化成肝细胞。

4 结论

MSCs能够分化为肝细胞,抑制和减轻肝纤维化,并且不发生同种异体移植排斥反应,在治疗肝硬化肝纤维化方面具有广阔的应用前景。但是直到目前为止,MSCs广泛应用于临床还有许多问题亟待解决:MSCs体内数量少,体外分离、纯化及扩增方法还不够完善;MSCs特异性表面标志分子不确定;MSCs逆转肝纤维化的分子机制尚不清楚;MSCs移植后是否会产生无法控制的细胞分化增殖,是否具有致癌性。相信随着这些难题的解决,MSCs移植有望成为治疗肝纤维化的理想方法。

5 参考文献

- 1 Bonis PA, Friedman SL, Kaplan MM. Is liver fibrosis reversible? *N Engl J Med* 2001; 344: 452-454
- 2 Noble-Jamieson G, Valente J, Barnes ND, Friend PJ, Jamieson NV, Rasmussen A, Calne RY. Liver transplantation for hepatic cirrhosis in cystic

■ 相关报道

有关骨髓间充质干细胞逆转肝纤维化的机制还不清楚,目前研究主要集中在MSCs抑制HSC活化、促进HSC凋亡以及分泌各种细胞因子、抑制炎症反应方面。

同行评价

本文立题新颖,读者可以进一步深入了解骨髓间充质干细胞在逆转肝纤维化中的作用,为肝纤维化、肝硬化患者的基础和临床的研究提供新的思路,具有较大的意义。

- 3 Ben-Ari Z, Pappo O, Zemel R, Mor E, Tur-Kaspa R. Association of lamivudine resistance in recurrent hepatitis B after liver transplantation with advanced hepatic fibrosis. *Transplantation* 1999; 68: 232-236
- 4 Kumar M, Sarin SK. Is cirrhosis of the liver reversible? *Indian J Pediatr* 2007; 74: 393-399
- 5 Arthur MJ. Reversibility of liver fibrosis and cirrhosis following treatment for hepatitis C. *Gastroenterology* 2002; 122: 1525-1528
- 6 Poynard T, McHutchison J, Manns M, Trepo C, Lindsay K, Goodman Z, Ling MH, Albrecht J. Impact of pegylated interferon alfa-2b and ribavirin on liver fibrosis in patients with chronic hepatitis C. *Gastroenterology* 2002; 122: 1303-1313
- 7 Dufour JF, DeLellis R, Kaplan MM. Reversibility of hepatic fibrosis in autoimmune hepatitis. *Ann Intern Med* 1997; 127: 981-985
- 8 Wanless IR. Use of corticosteroid therapy in autoimmune hepatitis resulting in the resolution of cirrhosis. *J Clin Gastroenterol* 2001; 32: 371-372
- 9 Kaplan MM, DeLellis RA, Wolfe HJ. Sustained biochemical and histologic remission of primary biliary cirrhosis in response to medical treatment. *Ann Intern Med* 1997; 126: 682-688
- 10 Kweon YO, Goodman ZD, Dienstag JL, Schiff ER, Brown NA, Burchardt E, Schoonhoven R, Brenner DA, Fried MW. Decreasing fibrogenesis: an immunohistochemical study of paired liver biopsies following lamivudine therapy for chronic hepatitis B. *J Hepatol* 2001; 35: 749-755
- 11 Hammel P, Couvelard A, O'Toole D, Ratouis A, Sauvanet A, Fléjou JF, Degott C, Belghiti J, Bernades P, Valla D, Ruszniewski P, Lévy P. Regression of liver fibrosis after biliary drainage in patients with chronic pancreatitis and stenosis of the common bile duct. *N Engl J Med* 2001; 344: 418-423
- 12 Bataller R, Brenner DA. Liver fibrosis. *J Clin Invest* 2005; 115: 209-218
- 13 Bataller R, Brenner DA. Hepatic stellate cells as a target for the treatment of liver fibrosis. *Semin Liver Dis* 2001; 21: 437-451
- 14 Elsharkawy AM, Oakley F, Mann DA. The role and regulation of hepatic stellate cell apoptosis in reversal of liver fibrosis. *Apoptosis* 2005; 10: 927-939
- 15 Friedman SL, Bansal MB. Reversal of hepatic fibrosis -- fact or fantasy? *Hepatology* 2006; 43: S82-S88
- 16 Kisseleva T, Brenner DA. Hepatic stellate cells and the reversal of fibrosis. *J Gastroenterol Hepatol* 2006; 21 Suppl 3: S84-S87
- 17 Breitkopf K, Haas S, Wiercinska E, Singer MV, Dooley S. Anti-TGF-beta strategies for the treatment of chronic liver disease. *Alcohol Clin Exp Res* 2005; 29: 121S-131S
- 18 Ueberham E, Löw R, Ueberham U, Schöning K, Bujard H, Gebhardt R. Conditional tetracycline-regulated expression of TGF-beta1 in liver of transgenic mice leads to reversible intermediary fibrosis. *Hepatology* 2003; 37: 1067-1078
- 19 Kassem M, Abdallah BM. Human bone-marrow-derived mesenchymal stem cells: biological characteristics and potential role in therapy of degenerative diseases. *Cell Tissue Res* 2008; 331: 157-163
- 20 Lange C, Bassler P, Lioznov MV, Bruns H, Kluth D, Zander AR, Fiegel HC. Hepatocytic gene expression in cultured rat mesenchymal stem cells. *Transplant Proc* 2005; 37: 276-279
- 21 Sato Y, Araki H, Kato J, Nakamura K, Kawano Y, Kobune M, Sato T, Miyaniishi K, Takayama T, Takahashi M, Takimoto R, Iyama S, Matsunaga T, Ohtani S, Matsuura A, Hamada H, Niitsu Y. Human mesenchymal stem cells xenografted directly to rat liver are differentiated into human hepatocytes without fusion. *Blood* 2005; 106: 756-763
- 22 譚浩翔, 高毅, 陳建鋒. 人骨髓間充質干細胞移植在大鼠肝再生衰竭中的作用. *中華肝病學雜誌* 2007; 15: 473-474
- 23 Saito T, Kuang JQ, Bittira B, Al-Khaldi A, Chiu RC. Xenotransplant cardiac chimera: immune tolerance of adult stem cells. *Ann Thorac Surg* 2002; 74: 19-24; discussion 24
- 24 Fändrich F, Lin X, Chai GX, Schulze M, Ganten D, Bader M, Holle J, Huang DS, Parwaresch R, Zavazava N, Binas B. Preimplantation-stage stem cells induce long-term allogeneic graft acceptance without supplementary host conditioning. *Nat Med* 2002; 8: 171-178
- 25 Uccelli A, Moretta L, Pistoia V. Immunoregulatory function of mesenchymal stem cells. *Eur J Immunol* 2006; 36: 2566-2573
- 26 Plumas J, Chaperot L, Richard MJ, Molens JP, Bensa JC, Favrot MC. Mesenchymal stem cells induce apoptosis of activated T cells. *Leukemia* 2005; 19: 1597-1604
- 27 Corcione A, Benvenuto F, Ferretti E, Giunti D, Cappiello V, Cazzanti F, Risso M, Gualandi F, Mancardi GL, Pistoia V, Uccelli A. Human mesenchymal stem cells modulate B-cell functions. *Blood* 2006; 107: 367-372
- 28 Bartholomew A, Sturgeon C, Siatskas M, Ferrer K, McIntosh K, Patil S, Hardy W, Devine S, Ucker D, Deans R, Moseley A, Hoffman R. Mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro and prolong skin graft survival in vivo. *Exp Hematol* 2002; 30: 42-48
- 29 Yamamoto N, Terai S, Ohata S, Watanabe T, Omori K, Shinoda K, Miyamoto K, Katada T, Sakaida I, Nishina H, Okita K. A subpopulation of bone marrow cells depleted by a novel antibody, anti-Liv8, is useful for cell therapy to repair damaged liver. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 313: 1110-1108
- 30 Sakaida I, Terai S, Yamamoto N, Aoyama K, Ishikawa T, Nishina H, Okita K. Transplantation of bone marrow cells reduces CCl4-induced liver fibrosis in mice. *Hepatology* 2004; 40: 1304-1311
- 31 Terai S, Sakaida I, Nishina H, Okita K. Lesson from the GFP/CCl4 model--translational research project: the development of cell therapy using autologous bone marrow cells in patients with liver cirrhosis. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 2005; 12: 203-207
- 32 Fang B, Shi M, Liao L, Yang S, Liu Y, Zhao RC. Systemic infusion of FLK1(+) mesenchymal stem cells ameliorate carbon tetrachloride-induced liver fibrosis in mice. *Transplantation* 2004; 78: 83-88
- 33 Abdel Aziz MT, Atta HM, Mahfouz S, Fouad HH, Roshdy NK, Ahmed HH, Rashed LA, Sabry D, Hassouna AA, Hasan NM. Therapeutic potential of bone marrow-derived mesenchymal stem cells on experimental liver fibrosis. *Clin Biochem* 2007; 40: 893-899
- 34 Oyagi S, Hirose M, Kojima M, Okuyama M, Kawase M, Nakamura T, Ohgushi H, Yagi K. Therapeutic effect of transplanting HGF-treated bone marrow

- mesenchymal cells into CCl₄-injured rats. *J Hepatol* 2006; 44: 742-748
- 35 Terai S, Ishikawa T, Omori K, Aoyama K, Marumoto Y, Urata Y, Yokoyama Y, Uchida K, Yamasaki T, Fujii Y, Okita K, Sakaida I. Improved liver function in patients with liver cirrhosis after autologous bone marrow cell infusion therapy. *Stem Cells* 2006; 24: 2292-2298
- 36 朱康顺, 单鸿, 何可可, 李征然, 关守海, 黄明声, 钱结胜, 庞鹏飞, 姜在波. 自体骨髓干细胞肝内移植治疗失代偿期肝硬化的初步临床观察. *中国医学影像学技术* 2007; 23: 1863-1865
- 37 Lee KD, Kuo TK, Whang-Peng J, Chung YF, Lin CT, Chou SH, Chen JR, Chen YP, Lee OK. In vitro hepatic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Hepatology* 2004; 40: 1275-1284
- 38 Sakaida I, Terai S, Nishina H, Okita K. Development of cell therapy using autologous bone marrow cells for liver cirrhosis. *Med Mol Morphol* 2005; 38: 197-202
- 39 Hung SC, Chen NJ, Hsieh SL, Li H, Ma HL, Lo WH. Isolation and characterization of size-sieved stem cells from human bone marrow. *Stem Cells* 2002; 20: 249-258
- 40 Zhao DC, Lei JX, Chen R, Yu WH, Zhang XM, Li SN, Xiang P. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells protect against experimental liver fibrosis in rats. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 3431-3440
- 41 Shi L, Li G, Wang J, Sun B, Yang L, Wang G, Wang D, Mu L, Chen H, Jin L, Kostulas N, Li H. Bone marrow stromal cells control the growth of hepatic stellate cells in vitro. *Dig Dis Sci* 2008; 53: 2969-2974
- 42 Matsumoto K, Tajima H, Okazaki H, Nakamura T. Negative regulation of hepatocyte growth factor gene expression in human lung fibroblasts and leukemic cells by transforming growth factor-beta 1 and glucocorticoids. *J Biol Chem* 1992; 267: 24917-24920
- 43 Matsuda-Hashii Y, Takai K, Ohta H, Fujisaki H, Tokimasa S, Osugi Y, Ozono K, Matsumoto K, Nakamura T, Hara J. Hepatocyte growth factor plays roles in the induction and autocrine maintenance of bone marrow stromal cell IL-11, SDF-1 alpha, and stem cell factor. *Exp Hematol* 2004; 32: 955-961
- 44 Li Y, Chen J, Chen XG, Wang L, Gautam SC, Xu YX, Katakowski M, Zhang LJ, Lu M, Janakiraman N, Chopp M. Human marrow stromal cell therapy for stroke in rat: neurotrophins and functional recovery. *Neurology* 2002; 59: 514-523
- 45 Parekkadan B, van Poll D, Megeed Z, Kobayashi N, Tilles AW, Berthiaume F, Yarmush ML. Immunomodulation of activated hepatic stellate cells by mesenchymal stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; 363: 247-252
- 46 Oe H, Kaido T, Mori A, Onodera H, Imamura M. Hepatocyte growth factor as well as vascular endothelial growth factor gene induction effectively promotes liver regeneration after hepatectomy in Solt-Farber rats. *Hepatogastroenterology* 2005; 52: 1393-1397
- 47 Shi MN, Huang YH, Zheng WD, Zhang LJ, Chen ZX, Wang XZ. Relationship between transforming growth factor beta1 and anti-fibrotic effect of interleukin-10. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 2357-2362
- 48 Matsuda Y, Matsumoto K, Ichida T, Nakamura T. Hepatocyte growth factor suppresses the onset of liver cirrhosis and abrogates lethal hepatic dysfunction in rats. *J Biochem* 1995; 118: 643-649
- 49 Zheng WD, Zhang LJ, Shi MN, Chen ZX, Chen YX, Huang YH, Wang XZ. Expression of matrix metalloproteinase-2 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in hepatic stellate cells during rat hepatic fibrosis and its intervention by IL-10. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 1753-1758
- 50 Oertel M, Shafritz DA. Stem cells, cell transplantation and liver repopulation. *Biochim Biophys Acta* 2008; 1782: 61-74
- 51 Oh SH, Witek RP, Bae SH, Zheng D, Jung Y, Piscaglia AC, Petersen BE. Bone marrow-derived hepatic oval cells differentiate into hepatocytes in 2-acetylaminofluorene/partial hepatectomy-induced liver regeneration. *Gastroenterology* 2007; 132: 1077-1087

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 •

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)

肝癌组织NF- κ B表达及活化干预对肝癌细胞增殖的影响

邵苏吉, 姚登福, 沈俊俊, 吴玮, 姚宁华

■背景资料

NF- κ B活化与肝癌发生发展有关, TNF- α 的转录受NF- κ B调控, 且他又以自分泌或旁分泌方式作用于细胞, 诱导细胞凋亡同时也激活NF- κ B, 促使细胞建立快速防御机制, 发挥抗凋亡作用。

邵苏吉, 南通大学附属医院感染性疾病控制科 江苏省南通市 226001

姚登福, 沈俊俊, 吴玮, 南通大学临床医学研究中心 江苏省南通市 226001

姚宁华, 南通大学医学院 江苏省南通市 226001

邵苏吉, 主管技师, 从事医学研究和感染性疾病控制工作。

江苏省卫生科技基金资助项目, No. H2007027

作者贡献分布: 本文由邵苏吉、沈俊俊及姚登福设计; 邵苏吉与沈俊俊撰写; 姚登福审定。

通讯作者: 姚登福, 教授, 226001, 江苏省南通市西寺路20号, 南通大学附属医院临床医学研究中心. yaodf@ahnmc.com

电话: 0513-85052413 传真: 0513-85052523

收稿日期: 2010-04-22 修回日期: 2010-06-28

接受日期: 2010-07-05 在线出版日期: 2010-08-08

Intervention of NF- κ B activation inhibits the growth of human hepatocellular carcinoma HepG2 cells

Su-Ji Shao, Deng-Fu Yao, Jun-Jun Shen, Wei Wu, Ning-Hua Yao

Su-Ji Shao, Department of Infectious Diseases, the Affiliated Hospital of Nantong University, Nantong 226001, Jiangsu Province, China

Deng-Fu Yao, Jun-Jun Shen, Wei Wu, Clinical Medical Research Center, the Affiliated Hospital of Nantong University, Nantong 226001, Jiangsu Province, China

Ning-Hua Yao, School of Medicine, Nantong University, Nantong 226001, Jiangsu Province, China

Supported by: the Health and Technology Foundation of Jiangsu Province, No. H2007027

Correspondence to: Professor Deng-Fu Yao, Clinical Medical Research Center, the Affiliated Hospital of Nantong University, Nantong 226001, Jiangsu Province, China. yaodf@ahnmc.com

Received: 2010-04-22 Revised: 2010-06-28

Accepted: 2010-07-05 Published online: 2010-08-08

Abstract

AIM: To investigate the impact of intervention of nuclear factor- κ B (NF- κ B) activation with tumor necrosis factor- α (TNF- α) monoclonal antibody (TNF- α mab) on the proliferation of human hepatocellular carcinoma (HCC) HepG2 cells.

METHODS: HepG2 cells were cultured *in vitro* and incubated with TNF- α mab. The changes in cell cycle and apoptosis were detected by flow cytometry (FCM) and annexin-V/PI double staining assay, respectively. The expression of NF- κ B and TNF- α in human liver cancer, tumor-

adjacent liver tissue, and HepG2 cells were quantitatively analyzed by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).

RESULTS: The expression level of NF- κ B in human HCC was higher than that in tumor-adjacent liver tissue ($P < 0.01$). The percentage of apoptotic cells in HepG2 cells treated with TNF- α mab (5 mg/L) was higher than that in untreated HepG2 cells ($21.45\% \pm 4.07\%$ vs $5.63\% \pm 0.93\%$, $q = 10.07$, $P < 0.01$). The percentage of cells in G₀/G₁ phase was significantly higher in HepG2 cells treated with TNF- α mab than in untreated HepG2 cells ($q = 10.98$, $P < 0.01$) though no significant difference was noted in the percentage of cells in S phase between the two groups of cells. The level of NF- κ B in HepG2 cells treated with TNF- α mab was lower than that in untreated HepG2 cells [59.00 ng/mg ± 1.02 ng/mg nuclear protein (NP) vs 73.88 ng/mg ± 7.41 ng/mg NP, $q = 18.92$, $P < 0.01$]. Increased NF- κ B level is correlated with decreased TNF- α level in HepG2 cells treated with TNF- α mab ($r = 0.89$, $P < 0.01$). The inhibitory effect of TNF- α mab on TNF- α level is dose-dependent ($P < 0.01$).

CONCLUSION: Intervention of NF- κ B activation by TNF- α mab inhibits the proliferation of HepG2 cells by inducing apoptosis and blocking the cells in G₀/G₁ phase.

Key Words: Hepatocellular carcinoma; Tumor necrosis factor- α ; Nuclear factor- κ B; Apoptosis; HepG2

Shao SJ, Yao DF, Shen JJ, Wu W, Yao NH. Intervention of NF- κ B activation inhibits the growth of human hepatocellular carcinoma HepG2 cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(22): 2296-2301

摘要

目的: 分析核转录因子- κ B(NF- κ B)表达及活化干预对肝癌细胞HepG2增殖的影响。

方法: 培养HepG2肝癌细胞并给予抗人肿瘤坏死因子(TNF)- α 单克隆抗体, 以流式细胞术和Annexin V-FITC/PI双色标记法分别检测细胞

■同行评议者

郑鹏远, 教授, 郑州大学第二附属医院消化科

周期时相和细胞凋亡的变化;以酶联免疫吸附法(ELISA)定量分析肝癌组织及用药前后细胞培养液中TNF- α 和核蛋白NF- κ B的变化。

结果:人肝癌的癌灶组织中NF- κ B表达,较癌旁组织明显增强($P<0.01$);HepG2细胞培养给予抗TNF- α 单克隆抗体(5 mg/L)后,肝癌细胞凋亡率明显高于对照($21.45\%\pm 4.07\%$ vs $5.63\%\pm 0.93\%$, $q=10.07$, $P<0.01$); G_0/G_1 明显高于对照($66.23\%\pm 1.29\%$ vs $59.00\%\pm 1.02\%$, $q=10.98$, $P<0.01$),而S期细胞比例无明显改变;用药后细胞株NF- κ B水平明显低于对照(59.00 ng/mg ± 1.02 ng/mg核蛋白 vs 73.88 ng/mg ± 7.41 ng/mg核蛋白, $q=18.92$, $P<0.01$),与培养液中明显降低的TNF- α 水平呈显著正相关($r=0.89$, $P<0.01$),抑制效应呈浓度依赖性,高浓度时作用最明显($P<0.01$)。

结论:以TNF- α 抗体干预NF- κ B信号通路活化,可使肝癌细胞凋亡增加,细胞周期阻滞在 G_0/G_1 期,肝癌细胞增殖明显抑制。

关键词:肝细胞癌;肿瘤坏死因子- α ;核因子- κ B;凋亡;HepG2细胞

邵苏吉, 姚登福, 沈俊俊, 吴玮, 姚宁华. 肝癌组织NF- κ B表达及活化干预对肝癌细胞增殖的影响. 世界华人消化杂志 2010; 18(22): 2296-2301
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/2296.asp>

0 引言

肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)是在病毒、化学致癌物等多种因素的影响下,因癌基因或癌相关基因激活、抗癌基因失活或胚胎期某些酶基因重新复活等诸多因素引起的肝细胞生长失控而致癌变,期间经历了启动、促进、演变的多阶段发病过程,并与基因调控和表达等密切相关^[1-3].核转录因子- κ B(nuclear factor- κ B, NF- κ B)是具有多向性调节作用的转录因子,参与细胞增殖与凋亡的调节,并且能直接影响细胞周期或DNA复制.激活的NF- κ B在炎症相关性HCC的发生发展中高表达,在肝细胞慢性炎症和癌变之间起桥梁作用^[4-6].肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)是一种致炎性细胞因子,在慢性肝炎、HCC发生时TNF- α 表达明显升高,炎症性介质TNF- α 如何参与肝细胞癌变,其机制有待探讨^[6-8].我们对人肝癌及癌旁组织中的NF- κ B进行定量分析,并在体外培养HepG2细胞株,给予不同浓度抗TNF- α 单克隆抗体,动态观察细胞凋亡和周期时相变化、NF- κ B

和TNF- α 变化,以探讨经抗TNF- α 干预NF- κ B活化通路对HepG2细胞增殖的影响。

1 材料和方法

1.1 材料 人HepG2肝癌细胞株,由南京凯基生物科技发展有限公司提供. LEAF™ Purified anti-human TNF- α 单克隆抗体(BioLegend, 美国)购自达科为生物技术有限公司;RPMI 1640及胎牛血清购于Hyclone公司;0.25%胰蛋白酶溶液、青霉素-链霉素溶液(100 \times)、L-谷氨酰胺溶液(100 \times)、磷酸盐缓冲液、二甲基亚砜、Annexin-V-FITC凋亡检测试剂盒、碘化丙啶、RNaseA及Triton X-100、细胞核蛋白与细胞质蛋白抽提试剂盒、BCA蛋白浓度测定试剂盒均购自碧云天生物技术有限公司;人NF- κ B ELISA试剂盒(Cusabio, 美国)购自武汉华美生物技术有限公司;人TNF- α ELISA检测试剂盒(ADL, 美国)购自上海生物工程有限公司。

1.2 方法

1.2.1 人肝癌组织与总RNA制备:收集2009-03/2009-12手术后新鲜肝癌组织标本,按自身配对原则,留取癌和癌旁组织共30份,每份约200 mg,经病理学检查均为原发性肝癌,肝组织置于-85 $^{\circ}$ C冰箱保存备用.取肝组织50 mg置于无RNA酶匀浆器中,加入TRIzol RNA抽提试剂(Gibco公司)1.0 mL匀浆,氯仿,异丙醇,乙醇等制备总RNA,于60 $^{\circ}$ C, 10 min.在UV2201型紫外分光光度计上测定 A_{260} 和 A_{280} 值,比率为1.8-2.0。

1.2.2 肝匀浆制备和核蛋白提取:在分析天平上称取肝组织50 mg,剪成非常细小的组织碎片置于经高压灭菌的匀浆器中,再按细胞核蛋白与细胞质蛋白抽提试剂盒的使用说明进行操作,方法主要为:加入适当量的组织匀浆液,冰浴中充分匀浆,经离心后移去上清,再加入含有PMSF的细胞质蛋白抽提试剂A,震荡和冰浴后加入试剂B,再次震荡,冰浴,离心后移去上清,此时加入含有PMSF的核蛋白提取试剂,经反复震荡冰浴共30 min后,离心吸取上清(即核蛋白),置于-85 $^{\circ}$ C冰箱保存备用.以上抽提蛋白的所有步骤均在冰上或4 $^{\circ}$ C进行。

1.2.3 细胞培养及分组:HepG2肝癌细胞常规复苏后,以完全培养液(含100 mL/L胎牛血清、100 kU/L青霉素、100 mg/L链霉素及1% L-谷氨酰胺的RPMI 1640培养液,简称完培)在37 $^{\circ}$ C, 50 mL/L CO₂及100%湿度的条件下培养.适时传代,取对数生长期的细胞进行实验.将细胞分为单

■ 研发前沿

肿瘤坏死因子- α (TNF- α)是一种致炎性细胞因子,在慢性肝炎、HCC发生时TNF- α 表达明显升高,炎症性介质TNF- α 如何参与肝细胞癌变,其机制有待探讨。

■创新盘点

本研究对人肝癌及癌旁组织中的NF- κ B进行定量分析,并在体外培养HepG2细胞株,给予不同浓度抗TNF- α 单克隆抗体,动态观察细胞凋亡和周期时相变化、NF- κ B和TNF- α 变化,以探讨经抗TNF- α 干预NF- κ B活化通路对HepG2细胞增殖的影响。

抗组和对照组,每组设3个复孔。抗人TNF- α 单克隆抗体,稀释成5、0.5、0.05 mg/L 3个浓度,对照组不加任何药物。48 h后收集细胞备用。

1.2.4 细胞周期时相的变化:取对数生长期细胞,调整细胞密度为 10^5 /mL,以每孔 2×10^5 细胞接种于6孔培养板,常规培养24 h后弃去培养基,加入无血清的RPMI 1640培养24 h使细胞周期同步化,然后换用添加药物的完全培养基2 mL进行培养。48 h后以0.25%胰蛋白酶消化收集细胞,离心 $1\,000\text{ r/min} \times 5\text{ min}$,弃上清液, PBS洗涤细胞2次。以预冷($-20\text{ }^\circ\text{C}$)的700 mL/L乙醇2 mL固定($4\text{ }^\circ\text{C}$, 72 h)。离心 $1\,000\text{ r/min} \times 5\text{ min}$,除去固定液, PBS洗涤细胞2次。在细胞沉淀中加入1 mL碘化丙啶(propidium iodide, PI)混合染液(柠檬酸三钠0.25 g, Triton X-100 0.75 g, PI 0.025 g, 核糖核酸酶0.005 g, 双蒸水250 mL), $4\text{ }^\circ\text{C}$ 避光放置30 h。过300目细胞筛网,以488 nm波长为激发光上机检测, Macguist软件分析细胞周期分布。

1.2.5 细胞凋亡检测:取对数生长期细胞,调整细胞密度为 10^5 /mL,以每孔 5×10^4 细胞接种于24孔培养板,常规培养24 h后弃去培养基,换用添加了药物的完培0.5 mL继续培养,48 h后吸出各孔培养液至离心管, PBS洗涤细胞2次,以0.25%胰蛋白酶消化收集细胞于对应的离心管内,离心 $1\,000\text{ r/min} \times 5\text{ min}$,弃上清, PBS洗涤细胞2次,弃上清。加入195 μL Annexin V-FITC结合液($1 \times$)轻轻重悬细胞,再加入5 μL Annexin V-FITC,轻轻混匀,室温($20\text{ }^\circ\text{C}$ - $25\text{ }^\circ\text{C}$)避光孵育10 min。离心 $1\,000\text{ r/min} \times 5\text{ min}$,弃上清,加入190 μL Annexin V-FITC结合液($1 \times$)轻轻重悬细胞。加入10 μL PI染色液,轻轻混匀,冰浴避光放置。使用流式细胞仪进行检测分析。

1.2.6 细胞收集:取对数生长期的细胞,调整细胞密度为 10^5 /mL,以每孔 2×10^5 细胞接种于6孔培养板,常规培养24 h后弃去培养基,换用添加了药物的完培2 mL进行培养。48 h后吸出各孔内的培养液, $-80\text{ }^\circ\text{C}$ 保存备用。细胞以PBS清洗2次,用细胞刮子收集细胞于离心管内, $1\,000\text{ r/min} \times 5\text{ min}$ 。弃上清液,留下细胞沉淀。按照细胞核蛋白与浆蛋白抽提试剂盒说明书提取细胞核蛋白,以BCA法测定核蛋白的浓度。

1.2.7 NF- κ B定量分析: NF- κ B活性测定按TransAM(Active Motif提供)的具体说明进行。其方法:每孔加结合缓冲液30 μL 和10 μL 细胞核蛋白提取液,并加细胞裂解液(cell lysis buffer, CLB)20 μL 。阳性对照孔中加2.5 μg Jurkat核提取

物并稀释到20 μL CLB中,空白孔中只加20 μL CLB液体。标准孔中依次加20 μL 重组蛋白质P50或P65,封板后置于震荡培养箱中室温孵育1 h。每孔以洗涤液200 μL 洗3次。然后加入100 μL 稀释的NF- κ B抗体,封板后室温孵育1 h,再以洗涤液200 μL 洗3次。每孔加100 μL HRP结合的抗体,封板后室温震荡1 h,以洗涤液200 μL 洗4次。每孔加100 μL 显色剂,室温置2-10 min,每孔加终止液100 μL ,测定 $A_{450\text{nm}}$ 值,根据标准曲线计算出蛋白浓度。

1.2.8 TNF- α 浓度测定:取出浆蛋白提取液中总浆蛋白浓度以BCA法测定,临用前试剂A和B以50:1配制成适量BCA工作液。取蛋白标准品10 μL 用9 g/L生理盐水稀释到100 μL 。将标准品按0, 1, 2, 4, 8, 12, 16和20 μL 加到96孔板的标准品孔中,除最后1孔外其余加标准品稀释液补足至20 μL 。根据样品浓度的高低,加适当体积样品到样品孔中,加标准品稀释液到20 μL ,各孔加入200 μL BCA工作液, $37\text{ }^\circ\text{C}$ 放置30 min,在酶标分析仪上578 nm处测定其 A 值,按标准曲线计算蛋白浓度。肝组织匀浆及血清中TNF- α 水平测定严格按照操作说明书进行。

统计学处理 数据以mean \pm SD表示,多个样本均数间的比较先进行方差齐性检验,方差相等时采用 t 检验或者方差分析,用Stata7.0统计软件处理数据,以 $P < 0.05$ 表示差别有统计学意义。

2 结果

2.1 人癌及癌旁组织中总RNA水平和NF- κ B浓度比较 肝癌组织中核酸代谢旺盛,人HCC组织总RNA表达水平(比浓度:每毫克湿质量肝组织中总RNA微克数)明显低于自身的癌周(non-HCC)组织($P < 0.01$,图1A),因癌灶组织中存在更多的坏死组织所致;而癌周组织中NF- κ B表达水平,以湿质量肝组织的比浓度计算,癌组与癌旁组NF- κ B表达差异明显,癌组NF- κ B比浓度大约是癌旁组的3倍($P < 0.01$,图1B);如以肝微克RNA计算NF- κ B比浓度,癌组织NF- κ B表达水平则十分显著地高于癌周组织($P < 0.01$)。

2.2 TNF- α 单抗干预对HepG2周期的影响 经不同浓度TNF- α 单抗(0.05、0.5、5 mg/L)作用后, HepG2细胞周期时相发生了改变(表1,图2)。单抗组 G_0/G_1 期细胞比例明显高于对照组,且呈现剂量依赖性。随着单抗浓度增加, G_0/G_1 期比例升高,以5 mg/L时最高($P < 0.01$),而S期比率无明显改变($P > 0.05$)。经0.05、0.5和5 mg/L TNF- α 单抗

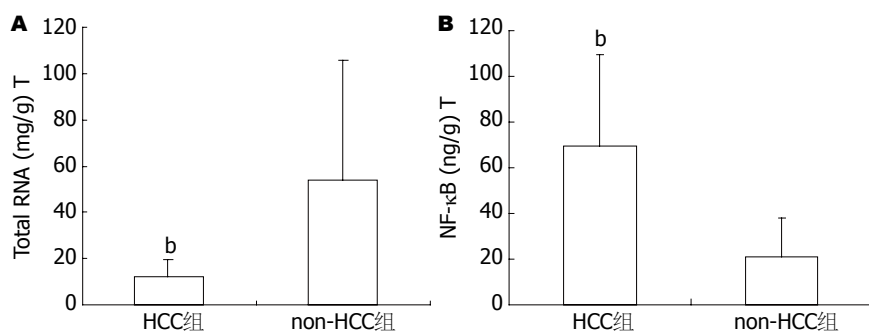


图1 人肝癌与癌周组织中总RNA及NF-κB浓度变化. A: 总RNA; B: NF-κB. ^b $P<0.01$ vs non-HCC组.

■应用要点
在小鼠肝癌模型中采用TNF-α抗体干预, 可以阻断NF-κB活化, 促使异型肝细胞发生凋亡, 使肝细胞癌变进程受到抑制, 可见TNF-α抗体能用于炎症相关性肝癌的治疗.

表1 不同浓度单抗对HepG2细胞周期的影响

浓度(mg/L)	G ₀ /G ₁ 比率(%)	q值	S期比率(%)	q值
对照组	59.00 ± 1.02		31.11 ± 4.16	
0.05	61.19 ± 1.49	2.75	26.24 ± 1.89	2.68
0.5	64.42 ± 0.53 ^b	7.66	26.25 ± 3.17	2.68
5	66.23 ± 1.29 ^{bd}	10.98	25.03 ± 2.95	3.35

^b $P<0.01$ vs 对照组; ^d $P<0.01$ vs 低浓度组.

表3 不同浓度单抗作用后细胞分泌TNF-α及NF-κB的变化

浓度(mg/L)	TNF-α(ng/L)	q值	NF-κB(μg/g核蛋白)	q值
对照组	20.57 ± 7.97		73.88 ± 7.41	
0.05	15.42 ± 3.22	2.03	41.81 ± 4.08	8.76
0.5	7.58 ± 1.08 ^a	5.11	17.24 ± 9.26 ^a	15.47
5	1.30 ± 1.53 ^{ab}	7.58	4.60 ± 1.87 ^{ab}	18.92

^a $P<0.05$ vs 对照组; ^b $P<0.01$ vs 低浓度组.

表2 不同浓度单抗作用HepG2细胞凋亡率的变化

浓度(mg/L)	早期凋亡率(%)	q值	P值
对照组	5.63 ± 0.93		
0.05	8.93 ± 2.49	2.10	>0.05
0.5	10.27 ± 2.44	2.96	>0.05
5	21.45 ± 4.07 ^b	10.07	<0.01

^b $P<0.01$ vs 其他组.

作用后, 在DNA组方图(图2)可见明显的凋亡峰出现, 且随TNF-α单抗浓度的增加, HepG2细胞的凋亡比率也随之逐渐增高.

2.3 TNF-α单抗诱导HepG2细胞凋亡 TNF-α单抗作用后, HepG2细胞凋亡率明显增加, 呈现剂量依赖性(表2). 随着单抗浓度增加, 凋亡细胞比例明显上升, 5 mg/L时达到最高($P<0.01$), 但中、低浓度组凋亡率未见统计学意义($P>0.05$).

2.4 用药后NF-κB和TNF-α的定量分析 TNF-α单抗作用后, HepG2细胞表达的NF-κB明显降低, 并呈明显浓度依赖性(表3). 随着药物浓度增加, NF-κB水平逐渐降低, 以5 mg/L时最低($P<0.01$). 用药组培养液中TNF-α浓度也明显低于对照组, 并呈浓度依赖性. 随着药物浓度的增加, 培养液中TNF-α量逐渐降低, 以5 mg/L时最低(表3). NF-κB水平与TNF-α呈正相关($r = 0.89, t = 9.22, P<0.01$).

3 讨论

NF-κB是一种能与免疫球蛋白κ轻链基因的增强

子κB序列特异性结合的蛋白质因子, 具有广泛生物学活性^[9,10]. NF-κB能调节许多细胞因子、生长因子的转录, 参与细胞增殖与凋亡的调节, 且能直接作用于细胞周期或DNA复制, 导致肿瘤的发生发展. 除胚胎细胞外, 正常细胞中NF-κB表达很少, 且在κB抑制因子(inhibitor κB, IκB)作用下处于失活状态, 但在肿瘤细胞中NF-κB被激活. HCC发生发展具有多病因、多中心和多阶段的特征, 其病原学因素主要为HBV、HCV感染. 我国HCC患者中90%伴HBV感染, HBV或HCV的持续感染, 肝细胞长期慢性炎症导致肝硬化, 最终发展为肝癌^[11,12]. 肝癌组织中核酸代谢旺盛, 肝炎病毒感染能刺激NF-κB表达并使其DNA结合能力增强, 胞内NF-κB异常与HCC发生发展密切相关.

正常肝细胞中NF-κB异二聚体在胞质内与IκB结合, 当他受到细胞因子、有丝分裂原、病毒等刺激剂激活后, IκB发生磷酸化并降解, NF-κB核定位信号暴露并转入核内与靶基因的κB基序结合, 增强其表达, NF-κB在细胞增殖和凋亡中扮演重要的角色. 在诱癌过程中随着肝细胞癌变的发生, NF-κB的水平越来越高, 在肝细胞变性组, 其总体趋势已明显高于正常对照组, 在肝细胞发生癌变时, 其活性达高峰^[13,14], 提示HCC是NF-κB高表达肿瘤, NF-κB可参与肝细胞的癌变过程, 浓度的进行性增加可反映肝细胞的早期癌变, 可见NF-κB在肝癌发生发展中的重要作用^[15,16].

同行评价

本文立意明确,方法较为先进,具有一定的理论意义和潜在的临床价值。

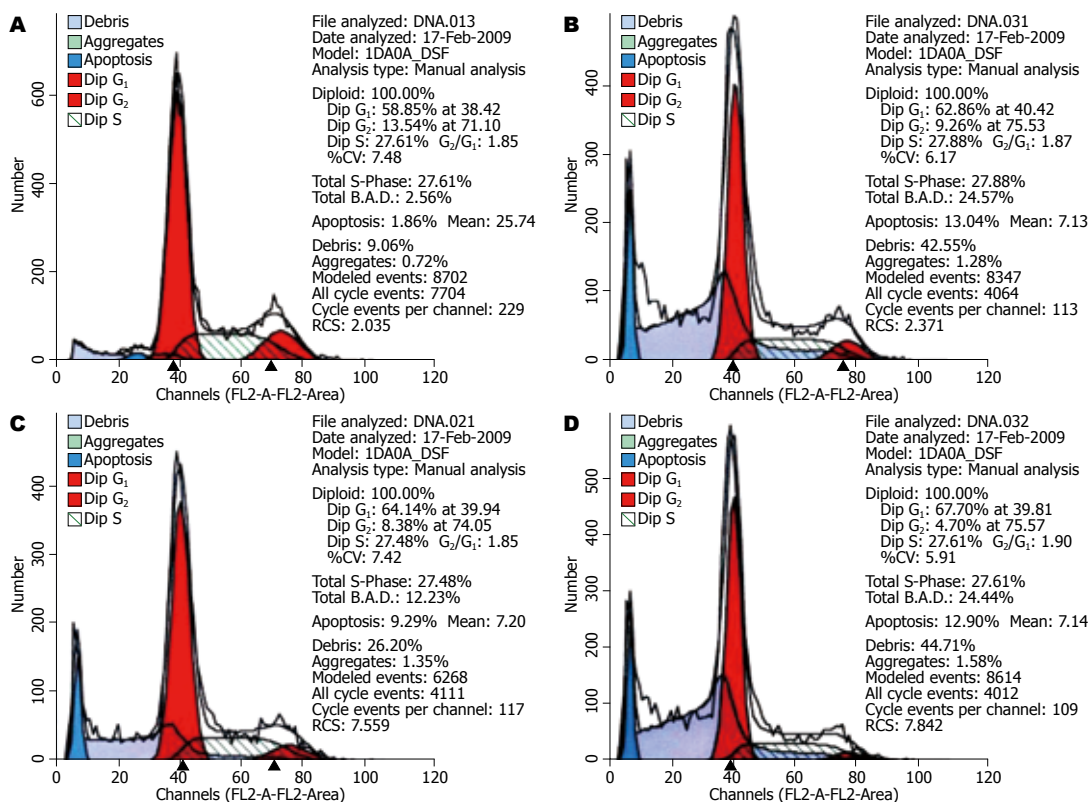


图2 不同浓度单抗作用后HepG2细胞周期的变化。A: 0 mg/L; B: 0.05 mg/L; C: 0.5 mg/L; D: 5 mg/L。

HBV和HCV的慢性持续感染与肝癌发生关系极为密切, HBxAg主要通过ras-raf-map激酶通路激活NF- κ B, 而HCV核心蛋白可能通过与TNF受体I和LT β 受体结合后激活NF- κ B, 抑制携带肝炎病毒的肝细胞的凋亡, 促进其增生^[17,18]。肝炎病毒利用各种通路激活NF- κ B, 促使病毒复制, 细胞向恶性转变, 抑制癌细胞凋亡。病毒感染的癌组织中NF- κ B表达均高于正常肝组织, HBxAg阳性癌组织的胞质及胞核均有NF- κ B表达, 而HBxAg阴性癌组织中, NF- κ B仅见胞质; 若将PCDNA3-1-HBX转导至人HCC细胞株HCC-9204时, NF- κ B可在癌细胞的胞核中出现, 说明HBxAg能激活NF- κ B并使其转移至癌细胞核^[19,20]。本研究中人肝癌组织及癌旁组织中均能定量检测到NF- κ B活性, 且癌组织明显高于癌旁组织, 可见肝癌细胞NF- κ B增强表达与癌细胞生长密切相关。

TNF- α 为非糖基化蛋白多肽, 主要是由巨噬细胞产生, 具有多种生理活性。活化的NF- κ B能抑制细胞的凋亡, 在肝脏发育过程中能保护胚胎肝细胞免受TNF- α 等介导的凋亡。NF- κ B活化与肝癌发生发展有关, TNF- α 的转录受NF- κ B调控, 且他又以自分泌或旁分泌方式作用于细胞, 诱导细胞凋亡同时也激活NF- κ B, 促使细

胞建立快速防御机制, 发挥抗凋亡作用^[21,22]。给予TNF- α 单抗后, HepG2细胞培养液中可检出TNF- α , 其水平明显低于对照组, 浓度越高, 中和的效果越好; NF- κ B水平在单抗组明显低于对照组, TNF- α 与NF- κ B水平呈正相关。提示TNF- α 单抗消耗培养液中TNF- α 干预NF- κ B活化, 抑制NF- κ B进入细胞核内发挥转录作用。

NF- κ B是多种抗凋亡基因表达的主要激活子, 而TNF- α 所介导的NF- κ B信号通路的活化是肝癌细胞抵抗凋亡、耐药的原因之一^[23-25]。给予TNF- α 抗体, HepG2细胞凋亡明显增加, 并呈现剂量依赖性, TNF- α 单抗可间接促进肝癌细胞的凋亡。主要是通过抑制NF- κ B活化, 影响TNF- α 和NF- κ B间正反馈调节机制, 减弱其抗凋亡效应而发挥作用。恶性肿瘤发生发展与细胞周期的紊乱密切相关。NF- κ B能直接作用于细胞周期或DNA复制, 通过促进cyclin D的表达促使细胞周期从G₀/G₁期向S期转化, 使细胞增殖失控从而参与肿瘤的发生发展。TNF- α 抗体组G₀/G₁期比率明显高于对照组, 而S期无明显改变。说明单抗抑制NF- κ B活化, HepG2细胞分裂增殖受到抑制, 细胞周期阻滞在G₀/G₁期, 表明TNF- α 单抗干预NF- κ B活化可抑制癌细胞增殖。本研究表明TNF- α 单抗能明显抑制NF- κ B信号通路的活化,

诱导癌细胞凋亡, 使细胞周期阻滞在G₀/G₁期, 其在肝癌的免疫治疗中具有良好的应用前景^[26,27].

4 参考文献

- 1 Jain S, Singhal S, Lee P, Xu R. Molecular genetics of hepatocellular neoplasia. *Am J Transl Res* 2010; 2: 105-118
- 2 Fernández M, Semela D, Bruix J, Colle I, Pinzani M, Bosch J. Angiogenesis in liver disease. *J Hepatol* 2009; 50: 604-620
- 3 Lee CF, Ling ZQ, Zhao T, Fang SH, Chang WC, Lee SC, Lee KR. Genomic-wide analysis of lymphatic metastasis-associated genes in human hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2009; 15: 356-365
- 4 Cho HA, Park IS, Kim TW, Oh YK, Yang KS, Kim JS. Suppression of hepatitis B virus-derived human hepatocellular carcinoma by NF- κ B-inducing kinase-specific siRNA using liver-targeting liposomes. *Arch Pharm Res* 2009; 32: 1077-1086
- 5 Wang C, Lu Y, Chen Y, Feng Y, An L, Wang X, Su S, Bai W, Zhou L, Yang Y, Xu D. Prognostic factors and recurrence of hepatitis B-related hepatocellular carcinoma after argon-helium cryoablation: a prospective study. *Clin Exp Metastasis* 2009; 26: 839-848
- 6 Okamoto T, Sanda T, Asamitsu K. NF- κ B signaling and carcinogenesis. *Curr Pharm Des* 2007; 13: 447-462
- 7 Li H, Lin X. Positive and negative signaling components involved in TNF α -induced NF- κ B activation. *Cytokine* 2008; 41: 1-8
- 8 He Y, Zhang H, Yin J, Xie J, Tan X, Liu S, Zhang Q, Li C, Zhao J, Wang H, Cao G. IkappaB α gene promoter polymorphisms are associated with hepatocarcinogenesis in patients infected with hepatitis B virus genotype C. *Carcinogenesis* 2009; 30: 1916-1922
- 9 Vainer GW, Pikarsky E, Ben-Neriah Y. Contradictory functions of NF- κ B in liver physiology and cancer. *Cancer Lett* 2008; 267: 182-188
- 10 Berasain C, Castillo J, Perugorria MJ, Latasa MU, Prieto J, Avila MA. Inflammation and liver cancer: new molecular links. *Ann N Y Acad Sci* 2009; 1155: 206-221
- 11 Amann T, Bataille F, Spruss T, Mühlbauer M, Gäbele E, Schölmerich J, Kiefer P, Bosserhoff AK, Hellerbrand C. Activated hepatic stellate cells promote tumorigenicity of hepatocellular carcinoma. *Cancer Sci* 2009; 100: 646-653
- 12 Sakai T, Liu L, Teng X, Ishimaru N, Mukai-Sakai R, Tran NH, Kim SM, Sano N, Hayashi Y, Kaji R, Fukui K. Inflammatory disease and cancer with a decrease in Kupffer cell numbers in Nuclng-knockout mice. *Int J Cancer* 2010; 126: 1079-1094
- 13 Wu W, Yao DF, Qiu LW, Sai WL, Shen JJ, Yu HB, Wu XH, Li YM, Wang YL, Gu WJ. Characteristics of hepatic nuclear-transcription factor- κ B expression and quantitative analysis in rat hepatocarcinogenesis. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2009; 8: 504-509
- 14 Zhang X, Liu S, Hu T, Liu S, He Y, Sun S. Up-regulated microRNA-143 transcribed by nuclear factor κ B enhances hepatocarcinoma metastasis by repressing fibronectin expression. *Hepatology* 2009; 50: 490-499
- 15 Kim HR, Lee SH, Jung G. The hepatitis B viral X protein activates NF- κ B signaling pathway through the up-regulation of TBK1. *FEBS Lett* 2010; 584: 525-530
- 16 Yoneda K, Sugimoto K, Shiraki K, Tanaka J, Beppu T, Fuke H, Yamamoto N, Masuya M, Horie R, Uchida K, Takei Y. Dual topology of functional Toll-like receptor 3 expression in human hepatocellular carcinoma: differential signaling mechanisms of TLR3-induced NF- κ B activation and apoptosis. *Int J Oncol* 2008; 33: 929-936
- 17 Feng YX, Zhao JS, Li JJ, Wang T, Cheng SQ, Yuan Y, Wang F, Wang XF, Xie D. Liver cancer: EphrinA2 promotes tumorigenicity through Rac1/Akt/NF- κ B signaling pathway 120. *Hepatology* 2010; 51: 535-544
- 18 Jiang R, Xia Y, Li J, Deng L, Zhao L, Shi J, Wang X, Sun B. High expression levels of IKK α and IKK β are necessary for the malignant properties of liver cancer. *Int J Cancer* 2010; 126: 1263-1274
- 19 Németh J, Stein I, Haag D, Riehl A, Longereich T, Horwitz E, Breuhahn K, Gebhardt C, Schirmacher P, Hahn M, Ben-Neriah Y, Pikarsky E, Angel P, Hess J. S100A8 and S100A9 are novel nuclear factor κ B target genes during malignant progression of murine and human liver carcinogenesis. *Hepatology* 2009; 50: 1251-1262
- 20 Carlisi D, Lauricella M, D'Anneo A, Emanuele S, Angileri L, Di Fazio P, Santulli A, Vento R, Tesoriere G. The histone deacetylase inhibitor suberoylanilide hydroxamic acid sensitises human hepatocellular carcinoma cells to TRAIL-induced apoptosis by TRAIL-DISC activation. *Eur J Cancer* 2009; 45: 2425-2438
- 21 Cheng KS, Tang HL, Chou FT, Chou JW, Hsu CH, Yu CJ, Kao ST, Li TC. Cytokine evaluation in liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma. *Hepatogastroenterology* 2009; 56: 1105-1110
- 22 Kummee P, Tangkijvanich P, Poovorawan Y, Hirankarn N. Association of HLA-DRB1*13 and TNF- α gene polymorphisms with clearance of chronic hepatitis B infection and risk of hepatocellular carcinoma in Thai population. *J Viral Hepat* 2007; 14: 841-848
- 23 Auyeung KK, Law PC, Ko JK. Astragalus saponins induce apoptosis via an ERK-independent NF- κ B signaling pathway in the human hepatocellular HepG2 cell line. *Int J Mol Med* 2009; 23: 189-196
- 24 Sun W, Zhong F, Zhi L, Zhou G, He F. Systematic -omics analysis of HBV-associated liver diseases. *Cancer Lett* 2009; 286: 89-95
- 25 Wang F, Kaur S, Cavin LG, Arsura M. Nuclear-factor- κ B (NF- κ B) and radical oxygen species play contrary roles in transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1)-induced apoptosis in hepatocellular carcinoma (HCC) cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2008; 377: 1107-1112
- 26 Calvisi DF, Pascale RM, Feo F. Dissection of signal transduction pathways as a tool for the development of targeted therapies of hepatocellular carcinoma. *Rev Recent Clin Trials* 2007; 2: 217-236
- 27 Wu JM, Sheng H, Saxena R, Skill NJ, Bhat-Nakshatri P, Yu M, Nakshatri H, Maluccio MA. NF- κ B inhibition in human hepatocellular carcinoma and its potential as adjunct to sorafenib based therapy. *Cancer Lett* 2009; 278: 145-155

编辑 李军亮 电编 何基才

肝线粒体超微结构和自由基在大鼠肝再生过程中的变化

周运恒, 曹广亚, 袁斌, 焦炳华, 缪明永

■背景资料

线粒体是肝再生过程的一个重要调节点, 可能与肝再生的启动和终止有关, 研究肝再生分子机制必将对肝脏移植、创伤、各种肝病及肝肿瘤诊治起到重要作用。

周运恒, 曹广亚, 武警上海总队医院检验科 上海市 201103
袁斌, 焦炳华, 缪明永, 中国人民解放军第二军医大学生物化学与分子生物学教研室 上海市 200433
周运恒, 主治医师, 博士, 主要从事消化系统疾病基础研究和临床检验工作。

国家自然科学基金资助项目, No. 30570837

作者贡献分布: 此课题由周运恒、缪明永及焦炳华设计; 研究过程由周运恒与袁斌完成; 数据分析和本论文写作由周运恒、曹广亚及缪明永完成。

通讯作者: 缪明永, 副教授, 硕士生导师, 200433, 上海市翔殷路800号, 中国人民解放军第二军医大学生物化学与分子生物学教研室. miaomy@163.com

电话: 021-81870970-8006

收稿日期: 2010-04-08 修回日期: 2010-06-16

接受日期: 2010-06-28 在线出版日期: 2010-08-08

Changes in mitochondrial ultrastructure and malondialdehyde level in regenerating liver tissue in rats

Yun-Heng Zhou, Guang-Ya Cao, Bin Yuan,
Bing-Hua Jiao, Ming-Yong Miao

Yun-Heng Zhou, Guang-Ya Cao, Department of Clinical Laboratory, Shanghai Crops Hospital of Chinese People's Armed Police, Shanghai 201103, China

Bin Yuan, Bing-Hua Jiao, Ming-Yong Miao, Department of Biochemistry & Molecular Biology, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30570837

Correspondence to: Associate Professor Ming-Yong Miao, Department of Biochemistry & Molecular Biology, Second Military Medical University, 800 Xiangyin Road, Shanghai 200433, China. miaomy@163.com

Received: 2010-04-08 Revised: 2010-06-16

Accepted: 2010-06-28 Published online: 2010-08-08

Abstract

AIM: To investigate the role of mitochondria permeability transition (MPT) in liver regeneration.

METHODS: One hundred and five male Sprague-Dawley rats were randomly divided into three groups: partial hepatectomy (PH) group, cyclosporin A (CsA) group and sham-operated (SH) group. Animals in the PH and CsA groups underwent 2/3 partial hepatectomy. Animals in the CsA group were administered CsA before the surgery. The animals in each group were further divided into seven sub-groups.

Ultrastructural morphology of mitochondria in remnant liver after PH was determined by electron microscopy. The content of malondialdehyde (MDA) in liver tissue was also measured.

RESULTS: Remarkable changes were observed in the morphology and ultrastructure of the liver mitochondria at 24 h after PH, including conspicuous swelling, increased membrane permeability, reduced number of cristae, and matrix vacuolation. At 72 h, moderate mitochondrial swelling was observed, while, at other time points, mild mitochondrial swelling was seen. Mitochondrial permeability increased at 0, 3 and 6 h in the CsA group, but decreased at 24 and 72 h when compared with the PH group. Similar changes in endoplasmic reticulum were also noted. The content of MDA increased at 3 h after PH, peaked at 24 h, and then decreased and returned to normal level at 120 h. The contents of MDA at all time points in the CsA group were significantly higher than those in the PH group.

CONCLUSION: The changes in mitochondrial ultrastructure and MDA level are closely associated with MPT during live regeneration in rats, especially prominent at 24 h after PH. The changes in mitochondrial ultrastructure and MDA level in liver tissue is possibly related to the initiation of liver regeneration after PH.

Key Words: Liver regeneration; Mitochondrial ultrastructure; Malondialdehyde

Zhou YH, Cao GY, Yuan B, Jiao BH, Miao MY. Changes in mitochondrial ultrastructure and malondialdehyde level in regenerating liver tissue in rats. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(22): 2302-2307

摘要

目的: 探讨肝再生过程中线粒体通透性转换的作用。

方法: 将SD大鼠105只随机分成3个实验组: 肝再生(PH)组、环孢菌素A(CsA)处理组和对照(SH)组, 每组取7个时间点; PH组和CsA组大鼠经70%肝切除, CsA组用CsA进行灌胃。用透射

■同行评议者

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

电镜观察线粒体超微结构的变化, 并检测肝组织匀浆内丙二醛(MDA)的变化。

结果: 透射电镜显示在PH后24 h时线粒体发生重度肿胀, 线粒体明显增大变圆, 基质变淡, 甚至完全空泡化, 嵴明显缩短甚至消失; 72 h时中度肿胀, 6 h、120 h时轻度肿胀, 内质网也有类似的变化; CsA组在0 h、3 h和6 h时轻度肿胀, 24 h中度肿胀, 72 h和168 h时则明显收缩。肝组织中MDA在PH后3 h时轻度升高, 到24 h时达到最高, 之后逐渐下降, 到120 h时恢复正常。CsA组MDA的变化规律与PH组的基本一致, 但在(0-120 h)的各个时间点自由基含量明显高于PH组。

结论: 肝再生过程中, 线粒体的超微结构变化和肝组织MDA的变化可能与线粒体通透性转换有关, 尤其在24 h时变化最显著, 这种变化与肝再生的启动密切相关。

关键词: 肝再生; 超微结构; 自由基

周运恒, 曹广亚, 袁斌, 焦炳华, 缪明永. 肝线粒体超微结构和自由基在大鼠肝再生过程中的变化. 世界华人消化杂志 2010; 18(22): 2302-2307

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/2302.asp>

0 引言

大鼠经70%肝切除后(partial hepatectomy, PH), 其残余肝组织再生过程非常显著, 大约经过7-10 d就可以恢复到原来的体积和体质量。研究肝再生分子机制必将对肝脏移植、创伤、各种肝病及肝肿瘤诊治具有重要意义。但是目前对肝再生的分子机制, 尤其是肝再生启动和终止的机制仍不清楚。而能量代谢的调控始终是肝细胞再生过程中的重要环节, 线粒体作为细胞生命活动中一个非常重要的细胞器, 他不仅为细胞活动各个环节提供所需的能量, 而且直接参与细胞内许多信号转导过程, 与细胞许多生命活动有关^[1,2]。近年来关于肝再生与线粒体通透性转换(mitochondrial permeability transition, MPT)的关系研究比较多, 发现在肝再生过程中MPT有一些明显特征性的变化, 提示线粒体可能是肝再生过程的一个重要调节点, 可能与肝再生的启动和终止有关^[3-5]。我们通过离体实验研究发现: 在大鼠肝再生早期(PH后0-24 h)和后期(PH后120-168 h)都表现为肝线粒体先收缩后肿胀, 也即通透性先下降后增高^[6]。但是线粒体由于纯化技术和活性不稳定等原因, 在体和离体的结构和功能可能会有所不同, 而且目前国

内外在此方面的研究比较少, 仅见Ferri等^[7]关于在肝再生早期线粒体超微结构在PH后24 h发生肿胀的报道。

MPT受许多因素影响, 其中活性氧族(reactive oxygen species, ROS)是一个重要的诱导因素, 线粒体消耗的氧约有2%-5%用于生成ROS, 主要是呼吸链复合物I、III漏出的电子直接与氧反应生成的; 线粒体通透性转换孔开放又可引起线粒体产生ROS^[8,9]。有研究发现肝再生早期肝线粒体氧化磷酸化下降时, 肝线粒体内自由基显著升高和GSH含量下降, 而当肝线粒体氧化磷酸化恢复上升时, 自由基则逐步下降, 两者呈现十分明显的消长关系^[10]。但是整个肝再生过程的自由基变化与MPT的关系还未见报道。我们通过建立肝再生模型, 并用线粒体通透性转换抑制剂环孢菌素A(cyclosporin A, CsA)对肝再生过程进行在体的干预, 系统研究肝再生过程中肝脏线粒体超微结构的变化, 自由基代谢产物丙二醛(malondialdehyde, MDA)与MPT之间的关系, 以期进一步探讨线粒体通透性的改变与肝再生之间的关系。

1 材料和方法

1.1 材料 实验动物分组SD大鼠, ♂, 8 wk左右, 体质量200-250 g, 购于中国人民解放军第二军医大学实验动物中心, 正常饮食, 室温24℃±2℃, 每天光照12 h。日立H-800型透射电镜, LKB超薄切片机, Model 100A高精度天平(美国精密仪器公司), 722-S分光光度计。考马斯亮蓝试剂盒为上海申能博彩生物科技有限公司, MDA检测试剂盒为南京建成生物工程研究所, 环孢素软胶囊(Novartis, 诺华制药, 德国), 橄榄油为意大利原装进口, 多聚甲醛和EPON 812包埋剂为Sigma公司。

1.2 方法

1.2.1 分组: 105只大鼠随机分成3个实验组: 肝再生(PH)组、CsA处理的肝再生(CsA)组和对照(sham-operated, SH)组, 每组取7个时间点, 分别是术后0、3、6、24、72、120和168 h, 每个时间点取5只动物。CsA组在手术前4 d和手术后1 d按照20 mg/(kg·d)的CsA进行灌胃, CsA用橄榄油(5 g/L)溶解, 同时PH和SH组的所有大鼠按照相同的剂量用安慰剂橄榄油灌胃^[11]。

1.2.2 造模: PH组和CsA组大鼠用乙醚麻醉后, 切除肝左叶和中叶(约为全肝的70%)^[12]; SH组动物同样施行麻醉和开腹, 但不切肝。

1.2.3 透射电镜: 各个时间点5只大鼠同时断头处死, 迅速分离肝组织, 用锋利的刀片在每只大鼠

■ 研发前沿

近年来关于肝再生与线粒体通透性转换的关系研究比较多, 目前对肝再生的分子机制, 尤其是肝再生启动和终止的机制仍不清楚。

■相关报道

Crumm等研究发现在肝再生的早期(0-48 h)线粒体ATP酶活性显著降低,这可能提示自由基的增多抑制ATP酶活性,从而诱导肝再生的启动。

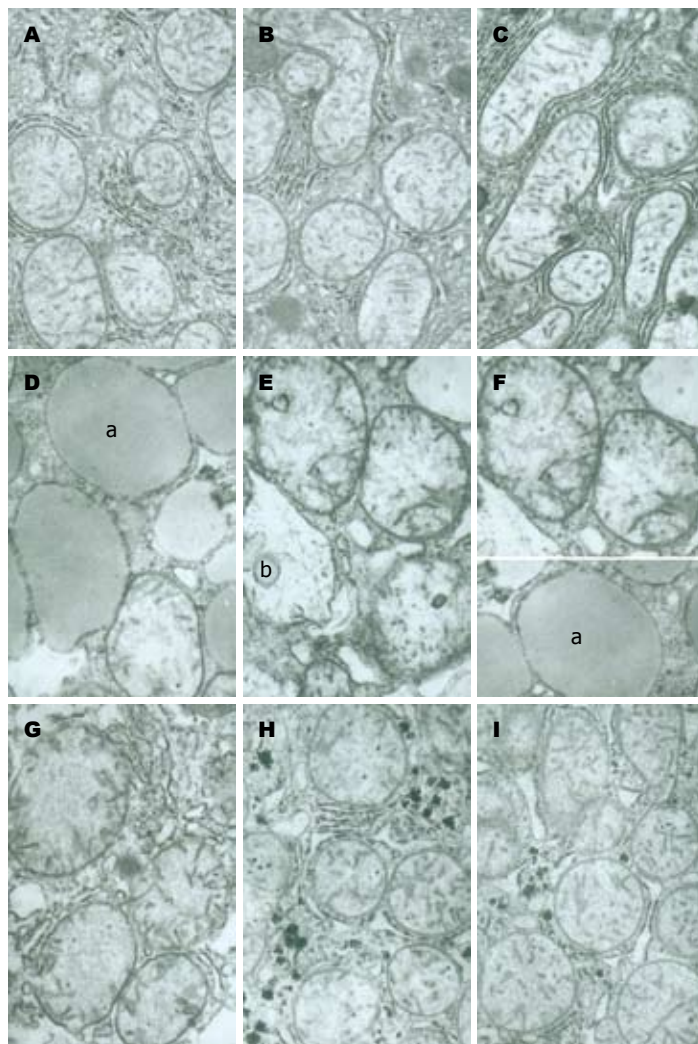


图1 PH组的线粒体超微结构变化($\times 15\ 000$). A: 0 h; B: 3 h; C: 6 h; D-F: 24 h; G: 72 h; H: 120 h; I: 168 h. a: 空泡化; b: 嵴肿胀。

的肝右叶切取4块 $1\text{ mm}\times 1\text{ mm}\times 1\text{ mm}$ 大小组织,用40 g/L多聚甲醛固定4 h,1%锇酸固定2 h;0.1 mol/L PBS漂洗10 min;丙酮梯度脱水:30、50、70、90%各1次,每次10 min,100%丙酮脱水3次,每次10 min;EPON 812包埋剂浸透、包埋、聚合;LKB超薄切片机切片;铀染色30 min,铅染色5-10 min;日立H-800透射电镜观察。

1.2.4 10%肝匀浆的制备:动物断头取肝,称肝质量,加入10 mL/g分离介质(Buffer A: 250 mmol/L甘露醇、75 mmol/L蔗糖、0.1 mmol/L K^+ -EDTA、0.5 mmol/L K^+ -EGTA、10 mmol/L K^+ -HEPES、pH7.2)。用Teflon芯的玻璃匀浆器匀浆,低速离心3 000 r/min,15 min,取上清用于测定肝MDA含量,整个分离过程严格控制在 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 中进行。

1.2.5 丙二醛(MDA)的测定:用考马斯亮蓝试剂盒测定蛋白浓度,按照操作说明测定和计算各时间点肝组织匀浆中MDA的含量。

统计学处理 采用SPSS13.0统计分析软件,组间比较用 t 检验,数据均以 $\text{mean}\pm\text{SD}$ 表示。 $P<0.05$ 差异有统计学意义。

2 结果

2.1 电镜观察结果 在PH组内,0、3和168 h时,线粒体基本正常,外膜完整,基质和嵴清楚,粗面和光滑内质网基本正常;在6 h和120 h时,线粒体轻度肿胀,基质较淡,嵴缩短,粗面内质网和光滑内质网轻度扩张;在24 h时,线粒体质量度肿胀,体积增大变圆,基质电子密度变低,颜色很淡甚至空泡化,嵴明显缩短甚至消失溶解,部分出现嵴肿胀,部分线粒体外膜膨胀鼓泡,甚至破裂,内质网极度扩张;在72 h时线粒体中度扩张,形态变圆基质变淡,嵴明显缩短,部分线粒体外膜膨胀破裂,内质网也有类似的变化(图1)。在SH组内,SH后3 h和168 h,线粒体基本正常,外膜完整,基质和嵴清楚,粗面和光滑内质网基本正常;SH后24 h线粒体轻微肿胀,基质稍淡,嵴部分轻微缩短,内质网中度扩张(图2)。在CsA组,0、3和6 h时线粒体轻度肿胀;在24 h时线粒体中度肿胀,基质变淡,部分甚至空泡化,嵴明显缩短,部分出现嵴肿胀,外膜局部破裂,线粒体体积增大变圆,内质网中度扩张;在72和168 h时线粒体明

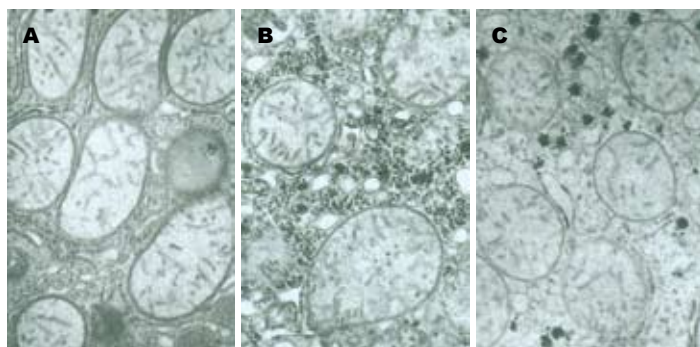


图 2 SH组的线粒体超微结构变化($\times 15\ 000$). A: 3 h; B: 24 h; C: 168 h.

■创新盘点

本研究通过观察整个肝再生过程自由基和线粒体超微结构的变化来研究肝再生过程中线粒体通透性转换的作用.

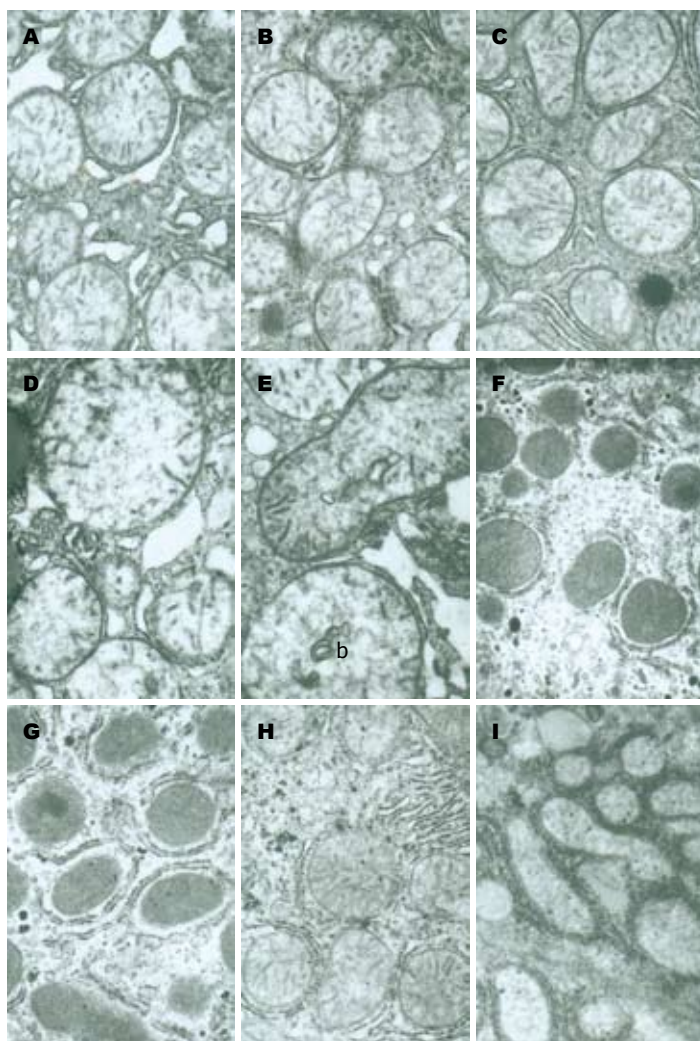


图 3 CsA组的线粒体超微结构变化($\times 15\ 000$). A: 0 h; B: 3 h; C: 6 h; D, E: 24 h; F, G: 72 h; H: 120 h; I: 168 h. b: 嵴肿胀.

显收缩, 体积变小, 嵴清晰, 基质电子密度增加, 粗面内质网扩张, 数量明显增加(图3).

2.2 大鼠肝再生过程中肝组织MDA含量的变化 在PH组, MDA在早期3 h时开始升高, 到24 h时达到峰值, 然后逐渐下降, 到120 h时恢复正常; 在CsA组与PH组的变化规律基本一致, 但在(3-72 h)阶段的各时间点, MDA含量则显著高于PH组($P<0.01$, 表1).

3 讨论

在本实验中, 我们发现肝再生过程中与对照组

相比, PH组在术后24和72 h时线粒体的超微结构变化最明显, 发生重度肿胀, 72 h时发生中度肿胀, 同时内质网也有类似的变化. 说明在PH后24和72 h时线粒体的通透性增高, 这与Guerrieri等^[13]的研究基本一致, 他们也认为在PH后24 h时线粒体的通透性最大, 而且此时有一些线粒体基质酶如苹果酸脱氢酶、天冬氨酸氨基转移酶释放到胞液中. 我们通过离体实验研究发现线粒体通透性在早期和后期都升高, 早期的这些变化与我们在体实验的结果相一致, 但是后期的变化规律与在体的变化情况明显不一致, 我

同行评价

本研究选题较好, 内容新颖, 学术价值较好.

表 1 大鼠肝再生过程中肝组织MDA含量的变化(Immol/(g · prot)), mean ± SD, n = 5]

分组	0 h	3 h	6 h	24 h	72 h	120 h	168 h
PH组	0.86 ± 0.07	1.20 ± 0.08 ^c	1.31 ± 0.06 ^d	1.98 ± 0.19 ^d	1.39 ± 0.09 ^d	0.95 ± 0.05	0.92 ± 0.04
CsA组	1.06 ± 0.06 ^{bd}	1.51 ± 0.11 ^{bd}	1.64 ± 0.10 ^{bd}	2.98 ± 0.28 ^{bd}	1.97 ± 0.16 ^{bd}	0.98 ± 0.08	0.89 ± 0.06
SH组	0.88 ± 0.03	0.97 ± 0.07	0.90 ± 0.05	0.92 ± 0.06	0.86 ± 0.02	0.89 ± 0.05	0.84 ± 0.04

^bP<0.01 vs PH组; ^cP<0.05, ^dP<0.01 vs SH组.

们在体实验发现在肝再生后期(PH后120、168 h)线粒体和内质网的结构已经基本恢复正常, 与SH组基本一致, 并没有发生肿胀. 而在离体情况下线粒体的通透性变化可能是因为对Ca²⁺的敏感性发生变化, 并不表现在结构上.

而用CsA处理后的动物在肝再生早期(0、3、6 h)时线粒体有轻度的肿胀, 同时发现0 h和3 h时内质网明显肿胀, 表明内质网功能增强, 这些变化可能与CsA对肝脏的毒性作用有关. 有学者认为CsA在肝移植后作为免疫抑制剂时对肝再生有一定的毒性作用^[14]. 在24 h时线粒体和内质网的肿胀程度比对应的PH组低, 在72 h和168 h时线粒体发生明显收缩, 这可能与CsA对线粒体通透性直接抑制作用有关.

在肝再生过程中, 线粒体超微结构的特征性变化, 尤其是在PH后24 h时, 线粒体发生重度肿胀, 72 h时发生中度肿胀, 到后期恢复正常, 一方面说明在肝再生过程中线粒体肿胀是可逆性的. 另一方面, 线粒体肿胀可能与MPT直接相关. 这种改变可能有利于线粒体内外的物质和离子交换, 尤其是24 h时超微结构变化最明显, 这意味着肝再生过程中线粒体超微结构的变化与肝再生的发生和发展有一定的相关性.

线粒体呼吸链是体内氧自由基的主要来源, 同时线粒体膜中含有较丰富的多不饱和脂肪酸, 易受氧自由基尤其是羟自由基的攻击, 发生脂质过氧化反应, 使线粒体膜结构改变, 膜镶嵌的一系列酶空间排列紊乱, 活性降低, 从而使膜通透性改变. MDA是自由基的代谢产物, 其高低可反应机体细胞自由基水平程度. 在本实验中, 我们发现在PH后3 h时MDA轻度升高, 到24 h时达到最高, 之后逐渐下降, 到120 h时恢复正常. Crumm等^[15]研究发现在肝再生的早期(0-48 h)线粒体ATP酶活性显著降低, 这可能提示自由基的增多抑制ATP酶活性, 从而诱导肝再生的启动.

CsA组在肝再生过程中(0-72 h)阶段自由基显著升高, Kim等^[16]研究发现在CsA可以引起PH后24 h肝组织自由基升高, 并认为CsA促进自由基

的升高可能是与CsA的免疫抑制剂的不良反应有关. Rezzani等^[17]研究发现在CsA在肝移植术后, 还会引起肝细胞中毒样的形态学改变以及细胞内氧化作用和抗氧化作用的失衡.

肝再生早期自由基升高确切机制不太清楚, 可能与Ca²⁺升高或抗氧化系统的削弱等多方面有关, MPT又与许多因素有关, 如Ca²⁺是线粒体的一个重要诱导剂, 与线粒体膜通透性有着密切的关系. 有研究报道肝再生过程PH后24 h肝线粒体内Ca²⁺明显升高, Ca²⁺增加可以诱导ROS的产生, 从而使线粒体膜通透性升高, 同时Ca²⁺也可以通过线粒体通透性转运孔(permeability transition pore, PTP)转运, 从而来调节细胞和线粒体的功能^[18,19].

MDA在肝再生早期显著升高, 而且MDA在时相上比MPT变化更早, 提示肝再生早期MPT的变化可能是由自由基升高而引起的. 同时自由基与MPT是互为因果关系, 两者的相互影响可能在肝再生过程中起很重要的作用. 尤其是在PH后24 h时MDA含量最高, 而此时线粒体的超微结构变化最明显, 线粒体的肿胀可能与线粒体功能代偿性增强有关, 而这种变化对肝再生的发生有着积极的意义, 但是MPT变化的具体机制和意义仍需要进一步研究.

参考文献

- 1 Fausto N, Campbell JS, Riehle KJ. Liver regeneration. *Hepatology* 2006; 43: S45-S53
- 2 Duchon MR. Roles of mitochondria in health and disease. *Diabetes* 2004; 53 Suppl 1: S96-S102
- 3 Hernández-Muñoz R, Sánchez-Sevilla L, Martínez-Gómez A, Dent MA. Changes in mitochondrial adenine nucleotides and in permeability transition in two models of rat liver regeneration. *Hepatology* 2003; 37: 842-851
- 4 Zhong Z, Theruvath TP, Currin RT, Waldmeier PC, Lemasters JJ. NIM811, a mitochondrial permeability transition inhibitor, prevents mitochondrial depolarization in small-for-size rat liver grafts. *Am J Transplant* 2007; 7: 1103-1111
- 5 Theruvath TP, Snoddy MC, Zhong Z, Lemasters JJ. Mitochondrial permeability transition in liver ischemia and reperfusion: role of c-Jun N-terminal

- kinase 2. *Transplantation* 2008; 85: 1500-1504
- 6 缪明永, 朱克军, 汪真诚, 刘军华, 蒋雷, 王学敏, 焦炳华. 大鼠肝再生时线粒体通透性转换的变化. *第二军医大学学报* 2004; 25: 292-294
- 7 Ferri D, Moro L, Mastrodonato M, Capuano F, Marra E, Liquori GE, Greco M. Ultrastructural zonal heterogeneity of hepatocytes and mitochondria within the hepatic acinus during liver regeneration after partial hepatectomy. *Biol Cell* 2005; 97: 277-288
- 8 Armstrong JS, Yang H, Duan W, Whiteman M. Cytochrome bc(1) regulates the mitochondrial permeability transition by two distinct pathways. *J Biol Chem* 2004; 279: 50420-50428
- 9 Kowaltowski AJ, Castilho RF, Vercesi AE. Mitochondrial permeability transition and oxidative stress. *FEBS Lett* 2001; 495: 12-15
- 10 Yang S, Tan TM, Wee A, Leow CK. Mitochondrial respiratory function and antioxidant capacity in normal and cirrhotic livers following partial hepatectomy. *Cell Mol Life Sci* 2004; 61: 220-229
- 11 Daoudaki M, Fouzas I, Stapf V, Ekmekcioglu C, Imvrios G, Andoniadis A, Demetriadou A, Thalhammer T. Cyclosporine a augments P-glycoprotein expression in the regenerating rat liver. *Biol Pharm Bull* 2003; 26: 303-307
- 12 Higgins GM, Anderson RM. Experimental pathology of the liver: Restoration of the liver of the white rat following partial surgical removal. *Arch Pathol* 1931; 12: 186-202
- 13 Guerrieri F, Pellicchia G, Lopriore B, Papa S, Esterina Liquori G, Ferri D, Moro L, Marra E, Greco M. Changes in ultrastructure and the occurrence of permeability transition in mitochondria during rat liver regeneration. *Eur J Biochem* 2002; 269: 3304-3312
- 14 Blanc P, Etienne H, Daujat M, Fabre I, Pichard L, Domergue J, Joyeux H, Fourtanier G, Maurel P. Antiproliferative effect of FK 506 and cyclosporine on adult human hepatocytes in culture. *Transplant Proc* 1991; 23: 2821-2824
- 15 Crumm S, Cofan M, Juskeviciute E, Hoek JB. Adenine nucleotide changes in the remnant liver: An early signal for regeneration after partial hepatectomy. *Hepatology* 2008; 48: 898-908
- 16 Kim YI, Kobayashi M, Egashira T, Kawano K, Morimoto A, Kai T, Shimada T. Augmentation of hepatocyte proliferation by immunosuppressant pretherapy is associated with up-regulation of malondialdehyde production. *Res Exp Med (Berl)* 1993; 193: 337-345
- 17 Rezzani R, Buffoli B, Rodella L, Stacchiotti A, Bianchi R. Protective role of melatonin in cyclosporine A-induced oxidative stress in rat liver. *Int Immunopharmacol* 2005; 5: 1397-1405
- 18 Kanno T, Sato EE, Muranaka S, Fujita H, Fujiwara T, Utsumi T, Inoue M, Utsumi K. Oxidative stress underlies the mechanism for Ca(2+)-induced permeability transition of mitochondria. *Free Radic Res* 2004; 38: 27-35
- 19 Lemasters JJ, Theruvath TP, Zhong Z, Nieminen AL. Mitochondrial calcium and the permeability transition in cell death. *Biochim Biophys Acta* 2009; 1787: 1395-1401

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《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)

溃疡性结肠炎大鼠 β 2AR- β -arrestin2-NF- κ B信号转导通路及氧化苦参碱的干预作用

范恒, 廖奕, 陈小艳, 张丽娟, 刘星星, 钟敏, 唐庆

■背景资料

溃疡性结肠炎是一种以肠道免疫功能紊乱为主的慢性非特异性炎症性肠道疾病。近20年来我国发病率呈逐年增加。其发病机制是遗传、环境和免疫因素相互作用的结果, 免疫功能紊乱起关键性作用, 是在遗传和环境因素的双重作用下, 机体对肠道菌群产生异常免疫反应, 最终导致肠道慢性炎症的发生。但其确切的发病原因和机制还不明确, 治疗上也比较棘手, 因此对本病的发病机制和治疗上的研究显得十分必要。

范恒, 廖奕, 陈小艳, 张丽娟, 刘星星, 钟敏, 唐庆, 华中科技大学同济医学院附属协和医院中西医结合科 湖北省武汉市 430022

范恒, 副教授, 副主任医师, 主要从事中西医结合消化系统疾病的研究。

国家自然科学基金资助项目, No. 30772878

作者贡献分布: 此课题由范恒设计; 研究过程由廖奕、陈小艳、张丽娟、刘星星、钟敏及唐庆操作完成; 数据分析由廖奕完成; 论文写作由廖奕与范恒完成。

通讯作者: 范恒, 副教授, 副主任医师, 430022, 湖北省武汉市, 华中科技大学同济医学院附属协和医院中西医结合科。

fanheng009@yahoo.com.cn

电话: 027-85726395

收稿日期: 2010-04-16 修回日期: 2010-06-17

接受日期: 2010-06-22 在线出版日期: 2010-08-08

Oxymatrine attenuates ulcerative colitis by modulating the β 2AR- β -arrestin2-NF- κ B signaling pathway in rats

Heng Fan, Yi Liao, Xiao-Yan Chen, Li-Juan Zhang, Xing-Xing Liu, Min Zhong, Qin Tang

Heng Fan, Yi Liao, Xiao-Yan Chen, Li-Juan Zhang, Xing-Xing Liu, Min Zhong, Qin Tang, Department of Integrated Chinese and Western Medicine, Union Hospital, Tongji Medical College of Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, Hubei Province, China
Supported by: National Natural Sciences Foundation of China, No. 30772878

Correspondence to: Associate Professor Heng Fan, Department of Integrated Chinese and Western Medicine, Union Hospital, Tongji Medical College of Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, Hubei Province, China. fanheng009@yahoo.com.cn

Received: 2010-04-16 Revised: 2010-06-17

Accepted: 2010-06-22 Published online: 2010-08-08

Abstract

AIM: To investigate whether the β 2-adrenoceptor (β 2AR)- β -arrestin2-NF- κ B signaling pathway mediates the therapeutic effects of oxymatrine on ulcerative colitis in rats.

METHODS: Forty Sprague-Dawley rats were randomly and equally divided into four groups: normal control group, model group, mesalazine group and oxymatrine group. Experiment colitis was induced with TNBS in rats in each group except the normal control group. The

rats in the oxymatrine group were intramuscularly injected with oxymatrine injection for 15 d, while those in the mesalazine group were lavaged with 3 mL mesalazine solution for the same duration. The rats in the normal control group and model group were lavaged with 3 mL water for 15 d. Diarrhea and bloody stools were carefully observed in experimental rats. Two rats in each group were randomly selected and executed on day 7 for observing colonic histological changes. On day 16, the remaining rats were executed after fasting 24 h to detect the expression of β 2AR, β -arrestin2 and NF- κ B p65 in colon tissue and splenic lymphocytes by immunohistochemistry and Western blotting, respectively.

RESULTS: Compared with the normal control group, the expression of NF- κ B p65 was significantly increased (both $P < 0.01$) and the expression of β 2AR and β -arrestin2 was significantly decreased (both $P < 0.01$) in colonic mucosa and splenic lymphocytes in the model group. Compared with the model group, the expression of NF- κ B p65 was significantly decreased (16.26 ± 5.51 and 18.34 ± 3.34 vs 61.90 ± 17.75 , both $P < 0.01$) and the expression of β 2AR and β -arrestin2 was significantly increased in colonic mucosa in the mesalazine group and oxymatrine group (47.27 ± 12.40 and 61.75 ± 10.40 vs 12.20 ± 2.70 , both $P < 0.01$; 70.71 ± 12.84 and 76.14 ± 8.77 vs 16.80 ± 7.17 , both $P < 0.01$). Compared with the model group, the expression of NF- κ B p65 was significantly decreased (114.23 ± 11.56 and 145.62 ± 13.05 vs 249.70 ± 18.94 , both $P < 0.01$) and the expression of β 2AR and β -arrestin2 was significantly increased in splenic lymphocytes in the mesalazine group and oxymatrine group (1006.50 ± 226.89 and 1102.11 ± 297.72 vs 594.97 ± 209.59 , both $P < 0.01$; 189.97 ± 21.12 and 162.04 ± 15.69 vs 111.77 ± 19.43 , both $P < 0.01$).

CONCLUSION: The β 2AR- β -arrestin2-NF- κ B signaling pathway participates in the pathogenesis of ulcerative colitis in rats. Oxyma-

■同行评议者

孙学英, 教授, 哈尔滨医科大学第一附属医院黑龙江省肝胆外科中心

trine attenuates ulcerative colitis by regulating the β2AR-β-arrestin2-NF-κB signaling pathway.

Key Words: β2-adrenoceptor; β-arrestin2; Nuclear factor-κB; Signal transduction; TNBS-induced colitis; Oxymatrine

Fan H, Liao Y, Chen XY, Zhang LJ, Liu XX, Zhong M, Tang Q. Oxymatrine attenuates ulcerative colitis by modulating the β2AR-β-arrestin2-NF-κB signaling pathway in rats. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(22): 2308-2316

摘要

目的: 探讨溃疡性结肠炎大鼠β2AR-β-arrestin2-NF-κB信号转导通路及氧化苦参碱的干预作用。

方法: SD ♂ 大鼠40只随机分为正常对照组、模型组、美沙拉嗪组和氧化苦参碱组4组, 每组10只。正常对照组未造模, 其余3组大鼠均采用TNBS造模诱导实验性大鼠结肠炎。其中氧化苦参碱组大鼠予苦参素(氧化苦参碱)注射液肌肉注射, 美沙拉嗪组大鼠予美沙拉嗪混悬液灌胃, 模型组和正常组大鼠均以3 mL蒸馏水灌胃。注意观察实验大鼠腹泻、便血症状。第7天, 每组随机处死2只大鼠, 比较各组结肠组织大体组织病理变化, 取病变明显的结肠组织石蜡包埋切片并HE染色, 镜下观察各组结肠病理组织学改变。第16天禁食24 h后处死大鼠, 用免疫组织化学技术和Western blot检测实验大鼠结肠组织和脾脏淋巴细胞β2肾上腺素受体(β2AR)、β-arrestin2和NF-κB p65表达的变化。

结果: 与正常对照组比较, 模型组大鼠结肠黏膜组织及脾脏淋巴细胞NF-κB p65表达均显著上升(均 $P<0.01$), β2AR和β-arrestin2表达均显著下降(均 $P<0.01$)。与模型组比较, 美沙拉嗪组和氧化苦参碱组大鼠结肠黏膜组织NF-κB p65表达均显著下降(16.26 ± 5.51 , 18.34 ± 3.34 vs 61.90 ± 17.75 , 均 $P<0.01$), β2AR表达均显著上升(47.27 ± 12.40 , 61.75 ± 10.40 vs 12.20 ± 2.70 , 均 $P<0.01$), β-arrestin2表达均显著上升(70.71 ± 12.84 , 76.14 ± 8.77 vs 16.80 ± 7.17 , 均 $P<0.01$)。与模型组比较, 美沙拉嗪组和氧化苦参碱组大鼠脾脏淋巴细胞NF-κB p65表达均显著下降(114.23 ± 11.56 , 145.62 ± 13.05 vs 249.70 ± 18.94 , 均 $P<0.01$), β2AR表达均显著上升(1006.50 ± 226.89 , 1102.11 ± 297.72 vs 594.97 ± 209.59 均 $P<0.01$), β-arrestin2表达均显著上升(189.97 ± 21.12 , 162.04 ± 15.69 vs

111.77 ± 19.43 , 均 $P<0.01$)。但美沙拉嗪组和氧化苦参碱组之间比较β2AR、β-arrestin2、NF-κB p65表达无显著差异。

结论: β2AR-β-arrestin2-NF-κB信号转导通路参与溃疡性结肠炎的病理过程, 氧化苦参碱可以通过调节β2AR-β-arrestin2-NF-κB信号转导通路减轻溃疡性结肠炎。

关键词: β2肾上腺素受体; β-抑制蛋白2; 核转录因子-κB; 信号转导; TNBS诱导的结肠炎; 氧化苦参碱

范恒, 廖奕, 陈小艳, 张丽娟, 刘星星, 钟敏, 唐庆. 溃疡性结肠炎大鼠β2AR-β-arrestin2-NF-κB信号转导通路及氧化苦参碱的干预作用. *世界华人消化杂志* 2010; 18(22): 2308-2316

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/2308.asp>

0 引言

炎症性肠病(inflammatory bowel disease, IBD)是特发性的慢性肠道炎症, 包括溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)和克罗恩病(Crohn's disease, CD)。IBD的病因和发病机制涉及遗传、环境和免疫等因素, 目前多数学者认为IBD的发病是由某些环境因素触发的肠道黏膜免疫调节功能的紊乱所致^[1-3]。促炎转录因子NF-κB的活化在IBD肠黏膜免疫反应紊乱中起着重要的作用, 在肠道炎症中的细胞信号转导过程中扮演着重要的角色。活化的NF-κB参与炎症细胞的活化, 促进促炎细胞因子IL-1β、IL-6、IL-8和TNF等的表达。抑制NF-κB的活化和表达可以减轻肠道炎症。抑制NF-κB的活化和表达是治疗IBD的重要策略, 糖皮质激素、柳氮磺胺吡啶、美沙拉嗪和英夫利昔单抗都可以抑制NF-κB的活性, 治疗IBD^[4-6]。β-arrestin2广泛存在于各种组织细胞中, 是参与调节G蛋白偶联受体(G protein-coupled receptor, GPCR)相关细胞信号通路信号转导的重要衔接蛋白。β-arrestin2生物功能多样, 可以通过多种途径抑制NF-κB的活性^[7]。β2肾上腺素受体(β2-adrenoceptor, β2AR)参与交感神经系统对免疫系统的调节, β2AR介导的信号通路与NF-κB活化的信号通路之间存在交叉对话(cross talk)^[8]。氧化苦参碱是从中药苦参中提取的生物碱, 有激素样作用, 作为抗炎免疫调节剂能有效的治疗炎症性肠病^[9-11]。我们通过建立三硝基苯磺酸诱导的UC模型研究β-arrestin2在UC的病理机制中的作用, 结果表明β2AR-β-arrestin2-NF-κB信号转导通路参与UC的发病机制。氧化苦参碱通过调节β-arrestin2的表达和

■ 研究前沿

溃疡性结肠炎的发病机制与免疫异常有关, 具有免疫调节作用的细胞因子在UC的发病过程中起重要作用。许多细胞因子的产生可能与NF-κB的信号转导和转录激活因子有关。NF-κB活化可能是UC发生发展的关键点。

■相关报道

临床上本课题组用复方苦参肠溶胶囊(主要含氧化苦参碱)治疗UC取得良好的临床效果。

β 2AR- β -arrestin2-NF- κ B信号转导通路,减轻UC,这是氧化苦参碱治疗UC的机制之一。

1 材料和方法

1.1 材料 SD大鼠40只,♂,SPF级,体质量250 g \pm 20 g,由华中科技大学同济医学院实验动物中心提供,实验动物生产许可证SCKY(鄂)2004-0007,实验动物使用许可证SYXK(鄂)2004-0028;三硝基苯磺酸(Sigma公司); β 2AR多克隆抗体(Bioss公司,BS-0947R); β -arrestin2多克隆抗体(Bioss公司,BS-1332R);NF- κ B p65多克隆抗体(Santa Cruz公司,sc-8008);迈新公司免疫组织化学试剂盒(KIT-5020,羊抗鼠/兔);大鼠淋巴细胞分离液(武汉博士德,CM0100);RIPA细胞/组织总蛋白提取液(ProMab, Cat. No: SJ-200501);Bradford蛋白浓度测定试剂盒(碧云天, Cat. No: P0006);美沙拉嗪(法国爱的发制药集团),规格500 mg \times 10袋/盒;苦参素注射液(江苏鹏鹞药业有限公司),规格2 mL: 0.2 g,主要成分为苦参素,即氧化苦参碱。

1.2 方法

1.2.1 分组: 健康♂SD大鼠40只随机分为正常对照组、模型组、美沙拉嗪组、氧化苦参碱组,每组10只,各组体质量比较无显著差异($P>0.05$)。

1.2.2 造模: 依据Morris等^[12]及Fan等^[13,14]提出的方法具体操作如下: SD大鼠禁食不禁水24 h后,用10%水合氯醛按每100 mg体质量0.3 mL,腹腔注射麻醉,麻醉后将内径2 mm的橡胶导尿管由肛门轻柔插入约8 cm后,将0.6 mL的5% TNBS液(溶于500 mL/L乙醇),用注射器缓慢推入橡胶导尿管,推入TNBS液后将大鼠尾巴提起,持续倒置30 s,防止药液流出。造模结束后让动物平躺,待其自然清醒,给予自由饮食。

1.2.3 药物干预和处死: 氧化苦参碱组每只大鼠用苦参素注射液按63 mg/(kg \cdot d)肌肉注射^[10],每天1次,连续15 d。美沙拉嗪组每只大鼠用美沙拉嗪0.5 g/(kg \cdot d)的蒸馏水溶液3 mL灌胃,每天1次,连续15 d。模型组、正常组: 每组每只大鼠均以蒸馏水3 mL灌胃,每天1次,连续15 d。注意观察实验大鼠腹泻、便血症状。第7天,每组随机处死2只大鼠,比较各组结肠组织大体组织病理变化,取病变明显的结肠组织石蜡包埋切片并HE染色,镜下观察各组结肠病理组织学改变。第16天禁食24 h后将大鼠颈椎脱位处死。实验过程中正常对照组、模型组、美沙拉嗪组各有2只大鼠在灌胃中死亡,最后纳入统计为: 正常对照组

6只、模型组6只、美沙拉嗪组6只和氧化苦参碱组8只。

1.2.4 大鼠脾脏淋巴细胞分离和蛋白质提取: 将处死的大鼠置于750 mL/L乙醇中浸泡3-5 min,在超净工作台无菌取出脾脏,并在盛有无小牛血清的RPMI 1640不完全培养液的培养皿中清洗干净。将脾脏置于放置在盛有无小牛血清的RPMI 1640不完全培养液的培养皿上的200目不锈钢金属网上,用10 mL注射器针柄轻柔研磨脾脏至留下白色纤维包膜组织,收集网下的细胞悬液,与Hank's液1:1混匀后,小心加于2 mL的大鼠淋巴细胞分离液的液面上,置离心机中,2 000 r/min,室温离心20 min,收集界面上的细胞,放入含Hank's液5 mL的试管中,充分混匀后,以2 000 r/min离心10 min,吸去上清液,沉淀再用不含小牛血清的RPMI 1640不完全培养液颠倒冲洗2次并重新悬浮为脾脏淋巴细胞悬液^[15],收集分离的淋巴细胞悬液置于EP管中,用RIPA细胞/组织总蛋白提取液裂解细胞提取总蛋白。在收集的淋巴细胞悬液中加入1 mL RIPA后充分吹打,然后置冰上20 min,再吹打20 min,将匀浆液吸出放到1.5 mL离心管中,超声3次破碎细胞,每次3 s,再9 000 r/min离心10 min,用移液管将富含蛋白质的上清液转移到样品管中, -70 $^{\circ}$ C存放备用。

1.2.5 免疫组织化学分析大鼠结肠黏膜组织 β 2AR、 β -arrestin2、NF- κ B p65表达: 处死大鼠取出脾脏后,剖腹暴露腹腔,切取肛门至回盲部的结肠,取出结肠后沿纵轴切开,并用生理盐水冲洗干净,观察大鼠结肠的大体病变情况,然后将大鼠结肠置于40 g/L多聚甲醛溶液中固定,石蜡包埋切片,常规HE染色,在显微镜下观察评估大鼠结肠黏膜损伤程度。采用免疫组织化学法检测 β 2AR、 β -arrestin2、NF- κ B p65表达,按免疫组织化学试剂盒(KIT-5020)说明书进行操作: 常规包埋,切片,厚度3 μ m, 60 $^{\circ}$ C-65 $^{\circ}$ C烤片4 h。切片脱蜡和水化。1 \times PBS缓冲液(0.01 mol/L, pH7.2)洗涤切片3 \times 5 min。高压抗原修复,取出抗原修复盒,待修复液自然冷却30 min, 3%过氧化氢去离子水室温孵育10 min,蒸馏水冲洗。PBS浸洗3 \times 5 min。滴加正常山羊血清封闭液,室温孵育15 min,甩去多余液体。分别加入稀释度为1:200兔抗鼠 β 2AR多克隆抗体、1:200兔抗鼠 β -arrestin2多克隆抗体、1:200小鼠抗大鼠NF- κ B p65多克隆抗体,各50 μ L,置于湿盒内,4 $^{\circ}$ C过夜,防止切片干燥。1 \times PBS洗

3次各5 min. 滴加复合生物素标记的二抗(HRP-Polymer anti ms/rb IgG), 室温孵育20 min. DAB显色, 在显微镜下控制显色程度, 蒸馏水终止显色反应. 苏木素复染, 30-60 s. 脱水, 透明, 中性树脂封片. 在显微镜下观察免疫组织化学结果, 并用图像分析软件Image-Pro Plus 6.0进行图像分析, 以黄色或棕黄色染色为阳性表达, 测定平均吸光度值(mean density).

1.2.6 Western blot检测脾脏淋巴细胞 $\beta 2AR$ 、 β -arrestin2、NF- κB p65蛋白表达: (1)测定蛋白浓度: 用Bradford蛋白浓度测定试剂盒测定样品蛋白浓度. (2)SDS-PAGE电泳: 在收集的蛋白样品中加入 $5\times$ SDS-PAGE蛋白上样缓冲液(体积比为5:1), 混匀, $100^{\circ}C$ 加热5 min, 按设计加样顺序加入蛋白样品(考马斯亮蓝染色), 电压200 V电泳, 待溴酚蓝线条迁移到分离胶底部0.5 cm时关闭电源. (3)免疫印迹和转膜: 组装转膜夹子, 在转移槽中注满 $4^{\circ}C$ 预冷的转移缓冲液, 并将冰盒装入缓冲液槽, 恒流300 mA转移70 min. 电转完毕后用5%的脱脂奶粉(PBS配制)封闭, $4^{\circ}C$ 过夜. (4)免疫检测: 用PBST洗膜5 min \times 3次, 按标记切下3 mm宽的膜条, 置于加样槽中, 加入 $\beta 2AR$ 多克隆抗体(Rabbit $\beta 2AR$ antibody, 稀释度1:100)、 β -arrestin2多克隆抗体(Rabbit β -arrestin 2 antibody, 稀释度1:100)、NF- κB p65多克隆抗体(Mouse NF- κB p65 antibody, 稀释度1:200)各1 mL孵育, $4^{\circ}C$ 过夜. 弃去一抗, 每个槽加2-3 mL PBST, 上摇床洗涤5-10 min, 换液, 反复4次, 再分别加入 $\beta 2AR$ 和 β -arrestin2的二抗(稀释度1:40 000)和NF- κB p65的二抗(稀释度1:80 000)各1 mL, 室温下孵育1 h. 弃去二抗, 每槽加2-3 mL PBST, 上摇床洗涤5-10 min, 换液, 反复4次. (5)化学发光: 将膜置于压片盒中, 滴加发光液, 将X光片压于膜上5 min后取出, 在显影液中显影1 min, 在定影液中定影5 min. 阳性条带以Gel pro4.0版凝胶吸光度分析软件测其LA值.

统计学处理 采用SPSS17.0统计软件进行统计学分析. 实验数据以mean \pm SD表示, 组间比较采用方差分析和多个样本均数间比较的SNK- q 检验, 以 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义.

2 结果

2.1 实验大鼠结肠的大体和组织病理学改变 正常对照组大鼠结肠黏膜纹理清晰, 无黏膜充血水肿, 未见黏膜糜烂和溃疡. 模型组大鼠结肠肠

管明显变粗, 肠壁增厚, 由肛门至回盲部的肠管长度变短, 纵行切开病变肠管可见由肛门约3 cm以上至回盲部结肠黏膜可见多处片状充血、水肿、糜烂、浅表或线状溃疡和瘢痕组织形成, 并伴有局部结肠肠腔的扩张, 严重的出现肠壁间渗出和粘连. 与模型组相比, 美沙拉嗪组和氧化苦参碱组大鼠结肠黏膜组织病理改变明显减轻, 充血、水肿、糜烂和溃疡面积明显缩小, 溃疡较浅表, 肠壁增厚较模型组轻, 未见肠壁粘连. 实验大鼠病变结肠组织切片后常规苏木精-伊红(HE)染色, 镜下可见: 正常对照组: 大鼠结肠黏膜结构完整, 黏膜腺体排列整齐清晰, 黏膜内血管基质正常, 无充血水肿、溃疡形成和炎性细胞浸润; 模型组: 大鼠结肠黏膜结构异常, 黏膜腺体破坏, 排列不规则, 杯状细胞减少, 黏膜和黏膜下固有层明显充血水肿, 可见黏膜局灶糜烂和溃疡, 有的溃疡深及黏膜肌层, 在黏膜及黏膜下固有层可见大量淋巴细胞、粒细胞和巨噬细胞浸润. 美沙拉嗪组和氧化苦参碱组: 大鼠结肠黏膜结构尚完整, 黏膜层和黏膜下固有层充血、水肿较轻, 溃疡较浅表, 腺体增生活跃, 杯状细胞增多, 炎性细胞浸润减少(图1).

2.2 实验大鼠结肠黏膜组织 $\beta 2AR$ 、 β -arrestin2、NF- κB p65阳性表达 与正常对照组比较, 模型组结肠黏膜组织NF- κB p65表达显著上升($P<0.01$), $\beta 2AR$ 和 β -arrestin2表达均显著下降($P<0.01$); 与模型组比较, 美沙拉嗪组和氧化苦参碱组结肠黏膜组织NF- κB p65表达均显著下降($P<0.01$), $\beta 2AR$ 和 β -arrestin2表达均显著上升($P<0.01$), 但美沙拉嗪组和氧化苦参碱组之间比较 $\beta 2AR$ 、 β -arrestin2、NF- κB p65表达无显著差异($P>0.05$, 图2-4, 表1).

2.3 大鼠脾脏淋巴细胞 $\beta 2AR$ 、 β -arrestin2、NF- κB p65蛋白表达 与正常对照组比较, 模型组脾脏淋巴细胞NF- κB p65蛋白表达水平显著上升($P<0.01$), $\beta 2AR$ 和 β -arrestin2蛋白表达水平显著下降($P<0.01$); 与模型组比较, 美沙拉嗪组和氧化苦参碱组脾脏淋巴细胞NF- κB p65蛋白表达水平均显著下降($P<0.01$), $\beta 2AR$ 和 β -arrestin2蛋白表达水平显著上升($P<0.01$), 但美沙拉嗪组和氧化苦参碱组之间比较 $\beta 2AR$ 、 β -arrestin2、NF- κB p65蛋白表达无显著差异($P>0.05$, 图5, 表2).

3 讨论

NF- κB 是NF- κB /Rel家族成员, 通常以二聚体形式存在, 分别通过其氨基端Rel同源结构域内的

■创新盘点

本文通过研究大鼠结肠和脾脏中 $\beta 2AR$ 、 β -arrestin2、NF- κB p65的表达来阐明溃疡性结肠炎的发病机制, 检测指标和UC密切相关, 为氧化苦参碱治疗溃疡性结肠炎提供了理论依据和研究思路.

应用要点

本文研究发现氧化苦参碱和美沙拉嗪均可以有效治疗溃疡性结肠炎,特别是中药提取物氧化苦参碱对该病有较好的治疗作用,值得进一步研究和开发,有一定的临床应用前景。

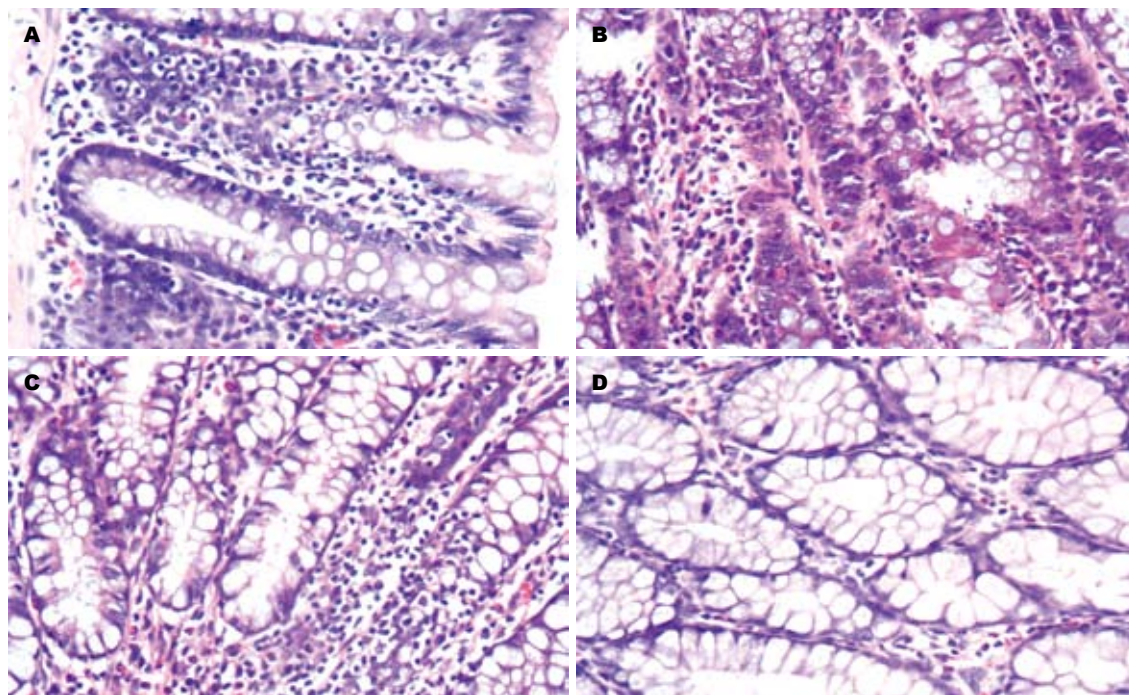


图1 实验大鼠结肠病理(H&E × 100). A: 正常组; B: 模型组; C: 美沙拉嗪组; D: 氧化苦参碱组。

表1 大鼠结肠组织 β 2AR、 β -arrestin2、NF- κ B p65阳性表达

分组	n	β 2AR	β -arrestin2	NF- κ B p65
正常组	6	56.69 ± 10.05	65.01 ± 14.28	15.10 ± 6.40
模型组	6	12.20 ± 2.70 ^b	16.80 ± 7.17 ^b	61.90 ± 17.75 ^b
美沙拉嗪组	6	47.27 ± 12.40 ^d	70.71 ± 12.84 ^d	16.26 ± 5.51 ^d
氧化苦参碱组	8	61.75 ± 10.40 ^d	76.14 ± 8.77 ^d	18.34 ± 3.34 ^d

^b $P < 0.01$ vs 正常组; ^d $P < 0.01$ vs 模型组。

DNA结合位点和抑制蛋白I κ B结合位点与DNA和I κ B结合,抑制蛋白I κ B与NF- κ B形成复合物并掩盖NF- κ B结构中的核定位信号序列,使其保留在细胞质中。NF- κ B是重要的转录因子,在上游刺激信号的作用下I κ B激酶(I κ B kinase, IKK)使I κ B降解,暴露NF- κ B的核定位信号序列, NF- κ B进入细胞核内,通过与细胞核内多种基因的增强子和启动子序列结合促进特定基因的转录和表达,广泛参与免疫,炎症,细胞凋亡和增殖的调节。NF- κ B的活化促进多种促炎细胞因子的表达和增强炎症细胞的募集, NF- κ B是炎症反应中的关键调节因子^[16,17]。Toll样受体信号是介导NF- κ B活化的重要途径, TLR/NF- κ B信号通路调节机制的破坏可以导致肠道炎症的发生, TLR/NF- κ B信号通路参与IBD的发病机制。IBD患者的病变结肠组织中NF- κ B表达增高, NF- κ B促进多种促炎细胞因子的表达, NF- κ B在IBD的病理机制

中扮演着重要的角色,阻断NF- κ B的活化是治疗IBD的重要手段^[6,18]。

β -arrestin2通过多种机制抑制NF- κ B的活化^[7], β -arrestin2与I κ B α 和IKK的结合抑制了CK2和IKK对I κ B α 的磷酸化,稳定了抑制蛋白I κ B α ,继而减弱NF- κ B p65的活化和核转位^[8,19]。NF- κ B的活化依赖TRAF6的泛素化和寡聚化, β -arrestin2与TRAF6结合阻止TRAF6的泛素化和寡聚化,抑制NF- κ B的活化^[20]。我们的研究表明三硝基苯磺酸诱导的实验性大鼠结肠炎结肠黏膜组织和脾脏淋巴细胞 β -arrestin2表达与正常对照组大鼠相比明显降低($P < 0.01$), NF- κ B p65的表达与正常对照组大鼠相比明显上升($P < 0.01$)。以上结果提示, β -arrestin2表达降低是UC中NF- κ B过度活化的重要原因, NF- κ B的过度活化是UC重要发病机制。

β 2AR受体信号通路通过 β -arrestin2调节

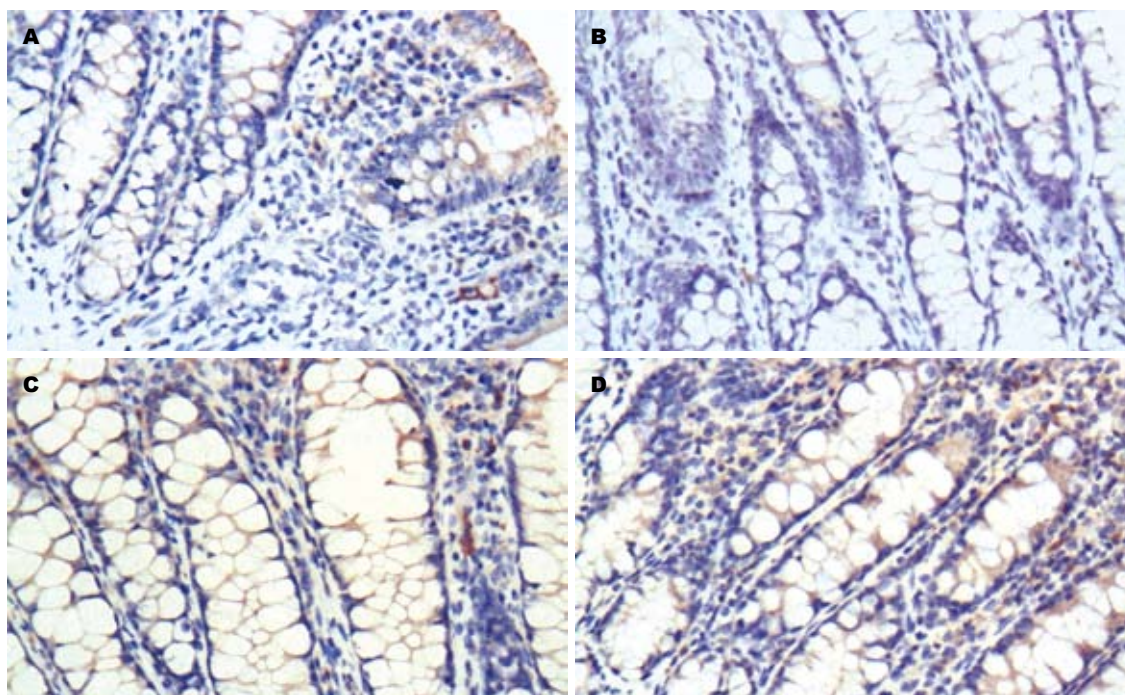


图 2 实验大鼠结肠 $\beta 2AR$ 表达. A: 正常组; B: 模型组; C: 美沙拉嗪组; D: 氧化苦参碱组.

■同行评价

本课题新颖, 实验设计比较严谨, 讨论较充分, 有一定的科学意义.

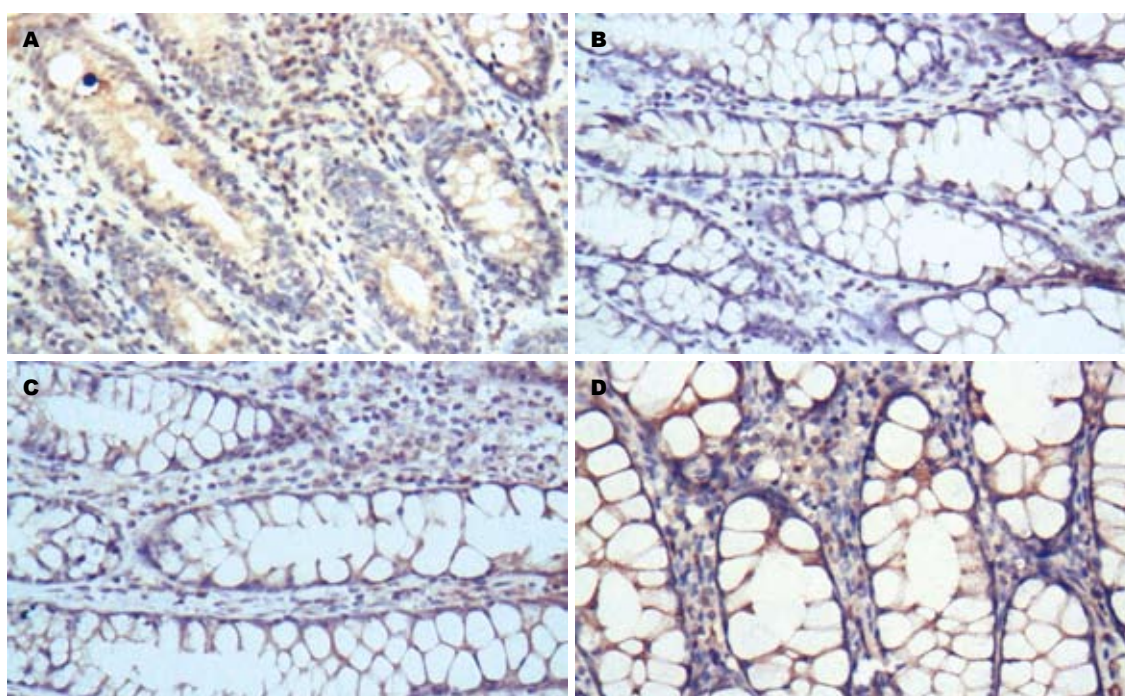


图 3 实验大鼠结肠 β -arrestin2表达. A: 正常组; B: 模型组; C: 美沙拉嗪组; D: 氧化苦参碱组.

NF- κB 的活化过程, $\beta 2AR$ 受体信号降低CK2磷酸化 β -arrestin2和诱导 β -arrestin2的特异性构象改变, 加强 β -arrestin2与 $I\kappa B\alpha$ 的结合, 稳定 $I\kappa B\alpha$, 抑制NF- κB 活化^[8]. $\beta 2AR$ / β -arrestin2信号通路与TLR4/NF- κB 信号通路存在交叉对话和相互调节. 脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)激活的TLR信号通路是活化NF- κB 的重要信号通路^[21], TLR/

NF- κB 信号通路包括依赖衔接蛋白MyD88(髓分化因子88)调节的早期时相通路和依赖衔接蛋白TRAM(Toll receptor associated molecule)和TRIF(Toll receptor associated activator of interferon)调节的晚期时相通路. 在LPS激活的TLR4/NF- κB 信号通路的晚期时相通过依赖TRIF的方式下调 $\beta 2AR$ 和 β -arrestin2的表达, 诱导

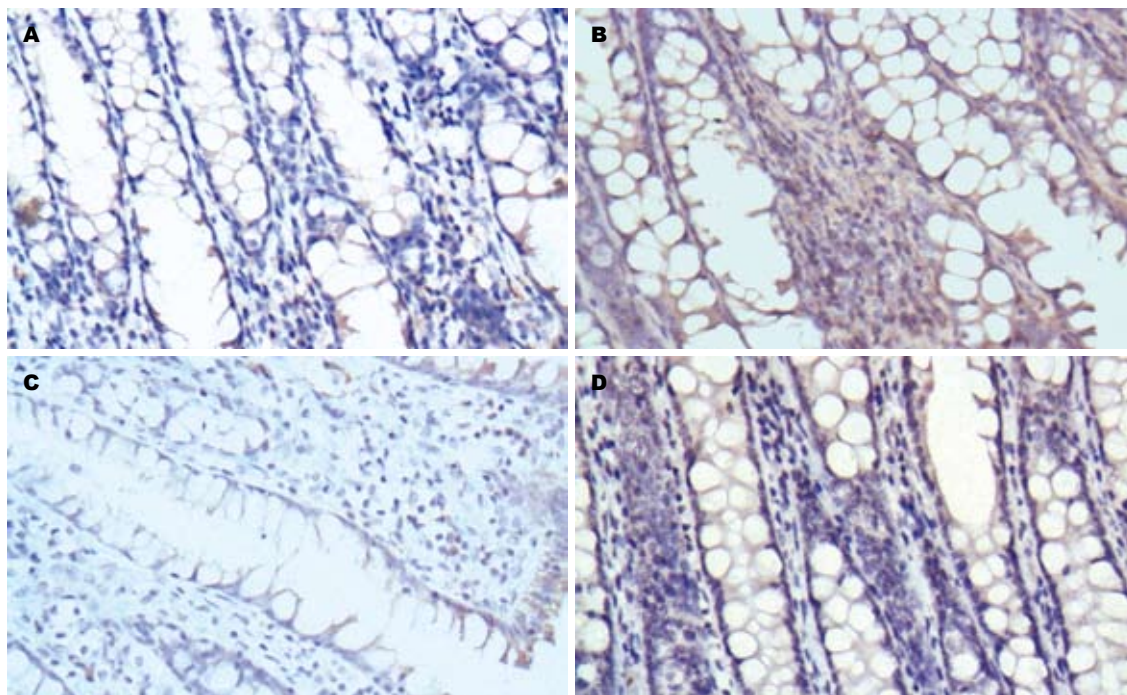


图 4 实验大鼠结肠NF-κB p65表达. A: 正常组; B: 模型组; C: 美沙拉嗪组; D: 氧化苦参碱组.

表 2 大鼠脾脏淋巴细胞β2AR、β-arrestin2、NF-κB p65蛋白表达

分组	n	β2AR	β-arrestin2	NF-κB p65
正常组	6	957.45 ± 249.82	302.31 ± 27.88	86.22 ± 10.95
模型组	6	594.97 ± 209.59 ^b	111.77 ± 19.43 ^b	249.70 ± 18.94 ^b
美沙拉嗪组	6	1 006.50 ± 226.89 ^d	189.97 ± 21.12 ^d	114.23 ± 11.56 ^d
氧化苦参碱组	8	1 102.11 ± 297.72 ^d	162.04 ± 15.69 ^d	145.62 ± 13.05 ^d

^bP<0.01 vs 正常组; ^dP<0.01 vs 模型组.

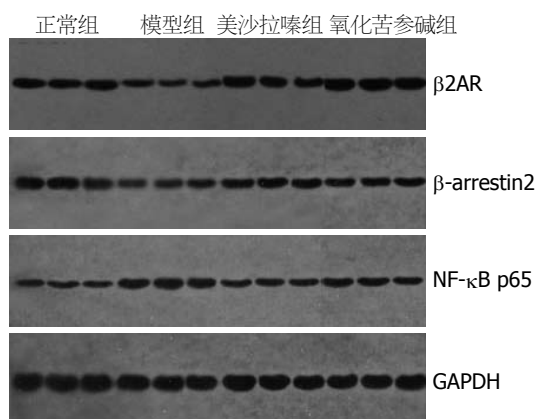


图 5 实验大鼠脾脏淋巴细胞β2AR、β-arrestin2和NF-κB p65蛋白表达.

晚期时相NF-κB的持续活化. 而β2AR/β-arrestin2信号通路可以减弱TLR4/NF-κB信号通路早期时相诱导的IκBα降解和NF-κB活化^[22,23]. 我们的研究表明β2AR/β-arrestin2信号转导通路通过调

节TLR4/NF-κB信号通路参与IBD中炎症和免疫调节的过程, 在UC中β2AR和β-arrestin2的表达明显下降, 而NF-κB p65的表达上升, β2AR和β-arrestin2表达的下降减弱了β-arrestin2对NF-κB活性的抑制作用, 说明β2AR-β-arrestin2-NF-κB信号转导通路参与UC的病理机制.

氧化苦参碱可以促进β2AR和β-arrestin2的表达, 抑制NF-κB的过度活化, 通过调节β2AR-β-arrestin2-NF-κB信号转导通路减轻UC的症状和组织病理改变. NF-κB的活化促进多种促炎细胞因子的表达, 抑制NF-κB的过度活化是治疗IBD的重要手段^[6,16,18]. β-arrestin2通过抑制NF-κB的活化, 调节多种炎症相关基因的表达. 氧化苦参碱是喹啉类生物碱, 具有细胞毒性和抗炎免疫调节功能, 氧化苦参碱可以抑制NF-κB的活性和下调NF-κB的表达^[24-26], 并通过抑制NF-κB活性和降低促炎细胞因子的表达

减轻UC^[9-11]。临床上我们用复方苦参肠溶胶囊(主要含氧化苦参碱)治疗UC取得良好的临床效果^[27-30]。动物实验中进一步研究发现氧化苦参碱可以显著提高三硝基苯磺酸诱导的实验性大鼠结肠炎模型结肠黏膜组织和脾脏淋巴细胞 β 2AR和 β -arrestin2的表达,降低NF- κ B p65的表达,说明氧化苦参碱可以促进 β 2AR和 β -arrestin2表达,增强 β -arrestin2对NF- κ B活化的抑制作用,通过 β 2AR/ β -arrestin2信号通路抑制NF- κ B的活性,这可能是氧化苦参碱减轻UC的机制之一。

总之,UC中 β 2AR和 β -arrestin2的表达下降, β -arrestin2对NF- κ B活化的抑制减弱,NF- κ B过度活化和活性增强,导致肠道炎症的发生和持续。在UC中 β 2AR/ β -arrestin2信号通路通过与TLR/NF- κ B信号通路的交叉对话,调节TLR活化的NF- κ B活性, β 2AR- β -arrestin2-NF- κ B信号通路参与UC的病理过程。氧化苦参碱促进UC中 β 2AR和 β -arrestin2的表达,抑制NF- κ B的活化,减轻UC的症状和组织病理改变。本研究为氧化苦参碱治疗UC提供了新的理论依据和思路,氧化苦参碱是否可以通过这一机制调节炎症相关细胞因子的表达有待进一步的研究。

4 参考文献

- Bouma G, Strober W. The immunological and genetic basis of inflammatory bowel disease. *Nat Rev Immunol* 2003; 3: 521-533
- Xavier RJ, Podolsky DK. Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature* 2007; 448: 427-434
- Neuman MG. Immune dysfunction in inflammatory bowel disease. *Transl Res* 2007; 149: 173-186
- Kucharzik T, Maaser C, Lügering A, Kagnoff M, Mayer L, Targan S, Domschke W. Recent understanding of IBD pathogenesis: implications for future therapies. *Inflamm Bowel Dis* 2006; 12: 1068-1083
- Sartor RB. Mechanisms of disease: pathogenesis of Crohn's disease and ulcerative colitis. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol* 2006; 3: 390-407
- Atreya I, Atreya R, Neurath MF. NF-kappaB in inflammatory bowel disease. *J Intern Med* 2008; 263: 591-596
- Chen F. Arresting NF-kappaB by beta-arrestin2. *Cell Death Differ* 2004; 11: 1155-1156
- Gao H, Sun Y, Wu Y, Luan B, Wang Y, Qu B, Pei G. Identification of beta-arrestin2 as a G protein-coupled receptor-stimulated regulator of NF-kappaB pathways. *Mol Cell* 2004; 14: 303-317
- Fan H, Chen R, Shen L, Lv J, Xiong P, Shou Z, Zhuang X. Oxymatrine improves TNBS-induced colitis in rats by inhibiting the expression of NF-kappaB p65. *J Huazhong Univ Sci Technol Med Sci* 2008; 28: 415-420
- Zheng P, Niu FL, Liu WZ, Shi Y, Lu LG. Anti-inflammatory mechanism of oxymatrine in dextran sulfate sodium-induced colitis of rats. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 4912-4915
- 吕建芳, 范恒, 沈霖, 寿折星, 庄雄. 氧化苦参碱对实验性结肠炎大鼠肠黏膜细胞因子和核因子- κ B p65表达的影响. *世界华人消化杂志* 2008; 16: 896-899
- Morris GP, Beck PL, Herridge MS, Depew WT, Szewczuk MR, Wallace JL. Hapten-induced model of chronic inflammation and ulceration in the rat colon. *Gastroenterology* 1989; 96: 795-803
- Fan H, Qiu MY, Mei JJ, Shen GX, Liu SL, Chen R. Effects of four regulating-intestine prescriptions on pathology and ultrastructure of colon tissue in rats with ulcerative colitis. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 4800-4806
- Fan H, Shen L, Tang Q, Xiong PC, Shou ZX, Liang L, Liao Y, Chen XY. Effect of Wumeiwan on Cytokine TNF- α , IL-6, IL-8, IL-10 and expression of NF-kB p65 of Rats with Ulcerative Colitis. *J Huazhong Univ Sci Technol Med Sci* 2009; 29: 650-654
- 沈关心, 周汝麟. 现代免疫学实验技术. 第2版. 武汉: 湖北科学技术出版社, 2002: 433-434
- Karin M, Yamamoto Y, Wang QM. The IKK NF-kappa B system: a treasure trove for drug development. *Nat Rev Drug Discov* 2004; 3: 17-26
- Tak PP, Firestein GS. NF-kappaB: a key role in inflammatory diseases. *J Clin Invest* 2001; 107: 7-11
- Karrasch T, Jobin C. NF-kappaB and the intestine: friend or foe? *Inflamm Bowel Dis* 2008; 14: 114-124
- Witherow DS, Garrison TR, Miller WE, Lefkowitz RJ. beta-Arrestin inhibits NF-kappaB activity by means of its interaction with the NF-kappaB inhibitor IkappaBalpha. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101: 8603-8607
- Wang Y, Tang Y, Teng L, Wu Y, Zhao X, Pei G. Association of beta-arrestin and TRAF6 negatively regulates Toll-like receptor-interleukin 1 receptor signaling. *Nat Immunol* 2006; 7: 139-147
- Abreu MT, Fukata M, Arditi M. TLR signaling in the gut in health and disease. *J Immunol* 2005; 174: 4453-4460
- Kizaki T, Izawa T, Sakurai T, Haga S, Taniguchi N, Tajiri H, Watanabe K, Day NK, Toba K, Ohno H. Beta2-adrenergic receptor regulates Toll-like receptor-4-induced nuclear factor-kappaB activation through beta-arrestin 2. *Immunology* 2008; 124: 348-356
- Kizaki T, Shirato K, Sakurai T, Ogasawara JE, Ohishi S, Matsuoka T, Izawa T, Imaizumi K, Haga S, Ohno H. Beta2-adrenergic receptor regulate Toll-like receptor 4-induced late-phase NF-kappaB activation. *Mol Immunol* 2009; 46: 1195-1203
- Zhang CQ, Feng J, Yan XN, Li WB, Hu G. Effects of Oxymatrine on the NF-kappa B expression of HaCaT cells. *J Nanjing Med Univ* 2008; 22: 178-182
- 张彩晴, 郭宏林, 冯捷, 闫小宁, 李文彬, 胡刚. 氧化苦参碱对HaCaT细胞核转录因子 κ B表达及一氧化氮分泌的影响. *中国组织工程研究与临床康复* 2008; 12: 3847-3852
- Liu Y, Zhang XJ, Yang CH, Fan HG. Oxymatrine protects rat brains against permanent focal ischemia and downregulates NF-kappaB expression. *Brain Res* 2009; 1268: 174-180
- 范恒, 庄雄, 段雪云, 梁丽, 廖奕, 唐庆. 复方苦参结肠溶胶囊对溃疡性结肠炎患者的治疗作用及其机制. 世

- 界华人消化杂志 2009; 17: 2429-2432
- 28 范恒, 寿折星, 吕建芳, 沈霖, 杨胜兰, 陈瑞. 复方苦参结肠溶胶囊治疗溃疡性结肠炎11例. 中国中西医结合消化杂志 2007; 15: 60-61
- 29 梁丽, 范恒, 唐庆, 陈小艳. 复方苦参结肠溶胶囊治疗溃疡性结肠炎(湿热型)40例临床观察. 中西医结合研究 2010; 2: 7-10
- 30 Fan H, Zhao J, Shen L, Tang Q, Shou ZX, Liang L, Liao Y, Chen XY. Effect of Compound Sophorae Flavescentis Jiechangrong Capsule on Expression of NF- κ Bp65 and STAT6 in the intestinal mucosa of patients with ulcerative colitis. *Front Med China* 2009; 3: 480-484

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

JAK2、ERK1干扰对幽门螺杆菌毒素相关蛋白CagA调控胃泌素基因表达的影响

谢渊, 周建奖, 赵艳, 汪苏, 陈娴

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

周建奖, 贵阳医学院附属医院 贵州省贵阳市 550004

谢渊, 硕士, 副教授, 主要从事肿瘤分子生物学研究.

国家自然科学基金资助项目, No. 30560038

贵州省科学技术基金资助项目, No. 黔科合J字[2007] 2084

贵州省国际科技合作基金资助项目, No. 黔科合外G字[2008]

700119

作者贡献分布: 谢渊与周建奖对此文所作贡献均等; 此课题由周建奖设计; 研究过程由谢渊、赵艳、汪苏及陈娴完成; 研究所用新试剂及分析工具由周建奖提供; 数据分析由谢渊完成; 本论文写作由谢渊与周建奖完成.

通讯作者: 周建奖, 教授, 550004, 贵州省贵阳市, 贵阳医学院附属医院. jianjiangzhou@gmail.com

电话: 0851-6752814

收稿日期: 2010-04-23 修回日期: 2010-07-03

接受日期: 2010-07-05 在线出版日期: 2010-08-08

RNA interference-mediated knockdown of JAK2 and ERK1 inhibits *Helicobacter pylori* CagA-induced gastrin up-regulation in gastric cancer cell lines AGS and SGC-7901

Yuan Xie, Jian-Jiang Zhou, Yan Zhao, Su Wang, Xian Chen

Yuan Xie, Yan Zhao, Su Wang, Xian Chen, Key Laboratory of Molecular Biology, Guiyang Medical University, Guiyang 550004, Guizhou Province, China

Jian-Jiang Zhou, the Affiliated Hospital of Guiyang Medical University, Guiyang 550004, Guizhou Province, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30560038; the Science and Technology Foundation of Guizhou Province, No. Qian Ke He J Zi [2007] 2084; and the International Technical Cooperation Project of Guizhou Province, No. Qian Ke He Wai G Zi [2008] 700119

Correspondence to: Professor Jian-Jiang Zhou, Key Laboratory of Molecular Biology, Guiyang Medical University, Guiyang 550004, Guizhou Province, China. jianjiangzhou@gmail.com

Received: 2010-04-23 Revised: 2010-07-03

Accepted: 2010-07-05 Published online: 2010-08-08

Abstract

AIM: To investigate the role of the JAK/STAT3 and ERK/MAPK signaling pathways in *Helicobacter pylori* (*H.pylori*) cytotoxin-associated protein A (CagA)-induced gastrin up-regulation in gastric cancer cell lines AGS and SGC-7901

by knocking down the JAK2 and ERK1 genes by RNA interference.

METHODS: AGS and SGC-7901 cells were transfected with a CagA expression vector (transfection group) or infected with CagA-positive *H.pylori* (infection group). Meanwhile, the JAK2 and ERK1 genes were knocked down by RNA interference. At 48 h postinfection, the expression of CagA protein and gastrin mRNA was detected by Western blot and real-time fluorescence quantitative PCR, respectively.

RESULTS: CagA protein was highly expressed in cells either transfected with the CagA expression vector or infected with *H.pylori*. Compared with control cells, gastrin mRNA levels increased 26.58 times (AGS) and 5.59 times (SGC-7901) in the transfection group and 1.88 times (AGS) and 8.59 times (SGC-7901) in the infection group, respectively. After JAK2 and ERK1 knockdown, gastrin mRNA levels significantly decreased in the two groups ($P < 0.05$). In the transfection group, the reduced rates of gastrin mRNA expression were 81.50% (AGS) and 99.00% (SGC-7901) after JAK2 knockdown and 75.55% (AGS) and 97.00% (SGC-7901) after ERK1 knockdown. In the infection group, the reduced rates of gastrin mRNA expression were 55.30% (AGS) and 90.00% (SGC-7901) after JAK2 knockdown and 38.30% (AGS) and 92.00% (SGC-7901) after ERK1 knockdown. These data suggest that the blockage of the ERK/MAPK and JAK/STAT signaling pathways can inhibit CagA-induced gastrin up-regulation.

CONCLUSION: CagA up-regulates the expression of the gastrin gene. The blockage of the JAK/STAT3 and ERK/MAPK signaling pathway by RNA interference can inhibit CagA-mediated gastrin up-regulation.

Key Words: Signaling pathway; RNA interference; Cytotoxin-associated protein A; Gastrin

Xie Y, Zhou JJ, Zhao Y, Wang S, Chen X. RNA interference-mediated knockdown of JAK2 and ERK1

■背景资料

幽门螺杆菌(*H.pylori*)慢性感染是导致胃癌的重要因素, CagA是*H.pylori*主要的毒力因子, 可能是胃癌发生的始动因素. 胃泌素(gastrin, GAS)由GAS分泌细胞(G细胞)产生, 具有刺激胃酸分泌和对胃肠黏膜的营养作用, 同时GAS也是一种促生长因子, 可刺激胃肠道黏膜增殖, 促进胃癌的发生. 前期研究成果中认为胃癌细胞分泌的GAS(产生自分泌环)是胃癌发生发展的重要因素. CagA蛋白是否调控GAS基因表达以及通过何种信号通路发挥作用尚不清楚.

■同行评议者

高国全, 教授, 中山大学中山医学院生化系

■研究前沿

了解高胃泌素血症与*H.pylori*感染在胃癌的发生、发展过程中的协同作用机制,明确*H.pylori*感染诱发胃癌的机制,是目前研究的热点。

inhibits *Helicobacter pylori* CagA-induced gastrin up-regulation in gastric cancer cell lines AGS and SGC-7901. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(22): 2317-2321

摘要

目的: 探讨JAK/STAT3和MAPK/ERK两条信号转导通路在分析和推断CagA调控胃泌素基因表达机制中的作用。

方法: 将含*cagA*基因的表达质粒和幽门螺杆菌(CagA阳性)株分别转染和感染胃癌细胞AGS和SGC-7901,同时用siRNA阻断*jak2*及*erk1*基因的表达,48 h后通过RT-PCR、Western blot检测细胞中有无CagA蛋白表达,实时荧光定量PCR检测胃泌素的变化。

结果: 转染组和感染组中均检测到CagA蛋白的表达,与对照相比胃泌素mRNA在转染组分别增加了26.58倍(AGS细胞)和5.59倍(SGC-7901),在感染组分别增加1.88倍(AGS细胞)和8.59倍(SGC-7901),表达量显著增高;siRNA干扰JAK2和ERK1后胃泌素mRNA表达量降低,在转染组JAK2干扰抑制率分别为81.50%(AGS)和99.00%(SGC-7901),ERK1干扰抑制率分别75.55%(AGS)和97.00%(SGC-7901)。在感染组JAK2干扰抑制率分别为55.30%(AGS)和90.00%(SGC-7901),ERK1干扰抑制率分别38.30%(AGS)和92.00%(SGC-7901)。结果显示ERK/MAPK和JAK/STAT通路阻断,抑制了CagA调控的胃泌素mRNA表达。

结论: CagA上调胃泌素基因的表达,siRNA干扰阻断JAK/STAT和ERK/MAPK这两个信号通路,可以抑制CagA对胃泌素mRNA表达的调控。

关键词: 信号通路; RNA干扰; 幽门螺杆菌毒素相关蛋白; 胃泌素

谢渊, 周建英, 赵艳, 汪苏, 陈娴. JAK2、ERK1干扰对幽门螺杆菌毒素相关蛋白CagA调控胃泌素基因表达的影响. *世界华人消化杂志* 2010; 18(22): 2317-2321

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/2317.asp>

0 引言

幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *H.pylori*)是一种可长期定植于人类胃黏膜的革兰氏阴性螺旋形微需氧菌,在全世界范围内感染率超过50%^[1],流行病学和动物实验证实*H.pylori*慢性感染是导致胃癌的重要危险因素^[2],其中*H.pylori*分泌的细胞毒素相关基因A蛋白(cytotoxin-associated

gene A, CagA)与胃癌的发生密切相关^[3]。磷酸化CagA能结合并激活含有SH2结构域的酪氨酸磷酸酶SHP-2,主要介导JAK-STAT及ERK/MAPK激酶等信号通路,在诱导细胞成活、增生及分化中起重要作用^[4]。胃泌素是一种多肽激素,由胃泌素分泌细胞(G细胞)产生,主要具有刺激胃酸分泌和对胃肠黏膜的营养作用。有学者研究认为,胃癌细胞能自分泌胃泌素,作为生长因子与癌细胞上胃泌素受体结合,形成自分泌环,在胃癌的发生中起重要作用^[5]。Wang等^[6]研究发现胃泌素水平和血清CagA阳性率在大多数胃癌患者中明显增加,高胃泌素血症与*H.pylori*感染在胃癌的发生、发展过程中有协同作用,但两者的相互关系如何,CagA蛋白能否调控胃泌素基因的表达,以及通过什么途径对胃泌素基因表达进行调控并未阐明。本研究通过小干扰RNA阻断JAK2和ERK1的表达,探讨JAK/STAT3和MAPK/ERK两条信号转导通路在分析和推断CagA调控胃泌素基因表达机制中的作用。

1 材料和方法

1.1 材料 人胃癌细胞AGS、SGC-7901(中科院上海细胞库),*H.pylori*标准菌株NCTC1163(中国幽门螺杆菌菌株管理与保藏中心馈赠),真核表达质粒(含CagA基因)pcDNA3.1Zeo(-)/cagA7由本室构建。改良型RPMI 1640(HyClone公司),胎牛血清(四季青公司);Lipofectamine 2000(Invitrogen公司),JAK2和ERK1特异小干扰RNA(上海吉玛公司),兔多抗CagA、HRP标记二抗(Santa Cruz公司),HRP-GAPDH(康成公司),Real time RT-PCR所用试剂及探针(Applied Biosystems); β -actin Taqman探针(基康公司);普通化学试剂(Sigma公司)。PVDF膜、ECL-Plus发光试剂、高效显影胶片(Amersham公司)。7300型荧光定量PCR仪(Applied Biosystems公司),双垂直电泳槽DYCZ-24D(北京六一仪器厂)。

1.2 方法

1.2.1 转染组: AGS、SGC-7901细胞用改良型RPMI 1640培养基(100 mL/L胎牛血清、青霉素100 kU/L,链霉素100 kU/L),50 mL/L CO₂,37 °C恒温培养。用0.25%胰酶消化对数生长期的细胞,计数并按每孔4×10⁵个细胞接种于6孔培养板,置37 °C培养箱培养至细胞生长达到90%-95%的融合率后进行细胞共转染。实验组分为:空白对照组(细胞未作任何处理)、空载转染组[pcDNA3.1 Zeo(-)/空载体]、CagA转染组[pcDNA3.1 Zeo(-)/cagA7]、JAK2干扰组

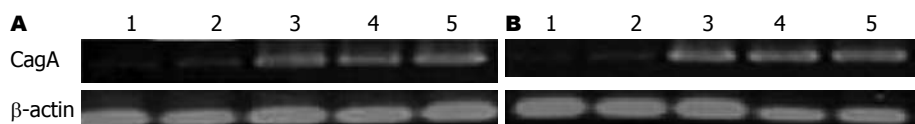


图 1 AGS细胞(A)和SGC-7901细胞(B)转染真核表达质粒后CagA及β-actin电泳结果. 1: 空白对照; 2: 空载转染组; 3-5: pcDNA3.1Zeo(-)/cagA7转染组.

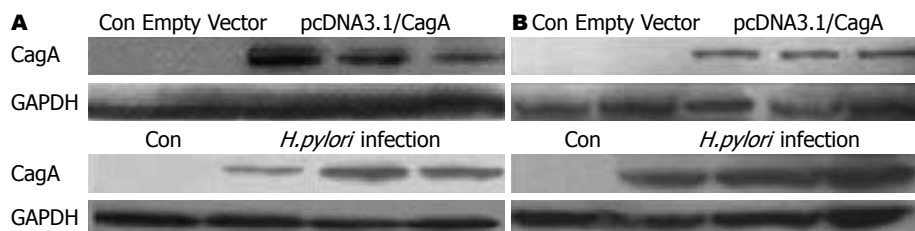


图 2 转染组与感染组CagA蛋白、GAPDH内对照检测结果. A: AGS细胞; B: SGC-7901细胞.

■ 相关报道

本课题组前期已研究用 pcDNA3.1Zeo(-)/CagA7 瞬时转染和 *H. pylori* 感染 AGS 细胞和 SGC-7901 细胞; 然后用化学阻断剂阻断 JAK/STAT3 和 ERK/MAPK 两条细胞内信号转导通路, 分析和推断 CagA 调控胃泌素基因表达的作用机制.

[pcDNA3.1 Zeo(-)/cagA7+ JAK2 siRNA]和ERK1 干扰组[pcDNA3.1 Zeo(-)/cagA7+ERK1 siRNA]. 质粒: siRNA: Lipofectamine™ 2000为1:1:3, 将培养板放入37℃、50 mL/L CO₂培养箱, 6 h后更换成含100 mL/L胎牛血清培养基, 继续培养48 h后收集细胞.

1.2.2 感染组: AGS、SGC-7901细胞培养及 siRNA转染同转染组. 实验分组: 空白对照组(细胞未作任何处理)、CagA感染组(*H. pylori* 感染)、JAK2干扰组(*H. pylori*+JAK2 siRNA)和 ERK1干扰组(*H. pylori*+ERK1 siRNA). *H. pylori* 标准株NCTC11637接种于哥伦比亚血琼脂板, 50 mL/L O₂、100 mL/L CO₂、850 mL/L N₂、37℃ 培养3 d后, 悬于PBS中, 用麦氏比浊法调细菌浓度达 15×10^8 个/mL. 细胞用siRNA转染42 h后按细菌与细胞的比例100:1感染细胞, 6 h后收集细胞.

1.2.3 RT-PCR检测转染组CagA表达: 根据文献设计CagA引物. 上游引物: 5'-AAT ACA CCA ACG CCT CCA AG-3'; 下游引物: 5'-TTG TTG CCG CTT TTG CTC TC-3'. PCR产物以1.5%琼脂糖凝胶电泳, 约397 bp条带即为目的DNA.

1.2.4 细胞总蛋白提取及Western blot检测转染组及感染组CagA蛋白: 细胞经PBS洗涤后用细胞裂解液(含PMSF和复合蛋白酶抑制剂)裂解, 定量后分装, -20℃保存备用; Western blot检测CagA蛋白表达.

1.2.5 细胞总RNA提取及RT-Real time PCR检测胃泌素表达水平: 采用TRIzol一步法提取细胞总RNA, 逆转录合成cDNA, 运用TaqMan Universal PCR Master Mix试剂盒在7300型实时荧光定量PCR仪上检测Gastrin和β-actin基因表达. 以SDS1.4软件进行荧光收集和分析ΔΔCt值

及RQ(relative quantity)值, $RQ = 2^{-\Delta\Delta C_t}$. 分析实验结果时以β-actin为内对照, 计算Gastrin扩增水平, 然后将其与对照组的结果进行比较并计算Gastrin的相对表达水平. 采用SPSS11.5统计软件进行方差分析, 组间比较采用 t 检验.

2 结果

2.1 RT-PCR检测转染组CagA表达 通过检测发现在所设立的5个组内, 均可见到CagA表达, 但明显的转染了pcDNA3.1Zeo(-)/CagA7的组中, cagA高表达(图1).

2.2 Western blot检测转染组及感染组CagA蛋白表达 pcDNA3.1Zeo(-)/cagA7和小干扰RNA转染后, 在AGS和SGC-7901细胞中均检测到CagA蛋白表达, 说明pcDNA3.1Zeo(-)/cagA7转染成功; *H. pylori*感染SGC-7901和AGS细胞后Western blot检测CagA蛋白, 结果显示有CagA蛋白存在, 说明发生了CagA蛋白转位(图2).

2.3 转染组Real-time PCR检测胃泌素基因表达 在AGS和SGC-7901细胞中pcDNA3.1Zeo(-)/CagA7转染组胃泌素mRNA表达水平较空白对照组均显著增高($P < 0.05$), 分别增加了26.58倍和5.59倍, 表明CagA蛋白能上调胃泌素基因的表达. 在JAK2和ERK1干扰后这种上调作用被抑制, 胃泌素基因的表达量显著降低($P < 0.05$), JAK2干扰组抑制率分别为81.5%(AGS)和99%(SGC-7901), ERK1干扰组抑制率分别为75.55%(AGS)和97%(SCG-7901)(表1, 图3).

2.4 感染组Real-time PCR检测胃泌素基因表达 *H. pylori*感染和RNAi转染AGS细胞, 其胃泌素mRNA表达水平较空白对照组略有增高, 为1.88倍, 经JAK2和ERK1干扰后这种上调作用被抑制, 抑制率为分别为55.3%和38.3%. 在SGC-7901

■创新盘点

本研究首次将 *H. pylori* 的毒力蛋白 CagA 与胃癌细胞自分泌胃泌素假说联系起来, 设想 CagA 蛋白可能通过 JAK/STAT3 和 ERK/MAPK 两条细胞内信号转导通路调控胃泌素基因的表达。

表 1 CagA 转染和 RNAi 对 AGS 和 SGC-7901 细胞胃泌素基因 mRNA 表达水平的影响 ($n = 6$)

分组	Ct of gastrin		Ct of β -actin		$2^{-\Delta\Delta Ct}$	
	AGS	SGC-7901	AGS	SGC-7901	AGS	SGC-7901
空白对照组	33.77 \pm 7.52	28.10 \pm 1.32	21.94 \pm 2.02	22.28 \pm 0.49	1.00	1.00
pcDNA3.1	29.21 \pm 1.62	27.70 \pm 3.77	21.92 \pm 0.46	18.92 \pm 6.10	23.22	0.13
+empty vector 组						
pcDNA3.1/CagA 组	28.38 \pm 1.50	23.19 \pm 2.99	21.28 \pm 1.24	19.96 \pm 1.97	26.58 ^a	5.59 ^a
pcDNA3.1/CagA+	30.82 \pm 3.06	29.07 \pm 5.02	21.30 \pm 1.55	19.33 \pm 5.32	4.94	0.07
siRNA/JAK2 组						
pcDNA3.1/CagA+	31.91 \pm 2.17	25.96 \pm 5.18	22.79 \pm 1.30	17.53 \pm 4.18	6.51	0.16
siRNA/ERK1 组						

^a $P < 0.05$ vs 对照组; $2^{-\Delta\Delta Ct}$: 胃泌素的相对表达水平。

表 2 CagA+*H. pylori* 感染和 RNAi 干扰对 AGS、SGC-7901 细胞胃泌素基因 mRNA 表达水平的影响 ($n = 6$)

分组	Ct of gastrin		Ct of β -actin		$2^{-\Delta\Delta Ct}$	
	AGS	SGC-7901	AGS	SGC-7901	AGS	SGC-7901
空白对照组	21.05 \pm 1.15	30.86 \pm 1.03	14.74 \pm 1.08	21.89 \pm 5.26	1.00	1.00
CagA+ <i>H. pylori</i> 组	21.37 \pm 0.18	29.59 \pm 0.63	15.97 \pm 2.54	23.72 \pm 1.53	1.88 ^a	8.59 ^a
CagA+ <i>H. pylori</i> +	25.71 \pm 5.06	26.11 \pm 2.89	19.16 \pm 4.05	16.89 \pm 3.83	0.84	0.84
siRNA/JAK2 组						
CagA+ <i>H. pylori</i> +	25.27 \pm 5.25	25.12 \pm 2.90	19.17 \pm 5.88	15.64 \pm 1.74	1.16	0.70
siRNA/ERK1 组						

^a $P < 0.05$ vs 对照组; $2^{-\Delta\Delta Ct}$: 胃泌素的相对表达水平。

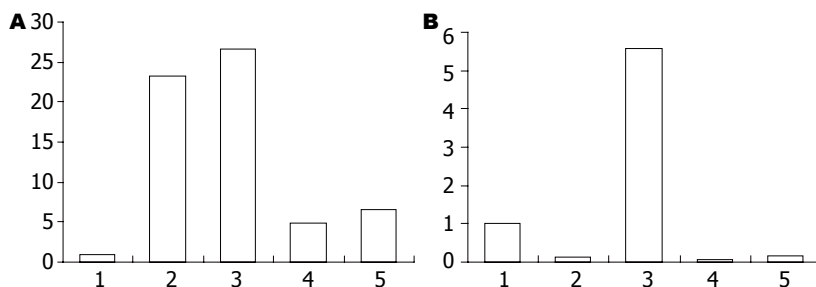
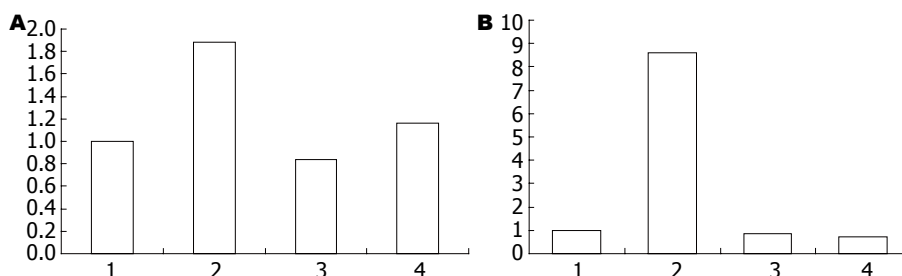


图 3 pcDNA3.1ZE0(-)/cagA7 和 siRNA 转染 AGS (A) 和 SGC-7901 (B) 细胞后胃泌素 mRNA 表达水平。1: 空白对照; 2: 空载转染组; 3: CagA 转染组; 4: JAK2 干扰组; 5: ERK1 干扰组。

图 4 *H. pylori* 感染和 siRNA 转染 AGS (A) 和 SGC-7901 (B) 细胞后胃泌素 mRNA 表达水平。1: 空白对照; 2: *H. pylori* 感染组; 3: JAK2 干扰组; 4: ERK1 干扰组。

细胞胃泌素 mRNA 表达水平较空白对照组显著增高 ($P < 0.05$), 增加了约 8.59 倍, JAK2 和 ERK1 干扰后这种上调作用被抑制, 胃泌素基因的表达量显著降低 ($P < 0.05$), 抑制率分别为 90% 和 92% (表 2, 图 4)。

3 讨论

胃癌的形成是一个多因素、多步骤的复杂的过程, *H. pylori* 感染、宿主遗传因素和环境因素起共同作用, 而 *H. pylori* 感染可能为先导, 从慢性活动性胃炎、慢性萎缩性胃炎、肠上皮化生和

不典型性增生最终发展成胃癌的癌变模式已被国内外大多数学者承认, 但*H.pylori*感染导致胃癌发生的确切机制尚不清楚。*H.pylori*具有多种毒力因子, 其中CagA是主要的毒力因子, 可能是胃癌发生的始动因素。CagA表达于60%-70%的*H.pylori*菌株中, 西方国家的研究结果认为, CagA阳性*H.pylori*为毒力菌株, 与消化性溃疡、萎缩性胃炎、胃癌发生密切相关。研究证实CagA通过IV型分泌系统进入宿主细胞后, 其C端的酪氨酸位点发生了酪氨酸磷酸化, 磷酸化的CagA可以特异地与SHP-2结合并激活其磷酸酶的活性, 这种相互作用激活了多个信号级联反应^[7]。Bronte-Tinkew等^[8]已证实*H.pylori* CagA蛋白在体内外能激活STAT3信号通路, 转录因子STAT是JAK直接底物, 他可将细胞因子信号从受体JAK直接传到核内, 调节特定基因表达, 促进胃癌的发生。Mimuro等^[9]证明*H.pylori*分泌的CagA转位到胃上皮细胞与接头蛋白Grb2相互作用, 激活ERK/MAPK信号通路, 从而促进了细胞分散和增生, 这是胃癌发生中的重要进程之一。故而我们推测JAK/STAT3和ERK/MAPK两条细胞内信号转导通路在CagA影响*H.pylori*与胃黏膜细胞相互作用, 诱导胃癌发生发展过程中起到了非常重要的作用。Ferrand等^[10]研究发现, 在高表达前胃泌素和甘氨酸胃泌素转基因大鼠, 其结肠上皮发生瘤变时可测到明显上调的STAT3, 表明STAT3信号转导途径可能参与了胃泌素诱导结肠上皮细胞癌变过程。Konturek等^[11]研究发现胃癌患者中CagA的血清阳性率及胃泌素水平显著增高, 多因素分析发现仅有CagA蛋白及胃泌素浓度可能在胃癌的形成中起重要作用。

为探讨CagA与胃泌素在诱导胃癌发生发展之间的可能关系, 我们建立了CagA基因转染人胃癌细胞和CagA+*H.pylori*感染人胃癌细胞两个平行的实验组, 然后用Real time PCR检测胃泌素基因表达, 结果发现无论是在转染组或感染组胃泌素基因的表达水平较对照均显著上调($P<0.05$), 表明*H.pylori*的CagA蛋白确实具有调控胃泌素基因表达的作用。通过RNAi靶向关键信号蛋白JAK2和ERK1阻断JAK/STAT3和ERK/MAPK两条细胞内信号转导通路后检测胃泌素基因表达, 发现CagA对胃泌素基因表达的上调作用均在一定程度上被抑制, 提示JAK/STAT3和ERK/MAPK两条细胞内信号转导通路参与了CagA对胃泌素的调控。本研究与课题组采用

化学阻断剂阻断JAK/STAT3和ERK/MAPK两条细胞内信号转导通路获得相似性结果^[12], 故而我们推测*H.pylori* CagA阳性菌株感染后, 在CagA蛋白的协同作用下, 使胃泌素基因表达增强, 胃泌素作为生长因子, 与细胞表面的CCK-B受体结合, 形成自分泌环, 促进胃溃疡乃至胃癌的形成。JAK/STAT和ERK/MAPK这两个信号通路参与CagA蛋白对胃泌素基因表达的调控, 通过siRNA干扰阻断这两个信号通路可有效抑制CagA上调胃泌素mRNA的表达, 实验研究结果可为探讨*H.pylori*感染导致胃癌发生发展的机制及治疗提供新的理论依据。

4 参考文献

- 1 张莉, 付晓霞. 幽门螺杆菌感染研究现状. 中国煤炭工业医学杂志 2009; 12: 1327-1328
- 2 柯巧, 王莉娜, 徐耀初. 幽门螺杆菌与胃癌关系的研究进展. 中国肿瘤 2007; 16: 979-981
- 3 杜雅菊, 裴凤华, 赵晶. 幽门螺杆菌CagA因子与胃癌的相关性分析. 哈尔滨医科大学学报 2004; 25: 195-196
- 4 Qu CK. Role of the SHP-2 tyrosine phosphatase in cytokine-induced signaling and cellular response. *Biochim Biophys Acta* 2002; 1592: 297-301
- 5 Zhou JJ, Chen ML, Zhang QZ. Human gastric tissues simultaneously express the classical and alternative splicing cholecystokinin-B/gastrin receptors. *Receptors Channel* 2004; 10: 1-4
- 6 Wang TC, Dangler CA, Chen D, Goldenring JR, Koh T, Raychowdhury R, Coffey RJ, Ito S, Varro A, Dockray GJ, Fox JG. Synergistic interaction between hypergastrinemia and *Helicobacter* infection in a mouse model of gastric cancer. *Gastroenterology* 2000; 118: 36-47
- 7 姬晓云, 张建中. CagA对幽门螺杆菌与宿主细胞相互作用影响的研究进展. 中国全科医学 2007; 10: 1033-1035
- 8 Bronte-Tinkew DM, Terebiznik M, Franco A, Ang M, Ahn D, Mimuro H, Sasakawa C, Ropeleski MJ, Peek RM Jr, Jones NL. *Helicobacter pylori* cytotoxin-associated gene A activates the signal transducer and activator of transcription 3 pathway in vitro and in vivo. *Cancer Res* 2009; 69: 632-639
- 9 Mimuro H, Suzuki T, Tanaka J, Asahi M, Haas R, Sasakawa C. Grb2 is a key mediator of *Helicobacter pylori* CagA protein activities. *Mol Cell* 2002; 10: 745-755
- 10 Ferrand A, Bertrand C, Portolan G, Cui G, Carlson J, Pradayrol L, Fourmy D, Dufresne M, Wang TC, Seva C. Signaling pathways associated with colonic mucosa hyperproliferation in mice overexpressing gastrin precursors. *Cancer Res* 2005; 65: 2770-2777
- 11 Konturek PC, Konturek SJ, Pierzchalski P, Bielański W, Duda A, Marlicz K, Starzyńska T, Hahn EG. Cancerogenesis in *Helicobacter pylori* infected stomach--role of growth factors, apoptosis and cyclooxygenases. *Med Sci Monit* 2001; 7: 1092-1107
- 12 汪苏, 周建奖, 单可人, 赵燕, 谢渊. 幽门螺杆菌毒素相关蛋白CagA上调胃泌素基因表达. 中华微生物学和免疫学杂志 2009; 29: 976-980

■同行评价

本文主要探讨了CagA调控胃泌素产生和分泌的机制, 选题尚可, 设计基本合理, 有一定参考价值。

CXCR4、MMP-2在食管鳞癌中的表达及其与淋巴结转移的关系

杜雅冰, 樊青霞

■背景资料

食管癌在我国是一种发病率较高, 生存率较低的肿瘤。食管癌的发生、发展涉及多个基因、分子水平的异常, 食管癌变是由多个基因参与, 多种因素共同作用的结果。

杜雅冰, 樊青霞, 郑州大学第一附属医院肿瘤内科 河南省郑州市 450052

杜雅冰, 硕士, 主要从事恶性肿瘤的化疗研究。

作者贡献分布: 此课题由杜雅冰与樊青霞共同设计; 研究过程由杜雅冰操作完成; 数据分析和论文写作由杜雅冰与樊青霞共同完成。

通讯作者: 樊青霞, 主任医师, 博士生导师, 450052, 河南省郑州市, 郑州大学第一附属医院, 中国抗癌协会食管癌专业。

fqx2243@yahoo.com.cn

电话: 0371-66295952

收稿日期: 2010-04-14 修回日期: 2010-06-10

接受日期: 2010-06-22 在线出版日期: 2010-08-08

Relationship between CXCR4 and MMP-2 expression and lymph node metastasis in esophageal squamous cell carcinoma

Ya-Bing Du, Qing-Xia Fan

Ya-Bing Du, Qing-Xia Fan, Department of Oncology, the First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, Henan Province, China

Correspondence to: Qing-Xia Fan, Department of Oncology, the First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, Henan Province, China. fqx2243@yahoo.com.cn

Received: 2010-04-14 Revised: 2010-06-10

Accepted: 2010-06-22 Published online: 2010-08-08

Abstract

AIM: To investigate the expression of CXC chemokine receptor 4 (CXCR4) and matrix metalloproteinase (MMP-2) and to analyze their relationship with lymph node metastasis in esophageal squamous cell carcinoma.

METHODS: The expression of CXCR4 and MMP-2 in 85 esophageal squamous cell carcinoma specimens and 20 normal esophageal tissue specimens was assessed by immunohistochemistry. The relationship between CXCR4 and MMP-2 expression and lymph node metastasis was then analyzed.

RESULTS: The positive rates of CXCR4 and MMP-2 expression in cancer tissue were significantly higher than those in normal esophageal

tissue (76.5% vs 25% and 70.6% vs 20%, both $P < 0.05$). The positive rates of CXCR4 and MMP-2 were higher in esophageal squamous cell carcinoma patients with lymph node metastasis than in those without lymph node metastasis (90% vs 57.1% and 92% vs 40%, both $P < 0.05$). There is a positive correlation between CXCR4 and MMP-2 expression in esophageal squamous cell carcinoma ($r = 0.439$).

CONCLUSION: CXCR4 and MMP-2 are up-regulated in esophageal squamous cell carcinoma. Up-regulated expression of CXCR4 and MMP-2 may be associated with lymph node metastasis in esophageal squamous cell carcinoma.

Key Words: Esophageal squamous cell carcinoma; CXC chemokine receptor 4; Matrix metalloproteinase; Metastasis

Du YB, Fan QX. Relationship between CXCR4 and MMP-2 expression and lymph node metastasis in esophageal squamous cell carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(22): 2322-2326

摘要

目的: 探讨CXC类趋化因子受体4(CXC chemokine receptor 4, CXCR4)与基质金属蛋白酶-2(matrix metalloproteinase, MMP-2)在食管癌中的表达及其与淋巴结转移的关系。

方法: 用免疫组织化学法检测食管癌85例, 正常食管黏膜组织20例中CXCR4、MMP-2的表达以及与淋巴结转移的关系, 同时分析食管鳞癌中CXCR4与MMP-2的相关性。

结果: 食管鳞癌组织85例中CXCR4阳性率76.5%, 正常食管黏膜20例中阳性率25%, 差异有显著性意义($P < 0.05$)。淋巴结转移组的癌组织CXCR4阳性率90%, 未有淋巴结转移组的癌组织CXCR4阳性率57.1%, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。食管鳞癌组织85例中MMP-2阳性率70.6%, 正常食管黏膜20例中阳性率25%, 差异有显著性意义($P < 0.05$)。淋巴结转移组的癌

■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

组织MMP-2阳性率92%, 未有淋巴结转移组的癌组织MMP-2阳性率40%, 差异有统计学意义($P < 0.05$). CXCR4和MMP-2蛋白在食管鳞癌中的表达具有相关性($r = 0.439$).

结论: CXCR4和MMP-2在食管癌中的表达明显升高, 与食管癌患者的淋巴结转移密切相关. CXCR4和MMP-2蛋白在食管鳞癌中的表达具有相关性.

关键词: 食管癌; CXC类趋化因子受体4; 基质金属蛋白酶; 转移

杜雅冰, 樊青霞. CXCR4、MMP-2在食管鳞癌中的表达及其与淋巴结转移的关系. 世界华人消化杂志 2010; 18(22): 2322-2326
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/2322.asp>

0 引言

食管癌在我国是一种发病率较高, 生存率较低的肿瘤. 食管癌的淋巴结转移以及肿瘤局部外侵使手术不能完全切除是食管肿瘤治疗失败的重要原因. 食管癌的发生、发展涉及多个基因、分子水平的异常, 食管癌变是由多个基因参与, 多种因素共同作用的结果. 近年来, CXC类趋化因子受体4(CXC chemokine receptor 4, CXCR4)与基质金属蛋白酶-2(matrix metalloproteinase, MMP-2)在食管癌发生发展、浸润、远处转移中的作用受到广泛的关注. 肿瘤转移的机制尚不明确, 它是一个复杂的、非随机的多步骤过程, 涉及肿瘤细胞迁移、黏附、侵袭、生长、新血管生成、特异性转移器官的归巢和逃避免疫几个关键步骤. 有些恶性肿瘤可以倾向性特异性的转移到某些远处的器官组织中, CXCR4的特异性的高表达可能是其中一个重要步骤. MMP-2降解细胞外基质, 介导了肿瘤的侵袭和转移. 为了解CXCR4及MMP-2在食管癌淋巴结转移中的作用, 我们用免疫组织化学的方法检测CXCR4及MMP-2在食管癌组织中的表达, 并观察CXCR4和MMP-2的表达与食管癌淋巴结转移的关系.

1 材料和方法

1.1 材料 选取2008-10/12在安阳市人民医院胸外科行根治性开胸手术的85例胸段食管鳞状细胞癌病例, 所有病例术前均无化疗、放疗及免疫治疗史. 标本离体后0.5 h内迅速取材, 每例标本均在无坏死癌灶及远离病灶的正常食管黏膜处取材, 经中性缓冲甲醛液固定, 石蜡包埋连续

切片, 免疫组织化学染色, 光镜筛选. 全部病例病理组织学证实85例食管癌均为鳞状细胞癌. 食管癌TNM分期参照美国癌症联合委员会标准. 组织判断标准如下, 正常食管黏膜: 食管癌手术切除标本中, 距癌灶边缘3 cm以上, 常规病理切片证实为正常的食管黏膜; 食管鳞状细胞癌组织: 食管癌手术切除标本中, 取无坏死的癌组织, 经常规病理切片证实为食管鳞状细胞癌. 85例病例中, 男55例, 女30例; 年龄35-82(中位年龄58)岁; 患者均为首次发病, 术前均未接受放化疗, 同时取20例正常食管黏膜组织做对照检查. 病理组织学证实85例食管癌均为鳞状细胞癌, 其中I+II期共30例, III+IV期共55例; 淋巴结转移50例, 淋巴结未转移35例. CXCR4一抗, MMP-2一抗购自北京中杉金桥生物技术有限公司, SP试剂盒购自上海生工生物工程技术有限公司.

1.2 方法 采用SP法. 将石蜡标本以5 μ m厚切片, 烤干, 于二甲苯液中脱蜡, 梯度酒精脱水, 3%的H₂O₂溶液室温下孵育15 min, PBS冲洗3次, 柠檬酸盐抗原修复液以微波炉法进行抗原修复, PBS冲洗3次, 5 min/次. 正常血清封闭20 min, 与一抗37 $^{\circ}$ C孵育2 h, 稀释度为1:100, PBS冲洗3次, 5 min/次. 最后用新鲜配置的DAB溶液显色, 自来水冲洗, 苏木素复染, 盐酸乙醇分化, 然后梯度脱水, 中性胶封片(PBS液代替一抗作为阴性对照). CXCR4和MMP-2染色结果评估参考文献报道[1,2]及预试验结果采用综合评分法, 根据染色强度及着色面积进行判断. 细胞染色强度分为4级: 无着色为0级计0分, 浅黄色为1级计1分, 棕黄色为2级计2分, 棕褐色为3级计3分. 在400倍光镜下随机观察5个不同的视野, 根据阳性细胞占总细胞数的百分率分为5个等级: <5%为0级; 5%-25%为1级; 26%-50%为2级; 51%-75%为3级; >75%为4级, 分别取相应分值0、1、2、3、4分. 用细胞数得分和强度得分的乘积作为判断表达结果, 若积分 ≤ 1 为阴性, >1 为阳性. 所有病理切片由两位不了解患者病情及研究内容的病理科医生共同判断.

统计学处理 采用SPSS13.0统计分析软件, 两样本率的比较采用四格表资料的 χ^2 检验; 多样本率的比较采用行列表资料的 χ^2 检验; 计量资料采用 t 检验及方差分析; 相关性检验用Spearman相关分析. 以 $P < 0.05$ 为差异有显著性意义的检验标准.

■ 相关报道

Kato等通过检测79例侵袭性乳腺导管癌组织中CXCR4的表达发现, CXCR4表达阳性与患者淋巴结转移相关. 一项关于结直肠癌的研究表明, CXCR4高表达与肿瘤的复发、肝脏转移相关, 并且相应患者生存率也较低.

■应用要点

本试验结果表明,食管癌组织中CXCR4的表达与MMP-2的表达呈明显的正相关($r = 0.439$),说明CXCR4可能通过上调食管癌组织中MMP-2的表达,共同参与食管癌的发展过程。

表 1 食管鳞癌组织和正常组织中CXCR4与MMP-2蛋白的表达

组织	n	CXCR4 n(%)		参数值	MMP-2 n(%)		参数值
		+	-		+	-	
癌组织	85	65(76.5)	20(23.5)	$\chi^2 = 19.301$	60(70.6)	25(29.4)	$\chi^2 = 11.424$
正常组织	20	5(25.0)	15(75.0)	$P = 0.000$	6(30.0)	14(70.0)	$P = 0.001$

表 2 食管鳞癌组织中CXCR4与MMP-2蛋白表达与临床病理学参数之间的关系

组织	n	CXCR4 n(%)		参数值	MMP-2 n(%)		参数值
		+	-		+	-	
性别							
男	55	40(72.7)	15(27.3)	$\chi^2 = 1.214$	38(69.1)	17(30.9)	$\chi^2 = 1.168$
女	30	25(83.3)	5(16.7)	$P = 0.271$	22(73.3)	8(26.7)	$P = 0.682$
年龄(岁)							
≤60	45	36(80.0)	9(20.0)	$\chi^2 = 0.662$	35(77.8)	10(22.2)	$\chi^2 = 2.381$
>60	40	29(72.5)	11(27.5)	$P = 0.416$	25(62.5)	15(37.5)	$P = 1.123$
TNM分期							
I + II	30	16(53.3)	14(46.7)	$\chi^2 = 13.794$	15(50.0)	15(50.0)	$\chi^2 = 9.466$
III + IV	55	49(89.1)	6(10.9)	$P = 0.0002$	45(81.8)	10(18.2)	$P = 0.002$
淋巴结							
转移组	50	45(90.0)	5(10.0)	$\chi^2 = 12.353$	46(92.0)	4(8.0)	$\chi^2 = 26.815$
未转移组	35	20(57.1)	15(42.9)	$P = 0.0004$	14(40.0)	21(60.0)	$P = 0.000$

2 结果

2.1 食管鳞癌和正常组织中CXCR4和MMP-2蛋白的表达 CXCR4阳性染色表现为细胞质内呈棕黄色颗粒, 85例食管鳞癌组织中CXCR4阳性表达率为76.5%。MMP-2阳性染色表现为细胞质内呈棕黄色颗粒, 85例食管鳞癌组织中MMP-2阳性表达率为70.6%(图1, 表1)。

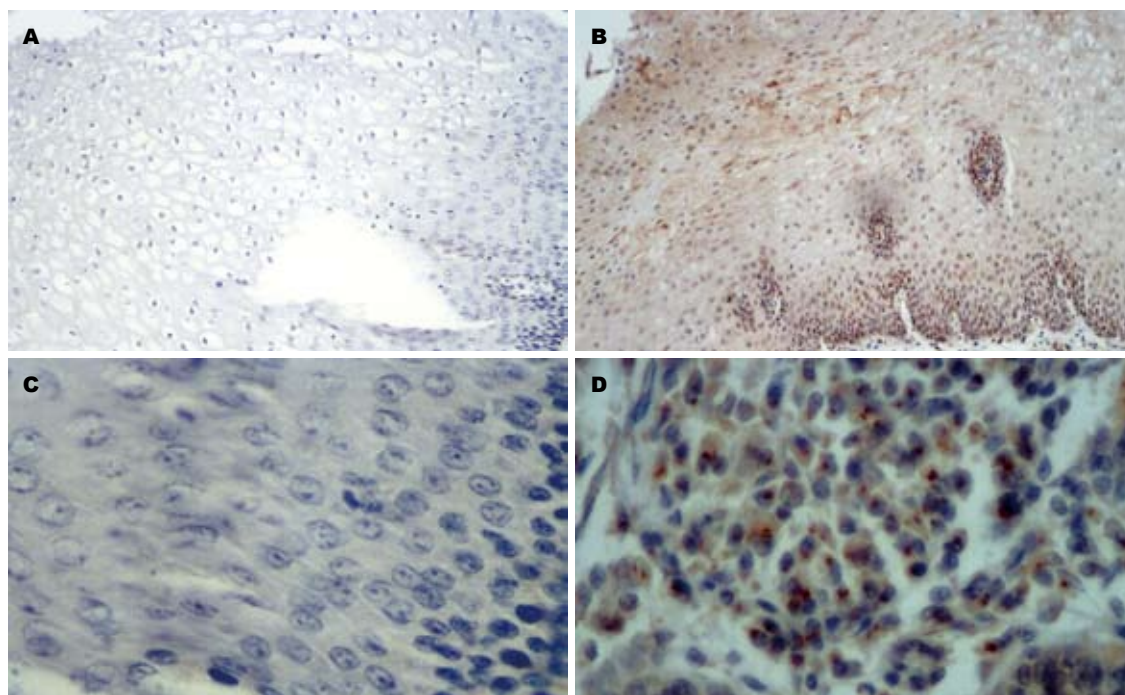
2.2 食管鳞癌组织中CXCR4与MMP-2蛋白表达与食管鳞癌临床生物学行为的关系 CXCR4与MMP-2在有淋巴结转移组阳性表达率(90%, 92%)明显高于无淋巴结转移组(57.1%, 40%), 各组间差异有显著性($\chi^2 = 12.353, 26.815$; 均 $P < 0.05$)。随着食管癌临床分期的增加, CXCR4与MMP-2的阳性率表达率有所升高, 统计学结果显示CXCR4与MMP-2阳性表达率在I + II(53.3%, 50%)与III + IV(89.1%, 81.8%)组间差异有显著性($\chi^2 = 13.794, 9.466$; 均 $P < 0.05$, 表2)。

2.3 CXCR4蛋白的表达与MMP-2蛋白表达的相关性分析 在CXCR4蛋白表达阳性的65病例中, 其MMP-2蛋白表达阳性的占54例, 而在CXCR4蛋白表达阴性的20病例中, 其MMP-2蛋白表达阴性的占14例, CXCR4及MMP-2蛋白在食管鳞癌组织中的表达呈正相关关系($r = 0.439$,

$P < 0.05$, 表3)。

3 讨论

趋化因子是一类具有化学趋化作用的细胞因子, 根据其N端前两个半胱氨酸(Cys)的数目及排列方式不同可分为CC、CXC、C和CX3C4个家族, 相应的受体分别为CCR、CXCR、CR和CX3CR。CXCR4是趋化性细胞因子基质衍生因子SDF-1的专属受体^[3]。最初CXCR4引起人们的关注是由于其在HIV感染中的重要作用^[4]。但是最近的研究发现其在众多肿瘤呈高表达, 据报道至少有23种肿瘤细胞表达CXCR4^[5,6], 而且CXCR4与CXCL12结合后可以引起细胞的迁移。Kato等^[7]通过检测79例侵袭性乳腺导管癌组织中CXCR4的表达发现, CXCR4表达阳性与患者淋巴结转移相关。一项关于结直肠癌的研究表明, CXCR4高表达与肿瘤的复发、肝脏转移相关, 并且相应患者生存率也较低^[8]。另外, 在卵巢癌、黑色素瘤、前列腺癌、神经母细胞瘤等其他肿瘤的研究中也得到了相似的结果^[9], 但是关于CXCR4在食管鳞癌中的表达及与肿瘤生物特性的研究较少, 而且其研究结果有许多矛盾之处, 到目前为止, 关于趋化因子与肿瘤的恶性程度的关系还没有定论。我们将收集到的85例食管鳞癌标



■同行评价

本研究设计基本合理, 方法选择适当, 结果可信, 但创新性一般。

图 1 CXCR4, MMP-2在正常食管组织和食管鳞癌组织中的表达(SP法). A: CXCR4在正常食管组织呈阴性表达($\times 100$); B: CXCR4在食管鳞癌组织呈阳性表达($\times 100$); C: MMP-2在正常食管组织呈阴性表达($\times 400$); D: MMP-2在食管鳞癌组织呈阳性表达($\times 400$).

表 3 CXCR4与MMP-2在食管鳞癌中的蛋白表达的相关性分析

CXCR4蛋白(个)	MMP-2蛋白(个)		<i>r</i> 值	<i>P</i> 值
	+	-		
+	54	11	0.439	<0.05
-	6	14		

本进行免疫组织化学染色分析, 比较了正常食管黏膜与癌组织CXCR4的表达程度, 结果显示癌组织中CXCR4表达程度明显高于正常食管黏膜($P<0.05$). 这个结果与其他恶性肿瘤的结果一致, 表明CXCR4在食管癌中也存在高表达现象. 在食管癌淋巴结阳性组CXCR4的表达率明显高于淋巴结阴性组($P<0.05$), 这提示CXCR4的高表达与食管癌淋巴结转移密切相关. 在TNM分期中, III+IV组CXCR4表达率明显高于I+II组($P<0.05$), 提示CXCR4表达促进了食管癌的侵袭和转移. 经统计学检验, CXCR4的表达与食管癌患者的性别和年龄不相关.

MMP是降解细胞外基质的最重要的一组蛋白酶, MMP-2是其中的一种, 参与了消化系统肿瘤的发生、发展及侵袭和转移的过程. MMP-2可降解细胞外基质和血管基膜的主要成分IV型胶原, 使肿瘤细胞易于脱离癌细胞巢, 进出血管从而促进肿瘤的侵袭、转移. Parsons等^[10]对

胃肠道恶性肿瘤组织中MMP-2表达的研究发现, MMP-2的表达与淋巴结的转移和肿瘤的分期呈正相关. 我们将收集到的85例食管鳞癌标本进行免疫组织化学染色分析, 比较了正常食管黏膜与癌组织MMP-2的表达程度, 结果显示癌组织中MMP-2表达程度明显高于正常食管黏膜($P<0.05$). 这个结果与其他恶性肿瘤的结果一致, 表明MMP-2在食管癌中也存在高表达现象. 在食管癌淋巴结阳性组MMP-2的表达率明显高于淋巴结阴性组($P<0.05$), 这提示MMP-2的高表达与食管癌淋巴结转移密切相关. 在TNM分期中, III+IV组MMP-2表达率明显高于I+II组($P<0.05$), 提示MMP-2表达促进了食管癌的侵袭和转移. 经统计学检验, MMP-2的表达与食管癌患者的性别和年龄不相关. 本次试验说明MMP-2的高表达可能与食管癌的进展有关, 是食管癌具有较强侵袭、转移潜能和患者预后差的重要标志.

在恶性肿瘤中, 趋化因子及其受体结合可诱导蛋白水解酶的释放, 通过对细胞外基质和基膜的降解, 增强癌细胞的侵袭能力. 有报道CXCR4活化后肿瘤细胞分泌更多的MMP、一氧化氮和血管生成因子(如VEGF)^[11,12]. 本试验结果表明, 食管癌组织中CXCR4的表达与MMP-2的表达呈明显的正相关($r = 0.439$), 说明CXCR4

可能通过上调食管癌组织中MMP-2的表达, 共同参与食管癌的发展过程, 但其相关性及其详细作用机制还需进一步研究.

4 参考文献

- 1 Falleni M, Pellegrini C, Marchetti A, Oprandi B, Buttitta F, Barassi F, Santambrogio L, Coggi G, Bosari S. Survivin gene expression in early-stage non-small cell lung cancer. *J Pathol* 2003; 200: 620-626
- 2 霍胜军, 汤恢煊, 魏伟. CXCL12及受体CXCR4在胆管癌中的表达及其临床意义. *现代生物医学进展* 2008; 8: 658-660
- 3 Rossi D, Zlotnik A. The biology of chemokines and their receptors. *Annu Rev Immunol* 2000; 18: 217-242
- 4 Jones J, Marian D, Weich E, Engl T, Wedel S, Relja B, Jonas D, Blaheta RA. CXCR4 chemokine receptor engagement modifies integrin dependent adhesion of renal carcinoma cells. *Exp Cell Res* 2007; 313: 4051-4065
- 5 Wang B, Love TM, Call ME, Doench JG, Novina CD. Recapitulation of short RNA-directed translational gene silencing in vitro. *Mol Cell* 2006; 22: 553-560
- 6 Smith MC, Luker KE, Garbow JR, Prior JL, Jackson E, Piwnica-Worms D, Luker GD. CXCR4 regulates growth of both primary and metastatic breast cancer. *Cancer Res* 2004; 64: 8604-8612
- 7 Kato M, Kitayama J, Kazama S, Nagawa H. Expression pattern of CXCR4 chemokine receptor-4 is correlated with lymph node metastasis in human invasive ductal carcinoma. *Breast Cancer Res* 2003; 5: R144-R150
- 8 Kim J, Takeuchi H, Lam ST, Turner RR, Wang HJ, Kuo C, Foshag L, Bilchik AJ, Hoon DS. Chemokine receptor CXCR4 expression in colorectal cancer patients increases the risk for recurrence and for poor survival. *J Clin Oncol* 2005; 23: 2744-2753
- 9 Burger JA, Kipps TJ. CXCR4: a key receptor in the crosstalk between tumor cells and their microenvironment. *Blood* 2006; 107: 1761-1767
- 10 Parsons SL, Watson SA, Collins HM, Griffin NR, Clarke PA, Steele RJ. Gelatinase (MMP-2 and -9) expression in gastrointestinal malignancy. *Br J Cancer* 1998; 78: 1495-1502
- 11 Gürlek A, Karavitaki N, Ansorge O, Wass JA. What are the markers of aggressiveness in prolactinomas? Changes in cell biology, extracellular matrix components, angiogenesis and genetics. *Eur J Endocrinol* 2007; 156: 143-153
- 12 Leelawat K, Leelawat S, Narong S, Hongeng S. Roles of the MEK1/2 and AKT pathways in CXCL12/CXCR4 induced cholangiocarcinoma cell invasion. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 1561-1568

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》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领域的专家评论及临床实践和基础研究相结合具有实践意义的文章, 为内科学、外科学、感染病学、中医药学、肿瘤学、中西医结合学、影像学、内镜学、介入治疗学、病理学、基础研究等医生和研究人員提供转换平台, 更新知识, 为患者康复服务.

TRX-1和STAT-3在原发性小肠恶性肿瘤中的表达及意义

牛桂军, 陈卓琳, 李西融, 唐澄海

牛桂军, 陈卓琳, 广西壮族自治区南溪山医院消化内科 广西
壮族自治区桂林市 541002

李西融, 唐澄海, 广西壮族自治区南溪山医院病理科 广西壮
族自治区桂林市 541002

牛桂军, 副主任医师, 副教授, 主要从事消化内科和消化内镜的
临床工作。

广西壮族自治区卫生厅科研基金资助项目, No. Z2009194
作者贡献分布: 此课题由牛桂军设计; 陈卓琳与李西融指导; 研
究过程由牛桂军、李西融及唐澄海等完成; 数据分析和论文写
作由牛桂军完成。

通讯作者: 牛桂军, 副主任医师, 副教授, 541002, 广西壮族自治
区桂林市崇信路46号, 广西壮族自治区南溪山医院消化内科。
glnj65@sina.com

电话: 0773-3981657

收稿日期: 2010-05-04 修回日期: 2010-06-30

接受日期: 2010-07-05 在线出版日期: 2010-08-08

Significance of TRX-1 and STAT-3 expression in primary malignant tumors of the small intestine

Gui-Jun Niu, Zhuo-Lin Chen, Xi-Rong Li,
Cheng-Hai Tang

Gui-Jun Niu, Zhuo-Lin Chen, Xi-Rong Li, Cheng-Hai
Tang, Department of Gastroenterology, Nanxishan Hospi-
tal, Guangxi Zhuang Autonomous Region, Guilin 541002,
Guangxi Zhuang Autonomous Region, China

Supported by: the Scientific Research Foundation of
Health Department of Guangxi Zhuang Autonomous Re-
gion, No. Z2009194

Correspondence to: Associate Professor Gui-Jun Niu, De-
partment of Gastroenterology, Nanxishan Hospital, Guangxi
Zhuang Autonomous Region, 46 Chongxin Road, Guilin
541002, Guangxi Zhuang Autonomous Region,
China. glnj65@sina.com

Received: 2010-05-04 Revised: 2010-06-30

Accepted: 2010-07-05 Published online: 2010-08-08

Abstract

AIM: To detect the expression of thioredoxin-1 (TRX-1) and signal transducer and activator of transcription 3 (STAT-3) and to analyze their relation to clinicopathological features in primary malignant tumors of the small intestine.

METHODS: The expression of TRX-1 and STAT-3 in primary malignant tumors of the small intestine and matched tumor-adjacent normal tissue was detected by immunohistochemistry. The relationship between TRX-1 and STAT-3 expression and clinicopathological features in

primary malignant tumors of the small intestine was then analyzed.

RESULTS: Overexpression of TRX-1 and STAT-3 was detected in primary malignant tumors of the small intestine. The positive rates of TRX-1 and STAT-3 expression were significantly higher in tumor tissue than in tumor-adjacent normal tissue (both $P < 0.01$). The intensity of TRX-1 and STAT-3 expression was significantly higher in moderately and poorly differentiated tumor tissue than in well differentiated tumor tissue ($P < 0.05$ or 0.01). Increased expression of TRX-1 and STAT-3 is significantly correlated with lymph node metastasis and TNM stage ($P < 0.05$ or 0.01). There is a positive correlation between the expression of TRX-1 and STAT-3 in malignant tumors of the small intestine ($r = 0.881$, $P < 0.01$).

CONCLUSION: TRX-1 and STAT-3 are overex-
pressed in primary malignant tumors of the small
intestine, indicating that high expression of TRX-1
and STAT-3 may be involved in the genesis, de-
velopment and progression of the disease.

Key Words: Small intestine; Malignant tumor;
Thioredoxin-1; Signal transducer and activator of
transcription 3; Expression

Niu GJ, Chen ZL, Li XR, Tang CH. Significance of TRX-1
and STAT-3 expression in primary malignant tumors of
the small intestine. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010;
18(22): 2327-2332

摘要

目的: 检测原发性小肠恶性肿瘤中硫氧还蛋白-1(TRX-1)和转录活化因子-3(STAT-3)的表达和临床病理特征, 并探讨二者之间的相关性。

方法: 用免疫组织化学法分别检测原发性小肠恶性肿瘤58例和癌旁正常小肠黏膜20例中TRX-1和STAT-3的表达。用半定量方法对免疫组织化学染色做评分, 结合临床和病理数据进行分析。

结果: TRX-1和STAT-3在原发性小肠恶性肿瘤中过度表达。他们较癌旁正常组织的表达显

■背景资料

TRX-1和STAT-3是癌蛋白家族的新成员, 在肿瘤组织中异常高表达并与肿瘤的浸润、转移和预后密切相关。但二者在原发性小肠恶性肿瘤中的表达和病理关系尚未见报道。

■同行评议者

房静远, 教授, 上海交通大学医学院附属仁济医院消化内科

■ 研发前沿

小肠原发性恶性肿瘤少见,对其发生发展的机制所知甚少,其在基因调控和分子生物学水平上的作用机制,有待进一步研究。寻找一条正确的途径预测小肠恶性肿瘤的发生发展并控制其浸润与转移,已经成为亟待解决的问题。

著增高。二者表达与正常组织有统计学的差异,且与病理分化不同有关($P<0.05$ 或 0.01)。他们在中低分化肿瘤比高分化者表达增强;也同淋巴结转移和TNM分级密切相关($P<0.05$ 或 0.01)。TRX-1和STAT-3在原发性小肠恶性肿瘤中的表达呈正相关($r=0.881$, $P<0.01$)。

结论: Trx-1和STAT-3在原发性小肠恶性肿瘤组织中的过度表达并与其发生发展有关,二者单独或共同相互作用,可能参与了小肠恶性肿瘤恶化的调控。

关键词: 小肠; 恶性肿瘤; 硫氧还蛋白-1; 转录活化因子-3; 表达

牛桂军, 陈卓琳, 李西融, 唐澄海. TRX-1和STAT-3在原发性小肠恶性肿瘤中的表达及意义. 世界华人消化杂志 2010; 18(22): 2327-2332

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/2327.asp>

0 引言

小肠原发性恶性肿瘤是消化系少见肿瘤,对其发生发展机制研究甚少,多基因突变,多阶段演进参与了其进展^[1]。硫氧还蛋白-1(thioredoxin-1, TRX-1)作为组织细胞氧化应激的重要的小分子蛋白,其过度激活导致细胞的异常增殖和凋亡障碍,促进正常细胞发生恶性转化,与许多肿瘤性疾病有密切关系^[2]。转录活化因子-3(signal transducer and activator of transcription 3, STAT-3)是信号转导和转录激活因子家族(STAT)的重要成员,是许多致癌途径的焦点。他通过对关键蛋白的调节失控促进肿瘤进展^[3]。二者已成为许多恶性肿瘤研究的热点。研究显示TRX-1在许多肿瘤中高表达,但不是在所有肿瘤中都如此^[2],在小肠恶性肿瘤和演变中的表达和作用尚不清楚。Arnér等^[2]和牛桂军等^[4,5]报道TRX-1和STAT-3分别参与了多种炎症性疾病和肿瘤性疾病,国外已有二者单独在结直肠癌方面的研究报道^[6,7]。在肠道恶性肿瘤的研究中,国内仅见STAT-3在大肠癌的研究,但缺乏二者在小肠恶性肿瘤方面研究的报道。我们用免疫组织化学法检测原发性小肠恶性肿瘤中TRX-1和STAT-3的表达,分析他们与临床病理特征的关系,并探讨二者之间的相关性,为深入进行小肠恶性肿瘤的研究提供有力依据。

1 材料和方法

1.1 材料 收集广西壮族自治区南溪山医院、柳州市人民医院、桂林市181医院和桂林市第五

人民医院外科2004-01/2009-10手术切除,病理证实的原发性小肠恶性肿瘤58例(术前均未行放疗或化疗),其中腺癌36例。男34例,女24例;年龄19-83(中位年龄55)岁, <50岁17例, ≥50岁41例;恶性肿瘤位置分布:十二指肠恶性肿瘤28例,空肠14例,回肠16例;肿瘤大小<5 cm 26例, ≥5 cm 32例。按组织学分化程度分为:高分化23例,中分化10例,低分化25例(其中间叶来源恶性肿瘤只分化较好和差,分别划入分化较好和分化较差组)。腺癌36例,其中高分化腺癌12例,中分化腺癌10例,低分化腺癌14例。临床和病理上证实有淋巴结转移23例,无淋巴结转移35例。腺癌按AJCC的TNM分期^[8]: I期: 癌肿未穿出肌层,无淋巴结转移; II期: 癌肿已穿出深肌层,侵入浆膜层、浆膜外或直肠周围组织,但无淋巴结转移; III期: 癌肿已发生淋巴结转移(包括早期大肠癌伴淋巴结转移的病例); IV期: 癌肿已发生远隔器官的转移(肝、肺等)。间叶来源按TGM分期^[9]: 分化较好和差两期,前者归入I-II期,后者归入III-IV期。小肠恶性淋巴瘤(本组6例均为B淋巴细胞性非霍奇金淋巴瘤)按Musshoff^[10,11]胃肠道淋巴瘤改良分期法分四期。全部病例中I、II期26例, III、IV期32例。另外,切取距肿瘤边缘大于10 cm的远端正常肠黏膜组织作为对照。免疫组织化学所用试剂Thioredoxin 1一抗: 单克隆抗体,浓缩型。STAT3一抗: 小鼠抗STAT3单克隆抗体,浓缩型,美国NeoMarkers公司产品。即用型第二代免疫组织化学广谱试剂盒SuperPicTure(Mouse/Rabbit KIT, Zymed分装,编号: 87-8963)购自天津津脉生物技术公司。DAB显色试剂盒(DAB-0031)等购自福州迈新生物技术公司。

1.2 方法

1.2.1 免疫组织化学染色: 采用Super PicTure法(一步法)。免疫组织化学所用试剂Thioredoxin 1一抗工作浓度为1:200。STAT3一抗工作浓度为1:100。

1.2.2 对照设置: 分别以一抗试剂说明书建议的人乳腺癌组织的石蜡切片为阳性对照片; 阴性对照片所用组织同阳性对照片,在染色过程中用PBS代替一抗,其余步骤同上述。

1.2.3 结果判断及半定量分析: 参考相关文献^[12]采用下述方法对免疫组织化学染色结果进行半定量分析,结果判定: 以细胞质或细胞核中出现黄色颗粒为阳性。采用单盲法观片,每张切片均随机观察5个高倍视野($\times 400$),每个视野中200

表 1 正常小肠黏膜、小肠恶性肿瘤中TRX-1、STAT-3的表达 (mean ± SD)

组织类型	n	TRX-1		STAT-3	
		阳性n(%)	免疫组织化学评分	阳性n(%)	免疫组织化学评分
正常	20	6(30.0)	1.27 ± 1.01	5(25.0)	1.29 ± 1.16
恶性肿瘤	58	41(70.7)	4.27 ± 2.13	38(65.5)	3.72 ± 1.95
χ^2 或t值 ¹		10.282	5.804	9.870	5.198
P值		<0.0001	<0.001	<0.0001	<0.001

¹阳性率用 χ^2 检验, 免疫组织化学评分用t检验。

个细胞被记数, 计算平均阳性率, 阳性细胞数 $\geq 10\%$ 为(+). 在每张切片的上、下、左、右、中各选取一个400倍视野, 分别观察每个视野中阳性细胞的染色强度以及该强度细胞占视野中所有肠细胞的百分率, 记录各视野得分, 计算各切片综合得分. 判断标准和综合得分的计算步骤如下: 首先根据阳性细胞染色强度分为3级: I级(1分): 弱阳性, 细胞着色为浅黄色; II级(2分): 中度阳性, 细胞着色为棕黄色; III级(3分): 强阳性, 细胞着色为棕褐色. 其次, 观察每个视野中阳性细胞占该视野总细胞的百分率, 以 $>5\%$ 作为阳性判断标准并分级: I级(1分): 6%-25%; II级(2分): 26%-50%; III级(3分): 51%-75%; IV级(4分): $>75\%$. 一个视野的免疫组织化学染色综合得分等于该视野中的各种染色强度得分与该强度阳性细胞的百分率得分的乘积之和; 该切片的免疫组织化学染色得分等于5个视野的免疫组织化学染色综合得分的平均分. 免疫组织化学评分, 得分 <3 为阴性, ≥ 3 为阳性^[13]. 所有切片由病理研究人员单盲独立阅片、计分后取均值.

统计学处理 试验资料以Excel建立数据库文件, 用SPSS15.0统计软件对资料进行统计分析: 率的比较采用 χ^2 检验; 免疫组织化学评分用mean \pm SD表示, 两组均数比较用t检验, 多组均数比较采用方差分析, 多样本均数的两两比较用LSD检验; TRX-1和STAT-3免疫组织化学评分的相关性采用Spearman等级相关分析, TRX-1和STAT-3阳性表达结果, 用计数资料列联表的相关分析, 以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义.

2 结果

2.1 TRX-1和STAT-3在正常小肠黏膜和小肠恶性肿瘤中的表达 TRX-1和STAT-3在正常对照肠黏膜可有弱表达, 主要位于绒毛黏膜腔表面的上皮细胞, 均定位于细胞质和胞核. TRX-1在小肠恶性肿瘤的阳性率为70.7%, 正常小肠黏膜组织

阳性率30.0%, 两组差异有统计学意义($P<0.01$, 表1, 图1A, B); STAT-3在小肠恶性肿瘤的阳性率为65.5%, 正常小肠黏膜组织阳性率25.0%, 两组差异有统计学意义($P<0.01$, 表1, 图1C, D).

2.2 TRX-1和STAT-3在小肠恶性肿瘤中的表达与临床病理参数的关系 TRX-1和STAT-3在小肠恶性肿瘤高、中、低分化组织间差异有统计学意义($P<0.05$ 或 0.01), 组织分化程度越低, TRX-1和STAT-3的表达越强; 同样的, 在上皮来源的小肠腺癌组织中也有上述特征(表2, 图1B, 1D). 其表达在有淋巴结转移的表达较强, 反之弱(均 $P<0.05$); TNM分期越高, 表达越强, 反之弱($P<0.05$ 或 0.01). 而他们的表达与患者性别、年龄、肿瘤大小、部位均无关($P>0.05$, 表2).

2.3 TRX-1和STAT-3在小肠恶性肿瘤中的表达的相关性分析 在小肠癌中TRX-1和STAT-3免疫组织化学评分经过Spearman等级相关分析, 两者具有高度相关性($r = 0.950$, $P<0.01$). TRX-1和STAT-3的阳性表达结果呈正的相关关系($r = 0.881$, $P<0.01$, 表3).

3 讨论

原发性小肠恶性肿瘤临床少见, 病理类型却呈明显多样性, 对其发病机制了解甚为有限, 有必要进行深入研究. 肿瘤的发生发展是多基因参与的复杂过程, 包括癌基因的异常激活和基因调控异常, 小肠恶性肿瘤的演变进展也不例外.

TRX-1是小分子氧化还原蛋白家族的一个重要成员, 位于细胞质和细胞核中, 包含108个氨基酸残基. 他具有抗氧化特性, 还能促进细胞生长、抑制凋亡并调节许多基本的炎症过程. 许多癌细胞有高水平表达, 他抑制凋亡、刺激细胞增殖和血管发生, 增加转录因子活性, 诱导血管生成和远处转移. 肿瘤中TRX-1水平的升高与肿瘤过度增长及降低患者生存率有关. TRX-1表达水平与细胞增殖呈显著正相关, 与凋亡呈

■ 相关报道

TRX-1和STAT-3分别参与了多种炎症性疾病和肿瘤性疾病的发生, 国外已有二者之一单因素在结直肠癌方面的研究报道. 在肠道恶性肿瘤的研究中, 国内仅见STAT-3在大肠癌的研究, 但缺乏二者在小肠恶性肿瘤方面研究的报道.

■创新盘点

本文首次在原发性小肠恶性肿瘤组织中研究TRX-1和STAT-3的表达及其与临床病理的关系和意义。

表 2 小肠恶性肿瘤患者TRX-1、STAT-3表达与临床病理特征的关系 (mean ± SD)

临床参数	n	TRX-1		STAT-3	
		阳性n(%)	免疫组织化学评分	阳性n(%)	免疫组织化学评分
性别					
男	34	25(73.5)	4.32 ± 2.23	22(64.7)	3.81 ± 2.07
女	24	16(66.7)	4.25 ± 2.01	16(66.7)	3.58 ± 1.79
χ^2 或t值 ²		0.320	0.245	0.024	0.437
P值		0.572	0.807	0.877	0.804
年龄(岁)					
≥50	41	30(73.2)	4.58 ± 2.24	27(65.9)	3.87 ± 2.16
<50	17	11(64.7)	3.57 ± 1.64	11(64.7)	3.29 ± 1.26
χ^2 或t值 ²		0.416	1.754	0.007	1.316
P值		0.519	0.085	0.933	0.194
肿瘤大小(cm)					
≥5	32	23(71.2)	4.23 ± 2.09	22(68.8)	3.70 ± 1.90
<5	26	18(69.2)	4.34 ± 2.20	16(61.5)	3.76 ± 2.04
χ^2 或t值 ²		0.048	0.159	0.330	0.074
P值		0.826	0.874	0.566	0.941
肿瘤部位					
十二指肠	28	22(78.6)	4.74 ± 2.36	20(71.4)	4.24 ± 2.16
空肠	14	11(78.6)	4.24 ± 1.76	9(64.3)	3.41 ± 1.41
回肠	16	8(50.0)	3.45 ± 1.79	9(56.3)	3.08 ± 1.81
χ^2 或F值 ²		4.565	1.942	1.051	2.112
P值		0.102	0.153	0.591	0.131
总分化程度					
高分化	23	12(52.2)	2.84 ± 0.93	10(43.5)	2.48 ± 0.78
中分化	10	8(80.0)	4.44 ± 1.28	8(80.0)	3.84 ± 1.04
低分化	25	21(84.1)	5.51 ± 2.39	20(80.0)	4.80 ± 2.30
χ^2 或F值 ²		6.362	13.790	8.194	11.643
P值		0.042	<0.001	0.017	<0.001
上皮来源					
高分化	12	6(50.0)	2.87 ± 0.88	5(41.7)	2.47 ± 0.84
中分化	10	8(80.0)	4.44 ± 1.29	8(80.0)	3.40 ± 1.04
低分化	14	13(92.9)	6.91 ± 1.91	13(92.86)	6.11 ± 2.05
χ^2 或F值 ²		6.514	25.265	8.858	20.090
P值		0.038	<0.001	0.012	<0.001
总淋巴结转移					
阴性	35	19(54.3)	3.79 ± 1.99	17(48.6)	3.41 ± 1.85
阳性	23	19(82.6)	4.99 ± 2.17	19(82.6)	4.63 ± 1.96
χ^2 或t值 ²		4.928	2.173	8.194	2.130
P值		0.0263	0.034	0.017	0.036
TNM分期					
I、II	26	13(50.0)	3.33 ± 1.88	11(42.3)	2.97 ± 1.70
III、IV	32	28(87.5)	5.03 ± 2.03	27(84.4)	4.33 ± 1.94
χ^2 或t值 ²		9.736	3.260	11.236	2.790
P值		0.002	0.002	0.0101	0.007

²阳性率用 χ^2 检验, 免疫组织化学评分用t检验或F检验。

显著负相关^[14-16]。TRX-1增加肿瘤细胞生长, 其机制可能涉及到其增强氧化还原敏感转录因子, 如NF- κ B、P53、AP-1。TRX-1抑制凋亡可能由

对前凋亡蛋白如ASK-1和肿瘤抑制子蛋白PTEN的抑制所致^[2,6]。

本研究显示, TRX-1主要定位于细胞质和部

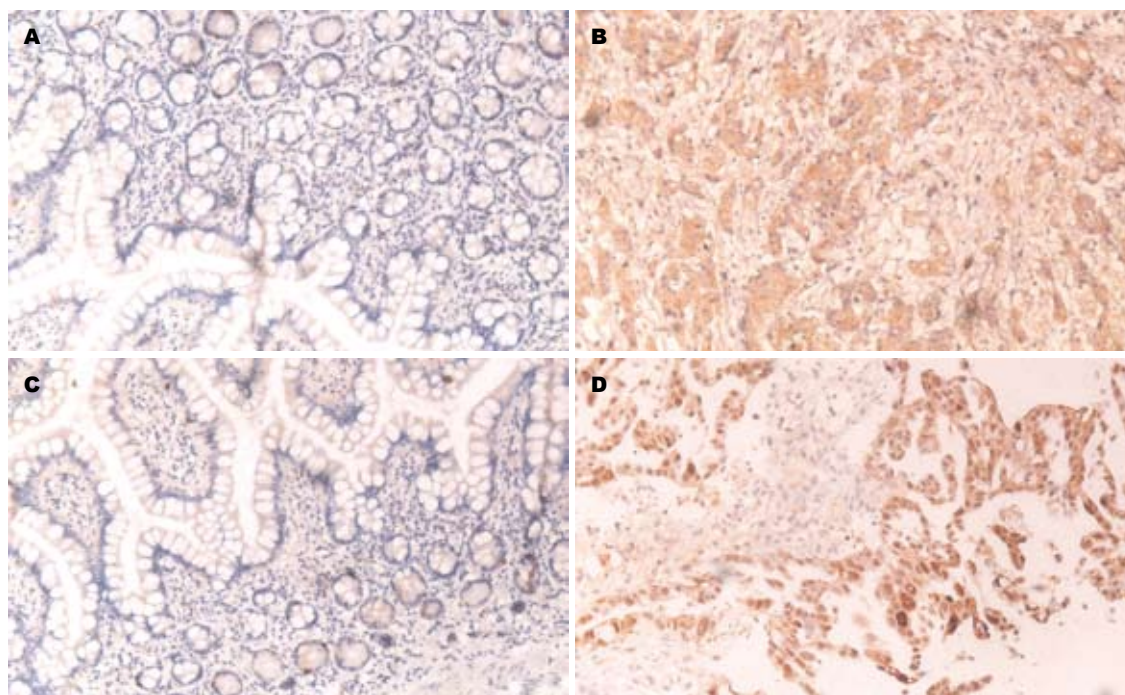


图 1 小肠组织免疫组织化学(DAB × 200). A, B: TRX-1; C, D: STAT-3; A, C: 正常对照组; B, D: 小肠腺癌组.

■应用要点

TRX-1和STAT-3在原发性小肠恶性肿瘤的发生发展中起重要作用, 本研究有助于对原发性小肠恶性肿瘤生长、浸润和转移机制等发病机制的阐明, 并为肿瘤的诊治提供更充分的理论依据. 联合检测可望作为判断该病恶性程度和预后的指标.

表 3 小肠恶性肿瘤中TRX-1、STAT-3表达的相关性分析

TRX-1	STAT-3		合计	r值	P值
	+	-			
阳性	34	7	41	0.881	<0.001
阴性	4	13	17		
合计	38	20	58		

分胞核, 在许多原发性小肠恶性肿瘤标本中, 较癌旁正常组织表达增强; 我们证实了该癌蛋白在小肠恶性肿瘤中表达上调. TRX-1在小肠恶性肿瘤高、中、低分化组织间差异有统计学意义, 组织分化程度越低, 二者表达越强; 与癌组织分化程度密切相关, 其在各种程度分化中的表达趋势同Raffel等^[6]在结直肠癌中的报道一致, 即TRX-1高表达大都集中在低中分化和恶性程度高的组织中, 且随恶性程度增高和分化下降而增高. 有淋巴结转移强, 反之弱; TNM分期越高, 表达越强, 这都提示TRX-1高表达与小肠恶性肿瘤的发生发展和恶性进展有密切关系.

STAT是一类DNA结合蛋白, 由750-850个氨基酸组成. STAT-3是该家族的重要成员, 是胞质的转录因子, 也是细胞因子和生长因子信号途径的介导子. STAT-3广泛表达于不同类型的细胞和组织中, STAT-3参与细胞生长、分化、增生、恶性转化及凋亡抑制等生理功能的调控^[5,17,18]. STAT-3是个与生长和肿瘤转化调控密切

关联的关键信号分子. 其活化已在许多来源的肿瘤细胞株和大量人类的恶性肿瘤中观察到.

本研究也显示STAT-3在原发性小肠恶性肿瘤中, 其表达水平高于癌旁正常组织, 并与组织分化程度相关, 分化越低表达越高. 提示其在肿瘤进展中的促进作用. 我们发现STAT-3定位于细胞质和胞核, 在小肠恶性肿瘤的阳性表达率明显高于正常小肠黏膜组织阳性表达率. Kusaba等^[7]检测了108例人结直肠腺癌组织中p-STAT3的表达, 结果显示57.4%的组织高表达, 其表达与肿瘤分化、淋巴结转移、Dukes分期及术后的预后有关, 提示p-STAT3蛋白的高表达与结直肠癌的进展及预后密切相关, 同我们在小肠恶性肿瘤中的试验结论基本一致. STAT-3通过诱导靶基因Survivin、Bcl-xL的表达, 促使肿瘤细胞增殖和淋巴结转移. 在癌肿中STAT-3活化或过表达, 而肿瘤抑制蛋白STAT-1表达下调, 他们是基因重要调节器, 二者的失衡显著影响肠组织的内环境稳态, 从而导致肿瘤发生^[19].

研究表明TRX-1和STAT-3二者均可在癌细胞中增加缺氧诱导因子(hypoxia-inducible factor 1, HIF-1)蛋白表达; 二者的过表达导致增加血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)合成并提高肿瘤血管生成^[20,21], 并且二者都可与p38丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinases, MAPKs)信号传导产生关联, 进而影响肿瘤的进展^[22]. TRX-1也可通过

■同行评价

本文探讨了原发性小肠恶性肿瘤中TRX-1和STAT-3的表达情况和临床病理特征,结果和讨论部分比较客观,有一定潜在的应用价值。

影响肿瘤细胞中活性氧簇的含量,而与STAT-3发生关联,促进肿瘤的增殖和抗凋亡^[23]。我们联合检测TRX-1和STAT-3,二者表达强度随着小肠恶性肿瘤组织分化程度降低而逐渐增强;有淋巴结转移强,反之弱,说明小肠恶性肿瘤的发生、发展与二者有关。但他们的表达与患者性别、年龄、肿瘤大小、部位均无关。TRX-1和STAT-3的表达呈正相关,说明TRX-1和STAT-3作为公认的癌蛋白,与结直肠癌等癌肿组织表达上调一样,在小肠恶性肿瘤中表达也增强,也说明他们的表达程度影响肿瘤的恶性程度,可在一定程度上预示小肠恶性肿瘤的预后。同黄东胜等^[24]对二者在肝细胞肝癌中的研究相似。

总之,TRX-1和STAT-3在小肠恶性肿瘤组织中的过度表达并与其发生发展有关,二者单独或共同相互作用,可能参与了小肠恶性肿瘤恶化的调控。鉴于原发性小肠恶性肿瘤少见,且病理类型的多样性,二者在小肠间质等非上皮来源的其他恶性肿瘤的恶变过程中的作用还需进一步扩大样本深入研究。我们仅从组织学角度研究二者在不同分化程度小肠恶性肿瘤的表达和有关病理参数的关系,以及二者的相关性。二者在小肠恶性肿瘤演变进展中深层次调控机制和作用有待在基因水平及分子生物学角度做进一步更深入研究。

志谢:衷心感谢柳州市人民医院消化内科李运泽主任、桂林181医院病理科万友华主任、桂林市第五人民医院病理科袁莲香主任在提供标本和临床资料上的大力支持;感谢广西医科大学肿瘤医院肿瘤实验室欧超主管技师实验上的帮助。

4 参考文献

- 1 李小燕,黄缘. 小肠癌分子生物学机制的研究进展. 中华消化杂志 2007; 27: 286-288
- 2 Arnér ES, Holmgren A. The thioredoxin system in cancer. *Semin Cancer Biol* 2006; 16: 420-426
- 3 Haura EB, Turkson J, Jove R. Mechanisms of disease: Insights into the emerging role of signal transducers and activators of transcription in cancer. *Nat Clin Pract Oncol* 2005; 2: 315-324
- 4 牛桂军,唐国都,梁志海,钟卫一,黄文福. 硫氧还蛋白-1在实验性急性坏死性胰腺炎大鼠肺表达及褪黑素干预的影响. 世界华人消化杂志 2010; 18: 550-556
- 5 牛桂军,黄杰安. STAT-3在消化系统恶性肿瘤研究进展. 国际消化病杂志 2010; 30: 48-49
- 6 Raffel J, Bhattacharyya AK, Gallegos A, Cui H, Einspahr JG, Alberts DS, Powis G. Increased expression of thioredoxin-1 in human colorectal cancer is associated with decreased patient survival.

- 7 J Lab Clin Med 2003; 142: 46-51
- 8 Kusaba T, Nakayama T, Yamazumi K, Yakata Y, Yoshizaki A, Inoue K, Nagayasu T, Sekine I. Activation of STAT3 is a marker of poor prognosis in human colorectal cancer. *Oncol Rep* 2006; 15: 1445-1451
- 9 金懋林. 消化道恶性肿瘤化学治疗. 第1版. 北京: 北京大学医学出版社, 2008: 291-296
- 10 Ng EH, Pollock RE, Munsell MF, Atkinson EN, Romsdahl MM. Prognostic factors influencing survival in gastrointestinal leiomyosarcomas. Implications for surgical management and staging. *Ann Surg* 1992; 215: 68-77
- 11 平凌燕,朱军. 原发肠道恶性淋巴瘤诊断和治疗的新观点. 临床肿瘤学杂志 2008; 13: 656-658
- 12 Turowski GA, Basson MD. Primary malignant lymphoma of the intestine. *Am J Surg* 1995; 169: 433-441
- 13 Lu CD, Altieri DC, Tanigawa N. Expression of a novel antiapoptosis gene, survivin, correlated with tumor cell apoptosis and p53 accumulation in gastric carcinomas. *Cancer Res* 1998; 58: 1808-1812
- 14 许良中,杨文涛. 免疫组织化学反应结果的判断标准. 中国癌症杂志 1996; 6: 229-230
- 15 Mukherjee A, Martin SG. The thioredoxin system: a key target in tumour and endothelial cells. *Br J Radiol* 2008; 81 Spec No 1: S57-S68
- 16 Sun Y, Rigas B. The thioredoxin system mediates redox-induced cell death in human colon cancer cells: implications for the mechanism of action of anticancer agents. *Cancer Res* 2008; 68: 8269-8277
- 17 Noike T, Miwa S, Soeda J, Kobayashi A, Miyagawa S. Increased expression of thioredoxin-1, vascular endothelial growth factor, and redox factor-1 is associated with poor prognosis in patients with liver metastasis from colorectal cancer. *Hum Pathol* 2008; 39: 201-208
- 18 Kim DJ, Chan KS, Sano S, Digiovanni J. Signal transducer and activator of transcription 3 (Stat3) in epithelial carcinogenesis. *Mol Carcinog* 2007; 46: 725-731
- 19 Lim CP, Cao X. Structure, function, and regulation of STAT proteins. *Mol Biosyst* 2006; 2: 536-550
- 20 Klampfer L. The role of signal transducers and activators of transcription in colon cancer. *Front Biosci* 2008; 13: 2888-2899
- 21 Welsh SJ, Bellamy WT, Briehl MM, Powis G. The redox protein thioredoxin-1 (Trx-1) increases hypoxia-inducible factor 1alpha protein expression: Trx-1 overexpression results in increased vascular endothelial growth factor production and enhanced tumor angiogenesis. *Cancer Res* 2002; 62: 5089-5095
- 22 Jung JE, Lee HG, Cho IH, Chung DH, Yoon SH, Yang YM, Lee JW, Choi S, Park JW, Ye SK, Chung MH. STAT3 is a potential modulator of HIF-1-mediated VEGF expression in human renal carcinoma cells. *FASEB J* 2005; 19: 1296-1298
- 23 谢晨曦,任建林. P38 MAPK信号传导通路胃癌关系的研究现状. 世界华人消化杂志 2008; 16: 3427-3432
- 24 Dixit D, Sharma V, Ghosh S, Koul N, Mishra PK, Sen E. Manumycin inhibits STAT3, telomerase activity, and growth of glioma cells by elevating intracellular reactive oxygen species generation. *Free Radic Biol Med* 2009; 47: 364-374
- 25 黄东胜,刘新,刘军伟,陈建峰,王建军,高卿,王耀. TRX与STAT-3在肝细胞肝癌高表达及相互作用研究. 中华肝胆外科杂志 2008; 14: 552-555

编辑 李军亮 电编 何基才

蛋白质组学在炎症性肠病研究中的应用

童明霞, 缪应雷

童明霞, 缪应雷, 昆明医学院第一附属医院消化内科 云南省昆明市 650032

作者贡献分布: 本文由童明霞完成; 缪应雷审阅.

通讯作者: 缪应雷, 副教授, 650032, 云南省昆明市西昌路295号, 昆明医学院第一附属医院消化内科. myldu@sina.com.cn
电话: 0871-5324888-2532

收稿日期: 2010-05-12 修回日期: 2010-07-03

接受日期: 2010-07-05 在线出版日期: 2010-08-08

Application of proteomics to the study of inflammatory bowel disease

Ming-Xia Tong, Ying-Lei Miao

Ming-Xia Tong, Ying-Lei Miao, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Kunming Medical College, Kunming 650032, Yunnan Province, China

Correspondence to: Associate Professor Ying-Lei Miao, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Kunming Medical College, Kunming 650032, Yunnan Province, China. myldu@sina.com.cn

Received: 2010-05-12 Revised: 2010-07-03

Accepted: 2010-07-05 Published online: 2010-08-08

Abstract

Inflammatory bowel disease (IBD), including ulcerative colitis (UC) and Crohn's disease (CD), is a chronic inflammatory disorder of the gastrointestinal tract. The initiation and development of IBD involve environmental and genetic factors, such as microorganisms. Complicated pathogenesis, diverse risk factors and atypical clinical features lead to a difficult diagnosis of IBD. The emergence of proteomics has given new impetus to IBD research. In this article, we will review the application of proteomics to the diagnosis of IBD and prediction of IBD-associated tumors.

Key Words: Proteomics; Inflammatory bowel disease; Biomarker

Tong MX, Miao YL. Application of proteomics to the study of inflammatory bowel disease. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(22): 2333-2338

摘要

炎症性肠病(inflammatory bowel disease, IBD)包括溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)和克

罗恩病(Crohn's disease, CD), 是胃肠道慢性炎症性疾病. 环境、遗传、微生物、细胞和分子因素的共同作用介导了IBD的发生和发展. 由于IBD的病因复杂, 危险因素涉及多个方面, 临床表现极不典型, 因此造成对该病的诊断存在很大难度. 蛋白质组学的出现, 使炎症性肠病的研究有了进一步的发展. 本文就蛋白质组学在炎症性肠病的诊断及相关肿瘤预测方面的研究进行综述.

关键词: 蛋白质组学; 炎症性肠病; 标志物

童明霞, 缪应雷. 蛋白质组学在炎症性肠病研究中的应用. *世界华人消化杂志* 2010; 18(22): 2333-2338

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/2333.asp>

0 引言

炎症性肠病(inflammatory bowel disease, IBD)在西方发达国家极为常见, 北美和欧洲发病率高达1/1 000. 随着我国经济水平的高速发展, 国人发病率亦呈上升趋势, 流行病学调查显示上海等沿海地区发病率已接近国外平均水平. 该疾病现正成为我国消化系统常见疾病和慢性腹泻的主要病因, 加之其病程迁延、活动期症状严重、治疗棘手, 已引起临床学者的高度重视. IBD是胃肠道慢性炎症性疾病. 环境、遗传、微生物、细胞和分子等因素的共同作用介导了IBD的发生和发展^[1,2]. 目前IBD的诊断是基于临床表现、内镜、组织学和放射学检查的结果, 尚无诊断的金标准^[3]. 基因组学已被广泛应用, 本研究小组^[4]已采用高通量基因芯片技术, 从全基因组角度比较UC患者与健康人群外周血单个核细胞差异表达基因, 通过生物信息学分析, 进一步采用半定量RT-PCR验证了3个明显差异表达基因, 支持基因芯片检测结果. 然而基因在转录前及转录调控过程中经过不同的剪接可能翻译成不同的蛋白质, 此外, 蛋白质在合成之后又可能经过包括磷酸化、糖基化、硫酸化、酰基化等不同的翻译后修饰过程, 导致基因的转录水平和蛋白质翻译水平的巨大差异. 因此, 仅从基因转录水平这一个角度不足以对蛋白质的种

■背景资料

IBD是胃肠道慢性炎症性疾病. 环境、遗传、微生物、细胞和分子等因素的共同作用介导了IBD的发生和发展. 目前IBD的诊断是基于临床表现、内镜、组织学和放射学检查的结果, 尚无诊断的金标准.

■同行评议者

颜宏利, 教授, 中国人民解放军第二军医大学遗传学教研室

■研发前沿

随着规模庞大的基因组测序的完成,人们逐渐认识到仅仅拥有完整的基因组序列并不能解释复杂的生命现象,由于基因组到蛋白质组间并不存在固定的线性关系,因此对疾病的蛋白质组学研究有着不可替代的意义和独特优势。

类和数量加以描述和预测,更不足以对主要由蛋白质演绎的复杂生命活动加以描述和预测。随着规模庞大的基因组测序的完成,人们逐渐认识到仅仅拥有完整的基因组序列并不能解释复杂的生命现象,由于基因组到蛋白质组间并不存在固定的线性关系,因此对疾病的蛋白质组学研究有着不可替代的意义和独特优势^[5,6]。并且蛋白质组研究是对基因组研究的重要补充,他是对生物体在蛋白质水平定量、动态、整体性的研究。蛋白质组学是一门对某一生物或细胞在特定生理或病理状态下表达的所有蛋白质的特征、数量和功能进行系统性研究的科学^[7]。蛋白质组学在医学方面的应用主要包括以下几个方面:通过寻找差异表达蛋白质以发现疾病相关的蛋白质;寻找用于诊断的疾病相关的标志物;研究疾病的发病机制等。蛋白质组学的核心技术为双向凝胶电泳(two-dimensional gel electrophoresis, 2-DE)和质谱分析,研究标本可分为:培养的细胞、生理或病理状态下的组织、各种体液等。目前血清蛋白质组学研究已经在前列腺癌、膀胱癌、乳腺癌和卵巢癌等疾病中发现了可能的诊断标志物^[8]。但目前对IBD的血清蛋白质组学研究鲜有提及。

1 蛋白质组学核心技术及其优点

1.1 2-DE 2-DE是蛋白质组学研究的核心技术之一,是目前唯一可将数千种蛋白质同时分离的方法。他利用了各种蛋白质等电点和相对分子质量的不同来分离复杂蛋白质组分,具有较高的分辨率和灵敏度,目前已成为复杂蛋白质组分检测和最好的生化技术。2-DE联合质谱技术被国际公认是目前蛋白质组研究技术的标准方法。2-DE具有以下优点:(1)分辨能力强;(2)信息量多,从2-DE图谱上可以初步得到细胞或组织内蛋白质的分布范围、表达蛋白质的个数等;(3)固定pH梯度胶条,IPG胶条机械性能好、重现性好、易处理;(4)可用计算机分析处理,并且能与质谱等分析鉴定方法相匹配。

1.2 荧光双向差异凝胶电泳 荧光双向差异凝胶电泳(fluorescence two-dimensional differential gel electrophoresis, F-2D-DIGE)是在传统2-DE基础上发展起来的定量分析凝胶蛋白质点的新方法。其特点是将3种待比较的蛋白样品用不同的荧光染料分别标记后在同一块凝胶上行双向电泳,通过激发不同荧光染料所得到的荧光强度

从而达到蛋白质差异比较的目的。此方法的优点是可以在同一块凝胶上比较不同来源或不同处理样本的蛋白质表达谱,能在较宽的动态范围内精确地对感兴趣的蛋白质进行定量。他避免了不同凝胶之间的差异对结果分析带来的困难,保证了实验条件的一致性,有利于差异表达点的筛选。F-2D-DIGE与传统的2-DE最大的差别在于前者采用了荧光试剂来标记蛋白质并通过荧光成像以获取电泳图像。

1.3 表面增强激光解析电离飞行时间质谱 蛋白质组谱技术是蛋白质组学研究的核心技术,是蛋白质组学研究的重要依托,具有高灵敏性和高精确性,可以分析极微量、低丰度的蛋白质,为检测细胞、组织、体液蛋白质的变化提供了技术手段。表面增强激光解析电离飞行时间质谱(surface-enhanced laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry, SELDI-TOF-MS)法由Ciphergen公司推出,将蛋白质芯片技术与质谱联用,分析过程不会破坏蛋白质,整合蛋白质样品处理、生化反应及检测分析过程于一体,实现了新型、高效、快速、高通量的检测。与传统测定技术相比具有以下优势:(1)待测样本来源广泛,可直接检测不经处理的尿液、血液、脑脊液、关节腔滑液、支气管洗出液、细胞裂解液和各种分泌液等,获得样品中目标蛋白的相对分子质量;(2)在同一系统中集分离、纯化、鉴定、检测和数据分析为一体,高通量、操作自动化、快捷方便;(3)样品需要量少,检测速度快,适合临床诊断及大规模筛查;(4)灵敏度高,适合低丰度相对分子质量小蛋白质的发现,并能检测疏水蛋白质;(5)对样品中的盐和其他杂质有较高的兼容性^[9]。因此,SELDI-TOF-MS技术的出现使应用少量临床样本即可检测到与疾病发展密切相关的低丰度蛋白成为可能,也使蛋白质组学诊断模式发展成为一种有价值的诊断标准。

2 IBD相关的生物标志物

2.1 血小板因子4 血小板因子4(platelet factor 4, PF4)属于CXCL趋化因子家族的成员,并且主要由巨核细胞产生,储存在血小板 α 颗粒中并在损伤激活时被释放^[10-12]。Danese等^[13]之前就报道了IBD患者比健康对照组表现出较高的血小板活性状态,并且提出血小板功能不良可能是IBD的病理生理的一部分。有研究指出,IBD活动期患者血液中的血小板升高,可能与IBD

活动时机体释放多种与刺激血小板形成有关的IL-3、IL-6、血小板生成素有关, 这些细胞因子能增加血小板生成速率^[14]. 到目前为止, 很少有报道应用蛋白质组学方法研究体液(血清/血浆或者尿液)中IBD的生物标志物^[15]. Meuwis等^[16]将120例血清样本分为4组(30例克罗恩病, 30例溃疡性结肠炎, 30例非炎症性肠病和30名健康对照), 应用SELDI-TOF-MS比较血清蛋白发现PF4在IBD患者和炎症对照的患者血清中分布不同, 这可能反映了血小板的功能障碍. 除此之外, 通过ELISA法评估了PF4在我们样本血清中的水平, 并且与活动性疾病的PF4的SELDI分布是相关的. 但是, 基于ELISA试验的PF4的分布不能为从SELDI谱中获得的IBD患者提供良好的分离. 其他人也用ELISA技术研究了PF4的分布^[17,18]. 有趣的是, PF4存在很多不同的形式并且由成熟形式的蛋白酶解加工产生^[19-21]. Meuwis等^[16]检测到的PF4的主要形式准确在7 771 Da. 与ELISA不同, SELDI-TOF-MS技术能够鉴别PF4变体, 能够有效地从炎症性消化系疾病中鉴别出活动性的IBD. 因此, 经过纯化和鉴定, PF4这个重要的生物标志物对IBD的诊断及病理生理学机制有着重要的作用. 用类似的方法, 对20例对英夫利昔单抗有反应或者无反应的克罗恩病(Crohn's disease, CD)患者的血清进行初步的研究^[22]. 在两项研究中, PF4被鉴定为潜在的生物标志物. 在SELDI峰的强度水平处, 确认PF4的水平与对英夫利昔单抗无反应者呈负相关. 然而, 这些相关性并没有通过ELISA法证实, 并且PF4没有表现出与其他疾病标志物(sCD40L, IL-6, CRP)或临床指标有任何相关性.

2.2 结合珠蛋白 结合珠蛋白(haptoglobin, Hp)又称触珠蛋白, 是血清 α_2 球蛋白组分中相对分子质量为85 000 Da的一种酸性糖蛋白, 广泛存在于人类和许多哺乳动物的血清及其他体液中, 主要在肝脏合成, 其降解也在肝脏. 其主要功能是通过与游离血红蛋白(hemoglobin, Hb)结合形成Hp-Hb复合物, 由于其分子较大, 不能从肾脏排出, 这样可以阻止Hb从肾小球滤过, 避免游离Hb对肾小管的损害. 此外, Hp作为一种急性期时相反应蛋白, 在参与宿主抗感染、损伤组织的修复以及内环境稳定的过程中起着重要作用. 当机体处在应激状态时, 血液中的Hp明显增多, 如心肌梗塞、肿瘤、炎症、创伤、感染等病理状态时. 除以上的功能外, Hp尚有抗氧化活性、抑制前列腺素合成、抑制细菌、促进血管生成及重要的

免疫作用^[23].

Hp是一个有2 α 和2 β 亚单位的多亚基蛋白复合物. Hp α 存在两种单体型Hp α_1 和Hp α_2 , 表现型为Hp1-1, Hp1-2, Hp2-2. Hp是由他的亚单位的重新分配所独立量化的, 被用于炎症或溶血的一般标志物, 并且随类型和疾病的演变波动. 早期的研究报道, 活动性IBD的Hp水平一般会增高, 与CD活性指数相关(Crohn's disease activity index, CDAI)^[24]. 而且, 还有报道用抗TNF成功治疗CD后Hp的水平呈整体下降^[25]. Meuwis^[16]等在缓解期的患者[他们中的一些经过抗肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)治疗]与活动期的患者相比, 观察到了Hp α_2 在血清中的低水平. Hp α_2 可能被认为是IBD新的特异性生物标志物, 且与疾病的临床活动性相关. 传统的炎症标志物, 如C-反应蛋白(C-reactive protein, CRP)并不完全与IBD临床和内镜活动性相关, 这一新的生物标志物可能对描述疾病的活动性有一定的补充作用. Kang等^[26]应用2-DE比较4例CD患者和8例健康人的血清蛋白质样本, 通过质谱鉴定Hp在CD患者的血清中表达上调, 说明Hp可能在CD的免疫失衡中有着重要的作用.

2.3 波形蛋白(vimentin) vimentin是一种中间丝波形蛋白, 大量表达于间充质细胞中, 在细胞结构的稳定方面起到重要的作用, 同时vimentin还与细胞的黏附、迁移、细胞信号传导、细胞生长凋亡及炎症反应有密切联系. 有研究发现, 用第85位天冬氨酸断裂的波形蛋白肽段转染细胞后, 干扰了正常波形蛋白的组装, 出现细胞变圆、细胞质收缩等凋亡特有的表现, 说明波形蛋白的裂解产物能促进凋亡^[27]. Yang等^[28]用TNF-2 α 刺激滑膜成纤维细胞后, 发现半胱氨酸蛋白酶4(caspase 4)被激活并降解vimentin, 破坏vimentin与P53蛋白形成的复合物, 从而诱发细胞凋亡. 已经报道了几个vimentin被caspase剪切降解的位点. Byun等^[27]报道vimentin被caspase-3/-7在Asp85(DSVD85-F)剪切, 或者在Asp259(IDVD259-V)位点被caspase-6剪切. 赵蕊梅等^[29]选取12例活动期溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)患者及12例正常肠黏膜为研究对象, 提取组织蛋白做2-D电泳、银染、胶图分析找差异点, 质谱鉴定蛋白质, 最后Western blot验证差异点. 结果共鉴定出蛋白质30个(上调16个, 下调14个), 成功选取其中的vimentin, 并得到Western blot方法的验证. 综上所述, 在UC患者的肠黏膜中存在vimentin被caspase水解片段的高

■ 相关报道

Brentnall等检测到S100P在UC相关的高度异型活检组织和结肠癌、UC进展者的非异型黏膜中过度表达, 而且免疫组织化学分析已经证实, S100P蛋白在UC进展的非异型结肠组织中的表达显著高于UC非进展的结肠黏膜, 进一步证明S100P可能成为一个潜在的生物标志物, 预测UC发展为结肠癌.

■同行评价

本文综述了蛋白质组学在炎症性肠病研究中的应用,有一定的新颖性,综述内容也比较丰富.

表达,而且Western blot验证了我们在差异蛋白质组学中的这一发现.可见vimentin的降解片段与UC的发生发展存在重要的关系,可能参与UC的发病机制,并为临床治疗提供新的治疗靶点.

2.4 人中性粒细胞防御素组分 防御素是最大的自然抗生素的肽家族之一.其表现对革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌、分枝杆菌、真菌和一些包裹病毒一定的抗菌活性.人中性粒细胞防御素组分(human neutrophil peptides 1-3, HNP1-3)是 α 防御素家族的一部分,并且是先天免疫的成分. HNP1-3是由中性粒细胞的前体细胞合成,并且在炎症状态下由成熟的循环中性粒细胞释放^[30,31].在活动性UC或CD患者的回肠和结肠上皮细胞可以观察到HNP1-3的表达^[32]. Kanmura等^[33]应用蛋白质组学方法证实了在活动性UC中的HNP1-3的平均血浆浓度显著高于缓解期UC、感染性结肠炎及健康对照组,并且倾向于结肠癌患者.除此之外,对皮质类固醇有反应的UC患者的HNP1-3的血浆浓度在治疗后下降,然而无反应者HNP1-3的血浆浓度无变化.由此可见, HNP1-3是一个可能对诊断活动性UC和预测治疗结果有用的新型的生物标志物.

有报道HNP1-3的水平在结肠癌患者的肿瘤组织和血清中升高^[34].也报道了由ELISA法决定的血浆HNP1-3浓度与健康对照相比,在结肠癌Duke's分级的C级和D级升高,在A级和B级不升高^[35].然而Kanmura等^[33]研究显示了在结肠癌患者Duke's A级的HNP1-3的浓度高于非活动性UC和健康对照.虽然结肠癌患者Duke's A级的HNP1-3的浓度在此研究中与之前的研究中几乎相似^[35],但在健康对照中的HNP1-3的浓度在两项研究中均不同.另外Albrethsen等^[35]提到,通过SELDI蛋白芯片检测到除了Duke's C级和D级, A级和B级的结肠癌组织中的HNP1-3表达高于正常组织.这就有争议了,在肿瘤中升高的HNP1-3是局限在肿瘤细胞还是中性粒细胞.有一种可能,血浆HNP1-3的浓度在A级升高并且HNP1-3浓度作为结肠癌晚期患者评估的一个潜在的标志物^[34,35].由此看来, HNP1-3可能不能鉴别活动性UC和结肠癌,但其可能作为UC患者发生结肠癌的一个辅助信号,对IBD的鉴别诊断是一个有用的标志物.

3 IBD相关肿瘤标志物

3.1 S100P蛋白 S100蛋白是1965年Heizmann等^[36]首先在牛脑组织中发现的一组相对分子质

量小的蛋白,因其能够100%溶解于中性饱和硫酸铵溶液而得名. S100蛋白是一个多基因钙结合家族包含了20种已知的成员^[37].他们有广泛的细胞内和细胞外功能,包括蛋白磷酸化和酶活性的调节、钙平衡、细胞骨架成分的构成和转录因子的调节^[37].一些S100蛋白位于线粒体膜并且一些S100蛋白通过诱导线粒体潜能的快速下降而在细胞凋亡中起着重要的作用^[38,39].而S100P蛋白是S100家族的一个新成员,最初从胎盘(placenta)中分离出来,故命名为“S100P”^[40].当前研究证明其与多种肿瘤的发生发展显著相关. S100P常常在一些上皮肿瘤类型包括胰腺^[41]和结肠中过表达.最近的研究提示S100P在分散的结肠癌有着重要的作用,其通过刺激细胞生长、迁移和影响一些促炎分子的信号传导通路^[42]. S100P的上调在胰腺癌的发展中是一早期分子事件,并且在前期损伤和侵袭性癌中处于高表达水平^[43,44].

UC有发展为结肠癌的高危险性.结肠镜检查对UC患者来说是相当昂贵的而且耗时,并且是一项侵袭性的操作.因此,检测到异型性的生物标志物可以帮助那些有发展为癌症危险性的UC患者. Brentnall等^[45]检测到S100P在UC相关的高度异型活检组织和结肠癌、UC进展者的非异型黏膜中过度表达.而且免疫组织化学分析已经证实, S100P蛋白在UC进展的非异型结肠组织中的表达显著高于UC非进展的结肠黏膜,进一步证明S100P可能成为一个潜在的生物标志物,预测UC发展为结肠癌.除了S100P表达异常之外,有3个S100蛋白在UC进展中表达增加(S100A6, S100A11和S100H),两个其他的S100蛋白显著地低表达,这对于预测UC肿瘤形成有着重要的价值.

3.2 transgelin蛋白 transgelin又称SM-22 α ,是一种主要在脊椎动物平滑肌中表达的保守蛋白^[46,47].彭佳远等^[48]研究发现transgelin蛋白在从正常组织至腺瘤再发展至腺癌的过程中,其表达量逐渐下降,而腺癌与肝转移之间的表达无显著差异,由此提示transgelin蛋白可能是结直肠黏膜恶变的一种重要标志物.李里等^[49]研究发现transgelin蛋白在结直肠癌的发生与进展过程中表达逐渐降低,这种表达减弱与肿瘤的分化程度及预后有关;在结直肠癌患者中血清transgelin水平上升,尤其以Duke B、C和D期更为明显.此研究结果提示, transgelin蛋白可能成为一种新的临床肿瘤标志物.研究发现, UC小鼠自发结肠肿瘤中transgelin蛋白的表达量较正常黏膜明显

下降^[50], 提示transgelin蛋白可能是UC相关结肠癌的一个候选标志物。

3.3 热休克蛋白 热休克蛋白(heat shock protein, HSP)是一组高度保守的蛋白质, 在细胞生长、发育、分化、基因转录、蛋白质合成、折叠、分解、细胞骨架功能等方面发挥重要生理作用。无论生理或病理状态, HSP都是保护肠黏膜细胞所必需的。在UC病变部位及其正常黏膜的活检标本中发现结肠炎病变黏膜HSP减少, 可能是因为损伤条件下肠黏膜上皮的细胞生理功能削弱, 使HSP产生减少。并由于HSP减少而使损伤加重, 可见HSP发挥保护功能有一定的生理条件^[51]。Araki等^[52]通过2-DE和质谱评估UC相关的癌与分散的结肠癌细胞之间的不同蛋白的表达发现, HSP47是UC相关的癌细胞中高表达的蛋白之一, 并且免疫组织化学证实了在UC相关的癌中的表达显著高于分散的结肠癌, 其表达随肿瘤性病变的进展而增加。总之, HSP47的过度表达是UC相关的癌的一个独特的特征, 需要进一步研究说明他的临床意义。

4 结论

尽管蛋白质组学技术对于我们进一步研究IBD提供了强有力的支持, 但我们还应看到蛋白质组技术的不足。用于蛋白分离的2-DE对于极酸、极碱以及低丰度的蛋白分离效果差, 且无法实现高通量、自动化的操作极大地限制了我们对蛋白质组的研究。SELDI-TOF-MS技术只能给出蛋白的相对分子质量, 对目标蛋白的鉴定还需一系列后续工作。而且由于使用激光解析电离飞行时间质谱分离全蛋白, 目标蛋白多集中于10 000 Da以内。然而蛋白质组学技术毕竟使我们对IBD的研究更深入了一步, 为研究疾病的发生、发展过程提供了一个全新的思路, 通过对IBD相关的生物标志物及IBD相关的肿瘤标志物的研究, 有可能为IBD的诊断及治疗提供新的靶向因子, 以达到早期诊断、早期治疗的目的, 对临床工作有指导性的意义。

5 参考文献

- 1 Kok K, Stokkers P, Reitsma PH. Genomics and proteomics: implications for inflammatory bowel diseases. *Inflamm Bowel Dis* 2004; 10 Suppl 1: S1-S6
- 2 Felley-Bosco E, André M. Proteomics and chronic inflammatory bowel diseases. *Pathol Res Pract* 2004; 200: 129-133
- 3 夏霖, 伍晓汀. 克罗恩病的诊断进展. *中国实用外科杂志* 2007; 27: 246-248
- 4 缪应雷, 肖玉良, 段丽平, 李晓燕, 陈丽芳, 李红纳. 寡聚核苷酸芯片检测溃疡性结肠炎患者基因表达谱的

- 研究. *中华消化杂志* 2009; 29: 775-777
- 5 Pandey A, Mann M. Proteomics to study genes and genomes. *Nature* 2000; 405: 837-846
- 6 Graves PR, Haystead TA. Molecular biologist's guide to proteomics. *Microbiol Mol Biol Rev* 2002; 66: 39-63; table of contents
- 7 Peng J, Gygi SP. Proteomics: the move to mixtures. *J Mass Spectrom* 2001; 36: 1083-1091
- 8 Petricoin EF, Ardekani AM, Hitt BA, Levine PJ, Fusaro VA, Steinberg SM, Mills GB, Simone C, Fishman DA, Kohn EC, Liotta LA. Use of proteomic patterns in serum to identify ovarian cancer. *Lancet* 2002; 359: 572-577
- 9 Kiehnopf M, Siegmund R, Deufel T. Use of SELDI-TOF mass spectrometry for identification of new biomarkers: potential and limitations. *Clin Chem Lab Med* 2007; 45: 1435-1449
- 10 Bikfalvi A. Platelet factor 4: an inhibitor of angiogenesis. *Semin Thromb Hemost* 2004; 30: 379-385
- 11 Slungaard A. Platelet factor 4: a chemokine enigma. *Int J Biochem Cell Biol* 2005; 37: 1162-1167
- 12 Stoeckle MY, Barker KA. Two burgeoning families of platelet factor 4-related proteins: mediators of the inflammatory response. *New Biol* 1990; 2: 313-323
- 13 Danese S, Motte Cd Cde L, Fiocchi C. Platelets in inflammatory bowel disease: clinical, pathogenic, and therapeutic implications. *Am J Gastroenterol* 2004; 99: 938-945
- 14 陈隆典, 杨英. 炎症性肠病疾病活动程度与血小板参数的相关性分析. *中华消化杂志* 2006; 26: 771-771
- 15 Alex P, Gucek M, Li X. Applications of proteomics in the study of inflammatory bowel diseases: Current status and future directions with available technologies. *Inflamm Bowel Dis* 2009; 15: 616-629
- 16 Meuwis MA, Fillet M, Geurts P, de Seny D, Lutteri L, Chapelle JP, Bours V, Wehenkel L, Belaiche J, Malaise M, Louis E, Merville MP. Biomarker discovery for inflammatory bowel disease, using proteomic serum profiling. *Biochem Pharmacol* 2007; 73: 1422-1433
- 17 Knot E, Ten Cate JW, Leeksa OC, Tytgat GN, Vreeken J. No evidence for a prethrombotic state in stable chronic inflammatory bowel disease. *J Clin Pathol* 1983; 36: 1387-1390
- 18 Vrij AA, Rijken J, Van Wersch JW, Stockbrügger RW. Platelet factor 4 and beta-thromboglobulin in inflammatory bowel disease and giant cell arteritis. *Eur J Clin Invest* 2000; 30: 188-194
- 19 Gupta SK, Hassel T, Singh JP. A potent inhibitor of endothelial cell proliferation is generated by proteolytic cleavage of the chemokine platelet factor 4. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; 92: 7799-7803
- 20 Van Damme J, Struyf S, Opdenakker G. Chemokine-protease interactions in cancer. *Semin Cancer Biol* 2004; 14: 201-208
- 21 Green CJ, Charles RS, Edwards BF, Johnson PH. Identification and characterization of PF4var1, a human gene variant of platelet factor 4. *Mol Cell Biol* 1989; 9: 1445-1451
- 22 Meuwis MA, Fillet M, Lutteri L, Marée R, Geurts P, de Seny D, Malaise M, Chapelle JP, Wehenkel L, Belaiche J, Merville MP, Louis E. Proteomics for prediction and characterization of response to infliximab in Crohn's disease: a pilot study. *Clin Biochem* 2008; 41: 960-967
- 23 Langlois MR, Delanghe JR. Biological and clinical significance of haptoglobin polymorphism in

- humans. *Clin Chem* 1996; 42: 1589-1600
- 24 Vucelić B, Milčić D, Krznarić Z, Korać B, Sentić M, Hadžić N, Stavljenić A, Cvorisćec D. [Serum acute phase proteins for determining disease activity of ulcerative colitis and Crohn disease] *Acta Med Austriaca* 1991; 18: 100-105
- 25 Kupcová V, Turecký L, Detková Z, Příkazská M, Keleová A. Changes in acute phase proteins after anti-tumor necrosis factor antibody (infliximab) treatment in patients with Crohn's disease. *Physiol Res* 2003; 52: 89-93
- 26 Kang L, Yang ZL, Liu W, Zhang LJ, Liu SJ, Huang MJ, Li MT, Wang JP. [Serum proteomic variation study in patients with Crohn disease] *Zhonghua Weichang Waike Zazhi* 2008; 11: 266-269
- 27 Byun Y, Chen F, Chang R, Trivedi M, Green KJ, Cryns VL. Caspase cleavage of vimentin disrupts intermediate filaments and promotes apoptosis. *Cell Death Differ* 2001; 8: 443-450
- 28 Yang X, Wang J, Liu C, Grizzle WE, Yu S, Zhang S, Barnes S, Koopman WJ, Mountz JD, Kimberly RP, Zhang HG. Cleavage of p53-vimentin complex enhances tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-mediated apoptosis of rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. *Am J Pathol* 2005; 167: 705-719
- 29 赵芯梅, 智发朝, 杨小明, 吕超蓝, 王焕景, 康滨, 吕有勇, 刘斯奇, 姜泊. 结肠黏膜vimentin降解在溃疡性结肠炎发病机制中的作用. *现代消化及介入诊疗* 2009; 14: 145-147
- 30 Ganz T, Selsted ME, Szklarek D, Harwig SS, Dahar K, Bainton DF, Lehrer RI. Defensins. Natural peptide antibiotics of human neutrophils. *J Clin Invest* 1985; 76: 1427-1435
- 31 van Wetering S, Sterk PJ, Rabe KF, Hiemstra PS. Defensins: key players or bystanders in infection, injury, and repair in the lung? *J Allergy Clin Immunol* 1999; 104: 1131-1138
- 32 Cunliffe RN, Kamal M, Rose FR, James PD, Mahida YR. Expression of antimicrobial neutrophil defensins in epithelial cells of active inflammatory bowel disease mucosa. *J Clin Pathol* 2002; 55: 298-304
- 33 Kanmura S, Uto H, Numata M, Hashimoto S, Moriuchi A, Fujita H, Oketani M, Ido A, Kodama M, Ohi H, Tsubouchi H. Human neutrophil peptides 1-3 are useful biomarkers in patients with active ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis* 2009; 15: 909-917
- 34 Melle C, Ernst G, Schimmel B, Bleul A, Thieme H, Kaufmann R, Mothes H, Settmacher U, Claussen U, Halbhauer KJ, Von Eggeling F. Discovery and identification of alpha-defensins as low abundant, tumor-derived serum markers in colorectal cancer. *Gastroenterology* 2005; 129: 66-73
- 35 Albrethsen J, Møller CH, Olsen J, Raskov H, Gammeltoft S. Human neutrophil peptides 1, 2 and 3 are biochemical markers for metastatic colorectal cancer. *Eur J Cancer* 2006; 42: 3057-3064
- 36 Heizmann CW, Fritz G, Schäfer BW. S100 proteins: structure, functions and pathology. *Front Biosci* 2002; 7: d1356-d1368
- 37 Salama I, Malone PS, Mihaimed F, Jones JL. A review of the S100 proteins in cancer. *Eur J Surg Oncol* 2008; 34: 357-364
- 38 Brezová A, Heizmann CW, Uhrík B. Immunocytochemical localization of S100A1 in mitochondria on cryosections of the rat heart. *Gen Physiol Biophys* 2007; 26: 143-149
- 39 Ghavami S, Kerkhoff C, Chazin WJ, Kadkhoda K, Xiao W, Zuse A, Hashemi M, Eshraghi M, Schulze-Osthoff K, Klonisch T, Los M. S100A8/9 induces cell death via a novel, RAGE-independent pathway that involves selective release of Smac/DIABLO and Omi/HtrA2. *Biochim Biophys Acta* 2008; 1783: 297-311
- 40 Emoto Y, Kobayashi R, Akatsuka H, Hidaka H. Purification and characterization of a new member of the S-100 protein family from human placenta. *Biochem Biophys Res Commun* 1992; 182: 1246-1253
- 41 Downen SE, Crnogorac-Jurcevic T, Gangeswaran R, Hansen M, Eloranta JJ, Bhakta V, Brentnall TA, Lüttges J, Klöppel G, Lemoine NR. Expression of S100P and its novel binding partner S100PBPR in early pancreatic cancer. *Am J Pathol* 2005; 166: 81-92
- 42 Fuentes MK, Nigavekar SS, Arumugam T, Logsdon CD, Schmidt AM, Park JC, Huang EH. RAGE activation by S100P in colon cancer stimulates growth, migration, and cell signaling pathways. *Dis Colon Rectum* 2007; 50: 1230-1240
- 43 Arumugam T, Simeone DM, Van Golen K, Logsdon CD. S100P promotes pancreatic cancer growth, survival, and invasion. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 5356-5364
- 44 Komatsu K, Andoh A, Ishiguro S, Suzuki N, Hunai H, Kobune-Fujiwara Y, Kameyama M, Miyoshi J, Akedo H, Nakamura H. Increased expression of S100A6 (Calcylin), a calcium-binding protein of the S100 family, in human colorectal adenocarcinomas. *Clin Cancer Res* 2000; 6: 172-177
- 45 Brentnall TA, Pan S, Bronner MP, Crispin DA, Mirzaei H, Cooke K, Tamura Y, Nikolskaya T, Jebailey L, Goodlett DR, McIntosh M, Aebersold R, Rabinovitch PS, Chen R. Proteins That Underlie Neoplastic Progression of Ulcerative Colitis. *Proteomics Clin Appl* 2009; 3: 1326-1337
- 46 Genini M, Schwalbe P, Scholl FA, Schäfer BW. Isolation of genes differentially expressed in human primary myoblasts and embryonal rhabdomyosarcoma. *Int J Cancer* 1996; 66: 571-577
- 47 Zuber J, Tchernitsa OI, Hinzmann B, Schmitz AC, Grips M, Hellriegel M, Sers C, Rosenthal A, Schäfer R. A genome-wide survey of RAS transformation targets. *Nat Genet* 2000; 24: 144-152
- 48 彭佳远, 张清福, 秦环龙. 结肠癌发生和发展不同阶段的差异蛋白质组学实验研究. *肿瘤* 2008; 28: 1023-1028
- 49 李里, 彭佳远, 马延磊, 黄龙, 张鹏, 刘伟杰, 秦环龙, 蒋智铭. Transgelin蛋白在人结直肠癌中的表达及其临床意义. *肿瘤* 2009; 29: 765-771
- 50 Yeo M, Kim DK, Park HJ, Oh TY, Kim JH, Cho SW, Paik YK, Hahm KB. Loss of transgelin in repeated bouts of ulcerative colitis-induced colon carcinogenesis. *Proteomics* 2006; 6: 1158-1165
- 51 张迎春, 潘胜武, 贺静. 热休克蛋白与炎症性肠病. *实用医学杂志* 2009; 25: 155-157
- 52 Araki K, Mikami T, Yoshida T, Kikuchi M, Sato Y, Oh-ishi M, Kadera Y, Maeda T, Okayasu I. High expression of HSP47 in ulcerative colitis-associated carcinomas: proteomic approach. *Br J Cancer* 2009; 101: 492-497

Toll样受体与消化系统损伤的研究进展

叶惠惠, 张咏梅

叶惠惠, 张咏梅, 徐州医学院麻醉生理学教研室 江苏省徐州市 221004

江苏省高校自然科学基金资助项目, No. 09KJD310009

徐州医学院院长基金资助项目, No. 09KJZ17

作者贡献分布: 本综述由叶惠惠完成; 张咏梅审核。

通讯作者: 张咏梅, 教授, 221004, 江苏省徐州市淮海西路84号, 徐州医学院麻醉生理学教研室, 麻醉学重点实验室。

zhangym700@sohu.com

收稿日期: 2010-04-25 修回日期: 2010-06-28

接受日期: 2010-07-05 在线出版日期: 2010-08-08

Advances in understanding the relationship between Toll-like receptors and digestive system injury

Hui-Hui Ye, Yong-Mei Zhang

Hui-Hui Ye, Yong-Mei Zhang, Department of Anaesthetic Physiology, Xuzhou Medical College, Xuzhou 221004, Jiangsu Province, China

Supported by: the Natural Science Foundation for Colleges and Universities in Jiangsu Province, No. 09KJD310009; and the President Foundation of Xuzhou Medical College, No. 09KJZ17

Correspondence to: Professor Yong-Mei Zhang, Department of Anaesthetic Physiology, Key Laboratory of Anaesthetic Physiology, Xuzhou Medical College, 84 Huaihai Road, Xuzhou 221004, Jiangsu Province, China. zhangym700@sohu.com

Received: 2010-04-25 Revised: 2010-06-28

Accepted: 2010-07-05 Published online: 2010-08-08

Abstract

Toll-like receptors (TLRs) are cell-surface molecules that play an important role in the host immune response. More and more evidence indicates that TLRs can recognize special pattern molecules to activate certain signal transduction pathways and result in the release of numerous inflammatory mediators and active substances to induce digestive system injury, such as *Helicobacter pylori* infection-induced gastric mucosal injury, alcohol-induced gastritis, alcohol-induced liver injury, acute hemorrhagic necrotizing pancreatitis, hepatic ischemia-reperfusion injury (I/RI), and dextran sodium sulfate (DSS)-induced colitis. Here, we review the advances in understanding the relationship between TLRs and digestive system injury and explore the clinical value of TLRs in the diagnosis and treat-

ment of digestive system diseases.

Key Words: Toll-like receptor; Gastric mucosal injury; Acute hemorrhagic necrotizing pancreatitis; Liver injury; Colitis

Ye HH, Zhang YM. Advances in understanding the relationship between Toll-like receptors and digestive system injury. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(22): 2339-2345

摘要

Toll样受体(Toll-like receptors, TLRs)是近几年来发现的在宿主体内发挥重要免疫应答作用的细胞表面受体分子,越来越多的证据表明TLRs可通过识别特定的模式分子,激活特定的信号转导通路,释放多种炎性介质和活性物质,在消化系统脏器损伤中起着至关重要的作用,如幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *H.pylori*)导致的胃黏膜损伤、酒精性胃炎、酒精性肝损伤、急性出血坏死性胰腺炎、肝缺血-再灌注损伤(ischemia/reperfusion injury, I/RI)、右旋硫酸钠(dextran sodium sulfate, DSS)诱导的结肠炎。本文对TLRs与消化系统脏器损伤的关系进行综述,初步探讨TLRs在消化系统疾病防治上的临床价值。

关键词: Toll样受体; 胃黏膜损伤; 急性出血坏死性胰腺炎; 肝损伤; 结肠炎

叶惠惠, 张咏梅. Toll样受体与消化系统损伤的研究进展. 世界华人消化杂志 2010; 18(22): 2339-2345

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/2339.asp>

0 引言

Toll受体是在研究果蝇胚胎腹背侧体轴形成过程中发现的一种跨膜受体蛋白,为模式识别受体,在哺乳动物中Toll受体称为Toll样受体(Toll-like receptors, TLRs)。目前已发现TLRs家族共有13个成员,其中对TLR2, TLR4的研究最多。当机体受到病原微生物的侵袭时,TLR2主要识别革兰阳性菌的肽聚糖^[1]、磷脂酸、脂蛋白等,而TLR4主要识别革兰阴性菌的脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)^[1,2],以上这些高度保

■背景资料

当消化系统受到病理性损伤时,机体免疫系统可产生一系列反应以保护机体免受进一步损伤,而TLRs作为免疫系统中重要的膜受体,可通过识别特定的模式分子和激活特定的信号转导通路,发挥其固有免疫应答的作用。

■同行评议者

冯志杰, 主任医师, 河北医科大学第二医院消化内科

■ 研发前沿

在消化系统损伤中,TLRs可识别损伤相关分子模式以发挥固有免疫应答作用,但目前研究多着重于TLR4、TLR2,对其他成员的研究相对较少,且所报道的损伤相关分子模式的种类也较局限。

守的分子结构常为一类或一群特定的病原微生物(及其产物)所共有,称为病原相关分子模式(pathogen-associated molecular pattern molecules, PAMPs)。2002年,Matzinger^[3]提出“危险模型(danger model)”,认为当机体收到危险信号时,固有免疫反应更关注于来自周围组织的危险,而非识别外来抗原,为应对潜在危险,细胞会释放内源性配体,启动宿主免疫反应。因此,常将损伤或濒死细胞释放的正常细胞成分或组织损伤后蛋白酶反应并释放的细胞外基质成分称为损伤相关分子模式(damage-associated molecular pattern molecules, DAMPs)^[4]。越来越多的证据支持TLRs作为免疫系统中的重要膜受体,可启动一系列与DAMPs有关的免疫反应^[5-7]。Barsness等^[8]也指出TLR4更倾向于是一种感受危险信号的受体,而不是单纯的模式识别受体。到目前为止发现他的内源性配体主要有高迁移率族蛋白1(high mobility group box 1 protein, HMGB1)^[9]、热休克蛋白60(heat shock protein 60, HSP60)^[10]、纤维蛋白原^[11]、血管紧张素II^[12]、透明质酸^[13]等,TLR2的内源性配体主要有HMGB1^[9]、HSP60^[10]、淀粉体^[14]、透明质酸^[15]、抗磷脂抗体^[16]等。因此,即使机体未受外源微生物的威胁,亦可因为受到非病原微生物损伤而通过TLRs启动系统的炎症反应。TLRs的信号转导通路主要有:依赖髓样分化因子(myeloid differentiation factor, MyD88)的途径和不依赖MyD88的途径。MyD88由含有死亡域的N端、中间区段、含有Toll/IL-1R同源结构域(TIR域)的C端组成,是一种胞内转接蛋白分子,当TLR4的TIR域活化后,MyD88可与TLR4作用,激活下游的NF- κ B, MAPK, I κ B, IRF5信号通路,从而表达炎症细胞因子^[17]; TRIF(TIR domain-containing adaptor inducing IFN- β)是一重要的TIR域受体蛋白,介导不依赖MyD88的信号通路,一方面他通过C端的RHIM(Rip homotypic interaction motif)与RIP1(receptor-interacting protein 1)结合,进一步激活NF- κ B和MAPK信号通路;另一方面,他还可通过TRAF3(TNF receptor-associated factor 3)激活IRF3信号通路,从而诱导I型干扰素等的转录^[17]。研究发现:TLR4, TLR2可在健康大鼠的消化系黏膜上结构性表达,其中TLR4主要在胃和远端结肠上表达,TLR2主要在近端结肠上表达,而MyD88在整个消化系统表达一致^[18]。正常情况下,消化系统的保护机制和损伤机制处于一种动态平衡状态,

不会引起机体病理反应。一旦打破这种平衡,消化系统各脏器就可能出现病理性损伤,表现出临床症状,有时可进一步发展成癌症。其中,免疫系统为保护脏器抵御不同的损伤,可释放多种细胞因子和化学因子,而TLRs又能通过信号转导通路释放大量的炎症因子,因此消化系统损伤必定与TLRs存在关联。我们就近年来有关TLRs及消化系统损伤的相关研究,作如下综述。

1 TLRs参与*H.pylori*导致的胃黏膜损伤

*H.pylori*感染可导致胃黏膜受损,他与胃、十二指肠溃疡病、胃底部腺癌、胃淋巴细胞增生性疾病如淋巴瘤等疾病密切相关。*H.pylori*可引起机体发生特异性的体液免疫及细胞免疫,这与他的毒力因子有关。细胞空泡毒素(vacuolating cytotoxin, VacA)是*H.pylori*十分重要的致病因子,是细菌毒性的重要标志之一,他通过干扰细胞内离子转运蛋白即空泡型ATP酶的功能而起作用,此外,还可作用于Na⁺-K⁺-ATP酶,抑制该酶的活性造成细胞水肿。细胞毒素相关蛋白(cytotoxin-associated protein A, CagA)常与VacA同时出现,他具有高度的免疫原性,能引起强烈的免疫反应,且与毒性增加有关。*H.pylori*还能产生一种在发病机制中起作用的尿素酶,他能将尿素分解为CO₂和NH₃, NH₃可以中和胃内的盐酸,可使*H.pylori*置身于强酸环境中而不致遭到破坏,从而使*H.pylori*能在胃内定居。HSP可以激活细胞免疫反应,刺激 γ δ T细胞,从而损伤胃组织,产生交叉免疫反应,引起炎症损伤,参与尿素酶的合成和转运及分子的稳定。*H.pylori*的黏附素、LPS、分泌的趋化因子以及其他类似于氧化酶、过氧化氢酶等的因子均可引起*H.pylori*感染所致的临床症状。

人类胃上皮细胞AGS可结构性表达TLR4^[19],而*H.pylori*感染可诱导TLR4的基因转录^[20]。蛋白免疫印迹结果显示当*H.pylori*与胃癌MKN 45胃黏膜上皮细胞一起孵育6 h后,I型*H.pylori*可增加糖基化TLR4水平,而II型*H.pylori*却没有这种作用,这说明CagA可上调TLR4的表达进而促进胃癌的发生^[19]。*H.pylori*致病的一个先决条件是在胃内长期定植。为了研究TLRs可否作为*H.pylori*的一种黏合机制,研究者们采用扫描电子显微镜、流式细胞仪细菌测定技术发现,与转染了TLR2及未转染TLR4的CHO细胞株相比,转染TLR4的CHO细胞株的黏

附作用显著增强, 可见*H.pylori*可利用TLR4作为一种受体以黏附到宿主细胞表面^[19]. Uno等^[21]在正常小鼠胃黏膜细胞GSM 06上观察到: TLR2可协同TLR4增加*H.pylori*感染后iNOS和NO的表达, *H.pylori* LPS可上调TLR2的表达并激活其下游NF- κ B信号转导通路, 而给予TLR4 siRNA干扰后, TLR2表达下降, NF- κ B信号转导通路的活化被抑制, 提示在GSM 06细胞上, TLR2的诱导可能来自TLR4与*H.pylori* LPS的交互作用. 同时, TLRs基因的多态性与*H.pylori*感染导致的临床疾病亦有关联. 研究发现, TLR4 Asp299Gly和Thr399Ileu的基因多态性是*H.pylori*感染者胃癌和癌前病变的易感因素^[22], 而TLR4+3725G/C的基因多态性是日本*H.pylori*感染者易发生萎缩性胃炎的高危因素^[23].

在胃黏膜受损前后, TLRs的分布亦可出现变化. 有研究人员报道在无*H.pylori*感染时, TLR4主要在胃体表达, 而感染后则在胃窦、胃体高度表达^[24]. 通过荧光共聚焦显微镜发现TLR4在*H.pylori*感染前后均分布于胃上皮的顶端和基底外侧, 而TLR5, TLR9在感染前分布与TLR4相似, 但在感染后只出现于基底外侧, 可见TLR5, TLR9的亚细胞分布并非是静止的, 而是一个似乎由*H.pylori*感染所调节的动态过程^[25]. 这提示了TLRs在宿主对*H.pylori*感染的固有免疫中可能发挥着“哨兵”的作用.

2 TLR4对酒精诱导的胃黏膜损伤起保护作用

酒精对胃黏膜的损伤包括急性及慢性两方面, 前者主要表现为急性糜烂性胃炎甚至溃疡, 与非甾体类抗炎药协同作用对胃黏膜的损伤更为显著, 后者主要表现为胃肠黏膜糜烂伴有上皮代偿性增生, 时间较长可出现肠上皮化生、上皮不典型增生, 甚至癌变. 急性酗酒所致的急性糜烂性胃炎是临床上常见的上消化道出血原因之一, 了解酒精对胃黏膜的损伤具有重要意义. Zhang等^[26]利用普通近交系小鼠C57BL/6J、TLR4野生型小鼠C3H/HeOuJ、TLR4突变型小鼠C3H/HeJ进行酒精灌胃以建立酒精导致的胃黏膜损伤模型, 4 h后将小鼠处死发现TLR4信号被激活, C3H/HeJ小鼠胃黏膜损伤程度重于C3H/HeOuJ小鼠, 同时环氧酶-2(cyclooxygenase-2, COX-2)、前列腺素E2(prostaglandin E2, PGE2)、巨噬细胞、巨噬细胞炎性蛋白-2(macrophage-inflammatory protein-2, MIP-2)的表达仅在C3H/HeOuJ小鼠胃

黏膜上增加, 并由此推断出TLR4通过诱导表达COX-2和产生PGE2对酒精诱导的胃黏膜损伤起保护作用.

3 TLR4促进酒精性肝病的发生

饮酒后乙醇有90%-95%在肝内代谢, 因此可对肝产生很大的损伤, 且损伤程度与乙醇剂量、接触时间呈正相关^[27]. 乙醇可导致胞质内毒素水平增高^[27], 而内毒素通过与CD14的相互作用引起肝损伤, 但是CD14并不含有跨膜序列, 不能直接诱导细胞内信号转导通路导致细胞产生毒性反应, 因此必定存在一个跨膜受体蛋白能介导这一过程, 研究人员发现TLR4即可参与这个过程^[27-30], 且这一过程并不依赖于MyD88^[29]. 通过激光扫描共焦显微镜观察到在给予酒精的实验组中, TLR4阳性细胞数明显多于对照组, 且8 wk的免疫荧光强度>4 wk, RT-PCR结果也显示TLR4 mRNA水平高于对照组^[28]. Gustot等^[30]发现给予小鼠TLR4的配体LPS后, 酒精性肝损伤模型小鼠肝脏上TNF- α mRNA的表达显著强于对照组小鼠肝脏上TNF- α mRNA的表达, 提示酒精可增加肝脏对细菌产物所致炎症的敏感性. 由细胞色素P450和烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, NADP)复合物所释放的氧自由基促进酒精对肝的损伤, 但是研究发现在TLR4基因缺陷型小鼠体上, 细胞色素P450和NADP复合物的表达和激活显著减少, 但在MyD88缺陷型小鼠体上却未有这种情况出现^[29]. 在TLR4基因缺陷型小鼠体上, 酒精导致的肝损害可显著减弱, TNF- α 表达也未见增加^[28]. 以上研究结果说明TLR4可促进酒精性肝病的发生, 但并没有通过MyD88信号通路发挥作用.

4 TLRs参与急性出血坏死性胰腺炎导致的肝损伤

急性出血坏死性胰腺炎常继发感染、腹膜炎、休克等多种并发症, 病情险恶, 死亡率高. 引起胰腺炎的病因常有胆道疾病、过量饮酒、十二指肠液反流、创伤因素、胰腺血液循环障碍、药物因素等. 此病常可导致多器官功能障碍综合征, 对肝脏的损害常表现为肝功能障碍, 甚至导致肝功能衰竭^[31]. Zhang等^[31]利用大鼠进行实验, 发现急性出血坏死性胰腺炎可导致肝内谷丙转氨酶、谷草转氨酶浓度显著增高, 可见肝功能严重受损. 在抑制TLR2/4 mRNA表达后, NO浓度增加, TNF- α 浓度降低, 同时肝组织损伤程度

■相关报道

TLRs通过识别病原相关分子模式对消化系统疾病产生免疫调节作用, 并经科学研究证实TLRs及其信号转导通路在胃黏膜损伤、肝脏损伤、肠道损伤等消化系统损伤中发挥重要作用.

■创新盘点

本文综合众多学者的研究结果,更全面地阐述在消化系损伤中,TLRs可识别损伤相关分子模式以发挥固有免疫应答作用,以进一步说明TLRs在消化系统疾病中的多方面作用。

明显降低。可见TLR2/4 mRNA的表达在急性出血坏死性胰腺炎导致肝损伤的发病、发展中起重要作用。

5 TLR4参与肝脏缺血-再灌注损伤

由于肝脏的血液供应丰富,对缺血敏感,耐受缺血能力差,肝移植术后不可避免会产生缺血-再灌注损伤(ischemia/reperfusion injury, I/RI)。肝脏I/RI后由于活性氧生成增多、诱导型一氧化氮合酶增加、炎性细胞因子释放、细胞黏附分子表达增加,引起Kupffer细胞激活、肝窦上皮细胞凋亡及中性粒细胞汇聚^[32]。Kupffer细胞可表达TLR4、MD-2 mRNA和蛋白,肝移植后由于肝脏发生I/RI,他们的表达显著增加^[33]。用敲除TLR4基因(TLR4^{-/-})的小鼠制备模型,结果发现来自TLR4^{-/-}供体小鼠的肝脏不管是被移植入野生型小鼠还是TLR4^{-/-}小鼠, I/RI都得到了极大改善,且伴随以下指标的变化: (1)肝内IFN- γ 诱导蛋白10(interferon-gamma-inducible protein 10, CXCL 10)、细胞间黏附分子-1(intercellular adhesion molecule, ICAM-1)表达降低、局部中性粒细胞和CD4⁺ T细胞浸润减弱; (2)TNF- α 、IFN- γ 、IL-1 β 、IL-2等Th1细胞因子减少,而IL-4、IL-10等Th2细胞因子表达显著增加; (3)肝内细胞凋亡减少, caspase-3活性降低,抗氧化剂HO-1上调^[34]。TLR4不仅能通过内毒素LPS参与肝脏I/RI, Zhai等^[35]发现TLR4还能通过他的内源性配体热敏感蛋白分子使巨噬细胞活性增高,释放TNF- α 。以上研究均说明TLR4参与肝脏I/RI^[33-38],且TLR4^{-/-}还与许多介导I/RI的通路有关: (1)抑制凋亡细胞活性、增加抗氧化蛋白表达、降低活性氧浓度^[34]; (2)抑制线粒体后凋亡、影响凋亡复合体的形成^[39]; (3)可能通过p38有丝分裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)^[40]或信号转导因子和转录激活因子6(signal transducer and activator of transcription 6, STAT6)^[41]增强抗炎/抗凋亡通路; (4)可能通过减弱NF- κ B^[42]或IRF3^[43]信号通路抑制各种炎性细胞因子的释放。

6 TLR4可促进坏死性小肠结肠炎病情的恶化

坏死性小肠结肠炎是新生儿死于消化系统疾病的重要原因^[44],以肠出血、坏死、穿孔为主要临床特征,临床进展急骤,可迅速发展成全身性败血症、多器官功能衰竭,甚至死亡,在美国病死率高达15%^[45]。当发生坏死性小肠结肠炎时,肠

黏膜TLR4表达可增加,进一步给予低氧刺激后,TLR4 mRNA和蛋白表达增加,坏死性小肠结肠炎病情恶化^[46]。此外研究发现给予小鼠窒息处理后,TLR4野生小鼠肠腔中细菌的毒性作用明显增强^[47],坏死性小肠结肠炎病情的恶化程度在TLR4野生小鼠显著强于TLR4突变小鼠^[47,48]。细胞黏附蛋白FAK在调节细胞凋亡、迁移、增殖方面起着重要作用^[48],他与MyD88之间存在交互作用^[49],Leaphart等^[46]发现在坏死性小肠结肠炎的恶化过程中,TLR4可促进FAK的磷酸化,导致细胞凋亡增加,细胞增殖和迁移能力降低,从而诱导细胞损伤,破坏肠道的修复机制。以上研究结果说明TLR4可促进坏死性小肠结肠炎病情的恶化。

7 TLRs参与DSS诱导的结肠炎

肠道内细菌多种多样,不仅存在致病菌,还有许多在正常情况下维持肠道功能的共生微生物,因此肠道免疫系统常面临着双重压力,既要保护宿主抵抗致病菌感染,还要维持机体对共生微生物的正常反应。DSS可诱导小肠上皮细胞凋亡,抑制细胞分化,引起上皮损伤、急慢性炎症细胞渗透,导致结肠炎^[50,51]。在DSS诱导的急性结肠炎小鼠模型上,TLR4^{-/-}、MyD88^{-/-}小鼠的急性炎症细胞浸润情况比对照组小鼠轻,但是肠道出血出现早且情况更严重,肠系膜淋巴结也易聚积革兰阴性菌^[50]。由单核细胞、巨噬细胞表达的MIP-2能发挥趋化作用^[52,53],使中性粒细胞聚集至小肠黏膜。在TLR4^{-/-}、MyD88^{-/-}小鼠黏膜固有层上可见MIP-2表达减少,中性粒细胞聚集程度减弱,说明TLRs信号可对MIP-2进行调节^[50,52]。以上实验结果提示了TLR4通过MyD88信号通路对急性肠损伤起着重要作用。脊椎蛋白2(Mindin)作为细胞外基质蛋白,是一种模式识别受体,可通过整合素和致病微生物启动固有免疫反应^[54]。Guleng等^[55]发现在DSS诱导的结肠炎中, Mindin mRNA表达增加, NF- κ B信号转导通路激活,而其中起介导作用的为TLR9,这提示了TLRs不仅自身可发挥固有免疫反应作用,还能间接地帮助其他具有固有免疫反应功能的物质协同促进结肠炎的发生发展。

8 结论

TLRs及其信号转导通路在胃黏膜损伤、肝脏损伤、肠道损伤等消化系统损伤中发挥重要的作用。但目前对此方面的研究多着重于TLR4,

TLR2. 随着对TLRs进一步的认识, 其他TLRs也将成为这一研究的热点. 并且, 通过影响TLRs信号通路对消化系损伤进行治疗也将成为现实.

9 参考文献

- Massonnet B, Delwail A, Ayrault JM, Chagneau-Derrode C, Lecron JC, Silvain C. Increased immunoglobulin A in alcoholic liver cirrhosis: exploring the response of B cells to Toll-like receptor 9 activation. *Clin Exp Immunol* 2009; 158: 115-124
- Eckert M, Wittmann I, Rölinghoff M, Gessner A, Schnare M. Endotoxin-induced expression of murine bactericidal permeability/increasing protein is mediated exclusively by toll/IL-1 receptor domain-containing adaptor inducing IFN-beta-dependent pathways. *J Immunol* 2006; 176: 522-528
- Matzinger P. The danger model: a renewed sense of self. *Science* 2002; 296: 301-305
- Tsung A, Klune JR, Zhang X, Jeyabalan G, Cao Z, Peng X, Stolz DB, Geller DA, Rosengart MR, Billiar TR. HMGB1 release induced by liver ischemia involves Toll-like receptor 4 dependent reactive oxygen species production and calcium-mediated signaling. *J Exp Med* 2007; 204: 2913-2923
- Wakefield D, Gray P, Chang J, Di Girolamo N, McCluskey P. The role of PAMPs and DAMPs in the pathogenesis of acute and recurrent anterior uveitis. *Br J Ophthalmol* 2010; 94: 271-274
- Bianchi ME. DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. *J Leukoc Biol* 2007; 81: 1-5
- Erridge C. Endogenous ligands of TLR2 and TLR4: agonists or assistants? *J Leukoc Biol* 2010; 87: 989-999
- Barsness KA, Arcaroli J, Harken AH, Abraham E, Banerjee A, Reznikov L, McIntyre RC. Hemorrhage-induced acute lung injury is TLR-4 dependent. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2004; 287: R592-R599
- Devaraj S, Dasu MR, Park SH, Jialal I. Increased levels of ligands of Toll-like receptors 2 and 4 in type 1 diabetes. *Diabetologia* 2009; 52: 1665-1668
- de Graaf R, Kloppenburg G, Kitslaar PJ, Bruggeman CA, Stassen F. Human heat shock protein 60 stimulates vascular smooth muscle cell proliferation through Toll-like receptors 2 and 4. *Microbes Infect* 2006; 8: 1859-1865
- Hodgkinson CP, Patel K, Ye S. Functional Toll-like receptor 4 mutations modulate the response to fibrinogen. *Thromb Haemost* 2008; 100: 301-307
- Ji Y, Liu J, Wang Z, Liu N. Angiotensin II induces inflammatory response partly via toll-like receptor 4-dependent signaling pathway in vascular smooth muscle cells. *Cell Physiol Biochem* 2009; 23: 265-276
- Gariboldi S, Palazzo M, Zanolibio L, Salleri S, Sommariva M, Sfondrini L, Cavicchini S, Balsari A, Rumio C. Low molecular weight hyaluronic acid increases the self-defense of skin epithelium by induction of beta-defensin 2 via TLR2 and TLR4. *J Immunol* 2008; 181: 2103-2110
- Tükel C, Wilson RP, Nishimori JH, Pezeshki M, Chromy BA, Bäuml AJ. Responses to amyloids of microbial and host origin are mediated through toll-like receptor 2. *Cell Host Microbe* 2009; 6: 45-53
- Scheibner KA, Lutz MA, Boodoo S, Fenton MJ, Powell JD, Horton MR. Hyaluronan fragments act as an endogenous danger signal by engaging TLR2. *J Immunol* 2006; 177: 1272-1281
- Satta N, Dunoyer-Geindre S, Reber G, Fish RJ, Boehlen F, Kruithof EK, de Moerloose P. The role of TLR2 in the inflammatory activation of mouse fibroblasts by human antiphospholipid antibodies. *Blood* 2007; 109: 1507-1514
- Lu YC, Yeh WC, Ohashi PS. LPS/TLR4 signal transduction pathway. *Cytokine* 2008; 42: 145-151
- Ortega-Cava CF, Ishihara S, Rumi MA, Kawashima K, Ishimura N, Kazumori H, Udagawa J, Kadowaki Y, Kinoshita Y. Strategic compartmentalization of Toll-like receptor 4 in the mouse gut. *J Immunol* 2003; 170: 3977-3985
- Su B, Ceponis PJ, Lebel S, Huynh H, Sherman PM. Helicobacter pylori activates Toll-like receptor 4 expression in gastrointestinal epithelial cells. *Infect Immun* 2003; 71: 3496-3502
- Zhou C, Ma FZ, Deng XJ, Yuan H, Ma HS. Lactobacilli inhibit interleukin-8 production induced by Helicobacter pylori lipopolysaccharide-activated Toll-like receptor 4. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 5090-5095
- Uno K, Kato K, Atsumi T, Suzuki T, Yoshitake J, Morita H, Ohara S, Kotake Y, Shimosegawa T, Yoshimura T. Toll-like receptor (TLR) 2 induced through TLR4 signaling initiated by Helicobacter pylori cooperatively amplifies iNOS induction in gastric epithelial cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2007; 293: G1004-G1012
- Achyut BR, Ghoshal UC, Moorchung N, Mittal B. Association of Toll-like receptor-4 (Asp299Gly and Thr399Ileu) gene polymorphisms with gastritis and precancerous lesions. *Hum Immunol* 2007; 68: 901-907
- Hishida A, Matsuo K, Goto Y, Mitsuda Y, Hiraki A, Naito M, Wakai K, Tajima K, Hamajima N. Toll-like receptor 4 +3725 G/C polymorphism, Helicobacter pylori seropositivity, and the risk of gastric atrophy and gastric cancer in Japanese. *Helicobacter* 2009; 14: 47-53
- Asahi K, Fu HY, Hayashi Y, Eguchi H, Murata H, Tsujii M, Tsuji S, Tanimura H, Kawano S. Helicobacter pylori infection affects Toll-like receptor 4 expression in human gastric mucosa. *Hepatogastroenterology* 2007; 54: 1941-1944
- Schmausser B, Andrusis M, Endrich S, Lee SK, Josenhans C, Müller-Hermelink HK, Eck M. Expression and subcellular distribution of toll-like receptors TLR4, TLR5 and TLR9 on the gastric epithelium in Helicobacter pylori infection. *Clin Exp Immunol* 2004; 136: 521-526
- Zhang Y, Chen H, Yang L. Toll-like receptor 4 participates in gastric mucosal protection through Cox-2 and PGE(2). *Dig Liver Dis* 2010; 42: 472-476
- Zuo G, Gong J, Liu C, Wu C, Li S, Dai L. Synthesis of Toll-like receptor 4 in Kupffer cells and its role in alcohol-induced liver disease. *Chin Med J (Engl)* 2003; 116: 297-300
- Uesugi T, Froh M, Arteel GE, Bradford BU, Thurman RG. Toll-like receptor 4 is involved in the

■应用要点

本文提示TLRs可为治疗消化系统损伤提供新的药物靶点, 扩展了临床上消化系统疾病的治疗途径.

■同行评价

本文内容全面, 参考文献引用合理, 具有一定的理论价值。

- mechanism of early alcohol-induced liver injury in mice. *Hepatology* 2001; 34: 101-108
- 29 Hritz I, Mandrekar P, Velayudham A, Catalano D, Dolganiuc A, Kodys K, Kurt-Jones E, Szabo G. The critical role of toll-like receptor (TLR) 4 in alcoholic liver disease is independent of the common TLR adapter MyD88. *Hepatology* 2008; 48: 1224-1231
- 30 Gustot T, Lemmers A, Moreno C, Nagy N, Quertinmont E, Nicaise C, Franchimont D, Louis H, Devière J, Le Moine O. Differential liver sensitization to toll-like receptor pathways in mice with alcoholic fatty liver. *Hepatology* 2006; 43: 989-1000
- 31 Zhang L, Wu HS, Chen Y, Guo XJ, Wang L, Wang CY, Zhang JH, Tian Y. Role of nitric oxide in Toll-like receptor 2 and 4 mRNA expression in liver of acute hemorrhagic necrotizing pancreatitis rats. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 485-488
- 32 Fondevila C, Busuttil RW, Kupiec-Weglinski JW. Hepatic ischemia/reperfusion injury—a fresh look. *Exp Mol Pathol* 2003; 74: 86-93
- 33 Peng Y, Gong JP, Liu CA, Li XH, Gan L, Li SB. Expression of toll-like receptor 4 and MD-2 gene and protein in Kupffer cells after ischemia-reperfusion in rat liver graft. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 2890-2893
- 34 Shen XD, Ke B, Zhai Y, Gao F, Tsuchihashi S, Lassman CR, Busuttil RW, Kupiec-Weglinski JW. Absence of toll-like receptor 4 (TLR4) signaling in the donor organ reduces ischemia and reperfusion injury in a murine liver transplantation model. *Liver Transpl* 2007; 13: 1435-1443
- 35 Zhai Y, Qiao B, Shen XD, Gao F, Busuttil RW, Cheng G, Platt JL, Volk HD, Kupiec-Weglinski JW. Evidence for the pivotal role of endogenous toll-like receptor 4 ligands in liver ischemia and reperfusion injury. *Transplantation* 2008; 85: 1016-1022
- 36 Shen XD, Ke B, Zhai Y, Gao F, Busuttil RW, Cheng G, Kupiec-Weglinski JW. Toll-like receptor and heme oxygenase-1 signaling in hepatic ischemia/reperfusion injury. *Am J Transplant* 2005; 5: 1793-1800
- 37 Jin X, Wang L, Wu HS, Zhang L, Wang CY, Tian Y, Zhang JH. N-acetylcysteine inhibits activation of toll-like receptor 2 and 4 gene expression in the liver and lung after partial hepatic ischemia-reperfusion injury in mice. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2007; 6: 284-289
- 38 Ellett JD, Evans ZP, Atkinson C, Schmidt MG, Schnellmann RG, Chavin KD. Toll-like receptor 4 is a key mediator of murine steatotic liver warm ischemia/reperfusion injury. *Liver Transpl* 2009; 15: 1101-1109
- 39 Antoku K, Maser RS, Scully WJ Jr, Delach SM, Johnson DE. Isolation of Bcl-2 binding proteins that exhibit homology with BAG-1 and suppressor of death domains protein. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 286: 1003-1010
- 40 Amersi F, Shen XD, Anselmo D, Melinek J, Iyer S, Southard DJ, Katori M, Volk HD, Busuttil RW, Buelow R, Kupiec-Weglinski JW. Ex vivo exposure to carbon monoxide prevents hepatic ischemia/reperfusion injury through p38 MAP kinase pathway. *Hepatology* 2002; 35: 815-823
- 41 Shen XD, Ke B, Zhai Y, Gao F, Anselmo D, Lassman CR, Busuttil RW, Kupiec-Weglinski JW. Stat4 and Stat6 signaling in hepatic ischemia/reperfusion injury in mice: HO-1 dependence of Stat4 disruption-mediated cytoprotection. *Hepatology* 2003; 37: 296-303
- 42 Wang H, Li ZY, Wu HS, Wang Y, Jiang CF, Zheng QC, Zhang JX. Endogenous danger signals trigger hepatic ischemia/reperfusion injury through toll-like receptor 4/nuclear factor-kappa B pathway. *Chin Med J (Engl)* 2007; 120: 509-514
- 43 Zhai Y, Shen XD, O'Connell R, Gao F, Lassman C, Busuttil RW, Cheng G, Kupiec-Weglinski JW. Cutting edge: TLR4 activation mediates liver ischemia/reperfusion inflammatory response via IFN regulatory factor 3-dependent MyD88-independent pathway. *J Immunol* 2004; 173: 7115-7119
- 44 Anand RJ, Leapheart CL, Mollen KP, Hackam DJ. The role of the intestinal barrier in the pathogenesis of necrotizing enterocolitis. *Shock* 2007; 27: 124-133
- 45 Miniño AM, Heron MP, Murphy SL, Kochanek KD. Deaths: final data for 2004. *Natl Vital Stat Rep* 2007; 55: 1-119
- 46 Leapheart CL, Cavallo J, Gribar SC, Cetin S, Li J, Branca MF, Dubowski TD, Sodhi CP, Hackam DJ. A critical role for TLR4 in the pathogenesis of necrotizing enterocolitis by modulating intestinal injury and repair. *J Immunol* 2007; 179: 4808-4820
- 47 Jilling T, Simon D, Lu J, Meng FJ, Li D, Schy R, Thomson RB, Soliman A, Arditi M, Caplan MS. The roles of bacteria and TLR4 in rat and murine models of necrotizing enterocolitis. *J Immunol* 2006; 177: 3273-3282
- 48 Basson MD, Sanders MA, Gomez R, Hatfield J, Vanderheide R, Thamilselvan V, Zhang J, Walsh MF. Focal adhesion kinase protein levels in gut epithelial motility. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2006; 291: G491-G499
- 49 Semaan N, Alsaleh G, Gottenberg JE, Wachsmann D, Sibia J. Etk/BMX, a Btk family tyrosine kinase, and Mal contribute to the cross-talk between MyD88 and FAK pathways. *J Immunol* 2008; 180: 3485-3491
- 50 Fukata M, Michelsen KS, Eri R, Thomas LS, Hu B, Lukasek K, Nast CC, Lechago J, Xu R, Naiki Y, Soliman A, Arditi M, Abreu MT. Toll-like receptor-4 is required for intestinal response to epithelial injury and limiting bacterial translocation in a murine model of acute colitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2005; 288: G1055-G1065
- 51 Reber SO, Obermeier F, Straub RH, Falk W, Neumann ID. Chronic intermittent psychosocial stress (social defeat/overcrowding) in mice increases the severity of an acute DSS-induced colitis and impairs regeneration. *Endocrinology* 2006; 147: 4968-4976
- 52 Fan J, Malik AB. Toll-like receptor-4 (TLR4) signaling augments chemokine-induced neutrophil migration by modulating cell surface expression of chemokine receptors. *Nat Med* 2003; 9: 315-321
- 53 Mihaescu A, Santen S, Jeppsson B, Thorlacius H. p38 Mitogen-activated protein kinase signalling regulates vascular inflammation and epithelial barrier dysfunction in an experimental model

- of radiation-induced colitis. *Br J Surg* 2010; 97: 226-234
- 54 Li Y, Cao C, Jia W, Yu L, Mo M, Wang Q, Huang Y, Lim JM, Ishihara M, Wells L, Azadi P, Robinson H, He YW, Zhang L, Mariuzza RA. Structure of the F-spondin domain of mindin, an integrin ligand and pattern recognition molecule. *EMBO J* 2009; 28: 286-297
- 55 Guleng B, Lian YM, Ren JL. Mindin is upregulated during colitis and may activate NF-kappaB in a TLR-9 mediated manner. *World J Gastroenterol* 2010; 16: 1070-1075

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 •

2008 年内科学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.

循环肿瘤细胞检测的临床应用

余 锋, 张 妤, 施乐华, 殷正丰

■背景资料

肿瘤转移是一个多阶段、多步骤的复杂过程. 存在于原发瘤和转移瘤之外的肿瘤细胞统称为游离肿瘤细胞(CTCs). 其中进入血流的又称循环肿瘤细胞(CTCs). 近年来, 随着敏感分子技术的发展, 使得分离、计数外周血CTCs成为可能. 目前CTCs的临床意义在乳腺癌、结直肠癌、前列腺癌等多种肿瘤中逐渐得到肯定.

余锋, 张妤, 施乐华, 殷正丰, 中国人民解放军第二军医大学东方肝胆外科医院 上海市 200438

余锋, 中国人民解放军第101中心医院肝胆外科 江苏省无锡市 214044

国家863基金资助项目, No. 2007AA02Z461

国家传染病重大专项基金资助项目, No. 2008ZX10002-021

国家自然科学基金资助项目, No. 30672002, 30772513

作者贡献分布: 本文综述由余锋与张妤完成; 施乐华与殷正丰审校、修改、定稿.

通讯作者: 殷正丰, 教授, 200438, 上海市, 中国人民解放军第二军医大学东方肝胆外科医院分子肿瘤实验室.

yinzfk@yahoo.com.cn

电话: 021-81875351

收稿日期: 2010-04-28 修回日期: 2010-06-30

接受日期: 2010-07-05 在线出版日期: 2010-08-08

Detection of circulating tumor cells: recent progress in clinical applications

Feng Yu, Yu Zhang, Le-Hua Shi, Zheng-Feng Yin

Feng Yu, Yu Zhang, Le-Hua Shi, Zheng-Feng Yin, Eastern Hepatobiliary Surgery Hospital, the Second Military Medical University, Shanghai 200438, China

Feng Yu, Department of Hepatobiliary Surgery, 101th Hospital of Chinese PLA, Wuxi 214044, Jiangsu Province, China

Supported by: the National High Technology Research and Development Program of China (863 Program), No. 2007AA02Z461; the National Key Project for Infectious Disease Research, No. 2008ZX10002-021; and National Natural Science Foundation of China, Nos. 30672002 and 30772513

Correspondence to: Professor Zheng-Feng Yin, Laboratory of Molecular Oncology, Eastern Hepatobiliary Surgery Hospital, the Second Military Medical University, Shanghai 200438, China. yinzfk@yahoo.com.cn

Received: 2010-04-28 Revised: 2010-06-30

Accepted: 2010-07-05 Published online: 2010-08-08

Abstract

During the process of cancer metastasis, some cancer cells, termed circulating tumor cells (CTCs), are liberated from primary tumor tissue. New techniques have been developed to isolate and characterize these cells. The early detection of CTCs represents not only a powerful diagnostic tool for cancer but also an important predictive and prognostic marker for evaluation of disease progression and treatment response. In this article, we discuss the clinical utility of CTCs detection in breast, prostate, and colon cancer, and explore the future directions in this field.

Key Words: Circulating tumor cell; Breast cancer;

Prostate cancer; Colorectal cancer

Yu F, Zhang Y, Shi LH, Yin ZF. Detection of circulating tumor cells: recent progress in clinical applications. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(22): 2346-2349

摘要

循环肿瘤细胞是存在于外周血中的少量恶性细胞, 起源于原发肿瘤或转移灶. 新技术的发展使分离和鉴定循环肿瘤细胞成为可能. 循环肿瘤细胞检测已被认为是一个可靠的预后指标. 在治疗过程中随时预测疾病的进展和患者的存活时间. 而系列监测结果能够更早地为医生提供更多的信息, 从而能够制定更明确的治疗方案. 本文综述了循环肿瘤细胞检测在乳腺癌、前列腺癌和结直肠癌中的临床应用, 希望帮助读者了解循环肿瘤细胞检测的适应证、临床意义和存在的问题.

关键词: 循环肿瘤细胞; 乳腺癌; 前列腺癌; 结直肠癌

余锋, 张妤, 施乐华, 殷正丰. 循环肿瘤细胞检测的临床应用. 世界华人消化杂志 2010; 18(22): 2346-2349

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/2346.asp>

0 引言

目前认为, 肿瘤微转移灶起源于侵入循环中的肿瘤细胞. 因此, 循环肿瘤细胞(circulating tumor cells, CTCs)可能是肿瘤远处转移的一种标志. 近年来, 随着敏感分子技术的发展, 使得分离、计数外周血CTCs成为可能. 在疾病早期阶段, CTCs可能有助于良、恶性肿瘤的鉴别, 转移风险的预测和判断. 在疾病进展期, CTCs或许可以提供重要的预后信息, 以及帮助医生监测治疗效果. 而且, CTCs可能反映肿瘤特征, 能够指导治疗方案的制定, 并且可以作为靶向治疗的靶标. 现有的CTCs分离、检测技术方法较多, 各有利弊. 富集方法通常是基于CTCs的物理性质(密度和大小)或免疫磁性, 包括梯度离心法、过滤法、免疫磁性分选法. 检测方法包括免疫学技术、基于RT-PCR技术、酶联免疫斑点(ELISPOT)技术和CTCs芯片技术^[1]. 其中免疫

■同行评议者

秦建民, 副教授, 上海中医药大学附属普陀医院肝胆外科

磁性分选法是目前最常用的CTCs富集方法. 而美国Veridex公司研发的专有技术CellSearch™ System已成为一个标准实验方案. 该系统的方法学主要步骤包括: 上皮细胞黏附因子(epithelial cells adhesion molecule, EpCAM)抗体磁珠用于捕获CTCs, 细胞内角蛋白荧光抗体(CK-PE)识别上皮细胞、白细胞荧光抗体(CD45-APC)识别白细胞以及DAPI荧光核染料用于生成细胞图像. 符合肿瘤细胞学形态特征并且CK-PE+、DAPI+和CD45-的细胞被定义为CTCs. 该检测可自动分选从上皮性肿瘤脱落后进入血液中的肿瘤细胞^[2,3]. 只需要7.5 mL血液样本, 即可从400多亿血细胞中检测到一个CTCs. 2004年, CellSearch™ System已被美国食品药物管理局(Food and Drug Administration, FDA)批准进入临床, 应用于预测转移性乳腺癌(metastatic breast cancer, MBC)、前列腺癌和结直肠癌的无进展生存时间(progression-free survival, PFS)和总存活时间(overall survival, OS). 本文就有关临床应用情况进行综述, 希望帮助读者了解CTCs检测的适应征和临床意义, 以及有待解决的问题.

1 乳腺癌

Cristofanilli等^[4]的研究涉及177名转移性MBC患者, 在一种新的化疗方案开始前和完成后检测外周血CTCs. 随访结果显示, 治疗前CTCs数为5个/7.5 mL(以下相同)的阈值可用来预测患者的存活时间. CTCs \geq 5个比 $<$ 5个具有更短的平均无进展生存时间(2.7 mo vs 7.0 mo, $P<0.001$), 前者的总生存时间比后者也显著缩短(10.1 mo vs 18 mo, $P<0.001$). 而且, 接受治疗后4 wk内CTCs数下降, 与较长的无进展生存时间和总生存时间相关^[5], 因此也可预测生存时间. 多变量分析考虑了许多预后因子, 如激素受体状态等, 结果表明治疗前CTCs数量是预测无进展生存时间和总生存时间最有力的因子. Dawood等^[6]在一项大型回顾性研究中证实了CTCs对于MBC患者预后的重要意义. 研究发现, 38.4%患者CTCs \geq 5较CTCs $<$ 5患者的中位总生存时间短(15 mo vs 28.3 mo, $P<0.0001$). 这一相关性不依赖于激素水平、人类表皮生长因子受体-2型(human epidermal growth factor receptor 2, HER-2/neu)基因表达水平和转移灶位置. Budd等^[7]比较了CTCs计数和影像学检查对疾病进展和总生存时间的预测作用. 138例已确诊的MBC患者在接受首次治疗前、治疗后4 wk和10 wk分别检测CTCs. 在所有影像学诊断为早期MBC患者中, CTCs \geq 5患

者的生存时间与CTCs $<$ 5患者有显著差异(15.3 mo vs 26.9 mo, $P = 0.038$). 而影像学诊断为进展期但CTCs数较少的患者比CTCs数量多的患者也有更长的生存时间(19.9 mo vs 6.4 mo, $P = 0.0039$). 因此, CTCs检测可以提供影像学检查以外的诊断信息.

虽然现有的数据支持CTCs作为MBC的一个预后因子, 并且FDA已批准CellSearch™ System用于预测MBC患者生存时间, 但基于CTCs检测结果制定的治疗方案是否能改善疗效尚不明确. 目前美国国家癌症研究中心西南协作组正在针对这一问题进行临床试验研究(Southwest Oncology Group, SWOG 0500), 计划招募500例已接受一次化疗的MBC患者进行CTCs检测. 将其中CTCs计数持续偏高(CTCs $>$ 5)的患者随机分为继续原有方案治疗组和改换其他方案治疗组, 观察CTCs对不同治疗方案的反应. 有关研究结果将最终决定CTCs能否用于指导MBC治疗方案的制定. 因为美国临床肿瘤协会2007年关于MBC肿瘤标志物指南中指出, CTCs检测不能用于诊断MBC或更改治疗方案^[8].

2 前列腺癌

Shaffer等^[9]发现超过65%转移性前列腺癌患者CTCs \geq 5, CTCs \geq 5患者的中位生存时间 $<$ 1年; 而CTCs $<$ 5患者的中位生存时间则 $>$ 4年. Olmos等^[10]研究了191例去势治疗失败的前列腺癌(castration-resistant prostate cancer, CRPC)患者治疗前和治疗后CTCs数与总生存时间的关系. 较高的CTCs数与高碱性磷酸酶、低血红蛋白、高前列腺特异性抗原(prostate specific antigen, PSA)、骨转移等相关. CTCs \geq 5患者的总生存时间为19.5 mo, 而CTCs $<$ 5患者的总生存时间则 $>$ 30 mo($P = 0.012$). 另外, CTCs \geq 5患者在接受2轮化疗后, CTCs数下降 $>$ 30%的患者具有较长的总生存时间. de Bono等^[11]报道了相似的结果, 研究涉及231例PSA \geq 5 μ g/L的CRPC患者, 在开始化疗之前检测CTCs. 之后每个月检测1次, 根据CTCs数目将患者分为良好组(CTCs $<$ 5)和不良组(CTCs \geq 5). 不良组总生存时间明显短于良好组(11.5 mo vs 21.7 mo, $P = 0.0001$). 治疗后CTCs计数改善的患者比没有改善(仍然位于不良组)的患者具有较长的总生存时间(21.3 mo vs 6.8 mo, $P = 0.0001$). 而且, 治疗期间CTCs计数的变化比治疗后不同时间点PSA变化更有预测价值. 因此认为CTCs是CRPC的一个预后因子, 而且在评估疗效方面可能比PSA更加敏感. Davis等^[12]

■研发前沿

现有的CTCs分离、检测技术方法较多, 美国Veridex公司研发的专有技术CellSearch™ System可自动分选从上皮性肿瘤上脱落后进入血液中的肿瘤细胞, 该技术已通过FDA批准应用于预测转移性乳腺癌、前列腺癌和结直肠癌的无进展生存时间和总存活时间. 虽然如此, 但是基于CTCs检测结果而制定的治疗方案是否能改善疗效尚不明确.

■相关报道

CTCs可能是原发肿瘤基因和表型特征的最好的代表. 分离、鉴定外周血中的CTCs可能适合潜在的各种类型的肿瘤. 而且, CTCs可能将用于干预治疗决策的制定, 并且可以作为分子靶向应用的靶标.

■应用要点

目前分离CTCs的标准方法是依赖于肿瘤细胞表面上皮性抗原的磁性激活细胞分选技术,该检测可随时进行,分选从上皮性肿瘤上脱落后进入血液中的肿瘤细胞。检测结果已应用于预测转移性乳腺癌、前列腺癌和结直肠癌的无进展生存时间和总存活时间。

检测了97例行根治性CRPC切除术患者术前及术后外周血,并且同期检测了25例PSA增高但前列腺活检没有发现肿瘤的患者外周血(作为对照组),比较了局限性CRPC患者CTCs与肿瘤体积、病理分级、Gleason评分之间的关系。检测结果表明,21%肿瘤患者和20%对照组患者检测到CTCs,CTCs数量与肿瘤体积、病理分级、Gleason评分之间没有相关性。

相对MBC而言,CRPC有着多种可供使用的生物学标志物。由于PSA已被用来评价CRPC的发生阶段,以及跟踪肿瘤转移过程,并作为限制性局部治疗后肿瘤复发的指标,临床上联合CTCs评估CRPC预后则面临着更高的要求。Scher等^[13]比较了CTCs计数变化和血清PSA含量变化在CRPC一线治疗后疗效监测方面的价值,发现治疗后4、8、12 wk CTCs计数变化与生存时间之间关系密切,而与PSA含量变化之间则无明显相关性。

3 结直肠癌

Cohen等^[14]在一项初步研究中应用免疫磁珠分选方法从转移性结直肠癌(metastatic colorectal cancer, MCRC)患者外周血中分离出CTCs,发现治疗期间CTCs数量变化可能预示着临床预后。在此基础上应用CellSearchTM System进行了一项包括430例患者的前瞻性研究^[15,16]。根据检测结果,患者被分为不良组(CTCs \geq 3)和良好组(CTCs $<$ 3)。与良好组相比,不良组患者有着较短的无进展生存时间(4.5 mo vs 7.9 mo, $P = 0.0002$)和总生存时间(9.4 mo vs 18.5 mo, $P = 0.0001$)。治疗期间从不良组转变到良好组的患者比持续位于不良组的患者有着相对较长的生存期。因此认为,在治疗前和治疗期间CTCs计数是MCRC患者无进展生存时间和总生存时间的独立预测因子。之后还根据年龄、肿瘤临床分期、治疗方法、是否存在肝转移、不同的治疗方案(奥沙利铂、伊替立康、贝伐单抗)等,将上述患者进一步分组。在所有的次级分组中,不良组都有着相对较差的预后^[16]。Koopman等^[17]在另一项前瞻性临床试验中,将467例MCRC患者随机分成卡倍他滨治疗组、奥沙利铂治疗组、贝伐单抗联合西妥昔单抗和贝伐单抗不联合西妥昔单抗治疗组。CTCs分析结果与Cohen等^[14]研究结果非常相似。在开始时,29%患者CTCs \geq 3,治疗期间这一比例下降。CTCs \geq 3患者组较CTCs $<$ 3患者组具有明显不同的无进展生存时间(8.2 mo vs 10.5 mo, $P = 0.0005$)和总生存时间

(13.7 mo vs 22.2 mo, $P = 0.0001$)。各随访时间点亦有着相同趋势。治疗期间任何时间点CTCs计数对于无疾病进展时间和总生存时间的预测价值都好于其他因素,如病灶位置、乳酸脱氢酶水平和治疗方案等。MCRC患者CTCs计数的预测价值明显支持将CTCs作为一项判断预后的独立指标。

MCRC患者CTCs计数已能够提供预测信息。早期CRC患者CTCs检测的临床应用则处于研究阶段。如果希望基于CTCs水平来制定治疗方案,则需要进行前瞻性临床研究评价CTCs变化与疗效的关系。一旦确定CTCs计数能够指导选择出“低风险”患者,则可以让这些患者安全地中断化疗(如停止使用奥沙利铂),减轻不必要的毒性反应,并且进一步为他们提供更有效的个体化治疗方案。

4 结论

CellSearchTM System是目前FDA批准进行临床应用的唯一一个CTCs检测方案。作为一个半自动化检测技术,可以减少人为因素造成的误差,不同实验室的检测结果具有很高的相关性^[18]。而且,样本采集后立即检测和放置72 h后检测,其结果之间没有明显差别^[19]。检验可随时进行,结果不受肿瘤细胞间断释放的影响,便于对患者进行实时监测。对于MBC、CRPC和结肠癌而言,CTCs检测已被认为是一种可靠的预后指标。在治疗过程中随时预测疾病的进展和患者的存活时间。而系列监测结果能够更早期地为医生提供更多的信息,从而能够制定更明确的治疗方案。57% CRPC、37% MBC、30%结肠癌患者样本都可以检出 \geq 2个CTCs。而健康志愿者和非恶性肿瘤患者样本几乎没有这种现象^[18]。基于CellSearchTM System的大多数临床试验采用的阈值均是每7.5 mL血中3-5个CTCs。在进展期CRPC患者中,如果CTCs $>$ 4则具有很高的预测价值^[20]。尽管如此,如何选择阈值目前尚存在争议。因此,仍然需要多中心、大规模的临床研究确定阈值和验证临床意义。在疗效监测方面,转移性CRPC患者的生存时间与CTCs计数变化之间关系密切,而与PSA含量变化之间则无明显相关性。对于转移性MBC患者,影像学诊断为相同病程进展的患者,CTCs检测结果不同,预后亦不相同,CTCs检测可以提供影像学检查以外的诊断信息。对那些影像学诊断无法明确的疾病进展情况(如无法明确的MBC或CRPC骨转移),该检测可能具有重大意义。总而言之,CTCs的临床应

用仍处于起步阶段, 今后需要通过大规模多中心的临床研究确定更多类型肿瘤的应用范围、适应征和临床意义等。进一步的研究还需明确现有方法的敏感性。也许更先进的技术, 如CTCs芯片, 将进一步提高CTCs检测的敏感性和疾病的检出率^[21]。另外, 对分离的CTCs进行针对性基因分析可能有助于指导个体化治疗。

5 参考文献

- 1 Paterlini-Brechot P, Benali NL. Circulating tumor cells (CTC) detection: clinical impact and future directions. *Cancer Lett* 2007; 253: 180-204
- 2 Naoe M, Ogawa Y, Morita J, Omori K, Takeshita K, Shichijyo T, Okumura T, Igarashi A, Yanaihara A, Iwamoto S, Fukagai T, Miyazaki A, Yoshida H. Detection of circulating urothelial cancer cells in the blood using the CellSearch System. *Cancer* 2007; 109: 1439-1445
- 3 Racila E, Euhus D, Weiss AJ, Rao C, McConnell J, Terstappen LW, Uhr JW. Detection and characterization of carcinoma cells in the blood. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95: 4589-4594
- 4 Cristofanilli M, Budd GT, Ellis MJ, Stopeck A, Matera J, Miller MC, Reuben JM, Doyle GV, Allard WJ, Terstappen LW, Hayes DF. Circulating tumor cells, disease progression, and survival in metastatic breast cancer. *N Engl J Med* 2004; 351: 781-791
- 5 Cristofanilli M, Hayes DF, Budd GT, Ellis MJ, Stopeck A, Reuben JM, Doyle GV, Matera J, Allard WJ, Miller MC, Fritsche HA, Hortobagyi GN, Terstappen LW. Circulating tumor cells: a novel prognostic factor for newly diagnosed metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 2005; 23: 1420-1430
- 6 Dawood S, Broglio K, Valero V, Reuben J, Handy B, Islam R, Jackson S, Hortobagyi GN, Fritsche H, Cristofanilli M. Circulating tumor cells in metastatic breast cancer: from prognostic stratification to modification of the staging system? *Cancer* 2008; 113: 2422-2430
- 7 Budd GT, Cristofanilli M, Ellis MJ, Stopeck A, Borden E, Miller MC, Matera J, Repollet M, Doyle GV, Terstappen LW, Hayes DF. Circulating tumor cells versus imaging--predicting overall survival in metastatic breast cancer. *Clin Cancer Res* 2006; 12: 6403-6409
- 8 Harris L, Fritsche H, Mennel R, Norton L, Ravdin P, Taube S, Somerfield MR, Hayes DF, 2007 Jc. American Society of Clinical Oncology 2007 update of recommendations for the use of tumor markers in breast cancer. *J Clin Oncol* 2007; 25: 5287-5312
- 9 Shaffer DR, Leversha MA, Danila DC, Lin O, Gonzalez-Espinoza R, Gu B, Anand A, Smith K, Maslak P, Doyle GV, Terstappen LW, Lilja H, Heller G, Fleisher M, Scher HI. Circulating tumor cell analysis in patients with progressive castration-resistant prostate cancer. *Clin Cancer Res* 2007; 13: 2023-2029
- 10 Olmos D, Arkenau HT, Ang JE, Ledaki I, Attard G, Carden CP, Reid AH, A'Hern R, Fong PC, Oomen NB, Molife R, Dearnaley D, Parker C, Terstappen LW, de Bono JS. Circulating tumour cell (CTC) counts as intermediate end points in castration-resistant prostate cancer (CRPC): a single-centre experience. *Ann Oncol* 2009; 20: 27-33
- 11 de Bono JS, Scher HI, Montgomery RB, Parker C, Miller MC, Tissing H, Doyle GV, Terstappen LW, Pienta KJ, Raghavan D. Circulating tumor cells predict survival benefit from treatment in metastatic castration-resistant prostate cancer. *Clin Cancer Res* 2008; 14: 6302-6309
- 12 Davis JW, Nakanishi H, Kumar VS, Bhadkamkar VA, McCormack R, Fritsche HA, Handy B, Gornet T, Babaian RJ. Circulating tumor cells in peripheral blood samples from patients with increased serum prostate specific antigen: initial results in early prostate cancer. *J Urol* 2008; 179: 2187-2191; discussion 2191
- 13 Scher HI, Jia X, de Bono JS, Fleisher M, Pienta KJ, Raghavan D, Heller G. Circulating tumour cells as prognostic markers in progressive, castration-resistant prostate cancer: a reanalysis of IMMC38 trial data. *Lancet Oncol* 2009; 10: 233-239
- 14 Cohen SJ, Alpaugh RK, Gross S, O'Hara SM, Smirnov DA, Terstappen LW, Allard WJ, Bilbee M, Cheng JD, Hoffman JP, Lewis NL, Pellegrino A, Rogatko A, Sigurdson E, Wang H, Watson JC, Weiner LM, Meropol NJ. Isolation and characterization of circulating tumor cells in patients with metastatic colorectal cancer. *Clin Colorectal Cancer* 2006; 6: 125-132
- 15 Cohen SJ, Punt CJ, Iannotti N, Saidman BH, Sabbath KD, Gabrail NY, Picus J, Morse M, Mitchell E, Miller MC, Doyle GV, Tissing H, Terstappen LW, Meropol NJ. Relationship of circulating tumor cells to tumor response, progression-free survival, and overall survival in patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2008; 26: 3213-3221
- 16 Cohen SJ, Punt CJ, Iannotti N, Saidman BH, Sabbath KD, Gabrail NY, Picus J, Morse MA, Mitchell E, Miller MC, Doyle GV, Tissing H, Terstappen LW, Meropol NJ. Prognostic significance of circulating tumor cells in patients with metastatic colorectal cancer. *Ann Oncol* 2009; 20: 1223-1229
- 17 Koopman M, Tol J, Miller MC. Circulating tumor cells (CTC) in advanced colorectal cancer (ACC) patients undergoing 1st line treatment with chemotherapy, bevacizumab and cetuximab as an important and early predictor of survival. *Ann Oncol* 2008; 19 (suppl 8): 5040
- 18 Allard WJ, Matera J, Miller MC, Repollet M, Connelly MC, Rao C, Tibbe AG, Uhr JW, Terstappen LW. Tumor cells circulate in the peripheral blood of all major carcinomas but not in healthy subjects or patients with nonmalignant diseases. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 6897-6904
- 19 Riethdorf S, Fritsche H, Müller V, Rau T, Schindlbeck C, Rack B, Janni W, Coith C, Beck K, Jänicke F, Jackson S, Gornet T, Cristofanilli M, Pantel K. Detection of circulating tumor cells in peripheral blood of patients with metastatic breast cancer: a validation study of the CellSearch system. *Clin Cancer Res* 2007; 13: 920-928
- 20 Goodman OB Jr, Fink LM, Symanowski JT, Wong B, Grobaski B, Pomerantz D, Ma Y, Ward DC, Vogelzang NJ. Circulating tumor cells in patients with castration-resistant prostate cancer baseline values and correlation with prognostic factors. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2009; 18: 1904-1913
- 21 Negrath S, Sequist LV, Maheswaran S, Bell DW, Irimia D, Ulkus L, Smith MR, Kwak EL, Digumarthy S, Muzikansky A, Ryan P, Balis UJ, Tompkins RG, Haber DA, Toner M. Isolation of rare circulating tumour cells in cancer patients by microchip technology. *Nature* 2007; 450: 1235-1239

同行评价

本文对循环肿瘤细胞检测在乳腺癌、前列腺癌和结肠直肠癌中的临床应用作一简要论述, 探讨循环肿瘤细胞检测的适应证、临床意义和存在的问题, 具有一定的学术参考价值。

中药微球介入治疗肿瘤的研究进展

陈红宇, 王炎, 李琦

■背景资料

对不能手术切除的肿瘤患者, 介入治疗是一种最为有效的非手术疗法。中药微球由于其低毒、缓释、靶向、栓塞的特性而广泛应用于各种肿瘤的介入治疗中, 对其进行探讨有助于为肿瘤的介入治疗提供新的思路和方法。

陈红宇, 王炎, 李琦, 上海中医药大学附属普陀医院肿瘤科实验中心 上海市 200062

上海市重点学科(第三期)基金资助项目, No. S30302

上海市卫生局青年基金资助项目, No. 2009Y91

作者贡献分布: 文献检索、文章撰写由陈红宇完成; 选题、指导、审校由王炎与李琦完成。

通讯作者: 李琦, 副教授, 副主任医师, 硕士生导师, 200062, 上海兰溪路164号, 上海中医药大学附属普陀医院肿瘤科, 实验中心。lzwf@hotmail.com

电话: 021-62572723-4308

收稿日期: 2010-04-20 修回日期: 2010-07-01

接受日期: 2010-07-05 在线出版日期: 2010-08-08

Advances in research of microspheres containing Chinese medicine for interventional cancer therapy

Hong-Yu Chen, Yan Wang, Qi Li

Hong-Yu Chen, Yan Wang, Qi Li, Department of Oncology, Experimental Center, Putuo Hospital Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200062, China

Supported by: the Shanghai 3rd Leading Academic Discipline Project, No. S30302; and the Youth Foundation of the Shanghai Municipal Health Bureau, No. 2009Y91

Correspondence to: Associate Professor Qi Li, Department of Oncology, Experimental Center, Putuo Hospital Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, 164 Lanxi Road, Shanghai 200062, China. lzwf@hotmail.com

Received: 2010-04-20 Revised: 2010-07-01

Accepted: 2010-07-05 Published online: 2010-08-08

Abstract

Drug-loaded microspheres represent a newly developed particulate drug delivery system that possesses the characteristics of controlled release and targeting delivery. The use of microsphere agents in Chinese medicine can make up for the deficiency of traditional preparations, improve bioavailability, and decrease use dosage and non-target toxicity, so it have controlled release and targeting characteristics. Therefore, the research on microsphere agents has become a hot topic in the development of new delivery system for Chinese medicine. In this paper, we will review the biological characteristics of microsphere agents and discuss the recent advances and problems encountered in the research of microsphere agents.

■同行评议者

曹鹏, 副研究员, 江苏省中医药研究院细胞与分子生物学实验室

Key Words: Microsphere; Chinese medicine; Cancer; Intervention

Chen HY, Wang Y, Li Q. Advances in research of microspheres containing Chinese medicine for interventional cancer therapy. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(22): 2350-2354

摘要

药物微球是近年来利用微球化技术发展的药物新剂型, 将微球制剂应用于中药可以弥补传统剂型的缺陷, 提高生物利用度, 降低药物使用剂量和非靶部位的毒性, 使其具有缓释和靶向特性, 因此中药微球已成为中药新剂型给药系统研究的热点。我们就中药微球的生物学特性、研究现状及存在的问题综述如下。

关键词: 微球; 中药; 肿瘤; 介入

陈红宇, 王炎, 李琦. 中药微球介入治疗肿瘤的研究进展. *世界华人消化杂志* 2010; 18(22): 2350-2354

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/2350.asp>

0 引言

药物微球是近年来发展的一种药物新剂型, 是利用如淀粉、壳聚糖、聚乳酸、明胶等高分子聚合物材料作为载体, 将固体或液体药物包裹固化而形成的微小球状实体的固体骨架物, 其直径大小不一, 一般在1-300 μm , 甚至更大, 属于基质型骨架微粒^[1]。微球制剂作为一种新型给药技术, 既能通过调节和控制药物的释放速度实现长效的目的, 又能保护药物不受体内酶的影响而降解, 掩盖药物的不良口味, 减少给药次数和药物刺激, 降低毒性和不良反应, 提高疗效。此外, 微球还与某些细胞组织有特殊亲和性, 能被器官组织的网状内皮系统所内吞或被细胞融合, 集中于靶区逐步扩散释出药物或被溶酶体中的酶降解而释出药物, 从而起到靶向治疗的作用。我国在微球制剂领域的研究开始于20世纪70年代, 随着微球制剂制备技术日臻成熟, 中药微球靶向抗肿瘤药物不断涌现, 从而为肿瘤的介入治疗提供了新的方法和手段。

1 中药微球的生物学特性

1.1 缓释性 微球中药物的释放可以通过骨架溶蚀[如聚乳酸(poly lactic acid, PLA)和乳酸/羟基乙酸共聚物(poly lactic-co-glycolic acid, PLGA)的降解]、表面溶蚀(如聚邻酯和聚酐类聚合物的降解^[2])、整体崩解、水汽膨胀、解离扩散及解吸附等方法^[3], 使微球中包裹的药物释放速度变慢, 成为长效制剂, 可减少给药次数, 消减药物峰谷现象. 中药通过各种物理化学方法进行修饰装备成药物-载体复合物微球, 取得了很好的缓释效果. 刘丹岩等^[4]以PLA为载体材料, 制备了苦参碱聚乳酸微球, 体外释放曲线可见其初期有药物突释现象, 随后微球中的药物呈持续缓慢释放, 在玻璃体腔内随时间延长表现为逐渐降解的过程, 具有明显的缓释效果, 有望成为一种理想的防治增生性玻璃体视网膜病变的给药系统. 朱陵君等^[5]以自行合成的单甲氧基聚乙二醇-聚己内酯为原料, 制备负载汉防己甲素的高分子纳米微球, 体外释放实验显示汉防己甲素载药纳米微球具有一定的缓释特征, 具有良好的应用前景和价值. 符旭东等^[6]以PLGA为载体, 制备了石杉碱甲缓释微球, 并从药动学和药效学两个方面评价其在大鼠体内的缓释效果, 结果表明石杉碱甲缓释微球在体内外均具有良好的缓释效果.

1.2 靶向性 微球靶向给药系统是依据机体不同的组织部位的生理学特性对不同大小微粒的不同阻留性而建立的, 通过生物体内的物理和生理作用能使这些混悬微粒选择性的聚集于肝、脾、肺、淋巴等部位, 释放药物而发挥疗效^[7]. 中药靶向微球制剂主要包括被动靶向制剂和磁靶向制剂. (1)被动靶向微球制剂是利用载体的组成、粒径、电荷等特征, 通过生物体内各组织细胞的内吞、融合、吸附和材料交换、毛细血管截留或利用病变组织毛细血管的高通透性等方式将药物传递至不同靶组织区域, 从而发挥靶向给药作用的制剂, 又称自然靶向制剂^[8]. 程国华等^[9]以PLA为载体材料制备出粒径在7-15 μm 的汉防己甲素微球, 分别对小鼠尾静脉注射汉防己甲素聚乳酸微球和汉防己甲素注射剂, 结果显示应用汉防己甲素聚乳酸微球后汉防己甲素在小鼠各组织中浓度明显高于普通溶液制剂, 且药物选择性浓集于肺部, 具有明显的肺靶向性. (2)磁靶向微球的基本原理为: 磁性载药微球作为药物载体, 被注射到体内, 在外部施加一定场强的磁场, 通过磁性药物微球的流动性能

和磁场的诱导性能, 逐渐将磁性药物载体移向病变区, 然后药物以受控方式(酶的活性或者生理条件的改变, 例如pH值、渗透压和温度改变等)缓慢定位释放, 集中在靶区发挥作用^[10]. 张仲海等^[11]用人血清白蛋白包埋的方法制备了秋水仙碱磁微球, 通过外磁场引导定位, 对裸鼠乳腺癌移植瘤进行实验治疗, 结果表明秋水仙碱磁微球对于定位治疗乳腺癌有较好疗效且毒性显著降低.

1.3 栓塞性 药物微球通过动脉插管注入肿瘤供血动脉后, 对肿瘤毛细血管网的栓塞较为完全, 直径大于12 μm 的微球被一级毛细血管网所截获, 直径更小的微球能到达毛细血管末梢阻断至毛细血管前动脉水平, 所以与常规栓塞剂相比更不易形成侧枝循环, 癌组织坏死更彻底, 在发挥栓塞作用的同时, 微球中的药物可集中在肿瘤区释药, 故既可产生栓塞效应, 又可作为抗癌药物的携带者, 使肿瘤区的药物长时间的维持在较高浓度水平^[12,13]. 李欣等^[14]制备了5-FU白芨微球并用其对兔VX2移植性肝癌模型进行栓塞化疗研究, 结果显示5-FU白芨微球具有良好的血管栓塞作用, 使用方便、安全, 是一种理想的末梢性栓塞剂. 施华平等^[15]采用莪术油和丝裂霉素两种药物制备出的复方莪术油微球, 观察其肝动脉栓塞对大鼠移植性肝癌的治疗作用, 结果显示复方莪术油微球组灌注后肝肿瘤体积明显减小, 对肿瘤生长率的抑制更明显, 肿瘤组织坏死程度高于其他组. 李琦等^[16]采用乳化-化学交联法制备出去甲斑蝥素-海藻/聚酸酐微球(N-MS), 平均粒径为69.6 μm 左右, 去甲斑蝥素的含量为4.3%, 动物实验结果表明N-MS介入栓塞治疗后肿瘤组织坏死明显、生长受到抑制、动物生存期延长.

2 肿瘤介入治疗中常用的中药微球

介入治疗是近年来新兴治疗方法, 包括血管内介入和非血管介入治疗, 血管内介入治疗常用Seldinger技术: 局麻下经股动脉穿刺, 在X线电视监控下, 将导管选择性插入肿瘤供血动脉注入抗癌药物、栓塞剂. 一方面又提高了局部药物浓度, 另一方面通过栓塞使肿瘤缺血缺氧坏死. 与内科外科的传统治疗相比, 它具有疗效确切和微创的特点^[17,18]. 对于目前治疗难度大的恶性肿瘤, 介入治疗(局部动脉灌注、化疗栓塞)可明显地提高肿瘤局部药物浓度, 同时减少药物对身体和其他器官的不良反应. 药物微球由于

■研发前沿

自20世纪60、70年代微球化技术得到广泛应用以来, 各种中药及相关单体的微球制剂成为肿瘤介入治疗领域研究的热点.

■创新盘点

本文从中药微球的生物学特性及肿瘤介入治疗中常用的中药微球制剂两个方面,对中药微球在肿瘤介入治疗中的应用进行了概述,并提出了目前存在的问题及发展趋势,为中药微球在肿瘤介入治疗中的广泛应用提供了理论依据。

其缓释、靶向、栓塞的特性而广泛应用于子宫平滑肌瘤、神经系统肿瘤、骨肿瘤等的介入治疗中^[19-21],显示出了优越的栓塞性能和良好的临床疗效。中药微球除具有以上的优点外,尚有低毒的优势,可减轻常规化疗药的骨髓抑制、肝肾功能损害及免疫抑制等不良反应。因此,近年来将中药微球应用于肿瘤的介入治疗成为介入治疗领域中的热点。

2.1 中药单体化合物的微球制剂 中药单体化合物的化学结构和物理化学性质明确,其制备工艺和载体材料选择等方面与化学药比较接近,可以建立有效的质量监控指标和方法,进行深入的药理学研究,因而近年来对该类中药微球制剂的研究比较活跃和深入,涌现出大量具有缓释或靶向作用的中药单体化合物微球制剂。紫杉醇是从红豆杉科红豆杉属植物的树干和树皮中提取的一种具有独特结构的二萜类成分,其骨架被命名为紫杉烷,具有良好的抗癌活性,能够促进微管聚合并稳定微管,抑制细胞的有丝分裂从而达到抗肿瘤作用。谢明等^[22]以PLGA为载体制备出紫杉醇缓释微球,并评估紫杉醇微球瘤内直接注射对裸鼠Hep-2移植瘤的疗效,结果显示与紫杉醇瘤内注射组相比,紫杉醇微球瘤内注射治疗各组的抑瘤率高、肿瘤体积和重量均明显减小。鲍滨等^[23]以可生物降解材料聚己内酯(polycaprolactone, PCL)为原料制备出载紫杉醇亚微球,观察其治疗实验小鼠乳腺癌的效果,肿瘤局部注射紫杉醇亚微球2 wk后观察抑瘤率,结果显示紫杉醇亚微球中剂量组和高剂量组对小鼠乳腺癌的抑瘤率高于紫素阳性对照组。黄惠风等^[24]观察不同浓度磁性纳米紫杉醇微球在不同时间段对人胃癌细胞生长和凋亡的影响,结果显示磁性纳米紫杉醇微球可诱导人胃癌细胞凋亡且具有控释效应,可延长药物对胃癌细胞的有效作用时间,同时载药纳米微球没有改变紫杉醇成分的生物学活性。李琦等^[25]采用改良的复乳-液中干燥法制备出蜂毒素-聚乳酸/羟基乙酸微球,经肝动脉灌注蜂毒素-聚乳酸/羟基乙酸微球治疗大鼠肝癌,比较治疗后各组大鼠的肿瘤生长情况、肿瘤坏死程度和生存时间,结果微球组肿瘤坏死更广泛、更彻底,抗肿瘤效果明显优于单纯的蜂毒素和空白微球。徐阿祥等^[26]选择18例无法手术及晚期的膀胱癌患者,采用髂内动脉插管技术,把喜树碱微球通过导管栓入膀胱肿瘤的供血动脉,栓塞治疗后17例患者肿瘤出现不同程度坏死,瘤体缩小,血尿症

状全部消失,未见明显不良反应,1例无效。范健等^[27]用乳化聚合法制备了华蟾酥精明胶微球,使其选择性地栓塞肝窦前动脉,结果示药物微球组未见明显过敏反应和不良反应,肝功能无明显损害,外周血白细胞增加明显,由于其强烈的致血管炎作用,可致被栓塞血管产生血管炎和继发性栓塞,加强栓塞效果。

2.2 单味中药提取物的微球制剂 随着中药的提取、分离和精制技术不断完善,许多单味中药已经可以获得组成和药效都比较明确的有效成分提取物,这使得运用微球化技术研制该类中药的微球制剂成为可能。尽管目前此类制剂不多,但却具有很好的发展前景。莪术油为抗癌中药莪术经蒸馏得到的挥发油,不仅具有抗癌活性,还具有抗病毒、改善微循环等作用,是一种低毒性抗癌药物。邓嵘等^[28]将莪术油制成符合肝动脉栓塞要求的莪术油明胶微球,其球径在40-160 μm 的微球占97.16%,体外释药12 h累积释放达80%,释药规律符合一级动力学模型,肝动脉栓塞荷瘤大鼠后,结果表明平均生存率显著延长,肿瘤体积显著减小。吴万垠等^[29]利用大鼠移植性肝癌模型肝动脉灌注莪术油微球,实验高低剂量组与对照组比较大鼠肿瘤生长抑制率均受到显著抑制,肿瘤坏死以重度为主,生存时间亦明显延长。徐凯等^[30]将41例肝癌患者分为治疗组和对照组,治疗组予莪术油微球和华蟾素、艾迪注射液等经肝动脉灌注;对照组给予化学治疗药物和碘化油等灌注,结果两组治疗前后的白细胞下降、血小板下降、血红蛋白下降和恶心呕吐等不良反应,治疗组的发生率均低于对照组,其中白细胞下降、恶心呕吐差异有显著性。

2.3 中药复方的微球制剂 目前,中药复方的微球制剂的数量还比较少,对其研究也不够深入,现阶段主要选择药味较少、作用显著、质量可控的中药复方开展微球制剂的研究。刘晓华等^[31]采用对消化系肿瘤治疗效果较好的中药复方(主药为丹参、长不老、龙葵等药)化瘀散结药物浸膏与5-FU复合,制成粒度、含药量、含磁量一定的磁性微球制剂,他可在体外磁场的定向引导下,浓集并滞留在靶区癌组织上,定位释放药物,从而提高了疗效,降低了不良反应,临床治疗54例食管和胃肿瘤,总有效率87.05%。郑谊等^[32]将主药为川乌、草乌、莪术、白花蛇舌草、麦冬、沙参、虎杖、生地等组成的抗癌中药复方,提取浓缩精制成25-100 μm 的栓塞微球,用于家

兔肺、肝动脉插管给药, 栓塞后24 d, 均见肝动脉及较大分支管径重新缩小变细, 末梢分支无明显显影, 肝血管未见明显的侧枝循环形成, 与环磷酰胺等其他3组对照, 实验表明具有明显的肿瘤抑制和杀伤作用, 并可通过机械栓塞肿瘤末梢血管, 阻断、破坏供血而抗肿瘤。陈自谦等^[33]根据药典提供的数味具有抗癌和促凝作用的中草药, 将主要成分为三七、莪术、壳聚糖、白芨胶、雷公藤等原药或成品药组成的抗癌中药复方, 制成粒径约200-300 μm 的栓塞剂, 并应用其进行猪肝动脉栓塞, 结果显示该栓塞剂栓塞部位主要是末梢小动脉, 栓塞牢靠, 维持时间可达5 wk, 不易形成侧枝循环; 经光镜和电镜观察其对正常肝组织损失轻微, 仅出现栓塞部位的肝细胞水变性和胞质灶性坏死。

3 结论

中药微球制剂具有缓释、靶向、减少药物刺激, 降低不良反应, 提高疗效等优点, 使其在肿瘤治疗领域中具有很大的发展前途。但大多都还处在基础研究阶段, 研究方向主要停留在制剂工艺和动物体内靶向分布, 临床研究较少。同时, 中药微粒制剂在制备工艺及质量控制等方面存在许多问题。如控制微球粒度、药物的突释等问题尚未得到有效解决。目前的中药微球制剂大多数是中药单体药物, 中药复方因其药效成分非常复杂, 发挥疗效的机制也不甚明确, 因而在载体材料选择、处方设计、质量监控指标和方法的建立等方面都面临较大的困难。因此, 中药微球制剂的研究应当在中医药理论的指导下, 突出中医药特色, 充分利用现代先进的药剂学技术、方法和手段, 开发中药复方微球制剂, 重视载体材料等相关辅料的研究和开发, 制定出一系列中药微球制备工艺的相关标准和适合中药微球制剂的质量监控指标和质量评价方法, 推动我国中药微球制剂的发展, 使中药微球制剂成为安全、有效、稳定、可控的现代中药制剂而应用于临床肿瘤的治疗, 从而发挥中药的优势, 使祖国传统医药在医疗服务中发挥更大的作用。

4 参考文献

- 1 Li JQ, Wang SL, Xu F, Liu ZY, Li R. Therapeutic effectiveness of slow-release PLGA-oxaliplatin microsphere on human colorectal tumor-bearing mice. *Anticancer Drugs* 2010; 21: 600-608
- 2 Tamilvanan S, Venkatesh Babu R, Kannan K, Basu SK, Sa B. Manufacturing techniques and excipients

- used during the design of biodegradable polymer-based microspheres containing therapeutic peptide/protein for parenteral controlled drug delivery. *PDA J Pharm Sci Technol* 2008; 62: 125-154
- 3 Li Y, Lee PL. A new bioerodible system for sustained local drug delivery based on hydrolytically activated in situ macromolecular association. *Int J Pharm* 2010; 383: 45-52
- 4 刘丹岩, 马景学, 曹德英, 王建欣, 刘建宗, 吕兰存. 苦参碱聚乳酸微球的缓释性和玻璃体腔注射的安全性研究. *眼科研究* 2010; 28: 34-38
- 5 朱陵君, 李茹恬, 禹立霞, 钱晓萍, 刘宝瑞. 新型汉防己甲素纳米微球的制备及性质研究. *现代肿瘤医学* 2009; 17: 798-801
- 6 符旭东, 高永良, 平其能. 石杉碱甲缓释微球的制备及其在大鼠体内的药动学与药效学研究. *中国药学杂志* 2005; 40: 1496-1499
- 7 Lee W, Wiseman ME, Cho NJ, Glenn JS, Frank CW. The reliable targeting of specific drug release profiles by integrating arrays of different albumin-encapsulated microsphere types. *Biomaterials* 2009; 30: 6648-6654
- 8 Hoffman AS. The origins and evolution of "controlled" drug delivery systems. *J Control Release* 2008; 132: 153-163
- 9 程国华, 罗佳波. 汉防己甲素聚乳酸微球小鼠肺靶向研究. *中国药房* 2005; 16: 418-420
- 10 Saravanan M, Anbu J, Maharajan G, Pillai KS. Targeted delivery of diclofenac sodium via gelatin magnetic microspheres formulated for intra-arterial administration. *J Drug Target* 2008; 16: 366-378
- 11 张仲海, 吴少华, 王文学, 王长海, 行利. 秋水仙碱磁微球靶向治疗乳腺癌的实验研究. *中华物理医学杂志* 1997; 19: 193-195
- 12 Liapi E, Geschwind JF. Chemoembolization for primary and metastatic liver cancer. *Cancer J* 2010; 16: 156-162
- 13 Sottani C, Leoni E, Porro B, Montagna B, Amatu A, Sottotetti F, Quaretti P, Poggi G, Minoia C. Validation of an LC-MS/MS method for the determination of epirubicin in human serum of patients undergoing drug eluting microsphere-transarterial chemoembolization (DEM-TACE). *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2009; 877: 3543-3548
- 14 李欣, 冯敬生, 郑传胜, 柳曦, 孔健. 经肝动脉注射5-FU白芨微球治疗兔VX2移植性肝癌. *世界华人消化杂志* 2003; 11: 1337-1340
- 15 施华平, 周玲玲, 马健. 复方莪术油微球肝动脉栓塞对大鼠移植性肝癌的治疗作用. *上海中医药大学学报* 2009; 23: 58-61
- 16 李琦, 范忠泽, 李先茜, 刘晓华, 孙珏, 顾伟, Paul HENG, 高虹. 去甲斑蝥素微球介入治疗大鼠肝癌疗效及其机制研究. *中西医结合学报* 2006; 4: 378-383
- 17 Helmberger T. [Interventional procedures for hepatic metastases] *Chirurg* 2010; 81: 542-550
- 18 Maleux G, van Malenstein H, Vandecaveye V, Heye S, Vaninbroux J, Nevens F, Verslype C. Transcatheter chemoembolization of unresectable hepatocellular carcinoma: current knowledge and future directions. *Dig Dis* 2009; 27: 157-163
- 19 Maleki Z, Kim HS, Thonse VR, Judson K, Vinh TN, Vang R. Uterine artery embolization with trisacryl gelatin microspheres in women treated for leiomyomas: a clinicopathologic analysis of alterations in gynecologic surgical specimens. *Int J Gynecol Pathol* 2010; 29: 260-268
- 20 Laurent A, Wassef M, Chapot R, Wang Y, Houdart

■同行评价

本文行文流畅, 层次清晰, 比较全面地介绍了中药微球介入肿瘤的研究进展。

- E, Feng L, Tran Ba Huy P, Merland JJ. Partition of calibrated tris-acryl gelatin microspheres in the arterial vasculature of embolized nasopharyngeal angiofibromas and paragangliomas. *J Vasc Interv Radiol* 2005; 16: 507-513
- 21 Chu JP, Chen W, Li JP, Zhuang WQ, Huang YH, Huang ZM, Yang JY. Clinicopathologic features and results of transcatheter arterial chemoembolization for osteosarcoma. *Cardiovasc Intervent Radiol* 2007; 30: 201-206
- 22 谢明, 周梁, 殷晓璐, 姚明. 瘤内注射紫杉醇PLGA微球对人喉癌裸鼠移植瘤的实验研究. *肿瘤* 2009; 29: 5-10
- 23 鲍滨, 杨菁, 党丽捷, 宋存先. 紫杉醇亚微球制备及治疗小鼠乳腺癌的实验研究. *生物医学工程与临床* 2007; 11: 174-178
- 24 黄惠风, 施瑞华, 凌亭生, 朱宏, 杜琰萍. 磁性纳米紫杉醇微球对人胃癌细胞SGC-7901增殖和凋亡的影响. *中国消化内镜* 2007; 1: 39-42
- 25 李琦, 刘晓华, 陈庆华, 凌昌全. 蜂毒素微球经动脉介入治疗大鼠肝癌的实验研究. *浙江中西医结合杂志* 2004; 14: 72-74
- 26 徐阿祥, 王晓雄, 于淼, 许勇. 应用喜树碱微球超选择性动脉栓塞治疗膀胱癌. *中华医学杂志* 2000; 80: 358-359
- 27 范健, 黄懋魁, 伍福乐, 翁帼英. 华蟾酥精微球肝动脉栓塞的实验研究. *癌症* 1995; 14: 434-437
- 28 邓嵘, 陈济民, 姚崇舜, 吴万垠. 莜术油明胶微球用于肝动脉栓塞. *药学报* 2000; 35: 539-543
- 29 吴万垠, 邓嵘, 区勇全, 邓时贵, 莫莉莉. 经肝动脉灌注莜术油微球对大鼠移植性肝癌的治疗作用. *中华肝脏病杂志* 2000; 8: 24-26
- 30 徐凯, 罗海英, 李柳宁, 邓宏, 白建平, 郑剑霄, 曾越灿, 刘宇龙. 中药灌注栓塞为主综合治疗原发性肝癌的临床研究. *中国中西医结合杂志* 2005; 25: 299-302
- 31 刘晓华, 杜文清, 邵礼铮. 抗癌中药复合5-Fu磁性微球制剂研制. *中成药* 1998; 20: 4-7
- 32 郑谊, 江立富, 王希锐, 杜鸿章, 董进文. 抗癌中药栓塞剂的研制. *中国医药学报* 1998; 13: 54-55
- 33 陈白谦, 杨熙章, 沈俊杰, 王曙东, 郑晓刚, 曹建民. 中药组方作为血管栓塞剂栓塞肝动脉的实验研究. *介入放射学杂志* 2006; 15: 88-92

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》修回稿须知

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

1 修回稿信件

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

2 稿件修改

来稿经同行专家审查后, 认为内容需要修改、补充或删除时, 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.

胃溃疡大鼠在合募配穴针刺后胃组织的纳升级二维液相色谱

杨波, 严兴科

杨波, 长春中医药大学研究生学院 吉林省长春市 130117
严兴科, 长春中医药大学针灸推拿学院 吉林省长春市 130117
国家自然科学基金资助项目, No. 30873310
2009年度教育部高等学校博士学科点专项科研基金资助项目, No. 20092227120002
吉林省教育厅“十一五”科学研究基金资助项目, No. 2009-377
作者贡献分布: 杨波与严兴科对此文所作贡献均等; 此课题由严兴科与杨波设计; 研究过程由严兴科与杨波操作完成; 研究所用试剂及分析工具由严兴科提供; 数据分析由杨波完成; 本论文写作由杨波与严兴科完成。
通讯作者: 严兴科, 副教授, 130117, 吉林省长春市, 长春中医药大学针灸推拿学院. yanxk@126.com
收稿日期: 2010-03-21 修回日期: 2010-05-24
接受日期: 2010-06-02 在线出版日期: 2010-08-08

Nano-2D-LC analysis of proteomic alterations in rats with gastric stress ulcer after acupuncture at He-Sea point and Front-Mu point of the stomach meridian

Bo Yang, Xing-Ke Yan

Bo Yang, Graduate School, Changchun University of Chinese Medicine, Changchun 130117, Jilin Province, China
Xing-Ke Yan, School of Acupuncture-moxibustion and Massotherapy, Changchun University of Chinese Medicine, Changchun 130117, Jilin Province, China
Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30873310; the Specialized Research Fund for the Doctoral Program of Higher Education, No. 20092227120002; and the Scientific Research Foundation of Education Department of Jilin Province during the 11th Five-Year Plan Period, No. 2009-377
Correspondence to: Associate Professor Xing-Ke Yan, School of Acupuncture-moxibustion and Massotherapy, Changchun University of Chinese Medicine, Changchun 130117, Jilin Province, China. yanxk@126.com
Received: 2010-03-21 Revised: 2010-05-24
Accepted: 2010-06-02 Published online: 2010-08-08

Abstract

AIM: To investigate the therapeutic effect of acupuncture at He-Sea point and Front-Mu point of the stomach meridian on gastric stress ulcer (SU) in rats and to explore potential mechanisms involved.

METHODS: Thirty-five Wistar rats were randomly divided into five groups: blank control

group, model group, He-Sea point (Zusanli) group, Front-Mu point (Zhongwan) group, and He-Sea and Front-Mu point (He-Mu) group. Gastric SU was induced in rats by water immersion and restraint. Proteomic alterations in the stomach of rats were analyzed by nano-two-dimensional liquid chromatography (nano-2D-LC).

RESULTS: Five chromatographic peaks at a retention time between 27 and 32 min were noted on the chromatograms in the model group and acupuncture treatment groups. The retention time of these five peaks was basically identical. The peak area was largest in the model group, followed by the Front-Mu point group, He-Sea point group and He-Mu group.

CONCLUSION: Acupuncture at He-Sea point and Front-Mu point exerts a therapeutic effect on SU possibly by altering the expression of some proteins.

Key Words: Gastric stress ulcer; Matching acupoint; Nano-2D-LC; Spectrum peak

Yang B, Yan XK. Nano-2D-LC analysis of proteomic alterations in rats with gastric stress ulcer after acupuncture at He-Sea point and Front-Mu point of the stomach meridian. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(22): 2355-2358

摘要

目的: 揭示合募配穴法治疗胃溃疡特异性效应和协同机制。

方法: 大鼠35只随机分为空白对照组、应激性胃溃疡模型组、募穴组(中脘穴)、下合穴组(足三里组)和合募配穴组(中脘穴配足三里穴组), 利用水浸加捆绑法复制应激性胃溃疡模型大鼠, 借助纳升级二维液相色谱(Nano-2D-LC)技术研究大鼠胃经下合穴及募穴针刺后胃组织差异蛋白表达谱峰。

结果: 在保留时间27和32 min时, 模型组、募穴组、下合穴组和合募配穴组比空白对照组多出色谱峰5个, 并且色谱峰5个的峰面积依次

■背景资料

胃溃疡是全球性多发病、常见病, 也是世界范围内严重影响人类健康的常见病之一。针灸疗法因其简便、高效、安全、无不良反应等特点, 被广泛用于治疗胃溃疡及溃疡复发。

■同行评议者

王富春, 教授, 长春中医药大学针灸推拿学院; 沈克平, 主任医师, 上海中医药大学附属龙华医院肿瘤科

■研发前沿

以整体的观念和角度,从基因、蛋白质和代谢物入手,构建针灸组穴治疗胃溃疡效应研究的技术平台和方法,为腧穴效应研究、脏腑病证治疗和中医药现代化提供新的技术和理论体系。

对应缩小。

结论:针刺对应激性胃溃疡的治疗机制可能与5种多肽含量的减小有关。

关键词:应激性胃溃疡;合募配穴;纳升级二维液相色谱;差异多肽谱峰

杨波,严兴科.胃溃疡大鼠在合募配穴针刺后胃组织的纳升级二维液相色谱.世界华人消化杂志 2010; 18(22): 2355-2358
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/2355.asp>

0 引言

针灸疗法被广泛用于治疗胃溃疡及溃疡复发^[1,2]。蛋白质组学技术已经被用于针灸防治胃溃疡的机制研究^[3]。本文从合募配穴治疗胃溃疡的有效性出发^[4],对应激性胃溃疡大鼠进行针刺治疗,利用纳升级二维液相色谱(nano-two-dimensional liquid chromatograph, nano-2D-LC)技术对针刺治疗后的胃组织匀浆液进行蛋白质组研究,以揭示针灸防治胃溃疡的现代生物学机制。

1 材料和方法

1.1 材料 清洁级Wistar大鼠35只,♂,体质量200 g±30 g,由长春高新医学动物实验研究中心提供,实验动物合格证号:0003845。乙腈(ACN, G.R., Fisher Scientific Fair Lawn),甲酸(FA, G.R., Fluka),胰蛋白酶(Trypsin, Sigma, St. Louis, MO),牛血清白蛋白(BSA, A.R., Sigma),苯甲基磺酰氟(PMSF, A.R., Amresco),醋酸铵(NH₄AC, A.R., 北京化工厂),碳酸氢铵(NH₄HCO₃, A.R., 北京化工厂)。Agilent 1100纳升级的多维液相分析系统,美国Agilent公司产品。

1.2 方法

1.2.1 分组:将35只大鼠分为如下5组($n=7$),分别是:空白对照组;应激性胃溃疡模型组;募穴(中脘)组;下合穴(足三里)组;合募配穴(中脘穴配足三里穴)组。

1.2.2 穴位选取和针刺治疗:“足三里”、“中脘”的选取参照大鼠常用针灸穴位定位标准^[5]。按照分组要求,各组大鼠依照分组所取穴位,合募配穴组取“足三里穴”加“中脘穴”针刺,下合穴组取“足三里穴”针刺,募穴组取“中脘穴”针刺,均采用平补平泻针法治疗,每日1次,每次留针20 min,连续施术2 d;模型组每日同样抓取,不针刺;空白对照组正常喂养,不予处理。

1.2.3 模型复制:依据文献进行模型复制^[6,7],将所

有实验大鼠造模前禁食不禁水24 h,将模型组,募穴组,下合穴组,合募配穴组大鼠四肢捆绑固定于木板上,将木板直立浸于23℃±1℃的恒温水槽中,液面保持在大鼠胸骨剑突水平;空白对照组大鼠不予处理;模型组,募穴组,下合穴组,合募配穴组大鼠同时浸泡;5组大鼠于24 h后颈椎脱臼法处死。

1.2.4 鼠胃组织蛋白提取:将35只大鼠用颈椎脱臼法处死后,迅速剪取溃疡部胃组织,用冰的生理盐水冲洗3次以除去体液及血液中一些可能的污染物。用滤纸吸净多余水分,将鼠胃组织切成约3 mm³小块,接着称质量,以1:8(g:mL)的比例加入提取液(含1 mmol/L PMSF的水溶液)后用玻璃匀浆器对胃组织进行匀浆。匀浆液在冰浴中混悬20 min,然后在4℃条件下以13 000 r/min离心10 min。收集上清液,贮存在-80℃冰箱留待下一步使用。

1.2.5 鼠胃组织匀浆液总蛋白含量测定:采取Bradford法^[8],以牛血清白蛋白作标准品,用SmartSpec3000分光光度计进行定量。

1.2.6 酶解反应:取10 μL样品,用100 mmol/L NH₄HCO₃水溶液调节其pH值至7.5-8后,煮沸5 min,加入15% ACN,冷至室温,将胰蛋白酶加入该溶液中,使样品与胰蛋白酶的质量比为40:1。该样品液在37℃水浴条件下过夜后,滴入FA使pH值至3-4以终止酶解反应。

1.2.7 蛋白质酶解物的nano-2D-LC分离:第一维强阳离子交换(Strong Cation-Exchange, SCX)色谱柱采用Agilent ZORBAX Bio-SCX Series II (50 mm×0.8 mm, 3 μm),上样液与纳升级分析型反相液相色谱流动相A相同,即流动相A: H₂O-ACN-FA(体积比为95:5:0.1)溶液。洗脱液为0.5 mol/L的NH₄Ac,洗脱15 min,流速:10 μL/min。富集柱: C18柱为Agilent ZORBAX 300SB(50×0.3 mm, 5 μm)。样品的预浓缩和除盐时所用的溶液与纳升级液相色谱流动相A相同。第二维纳升级分析型RPLC柱: C18柱为Agilent ZORBAX SB(150×0.5 mm, 5 μm)。所用流动相A为H₂O-ACN-FA(体积比为95:5:0.1)溶液; B液为H₂O-ACN-FA(体积比为5:95:0.1)溶液,线性梯度洗脱程序: 0-15 min, 上样除盐; 15-25 min, 0%B-50%B; 25-35 min, 50%B-99%B; 35-45 min, 99%B-0%B, 流速4 μL/min, 多波长检测器(Multiwavelength Detector, MWD), 检测波长214 nm。鼠胃组织蛋白提取液的酶解样品由在线的nano-2D-LC系统完成分离。第一维

■创新盘点

本实验利用nano-2D-LC技术,筛选并分离合募配穴法防治应激性胃溃疡大鼠胃组织中的特定效应蛋白,揭示合募配穴法防止胃溃疡的作用机制。此法改变了以往单个蛋白的静态研究,从蛋白质组的整体变化研究胃溃疡针灸效应的物质基础,阐明针灸疗效的现代生物学机制。

表 1 4组样品共有色谱峰保留时间比较 (min, mean \pm SD)

	模型组	募穴组	下合穴组	合募配穴组	平均
峰1	27.286 \pm 0.68	27.189 \pm 0.79	27.045 \pm 0.54	26.894 \pm 0.47	27.1035 \pm 0.62
峰2	28.023 \pm 0.88	27.947 \pm 0.53	27.909 \pm 0.38	27.811 \pm 0.65	27.9225 \pm 0.61
峰3	28.980 \pm 0.89	28.850 \pm 0.92	28.700 \pm 0.71	28.606 \pm 0.76	28.7840 \pm 0.82
峰4	30.934 \pm 0.31	30.859 \pm 0.24	30.814 \pm 0.41	30.749 \pm 0.28	30.8390 \pm 0.31
峰5	31.546 \pm 0.87	31.386 \pm 0.77	31.338 \pm 0.62	31.262 \pm 0.70	31.3830 \pm 0.74

表 2 4组样品共有色谱峰峰面积比较 (mAu, mean \pm SD)

分组	共有峰峰1面积	共有峰峰2面积	共有峰峰3面积	共有峰峰4面积	共有峰峰5面积
模型组	1 711.8 \pm 2.89 ^a	18 734.1 \pm 5.87 ^d	12 339.8 \pm 4.28 ^d	4 464.9 \pm 8.95 ^d	4 163.4 \pm 1.56 ^d
募穴组	868.2 \pm 6.23 ^{bd}	7 322.9 \pm 4.64 ^{bd}	5 929.0 \pm 6.75 ^{bd}	2 543.3 \pm 6.31 ^{bd}	2 361.3 \pm 2.35 ^{bd}
下合穴组	786.9 \pm 5.21 ^{bdf}	3 604.7 \pm 7.21 ^{bdf}	3 656.3 \pm 5.37 ^{bdf}	1 608.3 \pm 7.39 ^{bdf}	1 554.9 \pm 2.61 ^{bdf}
合募配穴组	549.6 \pm 4.68 ^b	1 565.7 \pm 6.88 ^b	1 080.0 \pm 6.26 ^b	694.5 \pm 6.27 ^b	701.3 \pm 1.43 ^b

^b $P < 0.01$ vs 模型组; ^a $P < 0.01$ vs 合募配穴组; ^f $P < 0.01$ vs 募穴组。

是基于静电作用的离子交换色谱分离, 第二维是基于疏水作用的反相液相色谱分离。

2 结果

第一维采用SCX柱, 通过0.25 mol/L的NH₄Ac溶液置换, 由富集柱除盐吸附组分后反冲入反相液相色谱柱线形洗脱, 最后进入多波长检测器分析。

5组酶解液所有成分的色谱峰在40 min内出完, 比较5组色谱图(图1)。图1是5组样品重叠比较的色谱图。观察空白对照组、模型组和各治疗组色谱图, 在保留时间27-32 min时, 模型组和各治疗组比空白对照组多出5个色谱峰, 即模型组、下合穴组、募穴组及合募配穴组具有保留时间基本一致的5个多肽峰, 详细数据见表1, 各峰在4组间的保留时间差小于0.5 min, 峰1、2、3、4、5的保留时间在4组间均无显著差异(均 $P > 0.05$), 故确定为共有多肽峰。在空白对照组中未见这5个共有峰, 提示共有峰属于大鼠病理状态下产生的5种特异性多肽。

比较4组间5个色谱峰峰面积大小(图1), 可见模型组与治疗组相比, 5个共有峰的各个峰面积对应减小, 详细数据见表2。共有峰1、2、3、4、5的峰面积积分在模型组、募穴组、下合穴组和合募配穴组中呈现逐渐减小趋势, 组间峰面积积分比较均有非常显著性差异(均 $P < 0.01$), 并且合募配穴组峰面积积分最小, 最接近正常状态。

3 讨论

中医针灸疗法在治疗胃溃疡中具有很好的疗效,

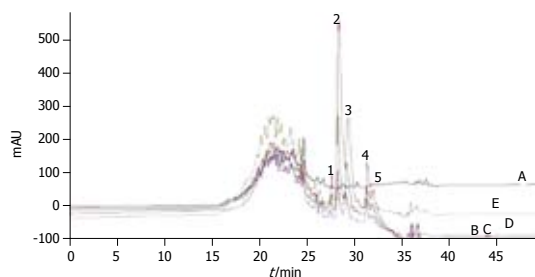


图 1 5组鼠胃组织酶解多肽的SCX-RPLC二维分离图(重叠)。A: 空白对照组; B: 模型组; C: 募穴组; D: 下合穴组; E: 合募配穴组。1-5为B、C、D、E组的共有色谱峰。

特别是选取中脘、足三里等穴配伍治疗胃溃疡等疾病效果显著^[9]。研究表明: 针刺足三里、中脘穴可有效改善胃肠运动失调, 其调整作用可使胃分泌功能协调, 使胃窦部位运动趋于正常, 胃节律恢复正常, 胃排空不受阻碍; 还能使处于病理状态下的胃电振幅恢复正常^[10]。针刺胃经穴对胃的运动、分泌以及胃黏膜损伤修复皆有明显的调节作用^[11], 研究发现针刺治疗胃溃疡的机制可能与针刺参与胃黏膜细胞分裂和增殖的信号转导机制有关^[12]。但目前针刺防治胃溃疡机制研究大都局限于以胃或胃局部改变为对象, 或以单一的指标改变进行观察, 研究结果难以体现中医“胃腑”的整体功能变化规律, 更难反映“胃腑”与其他脏腑的密切联系和相互作用。由于针灸效应的整体性, 仅从单个蛋白的静态研究难以全面反映针灸效应的整体变化, 因此改变以往单个蛋白的静态研究而从蛋白质组的整体变化研究针灸的效应将是针灸学研究的一

■应用要点

现代科技手段与针灸研究的基础工作相融合将成为针灸效应研究新的发展方向, 必将为腧穴效应研究、脏腑病证治疗和中医药现代化提供新的技术和理论体系, 也将为解决当代中医药学的重大疑难问题提供可寻求的新途径。

■同行评价

本文方法先进, 文字表达流畅, 为针灸效应研究提供了新的思路和技术。

个突破口。蛋白质组首先由澳大利亚Macquarie大学的Williams和Wilkins于1994年提出, 指的是“一个细胞或组织所表达的全部蛋白质”^[13]。蛋白质组学(Proteomics)即以蛋白质组为研究对象, 从蛋白质组的水平进一步认识生命活动的机制和疾病发生的分子机制, 是对生物体在蛋白质水平定量、动态、整体性的研究。蛋白质组所体现的时空性与整体性, 与中医精髓的整体观念亦十分贴近^[14]; 同时, 蛋白质组学通过采用高分辨率的蛋白质分离手段, 结合高效率的蛋白质鉴定技术, 全景式地研究在各种特定情况下的蛋白质谱^[15], 这一主要特点为中医针灸的整体调节效应研究提供了有利的理论指导与技术支持。

本实验结果显示, 空白对照组与模型组和治疗组色谱图, 在保留时间27-32 min时, 模型组、下合穴组、募穴组及合募配穴组具有5个多肽峰保留时间基本一致, 各峰在4组间的保留时间差小于0.5 min, 峰1、2、3、4、5的保留时间在4组间均无显著差异(均 $P>0.05$), 故确定为共有多肽峰。在空白对照组中未见这5个共有峰, 提示共有峰属于大鼠病理状态下产生的5种特异性多肽。

比较4组间5个色谱峰峰面积积分, 共有峰1、2、3、4、5的峰面积积分在模型组、募穴组、下合穴组和合募配穴组中呈现逐渐减小趋势, 组间峰面积积分比较有非常显著性差异(均 $P<0.01$), 并且合募配穴组峰面积积分最小, 最接近正常状态。通过比较发现, 针刺后5种特异性多肽峰的峰面积积分都明显减小, 并且针刺足三里穴比针刺中脘穴的减小程度大, 合募配穴组比单纯针刺中脘或足三里穴对其峰面积积分减小的程度更大, 表明针刺能够减小这5种多肽的含量, 并且针刺中脘穴、足三里穴及中脘穴配足三里穴对5种多肽含量减小的程度依次增大, 合募配穴比单纯选用下合穴或募穴对5种特异性多肽的作用强, 提示针刺对应激性胃溃疡的治疗机制可能与这5种多肽含量的减小有关, 合募配穴比单用下合穴或募穴对应激性胃溃疡

的治疗作用更强, 即合募配穴的疗效优于单纯针刺中脘穴或足三里穴, 同时单纯针刺足三里穴的疗效优于单纯针刺中脘穴^[16], 这与胃溃疡等胃腑疾病的临床表现和针灸治疗胃腑疾病的实践相一致。

4 参考文献

- 1 陈平国, 张泓. 消化性溃疡的针灸治疗与研究近况. 中医药导报 2008; 14: 81-83
- 2 高洋, 杨波, 严兴科. 针灸治疗胃溃疡的机理研究进展. 上海针灸杂志 2008; 27: 48-50
- 3 杨波, 高洋, 张燕, 严兴科. 针灸治疗胃溃疡蛋白质组学效应研究平台技术优化与策略研究. 时珍国医国药 2009; 20: 1398-1400
- 4 俞竹青, 毛水泉. 针灸治疗胃、十二指肠溃疡32例临床观察. 光明中医 2005; 20: 31-32
- 5 李辞蓉, 华兴邦, 周浩良, 宋大鲁, 胡元亮. 豚鼠针灸穴位图谱的研制. 上海针灸杂志 1992; 11: 30-32
- 6 卢文丽, 方肇勤, 潘志强, 刘小美, 廖明娟. 应激等致大鼠实验性胃溃疡的“同病异证”与“异病同证”. 浙江中医药大学学报 2008; 32: 318-320
- 7 翁泰来, 张锡流, 叶星江, 赵利华. 豚鼠应激性胃溃疡模型的制作与验证的实验研究. 广西中医学院学报 1999; 16: 80
- 8 海广范, 张慧, 牛秉轩, 尹志奎. 水的酸碱度对Bradford法检测蛋白质含量的影响. 新乡医学院学报 2009; 26: 144-145
- 9 赵艳鸿, 王富春. 下合穴与脏腑相关性探析. 针灸临床杂志 2002; 18: 4-5
- 10 李铁, 王富春, 项柏东, 周丹, 段晓英, 郭明. 不同针法针刺中脘、足三里对应激性胃溃疡模型大鼠胃电作用的研究. 针灸临床杂志 2005; 21: 47-48
- 11 Sherman KJ, Cherkin DC, Eisenberg DM, Erro J, Hrbek A, Deyo RA. The practice of acupuncture: who are the providers and what do they do? *Ann Fam Med* 2005; 3: 151-158
- 12 Lu W. Acupuncture for side effects of chemoradiation therapy in cancer patients. *Semin Oncol Nurs* 2005; 21: 190-195
- 13 Wasinger VC, Cordwell SJ, Cerpa-Poljak A, Yan JX, Gooley AA, Wilkins MR, Duncan MW, Harris R, Williams KL, Humphery-Smith I. Progress with gene-product mapping of the Mollicutes: *Mycoplasma genitalium*. *Electrophoresis* 1995; 16: 1090-1094
- 14 李喜悦, 张文生, 王永炎. 蛋白质组学技术在方证相关理论研究中的应用探讨. 中医研究 2007; 20: 5-6
- 15 王若光. 蛋白质组学研究中医药学的原创性发展. 中国医药学报 2003; 18: 619-620
- 16 黄琴峰. 针灸治疗胃肠病症用穴规律探讨. 中国针灸学会第八届全国中青年针灸推拿学术研讨会论文集汇编 2008: 59-61

编辑 李军亮 电编 何基才

国产醋酸奥曲肽治疗食管胃底静脉曲张破裂出血的系统评价

杨拯, 李晓娇, 吴金海, 陈建敏, 荣成, 张晓

杨拯, 陈建敏, 荣成, 张晓, 成都医学院实验技术教研室 四川省成都市 610081

李晓娇, 吴金海, 成都医学院基础医学院 四川省成都市 610081

作者贡献分布: 杨拯与李晓娇对此文贡献均等; 此课题由杨拯与李晓娇设计; 由杨拯、李晓娇及吴金海负责文献检索、文献质量评价、提取资料; 本文写作由杨拯与李晓娇完成; 陈建敏、荣成与张晓对本文提出修改意见并给予极大的工作支持; 张晓负责论文审阅。

通讯作者: 张晓, 教授, 610081, 四川省成都市, 成都医学院实验技术教研室. tyizx@yahoo.cn
电话: 028-68289174

收稿日期: 2010-04-23 修回日期: 2010-06-12

接受日期: 2010-06-22 在线出版日期: 2010-08-08

Efficacy and safety of China-made acetic octreotide in the treatment of bleeding from esophageal varices: a systematic review

Zheng Yang, Xiao-Jiao Li, Jin-Hai Guo, Jian-Min Chen, Cheng Rong, Xiao Zhang

Zheng Yang, Xiao Zhang, Jian-Min Chen, Cheng Rong, Department of Experiment Technology, Chengdu Medical College, Chengdu 610081, Sichuan Province, China
Xiao-Jiao Li, Jin-Hai Guo, School of Preclinical Medicine, Chengdu Medical College, Chengdu 610081, Sichuan Province, China

Correspondence to: Professor Xiao Zhang, Department of Experiment Technology, Chengdu Medical College, Chengdu 610081, Sichuan Province, China. tyizx@yahoo.cn

Received: 2010-04-23 Revised: 2010-06-12

Accepted: 2010-06-22 Published online: 2010-08-08

Abstract

AIM: To evaluate the efficacy and safety of China-made acetic octreotide in the treatment of bleeding from esophageal varices by comparing with imported octreotide (Sandostatin).

METHODS: A computer-based search of the Cochrane library, Medline, PubMed, China Journal Full-text Database and CBM database, in combination with a manual search of relevant journals, was performed to identify relevant randomized controlled trials that evaluated the use of acetic octreotide in the treatment of bleeding from esophageal varices, regardless of language. A

meta-analysis was conducted using the method for Cochrane systematic review.

RESULTS: Five trials involving 557 patients, including 285 treated with China-made acetic octreotide and 272 treated with Sandostatin, were included in the systematic review. No significant differences were found in the efficacy ($OR = 1.14$; 95%CI: 0.64-2.05; $P = 0.62$) and safety ($RR = 1.61$; 95%CI: 0.57-4.50; $P = 0.93$) between the two groups. There were also no significant differences in the frequency and amount of hematemesis and black stools between the two groups.

CONCLUSION: China-made acetic octreotide is effective and safe in the treatment of bleeding from esophageal varices in comparison with Sandostatin.

Key Words: Acetic octreotide; Sandostatin; Bleeding from esophageal varices; Efficacy; Safety; Systematic review; Meta-analysis

Yang Z, Li XJ, Guo JH, Chen JM, Rong C, Zhang X. Efficacy and safety of China-made acetic octreotide in the treatment of bleeding from esophageal varices: a systematic review. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(22): 2365-2369

摘要

目的: 评价国产醋酸奥曲肽注射液治疗肝硬化门静脉高压食管胃底静脉曲张急性出血的疗效和安全性。

方法: 计算机检索Cochrane图书馆临床对照试验, Medline、PubMed及中国期刊全文数据库, 中国生物医学文献数据库等中外文数据库。并辅以文献追溯、手工检索等方法收集查阅文献。凡评价国产醋酸奥曲肽注射液治疗肝硬化门静脉高压食管胃底静脉曲张急性出血的随机对照试验, 无论语种、是否采用盲法均纳入, 应用国际Cochrane协作网系统评价方法对其疗效和安全性进行Meta分析。

结果: 共纳试验5个包括患者557例。试验组

■背景资料

食管胃底静脉曲张破裂出血是肝硬化最严重的并发症和死亡原因。目前药物治疗是首选方法, 而生长抑素及类似物是药中首选。奥曲肽(善宁)作为生长抑素类似物目前在临床广泛运用并取得不错的疗效, 不良反应少。但善宁作为进口药物价格昂贵, 近年来国产醋酸奥曲肽研发并逐渐用于临床, 其疗效和安全性与善宁可比。因此, 国产醋酸奥曲肽治疗食管胃底静脉曲张破裂出血可能是安全有效的。

■同行评议者

董蕾, 教授, 西安交通大学第二附属医院消化内科

■相关报道

最新研究表明,对食管胃底静脉曲张破裂出血患者采用血管活性药物治疗是最安全有效的,无论是否及时采用内镜疗法,并且两者联合使用不良反应明显较硬化疗法少。

285例,对照组272例。国产醋酸奥曲肽注射液与善宁组比较,2组在疗效和安全性方面的差异无统计学意义,疗效合并 $OR = 1.14$, 95%CI: 0.64-2.05, $P = 0.62$; 不良反应的相对危险度 $RR = 1.61$, 95%CI: 0.57-4.50, $P = 0.93$; 对呕血和黑便病例的疗效Meta分析差异也无统计学意义。

结论: 国产醋酸奥曲肽注射液治疗食管胃底静脉曲张急性出血疗效与善宁相当,是安全有效的。

关键词: 醋酸奥曲肽; 善宁; 食管胃底静脉曲张破裂出血; 疗效; 安全性; 系统评价; Meta分析

杨拯, 李晓娇, 吴金海, 陈建敏, 荣成, 张晓. 国产醋酸奥曲肽治疗食管胃底静脉曲张破裂出血的系统评价. 世界华人消化杂志 2010; 18(22): 2365-2369

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/2365.asp>

0 引言

食管胃底静脉曲张破裂出血是肝硬化等所致门静脉高压症的最严重的并发症之一,病情危重,预后差,死亡率高。有研究^[1]表明醋酸奥曲肽能明显降低肝硬化门脉高压患者的门脉血流量,门脉压力和食管静脉曲张压力。临床已广泛用于治疗食管胃底静脉曲张破裂出血。醋酸奥曲肽(善宁)由瑞士Novartis上市,引进我国销售,临床反映良好,并有增加使用量的势头,但价格较昂贵。近年来,由我国生产的国产醋酸奥曲肽生产销售,且价格相对较低廉。但其疗效和安全性还有待考证。故本文就国产醋酸奥曲肽与善宁比较,治疗食管胃底静脉曲张破裂出血的疗效和安全性作系统评价。

1 材料和方法

1.1 材料 以英文关键词“variceal bleeding”, “Esophageal and Gastric Varices”, “octreotide acetate”等检索式在Medline或PubMed数据库(1978-2010年)、FMJS(EMCC)数据库(1978-2010年)中检索;以“食管胃底静脉曲张”,“奥曲肽”,“醋酸奥曲肽”等检索式在中国生物医学文献数据库(CBMDisc, 1978-2010年)、维普中文科技期刊全文数据库(1989-2010年)、中国期刊全文数据库(1979-2010)检索。并检索近3年来国内外有关食管胃底静脉曲张破裂出血的学术会议及论文集。并严格按纳入和排除标准筛选。

1.2 方法

1.2.1 纳入标准: (1)凡评价醋酸奥曲肽治疗食管胃底静脉曲张破裂出血的临床随机对照试验,无论语种; (2)试验组采用国产醋酸奥曲肽,对照组采用进口醋酸奥曲肽(善宁); (3)有明确的诊断标准并确诊,有明确的疗效指标; (4)评价指标中有疗效或有效率的比较的文献。

1.2.2 排除标准: (1)只有摘要无全文的文献资料以及数据不完整无法利用的文献; (2)无对照组或未采用善宁做对照的文献以及综述性的文献; (3)重复发表的文献,雷同文献。

1.2.3 评价标准: 所有文献的纳入由两名研究者独立进行,存在意见分歧时,由第三名研究者参与决定纳入与否。纳入研究的方法学质量评价采用Cochrane协作网推荐的方法^[2]进行,文献质量评价包括以下内容: 随机分配方法; 分配方案的隐藏; 盲法; 是否描述了失访、退出的发生; 是否进行了意向性分析(intention to treat, ITT). 并采用Jadad评分标准(0-5分),由两名研究者独立评分。高于3分者为高质量试验。

统计学处理 采用Cochrane协作网提供的Revman 4.2.8软件进行系统评价,计数资料采用比值比(OR)及其95%CI表示,或相对危险度(RR)及其95%CI表示。判断各研究间的异质性,当组内各研究间有统计学异质性($P \geq 0.1$, $I^2 \leq 50\%$)和临床同质性时,采用固定效应模型,若存在统计学异质性($P < 0.1$, $I^2 > 50\%$)时,分析异质性来源,确定是否能采用随机效应模型。计算国产醋酸奥曲肽治疗食管胃底静脉曲张破裂出血的治疗的疗效,以及不良反应的发生率等。为保证结果的稳定性行敏感性分析。以漏斗图检测潜在的发表偏倚。

2 结果

2.1 检索结果及研究方法学质量 初检文献93篇,经过阅读摘要和全文,排除重复文献,按纳入和排除标准,最后纳入5个试验^[3-7],均为国内研究,无符合标准的英文文献。共557例患者,试验组285例,对照组272例。5篇均多采用多中心、随机、阳性药物平行对照试验, Jadad评分4篇^[3,5-7]3分,1篇^[4]2分,文献质量较高。其中3篇^[3-5]采用双盲,2篇^[6,7]采用单盲。均描述了退出及脱落的病例数,2篇^[5,6]做ITT分析,1篇^[7]FAS数据分析,研究的基本情况与方法学质量见表1。

2.2 Meta分析结果

2.2.1 疗效比较: 为研究国产醋酸奥曲肽的治疗

表 1 纳入文献的基本情况与方法学质量

作者	基线情况	随机方法	分组	治疗措施	疗效	不良反应	盲法隐藏	分配	实验退出及随访(脱落数)	Jade 评分
朱长清等 ^[3]	可比	随机	试验组	A 50 μ g/h连续ip 48 h	68/70	1/70	双盲	充分	正确描述	3
			对照组	B 用法如上	61/66	1/66				
崔巍等 ^[5]	可比	随机	试验组	A 50 μ g/h连续ip 48 h	21/22	2/22	双盲	充分	未提及	2
			对照组	B 用法如上	17/18	1/18				
奥曲肽协作组 ^[6]	可比	随机	试验组	A 50 μ g/h连续ip 48 h	60/61	1/61	双盲	充分	正确描述, 并作ITT分析	3
			对照组	B 用法如上	60/60	1/60				
杨迅等 ^[4]	可比	随机	试验组	A 0.1 mg iv 5 min; 50 μ g/h, 持续ip, 次/12 h, 24 h内有效, 再连续用4 d	47/68	3/68	单盲	充分	正确描述, 并作ITT分析	3
			对照组	B 用法如上	41/63	2/63				
金鑫鑫等 ^[7]	可比	随机	试验组	A 首剂0.1 mg+5%葡萄糖20 mL iv, 随后以0.025 mg/h连续ip 72 h	60/64	2/64	单盲	充分	正确描述并作FAS分析	3
			对照组	B 用法如上	63/65	0/65				

A: 国产醋酸奥曲肽; B: 善宁。

效果, 做Meta分析, 将所有文献报道的有效率采用计数资料二分法研究。将临床治愈(或显效)与有效(或好转)合并1项, 无效为1项。采用Rev-man4.2.8软件分析得到森林图(表2), 5篇文献的Meta分析的结果显示各试验间无异质性($P = 0.62$), 采用固定效应模型。合并OR值为1.14, 其95%CI: 0.64-2.05, 菱形横跨无效线, 差异无统计学意义。说明国产醋酸奥曲肽与进口善宁治疗食管胃底静脉曲张破裂出血疗效相当。

2.2.2 不良反应: 5篇文献的meta分析的结果(表3)显示各试验间无异质性 $P = 0.93$, 采用固定效应模型。合并RR值为1.61, 其95%CI: 0.57-4.50, 菱形横跨无效线, 差异无统计学意义。表明国产醋酸奥曲肽与进口善宁安全性相近。另外, 5篇文献均提及无严重不良反应。杨迅^[4]试验组国产奥曲肽组出现2例受试者死亡, 但与研究药物的关系无关。金鑫鑫^[7]试验组2例患者出现发热的不良事件(计算在不良反应之内), 但经抗炎治疗后均得到彻底控制, 考虑与试验药物无关。

2.2.3 呕血例数疗效: 纳入2篇^[3,4]试验的Meta分析的结果如表2, 用药后对发生呕血的病例数起到作用效果的比较分别为治疗1 d、治疗2 d、停药24 h三个阶段。从Meta分析的值可以看出三个阶段的疗效差异均无统计学意义, 说明两组疗效相当, 呕血例数减少率相当。另外, 奥曲肽协作组三个阶段的呕血, 试验组和对照组组比较差

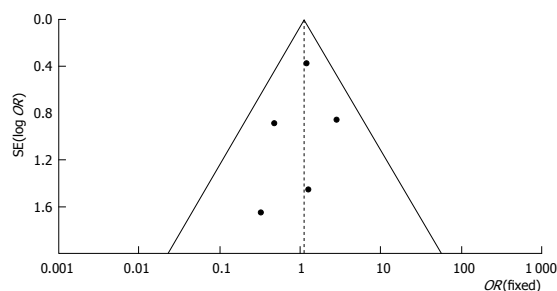


图 1 纳入文献漏斗图。

异也无统计学意义。

2.2.4 黑便例数疗效: 纳入2篇^[3,4]试验的Meta分析的结果如表4, 用药后对发生黑便的病例数起到作用效果的比较也同为分别为治疗1 d、治疗2 d、停药24 h三个阶段。从Meta分析的值可以看出, 第1阶段即治疗1 d时, 差异有统计学意义($Z = 2.34, P = 0.02, OR = 0.66, 95\%CI: 1.17-5.80$), 说明治疗1 d时, 试验组对黑便的疗效优于对照组。但治疗2 d、停药24 h的疗效差异均无统计学意义, 说明两组疗效相当, 黑便例数减少率相近。

2.2.5 发表偏移: 漏斗图肉眼观察无明显不对称(图1), 说明发表性偏移不大。

3 讨论

食管胃底静脉曲张破裂出血是肝硬化最严重的并发症和死亡原因。目前药物治疗是首选方法, 奥曲肽是人工合成的生长抑素八肽衍生物, 乙

■创新盘点

本研究在全世界范围内收集5个国产醋酸奥曲肽治疗食管胃底静脉曲张破裂出血的临床随机对照试验, 并进行系统评价, 为国产醋酸奥曲肽治疗食管胃底静脉曲张破裂出血的疗效和安全性及临床应用提供了依据。

■应用要点

本研究提示, 国产醋酸奥曲肽治疗食管胃底静脉曲张破裂出血是安全有效的, 今后开展的临床研究应充分考虑到现有研究的局限性, 扩大样本量, 尽量减少偏倚, 必要时结合经济学评价, 为临床应用提供更多的证据。

表 2 疗效分析

Study or sub-category	Treatment n/N	Control n/N	OR(fixed) 95%CI	Weight (%)	OR(fixed) 95%CI
奥曲肽协作组	60/61	60/60	← 0.33 [0.01, 8.35]	6.97	0.33 [0.01, 8.35]
朱长清	68/70	61/66	← 2.79 [0.52, 14.89]	8.47	2.79 [0.52, 14.89]
金鑫鑫	60/64	63/65	← 0.48 [0.08, 2.70]	18.45	0.48 [0.08, 2.70]
杨迅	47/68	41/63	← 1.20 [0.58, 2.49]	62.09	1.20 [0.58, 2.49]
崔巍	21/22	17/18	← 1.24 [0.07, 21.24]	4.01	1.24 [0.07, 21.24]
Total (95%CI)	285	272	◆ 1.14 [0.64, 2.05]	100.00	1.14 [0.64, 2.05]
Total events: 256 (Treatment), 242(Control)					
Test for heterogeneity: $\chi^2 = 2.65$, $df = 4$ ($P = 0.62$), $I^2 = 0\%$					
Test for overall effect: $Z = 0.45$ ($P = 0.65$)					
			0.1 0.2 0.5 1 2 5 10		
			Favours treatment Favours control		

表 3 不良反应发生率比较

Study or sub-category	Treatment n/N	Control n/N	RR(fixed) 95%CI	Weight (%)	RR(fixed) 95%CI
奥曲肽协作组	1/61	1/60	← 0.98 [0.06, 15.37]	17.66	0.98 [0.06, 15.37]
朱长清	1/70	1/66	← 0.94 [0.06, 14.77]	18.03	0.94 [0.06, 14.77]
金鑫鑫	2/64	0/65	← 5.08 [0.25, 103.72]	8.69	5.08 [0.25, 103.72]
杨迅	3/68	2/63	← 1.39 [0.24, 8.05]	36.36	1.39 [0.24, 8.05]
崔巍	2/22	1/18	← 1.64 [0.16, 16.62]	19.26	1.64 [0.16, 16.62]
Total (95%CI)	285	272	◆ 1.61 [0.57, 4.50]	100.00	1.61 [0.57, 4.50]
Total events: 9 (Treatment), 5(Control)					
Test for heterogeneity: $\chi^2 = 0.85$, $df = 4$ ($P = 0.93$), $I^2 = 0\%$					
Test for overall effect: $Z = 0.90$ ($P = 0.37$)					
			0.1 0.2 0.5 1 2 5 10		
			Favours treatment Favours control		

表 4 呕血例数和黑便例数疗效Meta分析比较结果

分组	呕血例数疗效Meta分析			黑便例数疗效Meta分析		
	治疗1 d	治疗2 d	停药24 h	治疗1 d	治疗2 d	停药24 h
合并统计检验	$Z = 0.59$ $P = 0.56$	$Z = 0.69$ $P = 0.49$	$Z = 0.52$ $P = 0.60$	$Z = 2.34$ $P = 0.02$	$Z = 0.47$ $P = 0.64$	$Z = 0.70$ $P = 0.47$
合并OR值	1.27	0.51	0.66	2.60	1.17	1.28
95%CI	0.57-2.86	0.07-3.52	0.14-3.19	1.17-5.80	0.61-2.26	0.64-2.56

酸奥曲肽为其主要活性成分, 有类似生长抑素的药理作用, 半衰期长, 作用比较持久。他也是生长抑素的类似物与生长抑素有相似的药理活性, 可抑制胃肠蠕动, 减少内脏血流量和降低门静脉压。Huang等^[8]发现生长抑素类似物及其衍生物除了直接作用于内脏血管平滑肌使之收缩

外, 还通过增强内皮素-1和抑制血管活性肠肽、P物质等发挥其收缩血管和降低门脉压力的作用。奥曲肽作为血管活性药物可以降低门静脉压力^[9]。最新研究表明^[10], 对食管胃底静脉曲张破裂出血患者采用血管活性药物治疗是最安全有效的, 无论是否及时采用内镜疗法, 并且两者

联合使用不良反应明显较硬化疗法少。另外大量的临床随机对照试验中, 静脉注射奥曲肽与硬化疗法有相同的疗效, 能减少出血量, 预防再出血, 不良反应较少^[11-13]。另外, 研究发现奥曲肽联合内镜治疗治疗急性静脉曲张破裂出血可提高疗效^[14,15]。

本系统评价中, 5篇试验实验组和对照组的临床显效率 and 有效率无统计学差异($P>0.05$), 其中2篇^[5,6]做了ITT数据分析和PP数据分析比较, 1篇^[7]作FAS数据和PP数据分析比较, 结果都相似。试验组和对照组的总有效率分别为89.82%, 88.97%。Meta分析结果表明国产醋酸奥曲肽与进口善宁治疗食管胃底静脉曲张破裂出血疗效相当。在安全性方面, 各组都没有严重的与实验药物有关不良反应, 主要为腹胀, 恶心, 呕吐。Meta分析无显著差异, 国产奥曲肽治疗食管胃底静脉曲张破裂出血安全有效。在对发生呕血和黑便病例数的分析中, 尽管只纳入了2篇^[3,4]文献进行分析, 但另外2篇^[5,7]文献也分别从发生呕血黑便的量和病例数进行了分析。结果表明, 治疗过程中, 试验组和对照组对呕血或黑便的治疗起效可能略有差异。最终的疗效是无差异的。综上分析, 可知国产醋酸奥曲肽治疗食管胃底静脉曲张破裂出血是安全有效的, 与进口善宁作用相当。

本次系统评价研究严格按照文献的纳入和排除标准收集文献, 漏斗图显示发表偏倚不大。本次分析所纳入文献有4篇^[3,5-7]为高质量研究, Jadad评分高于3分; 有4篇^[3,5-7]为多中心研究, 具体描述退出脱落病例数; 3篇^[5-7]作ITT分析与PP分析比较; 都采用盲法。虽然纳入文献的方法学质量普遍较高, 但总病例数较少, 影响分析结果。需更多高质量大样本的临床研究。

总之, 从现有资料和Meta分析结果来看, 国产醋酸奥曲肽注射液治疗食管胃底静脉曲张急性出血疗效与善宁相当, 是安全有效的。善宁作为生长抑素类似物在治疗食管胃底静脉曲张急性出血的药物中价格最贵^[16], 而国产醋酸奥曲肽价格相对低廉, 经济适用, 为临床应用提供参考。但尚需更多高质量大样本的临床研究提供更加充分的证据。

4 参考文献

1 D'Amico G, De Franchis R. Upper digestive bleeding in cirrhosis. Post-therapeutic outcome and

- 2 prognostic indicators. *Hepatology* 2003; 38: 599-612
- 3 Higgins JPT, Green S, editors. *Cochrane Handbook for Systematic Reviews of Interventions* 4.2 [updated March 2005]. Section 8.7.2. In: *The Cochrane Library*, Issue 2. Chichester: Wiley, 2005
- 4 朱长清, 董胜翔, 茅益民, 曾民德, 蒋义斌, 许建明, 田德安, 刘吉勇, 徐三平, 孙樱, 罗和生, 王炳元. 奥曲肽治疗肝硬化门静脉高压食管胃底静脉曲张急性出血的多中心对照研究. *世界华人消化杂志* 2009; 17: 2570-2573
- 5 杨迅, 李红梅, 于中麟, 张澍田. 奥曲肽注射液治疗食管胃底静脉曲张破裂出血的有效性和安全性. *首都医科大学学报* 2006; 27: 457-459
- 6 崔巍, 王炳元. 国产奥曲肽治疗肝硬化食管胃底静脉曲张出血的疗效研究. *中国误诊学杂志* 2008; 8: 1048-1049
- 7 奥曲肽协作组. 国产与进口奥曲肽治疗肝硬化食管胃底静脉曲张出血的多中心随机双盲临床研究. *中华消化杂志* 2005; 25: 492-493
- 8 金鑫鑫, 朱人敏, 刘炯, 田德安, 黄焕军, 孙士其, 张振玉, 韩真, 章顺国. 国产注射用醋酸奥曲肽治疗食管胃底静脉曲张破裂出血的多中心随机对照临床研究. *胃肠病学* 2006; 11: 538-541
- 9 Huang HC, Lee FY, Chan CC, Chang FY, Wang SS, Lin HC, Hou MC, Chen CT, Tai CC, Lai IN, Lee SD. Effects of somatostatin and octreotide on portal-systemic collaterals in portal hypertensive rats. *J Hepatol* 2002; 36: 163-168
- 10 Dell'Era A, de Franchis R, Iannuzzi F. Acute variceal bleeding: pharmacological treatment and primary/secondary prophylaxis. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2008; 22: 279-294
- 11 D'Amico G, Pagliaro L, Pietrosi G, Tarantino I. Emergency sclerotherapy versus vasoactive drugs for bleeding oesophageal varices in cirrhotic patients. *Cochrane Database Syst Rev* 2010; 3: CD002233
- 12 Bildozola M, Kravetz D, Argonz J, Romero G, Suarez A, Jmelnitzky A, Fainberg M, Fassio E, Berreta J, Romero G, Landeira G, Martinez H, Bosco A, Guevara M, Valero J, Chopita N, Berenstein G, Terg R. Efficacy of octreotide and sclerotherapy in the treatment of acute variceal bleeding in cirrhotic patients. A prospective, multicentric, and randomized clinical trial. *Scand J Gastroenterol* 2000; 35: 419-425
- 13 Jenkins SA, Shields R, Davies M, Elias E, Turnbull AJ, Bassendine MF, James OF, Iredale JP, Vyas SK, Arthur MJ, Kingsnorth AN, Sutton R. A multicentre randomised trial comparing octreotide and injection sclerotherapy in the management and outcome of acute variceal haemorrhage. *Gut* 1997; 41: 526-533
- 14 Sivri B, Oksuzoglu G, Bayraktar Y, Kayhan B. A prospective randomized trial from Turkey comparing octreotide versus injection sclerotherapy in acute variceal bleeding. *Hepatogastroenterology* 2000; 47: 168-173
- 15 Ferguson JW, Tripathi D, Hayes PC. Review article: the management of acute variceal bleeding. *Aliment Pharmacol Ther* 2003; 18: 253-262
- 16 Döhler KD, Walker S, Mentz P, Forssmann K, Staritz M. [Vasoconstrictive Therapies for Bleeding Esophageal Varices and their Mechanisms of Action] *Z Gastroenterol* 2003; 41: 1001-1016
- 16 Connolly M, Bhatt A, Wechowski J, Colle I. An economic evaluation of vasoactive agents used to treat acute bleeding oesophageal varices in Belgium. *Acta Gastroenterol Belg* 2008; 71: 230-236

■同行评价

文章设计严谨, 科学合理, 内容实用, 结论明确。

早期肠内免疫营养对烫伤大鼠Peyer's结Th1/Th2细胞因子的影响

邓志云, 郭光华, 杨毅, 赵晓雷, 崔泉

邓志云, 杨毅, 赵晓雷, 崔泉, 广东省边防武警总队医院一外科 广东省深圳市 518029
郭光华, 南昌大学第一附属医院烧伤中心 江西省南昌市 330006

江西省自然科学基金资助项目, No. 0340078

作者贡献分布: 此课题由邓志云与郭光华设计; 研究过程由邓志云与郭光华完成; 数据分析由邓志云完成; 本论文写作由邓志云完成。

通讯作者: 邓志云, 主治医师, 博士, 518029, 广东省深圳市, 广东省边防武警总队医院一外科. dennis8710@163.com

电话: 0791-8692537

收稿日期: 2010-05-09 修回日期: 2010-06-08

接受日期: 2010-06-22 在线出版日期: 2010-08-08

Effect of early enteral immunonutrition on the secretion of TH1/TH2 cytokines in Peyer's patches of scalded rats

Zhi-Yun Deng, Guang-Hua Guo, Yi Yang, Xiao-Lei Zhao, Quan Cui

Zhi-Yun Deng, Yi Yang, Xiao-Lei Zhao, Quan Cui, Department of General Surgery, Guangdong Frontier Defense Corps Hospital of Armed Police Forces, Shenzhen 518029, Guangdong Province, China

Guang-Hua Guo, Burn Center, the First Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang 330006, Jiangxi Province, China

Supported by: the Natural Science Foundation of Jiangxi Province, No. 0340078

Correspondence to: Zhi-Yun Deng, Department of General Surgery, Guangdong Frontier Defense Corps Hospital of Armed Police Forces, Shenzhen 518029, Guangdong Province, China. dennis8710@163.com

Received: 2010-05-09 Revised: 2010-06-08

Accepted: 2010-06-22 Published online: 2010-08-08

Abstract

AIM: To investigate the changes in the secretion of TH1/TH2 cytokines in Peyer's patches of scalded rats after enteral nutrition supplementation.

METHODS: Sixty-four Sprague-Dawley rats were divided into EN group ($n = 32$) and EIN group ($n = 32$). Rats were subjected to a 30% TBSA III degree scald injury. The EN group was given standard enteral nutrition (Nutrison Multi Fibre), while the EIN group was given enteral immunonutrition. Peyer's patches were excised

to isolate lymphocytes to determine the changes in the secretion of TH1/TH2 cytokines.

RESULTS: On day 1 after scalding, the concentrations of IL-2 and IFN- γ released from Peyer's patch lymphocytes were significantly higher in the two experimental groups compared with pre-scald values (19.7 ± 7.3 vs 92.6 ± 21.3 and 97.6 ± 25.4 ; 63.7 ± 27.3 vs 279.4 ± 89.7 and 292.7 ± 97.4 ; all $P < 0.01$). On day 10, the concentrations of IL-2 and IFN- γ released from Peyer's patch lymphocytes were significantly lower in the EIN group than in the EN group (41.6 ± 16.5 vs 55.9 ± 14.4 ; 71.6 ± 26.9 vs 104.3 ± 31.7 ; both $P < 0.01$ or 0.05). The concentrations of IL-4 and IL-10 were significantly higher in the EIN group than in the EN group on days 4, 7 and 10.

CONCLUSION: The expression of Th1 cytokines is up-regulated in Peyer's patches of scalded rats. Enteral immunonutrition supplementation can promote the expression of Th2 cytokines, help correct TH2/TH1 imbalance, and improve mucosal barrier function.

Key Words: Immunonutrition; Scald; Peyer's patch; TH1/TH2 helper lymphocyte; Rat

Deng ZY, Guo GH, Yang Y, Zhao XL, Cui Q. Effect of early enteral immunonutrition on the secretion of TH1/TH2 cytokines in Peyer's patches of scalded rats. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(22): 2359-2364

摘要

目的: 观察伤大鼠烫伤后不同时间Peyer's淋巴细胞Th1细胞因子IL-2、IFN- γ 及Th2细胞因子IL-4、IL-10产生的变化。

方法: 选取健康SD大鼠随机分为标准肠内营养(EN)组和免疫营养(EIN)组, 制成烫伤动物模型(30%TBSA III度烫伤模型), 伤后早期分别给予标准肠内营养制剂(能全力)和肠内免疫营养制剂, 于伤后1、4、7、10 d取回肠Peyer's结, 分离并体外培养Peyer's结淋巴细胞24 h, 检测Th1/Th2细胞因子分泌的变化。

■背景资料

在烧(创)伤后肠黏膜的缺血缺氧性损害、炎性介质和细胞因子的瀑式释放、高代谢引起营养代谢底物的缺乏等应激性变化可造成肠黏膜免疫屏障的破坏, 细菌和内毒素移位, 继而启动多器官功能障碍综合征(MODS)。

■同行评议者

秦环龙, 教授, 上海交通大学附属第六人民医院外科

■相关报道

Bosque等发现肠道内毒素增加能引起GALT中IFN- γ 等细胞因子的过度释放,选择性下调细胞顶膜Na⁺运载体的表达和活化,松懈上皮间紧密连接复合体使肠黏膜通透性升高.大量的IFN- γ 产生可诱导吞噬细胞释放前炎症因子,如IL-1、TNF- α 等,这些细胞因子募集白细胞和单核细胞进入黏膜固有层.活化的白细胞和单核细胞在局部的浸润并释放炎症介质,进一步放大了炎症并导致组织损伤.

结果:烧伤后1 d时两组IL-2、IFN- γ 的表达明显上升(19.7 ± 7.3 vs 92.6 ± 21.3 、 97.6 ± 25.4 ; 63.7 ± 27.3 vs 279.4 ± 89.7 、 292.7 ± 97.4 ; 均 $P < 0.01$), EIN组两者分别在10 d及4、7、10 d时明显低于EN组(41.6 ± 16.5 vs 55.9 ± 14.4 ; 96.7 ± 31.2 vs 182.6 ± 52.9 , 73.9 ± 26.5 vs 129.9 ± 48.9 , 71.6 ± 26.9 vs 104.3 ± 31.7 ; $P < 0.01$ 或0.05); EIN组在4、7、10 d时IL-4、IL-10表达高于EN组(169.3 ± 57.7 vs 94.9 ± 28.6 , 157.6 ± 74.3 vs 65.2 ± 32.4).提示EIN能促进Peyer's结淋巴细胞Th2细胞因子IL-4、IL-10的表达.

结论:烫伤能引起Peyer's结内细胞细胞因子IL-2、IFN- γ 的表达明显上升,肠内免疫营养支持通过促进Th2细胞因子的分泌纠正局部Th2向Th1漂移的免疫偏差,改善局部的体液免疫,有利于肠道免疫屏障的恢复和强化.

关键词: 免疫营养; 烫伤; Peyer's结; 外周血辅助性TH1/TH2淋巴细胞; 大鼠

邓志云, 郭光华, 杨毅, 赵晓雷, 崔泉. 早期肠内免疫营养对烫伤大鼠Peyer's结Th1/Th2细胞因子的影响. 世界华人消化杂志 2010; 18(22): 2359-2364

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/2359.asp>

0 引言

黏膜免疫系统的主要功能是对黏膜表面吸入或食入的大量种类繁杂的抗原进行准确识别和作出迅速正确的反应,对有害抗原或病原体产生高效的体液和细胞免疫,进行有效的免疫排斥或排除(immune exclusion or immune elimination)^[1-3].在烧(创)伤后肠黏膜的缺血缺氧性损害、炎性介质和细胞因子的瀑式释放、高代谢引起营养代谢底物的缺乏等应激性变化可造成肠黏膜免疫屏障的破坏,细菌和内毒素移位,继而启动多器官功能障碍综合征(multiple organ dysfunction syndrome, MODS)^[4].我们于严重烫伤后早期对大鼠实行不同内容的肠内营养补给,观察其对Peyer's结淋巴细胞Th1细胞因子IL-2、IFN- γ 及Th2细胞因子IL-4、IL-10产生的变化的影响.

1 材料和方法

1.1 材料 成年健康SD大鼠72只,体质量220-250 g,雌雄兼用,由南昌大学医学院医学实验动物科学部提供(动物合格证:医动字021-9602).雌雄分笼,适应性喂养1 wk,自由摄水饮食.主要试剂:大鼠IL-2、IL-4、IFN- γ 、IL-10 ELISA检测

试剂盒购于深圳晶美生物科技有限公司.

1.2 方法

1.2.1 大鼠烫伤模型的制作: SD大鼠随机分为2组,即肠内营养(EN)组和免疫营养(EIN)组,2组所有大鼠均制成烫伤模型,每组32只.另取8只作为伤前对照,制成假烫模型,所得数据作为伤前参考值.大鼠烫伤前禁食12 h,10 g/L戊巴比妥钠(40 mg/kg)腹腔麻醉,电推去毛,称其质量后采用南昌大学第一附属医院实验中心自制蒸汽烫伤控制器,设定压力为0.03 mPa,温度108 $^{\circ}\text{C}$,持续8 s,造成总体表面积(TBSA)为30%的III度烫伤.伤后立即腹腔注射平衡液50 mL/kg抗休克.将大鼠放入限制笼内饲养,实验过程中室温保持在25 $^{\circ}\text{C}$ 左右,相对湿度约40%左右,创面外用碘伏消毒,实验室每天紫外线消毒.于伤后1, 4, 7和10 d检测观察指标,在每个时间点每组大鼠均为8只.

1.2.2 营养液的配制与供给: 两组给予同等热量的肠内营养物. EN组给予整蛋白型肠内营养剂能全力(418.2 焦/100 mL); EIN组肠内免疫营养制剂由南昌大学第一附属医院营养室配制(522.75 焦/100 mL),每100 mL添加谷氨酰胺1.30 g、精氨酸0.89 g, $\omega 6 : \omega 3$ 脂肪酸比例为3.45 : 1; 两组在层流台上将各种营养成分混匀后分装,4 $^{\circ}\text{C}$ 保存,用时复温到37 $^{\circ}\text{C}$.伤后4 h开始灌喂营养液,按每天731.5 kJ/kg的标准供给^[5],每天计划量分3-5次喂完,不限饮水.2组治疗疗程均为10 d.

1.2.3 指标检测: (1)Peyer's结细胞的分离: Peyer's结细胞的分离按Janu等^[6]的方法进行,具体操作步骤如下:取大鼠回肠,盐水冲洗肠腔,眼科剪分离Peyer's结置于无菌培养皿中,注射器针头撕碎,50 kU/L I型胶原酶的RPMI 1640 15 mL中37 $^{\circ}\text{C}$ 持续振荡并孵育60 min,在胶原酶消化后,细胞悬液通过200目过滤器过滤收集过滤液, Percoll梯度离心,0.4% 台盼鉴定活细胞数目并计数细胞总数,过滤液1 500 r/min离心10 min,去上清, RPMI 1640洗涤2次. (2)Peyer's结细胞的体外培养: 取洗涤两次的Peyer's结淋巴细胞,悬浮于含有抗生素(青霉素100 kU/L,链霉素100 kU/L)、100 mL/L FBS和植物凝血素(PHA 200 $\mu\text{g/L}$)的RPMI 1640中,调节细胞浓度至 $2 \times 10^6/\text{mL}$, CO_2 孵育箱37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育24 h,离心取上清液酶联免疫吸附测定试剂盒测定细胞因子IL-2、IFN- γ 、IL-4、IL-10的浓度.

统计学处理 所有数据均用SPSS10.0统计软件进行分析,用mean \pm SD进行统计描述,同种处

表 1 Peyer's结淋巴细胞体外培养IL-2浓度的变化 (mean \pm SD, ng/L, $n = 8$)

分组	伤前值	伤后时间(d)			
		1	4	7	10
EN组	19.7 \pm 7.3	92.6 \pm 21.3 ^d	74.6 \pm 17.8 ^d	58.7 \pm 18.5 ^d	55.9 \pm 14.4 ^d
EIN组		97.6 \pm 25.4 ^d	81.7 \pm 21.3 ^d	51.6 \pm 17.7 ^d	41.6 \pm 16.5 ^{ad}

^a $P < 0.05$ vs EN组; ^d $P < 0.01$ vs 伤前.

表 2 Peyer's结淋巴细胞体外培养IFN- γ 浓度的变化 (mean \pm SD, ng/L, $n = 8$)

分组	伤前值	伤后时间(d)			
		1	4	7	10
EN组	63.7 \pm 27.3	279.4 \pm 89.7 ^b	182.6 \pm 52.9 ^b	129.9 \pm 48.9 ^b	104.3 \pm 31.7 ^b
EIN组		292.7 \pm 97.4 ^b	96.7 \pm 31.2 ^{ac}	73.9 \pm 26.5 ^d	71.6 \pm 26.9 ^d

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs 伤前; ^c $P < 0.05$, ^d $P < 0.01$ vs EN组.

表 3 Peyer's结淋巴细胞体外培养IL-4浓度的变化 (mean \pm SD, ng/L, $n = 8$)

分组	伤前值	伤后时间(d)			
		1	4	7	10
EN组	92.3 \pm 31.7	117.6 \pm 37.4	165.9 \pm 54.2 ^a	103.4 \pm 37.6	94.9 \pm 28.6
EIN组		196.2 \pm 56.4 ^{bc}	289.1 \pm 74.1 ^{bc}	251.3 \pm 69.3 ^{bd}	169.3 \pm 7.7 ^{ac}

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs 伤前; ^c $P < 0.05$, ^d $P < 0.01$ vs EN组.

理不同时间组间比较及同一时间内不同处理组间比较均采用单因素方差分析. 统计结果以 P 值表示, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义, $P < 0.01$ 为差异极显著.

2 结果

2.1 伤后情况 各组大鼠伤后烫伤部位即为创面发白, 呈皮革状; 12 h后出现发黑现象. 各时间点烫伤组大鼠处死前活动减少, 精神较差, 毛发松散; 假烫组的所有大鼠全身与脱毛部位基本情况如常, 未见明显改变.

2.2 Peyer's结淋巴细胞体外培养Th1/Th2细胞因子浓度的变化

2.2.1 IL-2表达的变化: 烧伤后各时间点2组与伤前比较均明显升高, 尤其在伤后第1天为明显, 差异有极为显著的意义($P < 0.01$); EIN组10 d时与EN组比较明显降低($P < 0.05$, 表1).

2.2.2 IFN- γ 表达的变化: 烧伤后1 d、4 d 2组IFN- γ 的表达与伤前比较明显升高, 差异有显著的意义($P < 0.01$ 或0.05); EIN组在7 d、10 d时与伤前比较差异无显著性意义(均 $P > 0.05$). 在4 d、

7 d、10 d时EIN组IFN- γ 浓度与EN组比较明显降低($P < 0.01$ 或0.05, 表2).

2.2.3 IL-4表达的变化: 伤后EIN组IL-4表达明显上升, 在各时间点与伤前比较差异均有显著的意义($P < 0.01$ 或0.05); 在4 d时EN组与伤前比较明显升高, 差异有显著的统计学意义($P < 0.05$), 其余时间点两组与伤前比较差异无统计学意义(均 $P > 0.05$); 在伤后各时间点与EN组比较, EIN组IL-4浓度显著高于前2组($P < 0.01$ 或0.05, 表3).

2.2.4 IL-10表达的变化: IL-10在烧伤后1 d时两组明显升高, 与伤前比较差异有统计学意义(均 $P < 0.01$), EN组逐步下降, 但EN组4 d内均高于伤前; EIN组在实验观察时间内均明显高于伤前(均 $P < 0.01$), 组间比较EIN组在4 d、7 d和10 d时间IL-10的表达均高于EN组(均 $P < 0.01$, 表4).

3 讨论

Peyer's结是肠相关淋巴组织(gut-associated lymphoid tissue, GALT)的主要成员之一, Peyer's结T淋巴细胞主要为CD4⁺的T淋巴辅助细胞(Th)和CD8⁺的细胞毒性T淋巴细胞(Tc), 两者来自

■应用要点

本实验结果证实了烫伤明显地损害了Peyer's的免疫功能, 导致体液免疫损害, 通过促进Th2细胞因子的分泌而改善局部的体液免疫, 有利于肠道免疫屏障的恢复.

同行评价

本文总体上设计合理,有一定的新颖性和科学性.

表 4 Peyer's结淋巴细胞体外培养IL-10浓度的变化 (mean \pm SD, ng/L, $n = 8$)

分组	伤前值	伤后时间(d)			
		1	4	7	10
EN组	53.7 \pm 37.3	146.4 \pm 79.7 ^b	84.6 \pm 32.9 ^a	81.6 \pm 43.9	65.2 \pm 32.4
EIN组		171.7 \pm 83.4 ^b	219.3 \pm 71.3 ^{bd}	161.9 \pm 86.5 ^{bd}	157.6 \pm 74.3 ^{bd}

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs 伤前; ^d $P < 0.01$ vs EN组.

于同一前体Th0细胞. 根据其分泌的细胞因子不同将辅助T淋巴细胞分为Th1和Th2, Th1产生IL-2、IFN- γ 等, Th1细胞促进细胞介导的免疫反应, 占优势的Th1效应导致T淋巴细胞的活化; Th2细胞因子包括IL-4、IL-5、IL-6等, 参与了诱导部位B淋巴细胞增殖、分化, 占优势的Th2效应导致B淋巴细胞的活化和抗体产生的上调^[7-9]. 已经证实SIgA的合成与抗原呈递、淋巴细胞归巢迁移(trafficking)与周围环境中的细胞因子有很大关系^[10,11]. 为了了解细胞因子在肠道免疫中的作用以及不同营养素给予后的变化, 我们对从Peyer's结中分离纯化的淋巴细胞体外培养, 用植物血凝素(phytohemagglutinin phyto lectin, PHA)刺激细胞因子的分泌, 选择IL-2、IFN- γ 作为Th1细胞的标志性因子, 而IL-4、IL-10作为Th2细胞的标志性因子并对其进行分析.

在烧伤后EIN组IL-4、IL-10的水平分别多个时间点明显高于EN组; Kudsk等^[12]报道补充Glu的TPN能促进肠内IL-4、IL-10的产生, 其最终效应是保持肠道IgA的水平. 静止期B淋巴细胞在Peyer's结内进行同种型转换(isotype switch), 形成膜表面抗体IgA⁺的B淋巴细胞, 是形成IgA型浆细胞的关键之一, 以前的体外研究发现TGF- β 在此过程中起重要的作用, 既促使前B淋巴细胞基因表达重排, C α 基因替代CH基因, 从而使B淋巴细胞转型为IgA型B淋巴细胞. 近来的研究证实IL-4的作用远高于TGF- β . 在体内实验中^[13]证实IL-4是调控B淋巴细胞在Peyer's结内分化的主要因子, IL-4^{-/-}小鼠失去合成IgA的功能, 因此IL-4对于IgA的合成十分重要. IL-4还可激活静止期B淋巴细胞, 促使未成熟的B淋巴细胞进行型转换进而形成抗原特异性的IgA⁺ B淋巴细胞, 这些受刺激的淋巴细胞离开淋巴结, 流经淋巴管和肠系膜淋巴结, 进入体循环, 最后回归肠固有层和其他黏膜效应部位; 此时B淋巴细胞在T淋巴细胞, 主要是CD4⁺ T淋巴细胞的作用下, 进行最终的分化. Genton等^[14]发现IL-4的表达与MAdCAM-1的表达相

关. Boyaka等^[15]研究了各种TH2型细胞因子在黏膜免疫中的作用, 发现IL-4、IL-10可协同诱导SIgA⁺ B淋巴细胞分化成为IgA⁺浆细胞, 在给予外源性IL-4后, IgA⁺浆细胞增加. IL-10在维护肠道内环境稳定方面起关键作用^[16,17], Ruiz等^[18]发现IL-10基因敲除的动物不能抑制肠球菌定殖引起肠道的促炎症反应. 在我们以前的研究中已证实免疫营养支持可以改善烫伤后肠道免疫功能^[19-21], 结合本实验结果我们推测提高IL-4、IL-10的表达, 促进Peyer's结B淋巴细胞的成熟与循环可能是免疫营养改善肠道免疫功能的主要机制.

在实验中我们发现伤后早期T淋巴细胞IL-2、IFN- γ 的产生明显上升, 远高于Th2因子升高的幅度. 一方面这有助于增强巨噬细胞和吞噬细胞的吞噬能力和抗原递呈, 但局部Th1因子过度的释放对肠道免疫也有不利的一面. Pérez-Bosque等^[22]发现肠道内毒素增加能引起GALT中IFN- γ 等细胞因子的过度释放, 选择性下调细胞顶膜Na⁺运载体的表达和活化, 松懈上皮间紧密连接复合体使肠黏膜通透性升高^[23,24]. 大量的IFN- γ 产生可诱导吞噬细胞释放前炎症因子, 如IL-1、TNF- α 等, 这些细胞因子募集白细胞和单核细胞进入黏膜固有层. 活化的白细胞和单核细胞在局部的浸润并释放炎症介质, 进一步放大了炎症并导致组织损伤^[25].

在以前的研究中发现IFN- γ 能促进Th2细胞分化为Th1细胞, 影响Th1/Th2比率^[26]; 在本实验中烧伤后Peyer's结细胞分泌IFN- γ 明显上升, 这也证实烧伤后肠道存在Th2向Th1漂移的免疫偏差. 在正常的生理情况下, Th1、Th2两类细胞处于相互抑制、相互转化的平衡状态, 一旦平衡被打破, 机体就会处于Th1优势或Th2优势的漂移状态, 从而出现各种病理反应^[27]. McClave等^[28]报道缺乏Glu的肠内营养可以促进肠道黏膜或免疫细胞释放前炎症因子, 如TNF- α 、IFN- γ 等; 这些细胞因子会加重全身炎症反应, 使这种恶性循环进一步抑制肠道免疫监视作用,

并促进细菌移位。Zhang等^[29]报道饮食增加 ω -3脂肪酸能调节Th1/Th2, 通过抑制Th1因子的表达而增强Th2效应。Matsuda等^[30]发现手术前给予免疫营养能纠正患者的Th1/Th2平衡, 纠正Th2占优势的漂移现象, 从而改善机体的免疫状况。两组实验动物中, EIN组在10 d时IL-2、IFN- γ 低于EN组, 而Th2因子IL-4、IL-10明显升高, 这说明我们的免疫营养制剂可能是通过减少这些前炎症因子的释放, 更好地纠正烧伤后Th2向Th1的漂移, 协调细胞免疫和体液免疫之间的平衡。

总之, 本实验结果证实了烫伤明显地损害了Peyer's的免疫功能, 导致体液免疫损害, 从而使机体对外来抗原的反应与清除作用减弱, 处于易感状态。相对于普通肠内营养制剂, 肠内免疫营养支持能快速有效地促进, 纠正局部Th2向Th1漂移的免疫偏差, 通过促进Th2细胞因子的分泌而改善局部的体液免疫, 有利于肠道免疫屏障的恢复。

4 参考文献

- Briassoulis G, Filippou O, Hatzi E, Papassotiriou I, Hatzis T. Early enteral administration of immunonutrition in critically ill children: results of a blinded randomized controlled clinical trial. *Nutrition* 2005; 21: 799-807
- 张家平, 黄跃生, 杨宗城. 烧伤延迟复苏加重肠黏膜屏障功能损害的机制研究. *世界华人消化杂志* 2004; 12: 1329-1332
- Wilson MD, Dziewulski P. Severe gastrointestinal haemorrhage and ischaemic necrosis of the small bowel in a child with 70% full-thickness burns: a case report. *Burns* 2001; 27: 763-766
- Costantini TW, Loomis WH, Putnam JG, Drusinsky D, Deree J, Choi S, Wolf P, Baird A, Eliceiri B, Bansal V, Coimbra R. Burn-induced gut barrier injury is attenuated by phosphodiesterase inhibition: effects on tight junction structural proteins. *Shock* 2009; 31: 416-422
- 王凤君, 汪仕良, 赵云, 尤忠义, 王裴. 不同营养支持途径对烧伤大鼠肠黏膜上皮细胞周期的影响. *中华烧伤杂志* 2002; 18: 203-206
- Janu P, Li J, Renegar KB, Kudsk KA. Recovery of gut-associated lymphoid tissue and upper respiratory tract immunity after parenteral nutrition. *Ann Surg* 1997; 225: 707-715; discussion 715-717
- Kraehenbuhl JP, Neutra MR. Molecular and cellular basis of immune protection of mucosal surfaces. *Physiol Rev* 1992; 72: 853-879
- 乔治, 李荣, 徐迎新, 陈凇, 彭正, 杜晓辉, 田文, 周国民. Th1/Th2及Tc1/Tc2在胃癌患者外周血中的漂移及意义. *世界华人消化杂志* 2009; 17: 1238-1240
- Farrar JD, Asnagli H, Murphy KM. T helper subset development: roles of instruction, selection, and transcription. *J Clin Invest* 2002; 109: 431-435
- Amin PB, Diebel LN, Liberati DM. T-cell cytokines affect mucosal immunoglobulin A transport. *Am J Surg* 2007; 194: 128-133
- Santiago AF, Fernandes RM, Santos BP, Assis FA, Oliveira RP, Carvalho CR, Faria AM. Role of mesenteric lymph nodes and aging in secretory IgA production in mice. *Cell Immunol* 2008; 253: 5-10
- Kudsk KA, Wu Y, Fukatsu K, Zarza BL, Johnson CD, Wang R, Hanna MK. Glutamine-enriched total parenteral nutrition maintains intestinal interleukin-4 and mucosal immunoglobulin A levels. *J Parenter Enteral Nutr* 2000; 24: 270-274; discussion 274-275
- Vajdy M, Kosco-Vilbois MH, Kopf M, Köhler G, Lycke N. Impaired mucosal immune responses in interleukin 4-targeted mice. *J Exp Med* 1995; 181: 41-53
- Genton L, Kudsk KA, Reese SR, Ikeda S. Enteral feeding preserves gut Th-2 cytokines despite mucosal cellular adhesion molecule-1 blockade. *J Parenter Enteral Nutr* 2005; 29: 44-47
- Boyaka PN, Marinaro M, Jackson RJ, van Ginkel FW, Cormet-Boyaka E, Kirk KL, Kensil CR, McGhee JR. Oral QS-21 requires early IL-4 help for induction of mucosal and systemic immunity. *J Immunol* 2001; 166: 2283-2290
- Jump RL, Levine AD. Murine Peyer's patches favor development of an IL-10-secreting, regulatory T cell population. *J Immunol* 2002; 168: 6113-6119
- Zhou P, Streutker C, Borojevic R, Wang Y, Croitoru K. IL-10 modulates intestinal damage and epithelial cell apoptosis in T cell-mediated enteropathy. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2004; 287: G599-G604
- Ruiz PA, Shkoda A, Kim SC, Sartor RB, Haller D. IL-10 gene-deficient mice lack TGF- β /Smad signaling and fail to inhibit proinflammatory gene expression in intestinal epithelial cells after the colonization with colitogenic *Enterococcus faecalis*. *J Immunol* 2005; 174: 2990-2999
- 郭光华, 蔡晨, 范骏, 张红艳, 李国辉. 早期肠内免疫营养对烫伤大鼠免疫功能的影响. *中华烧伤杂志* 2007; 23: 257-260
- 范骏, 孟庆延, 郭光华, 谢勇, 李悦, 胡复荪, 修一平, 李泰然, 马靛. 早期肠内免疫营养对烫伤小鼠肠道免疫功能的影响. *中华烧伤杂志* 2009; 25: 140-143
- Fan J, Meng Q, Guo G, Xie Y, Li X, Xiu Y, Li T, Ma L. Effects of early enteral nutrition supplemented with arginine on intestinal mucosal immunity in severely burned mice. *Clin Nutr* 2010; 29: 124-130
- Pérez-Bosque A, Pelegrí C, Vicario M, Castell M, Russell L, Campbell JM, Quigley JD 3rd, Polo J, Amat C, Moretó M. Dietary plasma protein affects the immune response of weaned rats challenged with *S. aureus* Superantigen B. *J Nutr* 2004; 134: 2667-2672
- Nusrat A, Turner JR, Madara JL. Molecular physiology and pathophysiology of tight junctions. IV. Regulation of tight junctions by extracellular stimuli: nutrients, cytokines, and immune cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2000; 279: G851-G857
- Rocha F, Musch MW, Lishanskiy L, Bookstein C, Sugi K, Xie Y, Chang EB. IFN- γ downregulates expression of Na(+)/H(+) exchangers NHE2 and NHE3 in rat intestine and human Caco-2/bbe cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 2001; 280: C1224-C1232
- Blumberg RS, Strober W. Prospects for research in inflammatory bowel disease. *JAMA* 2001; 285: 643-647
- Dohi T, Fujihashi K, Kiyono H, Elson CO, McGhee JR. Mice deficient in Th1- and Th2-type cytokines develop distinct forms of hapten-induced colitis.

- Gastroenterology* 2000; 119: 724-733
- 27 Ren Z, Pang G, Clancy R, Li LC, Lee CS, Batey R, Borody T, Dunkley M. Shift of the gastric T-cell response in gastric carcinoma. *J Gastroenterol Hepatol* 2001; 16: 142-148
- 28 McClave SA, Ritchie CS. Artificial nutrition in pancreatic disease: what lessons have we learned from the literature? *Clin Nutr* 2000; 19: 1-6
- 29 Zhang P, Smith R, Chapkin RS, McMurray DN. Dietary (n-3) polyunsaturated fatty acids modulate murine Th1/Th2 balance toward the Th2 pole by suppression of Th1 development. *J Nutr* 2005; 135: 1745-1751
- 30 Matsuda A, Furukawa K, Takasaki H, Suzuki H, Kan H, Tsuruta H, Shinji S, Tajiri T. Preoperative oral immune-enhancing nutritional supplementation corrects TH1/TH2 imbalance in patients undergoing elective surgery for colorectal cancer. *Dis Colon Rectum* 2006; 49: 507-516

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》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审核, 核对无误后, 进行稿件排版及校对、图片制作及参考文献核对. 彩色图片保证放大400%依然清晰; 中文参考文献查找全文, 核对作者、题目、期刊名、卷期及页码, 英文参考文献根据本杂志社自主研发的“参考文献检测系统”进行检测, 确保作者、题目、期刊名、卷期及页码准确无误. 排版完成后, 电子编辑进行黑马校对, 消灭错别字及语句错误.

第六步 组版: 本期责任电子编辑负责组版, 对每篇稿件图片校对及进行质量控制, 校对封面、目次、正文页码和书眉, 修改作者的意见, 电子编辑进行三校. 责任科学编辑制作整期中英文摘要, 并将英文摘要送交英文编辑进一步润色. 责任电子编辑再将整期进行二次黑马校对. 责任科学编辑审读本期的内容包括封面、目次、正文、表格和图片, 并负责核对作者、语言编辑和语言审校编辑的清样, 负责本期科学新闻稿的编辑.

第七步 印刷、发行: 编辑部主任和主编审核清样, 责任电子编辑通知胶片厂制作胶片, 责任科学编辑、电子编辑核对胶片无误送交印刷厂进行印刷. 责任电子编辑制作ASP、PDF、XML等文件. 编务配合档案管理员邮寄杂志.

第八步 入库: 责任电子编辑入库, 责任科学编辑审核, 包括原始文章、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)

MELD评分联合血浆内毒素、D-Dimer浓度对肝硬化失代偿期患者预后的判断

郑中伟, 童学成

■背景资料

内毒素血症是肝硬化失代偿期患者出现感染的重要标志, D-Dimer是患者纤溶亢进的标志, 肝硬化失代偿期患者MELD评分与血浆内毒素、D-Dimer的相关性如何, 各指标单独或联合预测肝硬化失代偿期患者预后的价值如何, 这些方面尚没有系统的研究, 深入研究MELD评分与血浆内毒素、D-Dimer对肝硬化患者预后的判断价值具有较好的临床意义。

郑中伟, 童学成, 江苏省常州市第三人民医院肝病科16病区
江苏省常州市 213001

作者贡献分布: 郑中伟与童学成对此文所作贡献均等; 此课题由郑中伟与童学成设计; 研究过程由郑中伟与童学成操作完成; 研究所用新试剂由郑中伟提供; 分析工具由童学成提供; 数据分析由童学成完成; 本论文写作由郑中伟与童学成完成。

通讯作者: 郑中伟, 副主任医师, 213001, 江苏省常州市兰陵北路300号, 江苏省常州市第三人民医院肝病科16病区。

czzzw1966@126.com

电话: 0519-86641590

收稿日期: 2010-04-26 修回日期: 2010-07-01

接受日期: 2010-07-12 在线出版日期: 2010-08-08

Value of MELD score in combination with plasma endotoxin and D-dimer levels in the evaluation of the prognosis of patients with decompensated cirrhosis

Zhong-Wei Zheng, Xue-Cheng Tong

Zhong-Wei Zheng, Xue-Cheng Tong, Department of Hepatology, the Third People's Hospital of Changzhou, Changzhou 213001, Jiangsu Province, China

Correspondence to: Zhong-Wei Zheng, Department of Hepatology, the Third People's Hospital of Changzhou, Changzhou 213001, Jiangsu Province, China. czzzw1966@126.com

Received: 2010-04-26 Revised: 2010-07-01

Accepted: 2010-07-12 Published online: 2010-08-08

Abstract

AIM: To evaluate the short- and medium-term survival prognosis of cirrhotic patients by means of MELD (model for end-stage liver disease) scoring in combination with detection of plasma D-dimer and endotoxin levels.

METHODS: A total of 139 hospitalized patients with decompensated cirrhosis was retrospectively analyzed. These patients were divided into survival and death group according to follow-up data at 6, 12 and 18 mo. MELD scores and Child-Turcotte-Pugh (CTP) scores were calculated in each patient by detecting relevant parameters. Plasma endotoxin and D-dimer concentrations were measured. MELD score in combination with plasma D-dimer and endotoxin concentra-

tions were used to evaluate the survival diagnosis of patients with decompensated cirrhosis.

RESULTS: Nineteen, forty-two and seventy-eight patients died at 6-, 12- and 18-mo follow-up, respectively. MELD score and plasma D-dimer and endotoxin concentrations were of statistical significance between the survival group and death group (all $P < 0.05$). ROC curve analysis showed that MELD score and plasma endotoxin and plasma D-dimer levels were of great value in predicting the survival prognosis of patients with decompensated cirrhosis. The best critical value of MELD score to predict death in patients with decompensated cirrhosis is 28. The risk of death would rise if MELD score increased. The best critical value of plasma D-dimer level to predict death in patients with decompensated cirrhosis is 1.2 mg/L. The best threshold value of plasma endotoxin to predict death in patients with decompensated cirrhosis is 11 ng/L. The risk of death would rise if plasma D-dimer and endotoxin concentrations rised.

CONCLUSION: MELD score in combination with plasma endotoxin and D-dimer concentrations is of great value for evaluation of the survival prognosis of patients with decompensated cirrhosis.

Key Words: Liver cirrhosis; Endotoxin; D-dimer; Model for end-stage liver disease

Zheng ZW, Tong XC. Value of MELD score in combination with plasma endotoxin and D-dimer levels in the evaluation of the prognosis of patients with decompensated cirrhosis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(22): 2370-2374

摘要

目的: 探讨MELD评分联合血浆内毒素、D-Dimer浓度对肝硬化失代偿期患者预后的判断价值。

方法: 回顾性分析失代偿期肝硬化住院患者139例, 分别根据随访6 mo、12 mo及18 mo的

■同行评议者

李涛, 副主任医师, 北京大学人民医院肝胆外科

生存、死亡情况分组,通过测定相关指标计算存活组与死亡组患者MELD分值,测定血浆内毒素、D-Dimer浓度,探求MELD分值联合血浆内毒素、D-Dimer浓度与肝硬化失代偿期患者预后相关性。

结果: 随访6 mo, 患者19例死亡; 随访12 mo, 患者42例死亡; 随访18 mo, 患者78例死亡, 存活组与死亡组患者MELD分值、内毒素、血浆D-Dimer浓度之间的差异有统计学意义(均 $P<0.05$)。ROC判定MELD评分、血浆内毒素、血浆D-Dimer浓度对预测失代偿期肝硬化患者的死亡有很大应用价值。MELD分值预测失代偿期肝硬化患者死亡的最佳临界值为28, MELD分值增高可增加患者死亡风险; 血浆D-Dimer预测失代偿期肝硬化患者死亡的最佳临界值为1.2 mg/L, 血浆内毒素预测患者死亡的最佳临界值为11 ng/L, 血浆D-Dimer和内毒素浓度增高可增加患者死亡风险。

结论: MELD分值联合血浆内毒素、D-Dimer浓度对肝硬化失代偿期患者预后有较高的判断价值。

关键词: 肝硬化; 内毒素; D-二聚体; 终末期肝病模型

郑中伟, 童学成. MELD评分联合血浆内毒素、D-Dimer浓度对肝硬化失代偿期患者预后的判断. 世界华人消化杂志 2010; 18(22): 2370-2374

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/2370.asp>

0 引言

肝硬化失代偿期是并发症较多、且互为因果的恶性循环状态,对肝硬化失代偿期患者的预防性治疗措施是非常必要的。本研究拟通过检测目前通用的评估模型-终末期肝病模型(model for end-stage liver disease, MELD)分级所需指标进行评分,并动态监测血浆内毒素、D-Dimer浓度变化,以探讨MELD分值联合血浆内毒素、D-Dimer浓度对肝硬化失代偿期患者预后的判断价值,协助临床医师对高危的肝硬化失代偿期患者及时采取有针对性的预防或治疗措施,最大限度延长肝衰竭患者生命。

1 材料和方法

1.1 材料 回顾性分析及回访2008-01/2009-12江苏省常州市第三人民医院诊断为肝硬化失代偿期住院患者139例,其中男78例,女61例,年龄42-88(平均年龄 68 ± 14.3)岁;期间死亡患者78

例,男53例,女25例,平均年龄 69 ± 12.8 岁;存活患者61例,男25例,女36例,平均年龄 66 ± 15.2 岁。所有患者入院后治疗前测定血浆内毒素、D-Dimer浓度1次,如有出血在出血时和血流动力学稳定后的第3、8、15天分别测定血浆内毒素、D-Dimer浓度。全部肝硬化失代偿期患者入院后进行止血、抑酸、降门脉压力、支持和抗感染的相关治疗。

1.2 方法 采用全自动血凝分析仪测定血浆D-Dimer、纤维蛋白原(fibrinogen, Fib)、凝血酶原时间(prothrombin time, PT)、部分凝血活酶时间(activated partial thromboplastin time, APTT),试剂盒采用美国贝克曼库尔特公司的原装试剂;采用日立全自动生化仪测定肝肾功能;上海伊华临床医学科技公司提供的鲎试剂盒(II)定量检测内毒素,检测方法按说明书进行。全部患者根据血清胆红素水平、血清肌酐水平和PT国际标准化比值(INR)计算MELD分值: $MELD = 3.8 \times \ln(\text{总胆红素mg/dL}) + 11.2 \times \ln(\text{INR}) + 9.6 \times \ln(\text{肌酐mg/dL}) + 6.4 \times \text{病因}(\text{胆汁淤积或酒精为0; 其他为1})$ 。

统计学处理 应用SPSS15.0统计软件包对MELD分值、血浆内毒素和D-Dimer浓度进行统计学分析,检验水准设为0.05。计量资料采用 $\text{mean} \pm \text{SD}$ 表示,组间均数比较采用单因素方差分析。

2 结果

2.1 随访6 mo生存组和死亡组研究指标组间比较 随访6 mo, 死亡组患者MELD评分、CTP分值、血浆D-Dimer和内毒素浓度较生存组患者显著升高,组间各指标差异有统计学意义($P<0.05$, 表1)。

2.2 随访12 mo生存组和死亡组研究指标组间比较 随访12 mo, 死亡组患者MELD评分、CTP分值、血浆D-Dimer和内毒素浓度较生存组患者显著升高,组间各指标差异有统计学意义($P<0.05$, 表2)。

2.3 随访18 mo生存组和死亡组研究指标组间比较 随访18 mo, 死亡组患者MELD评分、CTP分值、血浆D-Dimer和内毒素浓度较生存组患者仍显著升高,组间各指标差异有统计学意义($P<0.05$, 表3)。

2.4 不同方法的评估价值 用Child-Pugh评分、MELD评分、MELD评分联合血浆内毒素、D-Dimer浓度判断预后的评估价值。Child-Pugh评分预测6、12、18 mo死亡危险的敏感性分别

■ 研发前沿 Child-Pugh(CTP)分级在判断终末期肝病病情方面越来越显示出局限性。如何定量地来分析肝硬化失代偿期患者的预后是临床工作中的难点和重点。MELD评分联合血浆内毒素、D-Dimer是肝脏储备功能和感染、纤溶的综合反映,可能提供更确切的定量生存预测依据,可以为临床对肝硬化失代偿期患者的发病过程有新的认识,并更好地为临床治疗提供指导。

■创新盘点

本研究对MELD评分所需指标进行测定, 计算MELD分值, 并监测血浆内毒素、D-Dimer浓度变化, 采用更确切的定量生存预测依据指导临床工作。

表 1 生存组和死亡组患者随访6 mo研究指标比较

分组	n	MELD	CTP	D-Dimer(mg/L)	内毒素(ng/L)
生存组	120	16.27 ± 7.21	8.72 ± 2.31	0.83 ± 0.15	8.65 ± 2.42
死亡组	19	43.76 ± 11.25 ^a	13.19 ± 3.47 ^a	1.86 ± 1.12 ^a	15.45 ± 6.33 ^a

^aP<0.05 vs 生存组。

表 2 生存组和死亡组患者随访12 mo研究指标比较

分组	n	MELD	CTP	D-Dimer(mg/L)	内毒素(ng/L)
生存组	97	14.86 ± 8.16	6.87 ± 1.98	0.76 ± 0.11	7.24 ± 4.15
死亡组	42	38.59 ± 10.63 ^a	12.46 ± 2.58 ^a	1.78 ± 1.35 ^a	13.86 ± 5.17 ^a

^aP<0.05 vs 生存组。

表 3 生存组和死亡组患者随访18 mo研究指标比较

分组	n	MELD	CTP	D-Dimer(mg/L)	内毒素(ng/L)
生存组	61	12.98 ± 8.16	6.42 ± 2.16	0.72 ± 0.23	6.84 ± 3.68
死亡组	78	35.81 ± 12.57 ^a	10.28 ± 2.36 ^a	1.69 ± 1.51 ^a	12.89 ± 6.04 ^a

^aP<0.05 vs 生存组。

是78%、57.8%、54.5%, 特异性分别是86.4%、91.3%、94.5%; MELD评分预测6、12、18 mo死亡危险的敏感性有所上升, 分别是100%、62.3%、59.2%, 特异性则下降为83.2%、86.5%、89.6%; 联合检测法预测6、12、18 mo死亡危险敏感性与MELD评分法相仿, 特异性分别是100.0%、76.1%、75.2%, 而特异性较MELD法升高, 与CTP评分相仿, 分别是88.7%、91.9%、95.4%(表4)。

2.5 ROC曲线对研究指标预测价值的判断 在所有139例失代偿期肝硬化患者中, 死亡患者与生存患者间的MELD评分间差异有统计学意义。ROC曲线确定出血患者MELD分值预测死亡的最佳临界值为28, ROC曲线确定血浆D-Dimer预测死亡的最佳临界值为血浆D-Dimer浓度≥1.2 mg/L, 血浆内毒素预测死亡的最佳临界值为血浆D-Dimer浓度≥11 ng/L。

2.5.1 ROC曲线对血浆D-Dimer预测价值的判断: ROC曲线下面积(area under curve, AUC)为0.802, 面积的标准误为0.091, 首次血浆D-Dimer用于判断死亡有统计学意义($P = 0.003$), 首次血浆D-Dimer越大, 死亡的可能性越大, 面积的95%可信区间(0.586, 0.958)。综合考虑敏感性、特异性。最佳临界值选为1.2 mg/L时, 敏感性0.752、特异

表 4 不同方法预测死亡危险的敏感性、特异性 (%)

	病死危险					
	6 mo		12 mo		18 mo	
	敏感性	特异性	敏感性	特异性	敏感性	特异性
CTP	78	86.4	57.8	91.3	54.5	94.5
MELD	100	83.2	62.3	86.5	59.2	89.6
联合法	100	88.7	76.1	91.9	72.5	95.4

CTP分值为10; MELD分值为28; 血浆D-Dimer为1.2 mg/L, 内毒素11 ng/L。

性0.852(图1)。

2.5.2 ROC曲线对血浆内毒素预测价值的判断: ROC曲线下面积为0.875, 标准误为0.042, 血浆内毒素用于判断死亡有统计学意义($P = 0.007$), 血浆内毒素浓度越高, 死亡的可能性越大, 面积的95%可信区间(0.823, 0.961)。综合考虑敏感性、特异性。最佳临界值选为11 ng/L, 敏感性0.821、特异性0.883(图2)。

2.5.3 ROC曲线对MELD分值预测价值的判断: ROC曲线下面积为0.901, 面积的标准误为0.058, MELD用于判断死亡有统计学意义($P = 0.002$), MELD越大, 死亡的可能性越大, 面积的95%可信区间(0.782, 1.008), 不包括0.5, 最佳临界值选为28

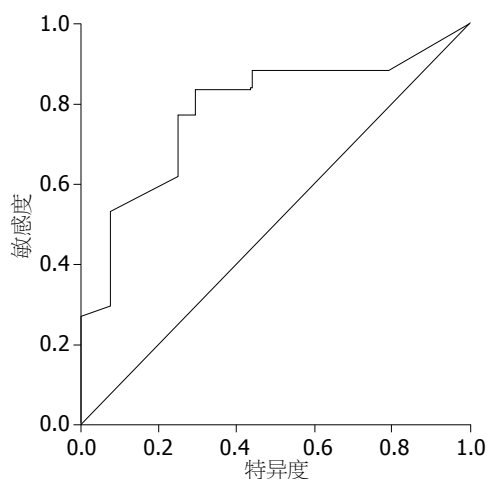


图 1 ROC曲线对血浆D-Dimer预测价值的判断.

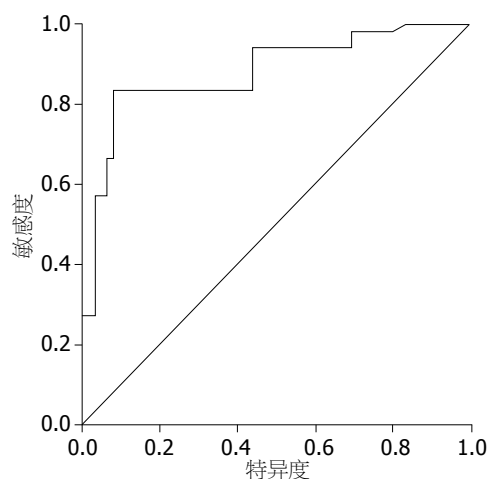


图 3 ROC曲线对MELD分值预测价值的判断.

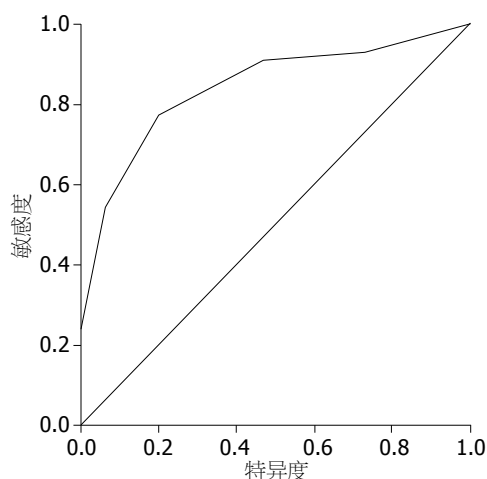


图 2 ROC曲线对血浆内毒素预测价值的判断.

应用要点

肝硬化失代偿期患者往往与感染、凝血功能、肝性脑病、肝肾综合征有密切关系,病理生理过程相互影响、相互促进. MELD分值、血浆内毒素和D-Dimer浓度系列定量指标有助于临床医师采取有效治疗措施.

时, 敏感性0.823, 特异性0.922, $OR = 18.021$, 95%可信区间(3.012, 98.622), 不包含1, 与1有显著性差异, 表明MELD>28是死亡的危险因素(图3).

3 讨论

正确判断失代偿期肝硬化患者预后, 预测进行人工肝和/或肝移植的疗效是正确选择治疗方法、最大限度延长患者生命的前提. 传统的CTP评分体系具有经典、简单、实用的优点, 但是在应用过程中CTP分级评分范围太窄, 区分力低. 2001年Kamath等^[1]提出了新的评价体系, 即MELD, 他的建立基于接受经颈静脉肝内门体静脉分流术的美国肝硬化患者资料基础上的, 采用客观的实验室检查指标替代了CTP评分中腹水、肝性脑病等主观性指标, 避免了不同判定者的主观误差^[2]. 多数学者认为, 与CTP评分系统比较, MELD在评价肝硬化患者肝脏储备功能方面以及预测肝硬化和接受手术后的患者预后

方面能提供更多信息^[3,4]. 研究证实, MELD评分对重型肝炎、酒精性肝炎及再次接受肝移植等患者的预后非常有显著的预测能力^[5-7]; 对肝硬化患者食管静脉曲张破裂出血也有较好的预测和评估价值^[8,9]; 对非酒精性肝硬化和原发性肝癌患者的预后的判断也有一定价值^[10,11].

感染和胃肠道出血是失代偿期肝硬化患者的常见临床症状, 是导致患者死亡的主要原因. 肝硬化出血的原因极为复杂, 除凝血因子、抗凝血因子的合成减少、脾功能亢进外, 肝硬化患者的继发性纤溶亢进占重要地位. 另外, 肝硬化患者常伴发内毒素血症, 而内毒素是引起肝脏损害的物质基础^[12]. 长期或反复的内毒素升高在门脉高压、加重肝病的发展等方面起着重要作用^[13,14].

慢性肝衰竭患者容易出现肝病肠源性内毒素血症, 在本研究中, 对139例肝硬化失代偿期随访6、12和18 mo后发现, 和生存患者相比较, 死亡患者血浆内毒素显著增高, 各时间段差异均有统计学意义($P < 0.05$), 考虑内毒素血症水平与肝功能分级的严重程度有相关性. ROC曲线对内毒素血症的预测价值的分析发现, ROC曲线下面积为0.875, 标准误为0.042, 血浆内毒素用于判断死亡有统计学意义($P = 0.007$), 血浆内毒素浓度越高, 死亡的可能性越大; 综合考虑敏感性、特异性, 其最佳临界值选为11 ng/L时, 敏感性0.821、特异性0.883.

血浆D-Dimer作为体内高凝状态和纤溶亢进的标志物具有临床特异性和便捷性, 已取代组织型纤溶酶原激活剂(tissue plasminogen activator, t-PA)作为纤溶亢进的首选指标. 在本研究中, 本研究对肝硬化失代偿期存活、死亡

■同行评价

本研究方法合理, 结果可信, 分析较为准确, 有较好的临床意义和实用价值。

患者进行了血浆D-Dimer测定。我们发现在最终死亡的出血患者早期血浆D-Dimer浓度变化很大, 表明纤溶亢进在急性出血患者的病程里扮演了重要角色。纤溶亢进指标的测定, 能够帮助评价此后再出血的危险性。通过ROC曲线分析, 首次血浆D-Dimer浓度越大, 死亡的可能性越大, 出血患者首次血浆D-Dimer浓度高于1.2 mg/L是死亡的危险因素。可以认为, 肝硬化失代偿期伴有食管静脉曲张出血患者的首次血浆D-Dimer浓度可直接对患者的再出血和死亡产生影响, 这对临床医师早期判断患者的病情和预后有重要意义。在患者急性出血期, 很难迅速改善肝功能, 但感染和纤溶亢进可以被有效治疗。本研究的结果表明, 除了应用内镜下硬化剂治疗及血管活性药物之外, 抗纤溶药物治疗肝硬化失代偿期伴有食管静脉曲张出血患者可能有较大的实际应用价值, 这种可能性可通过进一步大范围的临床观察来评估。

MELD评分以血清胆红素等常用的生化变化量为依据, 不仅考虑了肝功能状况而且兼顾了肾功能和病因的不同, 具有可动态观察及客观性强等特点, 避免了分级中的主观因素, 短期评估效率优于评分, 能较好地预测终末期肝病死亡发生的危险度^[15]。多数学者认为, 与CTP评分系统比较, MELD在预测肝硬化和接受手术后的患者预后方面能提供更多信息, 由于对终末期肝病患者病情判断的准确性较高, 从而逐渐被应用于其他领域, 进一步拓展了其应用范围^[16,17]。我国学者对此模型也进行了验证, 多数认为此模型能比较准确地预测肝硬化或重型肝炎患者的预后。张桂珍^[18]将MELD评分系统应用于晚期肝硬化患者上消化道出血术后短期生存率预后的判断, 结果提示评分值越高, 晚期肝硬化患者上消化道出血术后生存率越低, AUC越大, 诊断的准确性越高。当一个判断指标的AUC>0.8时, 可以认为他是一个非常好的判断标准^[19]。我们利用ROC曲线判定预测肝硬化失代偿期患者死亡的AUC为0.901, 最佳临界值为28, 对临床肝硬化失代偿期患者的应用有较大指导意义。

本研究的结果证实了MELD评分系统的价值和准确性, 通过随访发现, 对存活者和6、12和18 mo死亡的患者, MELD评分具有良好的判断力。此外MELD评分联合血浆D-Dimer、内毒素与单独MELD评分相比, 能更好地预测6、12和18 mo的死亡率。MELD评分系统可以作为判别肝硬化病情恶化的辅助指标, 此外应注意的

是, 血浆D-Dimer、内毒素升高意味着临床病情复杂和死亡危险性增高的信号。

4 参考文献

- 1 Kamath PS, Wiesner RH, Malinchoc M, Kremers W, Therneau TM, Kosberg CL, D'Amico G, Dickson ER, Kim WR. A model to predict survival in patients with end-stage liver disease. *Hepatology* 2001; 33: 464-470
- 2 Wiesner R, Edwards E, Freeman R, Harper A, Kim R, Kamath P, Kremers W, Lake J, Howard T, Merion RM, Wolfe RA, Krom R. Model for end-stage liver disease (MELD) and allocation of donor livers. *Gastroenterology* 2003; 124: 91-96
- 3 Malinchoc M, Kamath PS, Gordon FD, Peine CJ, Rank J, ter Borg PC. A model to predict poor survival in patients undergoing transjugular intrahepatic portosystemic shunts. *Hepatology* 2000; 31: 864-871
- 4 蒋淼, 樊晓明. 终末期肝病模型在肝硬化失代偿期患者中的评价作用. *中国临床医学* 2008; 15: 352-354
- 5 张铁英, 赵金满, 施贵静. 肝硬化患者肝储备功能对TIPSS术后近期疗效的影响. *世界华人消化杂志* 2005; 13: 415-418
- 6 宋春辉, 陈黎明, 张玲霞. 409例肝硬化和重型肝炎病例的MELD评分结果的构成分析. *中华实验和临床病毒学杂志* 2007; 21: 168-170
- 7 宋春辉, 陈黎明, 徐长江, 陈菊梅. 应用两种评分系统对409例肝硬化和重型肝炎病例的评估分析. *胃肠病学和肝病杂志* 2007; 16: 73-75
- 8 张慧. MELD评分对肝硬化食管胃底静脉曲张出血的评估价值. *现代医药卫生* 2009; 25: 1445-1447
- 9 申振宇, 蒋晓峰, 周莹群, 刘华, 万荣, 郭传勇. 肝硬化食管胃底曲张静脉破裂出血患者的MELD评分与预后分析. *同济大学学报(医学版)* 2009; 30: 119-120
- 10 吴巍, 顾掌生, 王贤军. MELD评分联合血清高密度脂蛋白胆固醇水平预测非酒精性肝硬化预后. *浙江医学* 2007; 29: 911-912
- 11 张俊勇, 刘吉勇, 张福奎, 王宝恩, 贾继东. 终末期肝病模型对原发性肝癌患者预后的判断价值. *中华消化杂志* 2006; 26: 271-272
- 12 霍丽霞, 岳锦生, 王彦民. 肝硬化合并上消化道出血患者血浆内毒素水平测定. *哈尔滨医科大学学报* 2002; 36: 246
- 13 周和龙, 杨小铭, 何生松, 曾令兰, 李淑莉, 罗罗德. 内毒素及h-EGF检测与重型病毒性肝炎预后的临床研究. *临床消化病杂志* 2004; 16: 198
- 14 王冬梅, 张振宇, 黄永存. 重症肝炎患者血浆内毒素测定及临床意义. *牡丹江医学院学报* 2008; 29: 51-52
- 15 刘青, 刘铮, 王泰龄. 应用MELD系统预测慢性重型肝炎的预后及其治疗效果. *中华医学杂志* 2005; 85: 1771-1777
- 16 Salerno F, Merli M, Cazzaniga M, Valeriano V, Rossi P, Lovaria A, Meregaglia D, Nicolini A, Lubatti L, Riggio O. MELD score is better than Child-Pugh score in predicting 3-month survival of patients undergoing transjugular intrahepatic portosystemic shunt. *J Hepatol* 2002; 36: 494-500
- 17 蒋忠胜, 江建宁. CTP和MELD评分预测慢性重型肝炎预后的临床价值. *中国危重病急救医学* 2007; 19: 412-415
- 18 张桂珍. 终末期肝病模型评分对肝硬化患者食管曲张静脉套扎术预后分析. *职业与健康* 2008; 24: 698
- 19 颜虹, 徐勇勇, 赵耐青. 医学统计学. 第1版. 北京: 人民卫生出版社, 2005: 220

终末期肝病模型在评估肝硬化患者预后中的价值

崔春吉

崔春吉, 延边大学附属医院消化内科 吉林省延吉市 133000
通讯作者: 崔春吉, 副主任医师, 133000, 吉林省延吉市, 延边大学附属医院消化内科. yjadsl27181@163.com
收稿日期: 2010-04-12 修回日期: 2010-06-17
接受日期: 2010-06-22 在线出版日期: 2010-08-08

Value of model for end-stage liver disease in assessment of the prognosis of patients with cirrhosis

Chun-Ji Cui

Chun-Ji Cui, Department of Gastroenterology, the Affiliated Hospital of Yanbian University, Yanji 133000, Jilin Province, China
Correspondence to: Chun-Ji Cui, Department of Gastroenterology, the Affiliated Hospital of Yanbian University, Yanji 133000, Jilin Province, China. yjadsl27181@163.com
Received: 2010-04-12 Revised: 2010-06-17
Accepted: 2010-06-22 Published online: 2010-08-08

Abstract

AIM: To compare the prognostic value of model for end-stage liver disease (MELD) and Child-Turcotte-Pugh (CTP) grading in patients with cirrhosis.

METHODS: A total of 1 790 patients with cirrhosis treated at our hospital were analyzed. These patients were allocated into two groups: survival group and death group. The MELD score and CTP classification were determined for each patient. The accuracy of MELD scoring and CTP grading in predicting the prognosis of patients with cirrhosis was assessed by comparing the area under the receiver operating characteristic curve (ROC). The predictive power of MELD scoring and CTP classification was evaluated using the cut-off approach.

RESULTS: MELD and CPT scores were significantly higher in the death group than in the survival group (both $P < 0.001$). The mortality of patients with cirrhosis increased with the increase in their MELD and CTP scores. The area under the ROC (AUC) of MELD was significantly higher than that of CPT (0.881 vs 0.824, $P < 0.01$). Survival analysis showed that both

MELD scoring and CTP grading could clearly discriminate patients who survived or died (both $P < 0.001$). MELD values showed significant correlation with CTP scores ($r = 0.705$, $P < 0.001$).

CONCLUSION: Both MELD scoring and CTP grading can accurately predict the prognosis of patients with cirrhosis. MELD scoring is more efficient than CTP grading in predicting the prognosis of patients with cirrhosis.

Key Words: Model for end-stage liver disease; Cirrhosis; Child-Turcotte-Pugh grading; Prognosis

Cui CJ. Value of model for end-stage liver disease in assessment of the prognosis of patients with cirrhosis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(22): 2375-2378

摘要

目的: 探讨终末期肝病模型(model for end-stage liver disease, MELD)对肝硬化住院患者预后的预测价值, 并与CTP(Child-Turcotte-Pugh)评分比较。

方法: 分析1790例肝硬化住院患者的临床资料, 将患者分为存活组和死亡组。分析两组患者MELD分值、CTP评分分级, 并运用ROC曲线及曲线下面积评价两种评分系统预测肝硬化患者预后的能力。

结果: 肝硬化患者死亡组MELD分值和CTP评分均显著高于生存组(均 $P < 0.001$), 肝硬化病死率随MELD分值和CTP评分的增加而升高。生存分析表明, MELD分值与CTP评分均可有效分辨可能生存及死亡的患者(均 $P < 0.001$), MELD分值评估住院患者预后的ROC曲线下的面积显著高于CTP评分($P < 0.01$)。MELD分值与CTP评分呈显著正相关($r = 0.705$, $P < 0.001$)。

结论: MELD分值及CTP评分均可预测肝硬化患者的预后, MELD分值评估效率优于CTP评分分级。

关键词: 终末期肝病模型; 肝硬化; CTP分级; 预后

崔春吉. 终末期肝病模型在评估肝硬化患者预后中的价值. 世

■背景资料

肝硬化是一种严重危害人民健康的常见病、多发病。如何准确地评估和预测肝硬化患者的病情严重程度及预后, 确定合适的治疗方案是十分重要的。2001年Kamath等提出了新的评价方法, 即终末期肝病模型(MELD), 因其简便、客观、较为准确而逐渐得到大家重视和应用。

■同行评议者

孙殿兴, 主任医师, 白求恩国际和平医院肝病科

■研究前沿

MELD模型能较准确地预测肝硬化患者的病情和预后,但该模型并没有包含所有对预后有影响的因素,MELD分值评估效率是否优于CTP评分,能否取代CTP评分尚需大规模的临床研究。

界华人消化杂志 2010; 18(22): 2375-2378

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/2375.asp>

0 引言

肝硬化是我国常见的,一种严重危害人民健康和生命的慢性疾病,病死率较高^[1]。如何准确评估和预测肝硬化患者的病情严重程度及预后,对确定合适的治疗方案十分重要。目前大多数学者采用CTP评分系统评估肝硬化患者肝功能储备、手术风险及预后^[2],但存在着许多不足之处^[3]。2001年Kamath等提出了新的评价方法,即终末期肝病模型(model for end-stage liver disease, MELD)^[4],因其简便、客观、较为准确而受到广泛的关注。本文应用MELD评分回顾性分析了1 790例肝硬化患者的生存状况,并与CTP分级作比较,以评估他们在预测肝硬化住院患者预后中的价值。

1 材料和方法

1.1 材料 研究对象为2002-09/2009-12延边大学附属医院院收治的按1990年全国肝硬化专题学术会制订的标准^[5],经临床及辅助检查综合诊断的具有完整资料的肝硬化患者1 790例(男1 138例,女652例,平均56.18岁±11.61岁),其中存活1 345例,死亡445例。

1.2 方法 计算每例肝硬化患者的MELD分值及CTP评分。根据公式MELD分值 = $3.8 \times \ln[\text{胆红素}(\text{mg/dL})] + 11.2 \times \ln(\text{INR}) + 9.6 \times \ln[\text{肌酐}(\text{mg/dL})] + 6.4 \times (\text{病因: 胆汁性或酒精性为0; 其他为1})$ ^[4]。根据MELD分值不同,可分为MELD≤9、10-19、20-29、≥30分4组。根据CTP评分不同,可分为A(5-6分)、B(7-9分)、C(10-15分)三级^[6]。

统计学处理 应用SPSS10.0统计软件包对数据进行分析。计量资料使用 t 检验;计数资料使用 χ^2 检验,多组间两两比较采用 χ^2 分割法;MELD分值与CTP评分的相关性用Spearman等级相关检验。分别以不同的MELD分值和CTP评分作为判断死亡与否的临界值,利用诊断试验的四格表分析法求得相应的敏感性和特异性,以敏感性为纵坐标、(1-特异度)为横坐标,绘制接受者工作特征(receiver operating characteristic, ROC)曲线,应用ROC曲线下面积(under the ROC, AUC)来衡量两种评分系统判别预后的能力。根据Youden指数(灵敏度+特异性-1)的最大值确定肝硬化患者生存与否的最佳临界值(截断点)。 $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 MELD分值和CTP评分与预后的关系

2.1.1 MELD分值与预后的关系:肝硬化死亡组MELD分值为 22.25 ± 9.91 ,而肝硬化存活组为 9.57 ± 5.07 ,两组比较差异有统计学意义($t = 35.06, P < 0.001$)。MELD≤9分组肝硬化病死率为5.26%(42/799),10-19分组为21.68%(147/678),20-29分组为75.12%(163/217),≥30分组为96.88%(93/96),4组之间比较差异有统计学意义($\chi^2 = 727.96$, 均 $P < 0.001$, 表1)。肝硬化病死率MELD≤9分组显著低于10-19分组($\chi^2 = 88.67, P < 0.001$),20-29分组($\chi^2 = 517.09, P < 0.001$)和≥30分组($\chi^2 = 561.64, P < 0.001$);MELD 10-19分组显著低于20-29分组($\chi^2 = 207.31, P < 0.001$)和≥30分组($\chi^2 = 222.26, P < 0.001$);MELD 20-29分组显著低于≥30分组($\chi^2 = 21.16, P < 0.001$);各分组之间两两比较差异均有统计学意义。

2.1.2 CTP评分与预后的关系:肝硬化死亡组CTP分值为 11.36 ± 2.09 ,而肝硬化存活组为 8.48 ± 2.16 ,两组比较差异有统计学意义($t = 24.49, P < 0.001$)。肝功能A级组肝硬化病死率为1.78%(5/281例),B级组为11.95%(84/703例),C级组为44.17%(356/806例),3级之间比较差异有统计学意义($\chi^2 = 303.74$, 均 $P < 0.001$, 表1)。肝硬化病死率肝功能A级组显著低于肝功能B级组($\chi^2 = 25.24, P < 0.001$)和C级组($\chi^2 = 168.79, P < 0.001$),肝功能B级组显著低于肝功能C级($\chi^2 = 188.71, P < 0.001$);各分级之间两两比较差异均有统计学意义。

2.1.3 MELD分值与CTP评分的相关性:采用非参数相关分析,计算Spearman相关系数。MELD与CTP评分的相关系数为0.705($t = 42.03, P < 0.001$)。

2.2 ROC曲线分析

2.2.1 MELD分值和CTP评分预测肝硬化患者预后的AUC: MELD和CTP在评估肝硬化患者预后的ROC曲线的AUC分别为0.878(SE: 0.010, 95%CI: 0.858-0.899)和0.822(SE: 0.011, 95%CI: 0.801-0.844),两者均有较大的曲线下面积,表明其分辨度好,能较好地地区分可能死亡和可能存活的患者;两者AUC比较差异有统计学意义($U = 3.77, P < 0.01$),MELD分值的分辨度优于CTP评分(图1, 表2)。

2.2.2 利用ROC曲线截断点判断肝硬化患者生存与死亡的危险性:ROC曲线分析表明,MELD及CTP计分对预后判断的截断值(最佳临界值)分别为15和11(图1, 表2)。MELD<15组

■相关报道

2001年Kamath等提出,有关MELD分值与CTP分级对评估肝硬化患者预后的准确性比较,国内外均有报道。部分结果认为MELD分值在预测晚期肝病病情方面优于CTP分级,也有研究认为两者在预测肝硬化预后方面的价值相当。

表 1 MELD分值及CTP分级与病死率的关系

项目	MELD分值				肝功能CTP分级		
	≤9	10-19	20-29	≥30	A级	B级	C级
<i>n</i>	799	678	217	96	281	703	806
死亡数	42	147	163	93	5	84	356
病死率(%)	5.26	21.68	75.12	96.88	1.78	11.95	44.17

表 2 MELD及CTP评价肝硬化患者预后的ROC分析

评价系统	灵敏度(%)	特异度(%)	最佳临界值	AUC	SE	95%CI	<i>U</i>
MELD	77.3	85.7	14.9	0.878 ^b	0.010	0.858-0.899	37.80
CTP	66.3	81.0	10.5	0.822	0.011	0.801-0.844	29.27

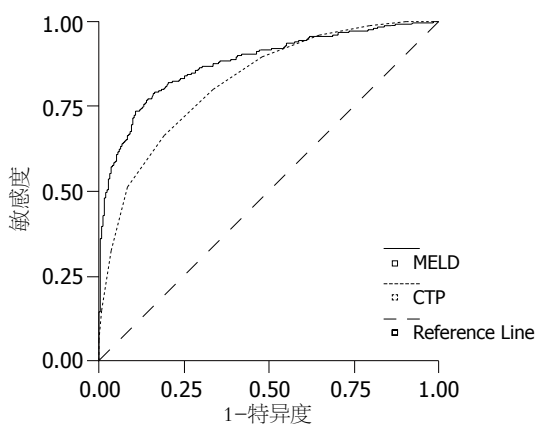
^b $P<0.01$ vs CTP组AUC.

图 1 ROC曲线分析.

病死率为7.82%(96/1 227), MELD≥15组病死率为61.99%(349/563), 两组比较差异有统计学意义($\chi^2 = 606.13$, $P<0.001$). CTP<11组病死率为12.11%(150/1 239), CTP≥11组病死率为53.54%(295/551), 两组比较差异有统计学意义($\chi^2 = 350.49$, $P<0.001$).

3 讨论

多年来沿用的CTP分级标准被认为是评估肝硬化患者肝功能储备, 手术风险及预后的良好指标. 但其中包含肝性脑病及腹水两项主观指标, 且血浆白蛋白定量极易受人为因素改变, 因此其客观、准确性受到了一定的影响^[7].

MELD评分系统是Kamath等^[4]采用了血清肌酐、总胆红素、INR及肝病原发病因作为参数, 通过数学公式计算得分. 比传统CTP分级, MELD分值不仅考虑了肝功能状况, 而且兼顾了肾功能和不同的病因, 避免了CTP分级评分中的

主观因素^[8]. 该评分系统具有简便可行、重复性好、客观性强等特点, 可较准确地反映终末期肝病患者病情严重程度^[9], 能较好地预测肝硬化患者死亡危险度. 2002年美国器官分配网络开始应用MELD评分系统决定供肝的分配^[10]. 有关MELD分值与CTP分级对评估肝硬化患者预后的准确性比较, 国内外均有报道. 部分结果认为MELD分值在预测肝硬化患者预后方面价值优于CTP分级^[9,11,12], 也有研究认为两者在预测肝硬化患者预后方面的价值相当^[13-15].

本研究采用MELD评分, 对1 790例肝硬化患者进行回顾性研究, 并与CTP分级相比较. 结果发现肝硬化死亡组MELD分值和CTP评分显著高于生存组($P<0.001$), 肝硬化病死率随MELD分值、CTP分级的增高而逐渐升高, 且各分组之均有显著性差异. 提示MELD分值和CTP分级与肝硬化预后有关, 且MELD分值、CTP分级越高患者病死的危险性越大. 相关分析表明, MELD分值与CTP评分显著正相关, 相关系数为0.705($P<0.001$).

ROC分析表明, MELD分值和CTP评分均有较大的AUC, 表明此两评分系统分辨率均较好, 评估肝硬化患者预后的准确性较高. ROC分析显示MELD分值ROC曲线的AUC明显高于CTP评分, 提示MELD分值较CTP评分更能反映病情的危急程度, 预测肝硬化患者预后的准确性优于CTP评分.

本研究利用ROC曲线截断点对肝硬化住院患者进行生存分析, 结果表明MELD分值和CTP评分最佳临界值上下患者病死率均有非常显著性差异(均 $P<0.001$), 因此通过确定ROC曲线截断

■创新盘点

本文通过分析1 790例肝硬化住院患者的临床资料, 并运用ROC曲线及曲线下面积(AUC)比较MELD分值和CTP评分分级预测肝硬化患者预后的能力, 对临床工作有一定的指导作用.

■同行评价

本文设计合理,内容详细,研究符合伦理学要求,对于肝硬化患者的预后判断具有一定的意义。

点方法可将肝硬化患者确定高、低危组群,对临床上选择适当的治疗方案有一定的指导作用。

总之, MELD分值和CTP评分分级均可以预测肝硬化患者病情的严重程度和预后, MELD分值评估效率优于CTP评分, 值得临床应用。尽管如此, 我们认为因MELD分值和CTP分级各有优缺点, MELD分值目前尚不能完全替代CTP分级, 但两者可以互为补充配合使用, 并在临床实际应用中不断地补充和完善。

4 参考文献

- 1 崔春吉, 申顺子. 影响肝硬化患者预后的相关因素分析. 临床荟萃 2006; 21: 1714-1715
- 2 Forman LM, Lucey MR. Predicting the prognosis of chronic liver disease: an evolution from child to MELD. Mayo End-stage Liver Disease. *Hepatology* 2001; 33: 473-475
- 3 周锡进, 杨文龙, 何金秋. 肝脏储备功能相关评价系统在终末期肝病中的应用进展. 江西医药 2009; 44: 505-509
- 4 Kamath PS, Wiesner RH, Malinchoc M, Kremers W, Therneau TM, Kosberg CL, D'Amico G, Dickson ER, Kim WR. A model to predict survival in patients with end-stage liver disease. *Hepatology* 2001; 33: 464-470
- 5 王吉耀. 全国肝硬化专题学术讨论会纪要. 中华消化杂志 1991; 11: 290-291
- 6 Pugh RN, Murray-Lyon IM, Dawson JL, Pietroni MC, Williams R. Transection of the oesophagus for

bleeding oesophageal varices. *Br J Surg* 1973; 60: 646-649

- 7 魏倪, 杨方, 吴晓枫, 李兴海. 失代偿期肝硬化患者的MELD评分与预后. 胃肠病学和肝病杂志 2008; 17: 142-144
- 8 郑盛, 朱为梅, 刘海, 王玉波. 终末期肝病模型和Child-Pugh分级对失代偿期肝硬化患者的预后分析. 肝脏 2007; 12: 472-473
- 9 熊伍军, 刘菲, 赵中辛, 邱德凯. 终末期肝病模型在评估肝硬化患者预后中的价值. 世界华人消化杂志 2004; 12: 1159-1162
- 10 Everson GT. MELD: the answer or just more questions? *Gastroenterology* 2003; 124: 251-254
- 11 Wiesner R, Edwards E, Freeman R, Harper A, Kim R, Kamath P, Kremers W, Lake J, Howard T, Merion RM, Wolfe RA, Krom R. Model for end-stage liver disease (MELD) and allocation of donor livers. *Gastroenterology* 2003; 124: 91-96
- 12 吕晓辉, 刘红波, 宋敏, 王炳元. 终末期肝病模型对失代偿期肝硬化患者预后的回顾性分析. 世界华人消化杂志 2007; 15: 960-963
- 13 Cholongitas E, Papatheodoridis GV, Vangelis M, Terreni N, Patch D, Burroughs AK. Systematic review: The model for end-stage liver disease--should it replace Child-Pugh's classification for assessing prognosis in cirrhosis? *Aliment Pharmacol Ther* 2005; 22: 1079-1089
- 14 吴岫平, 田江, 剧春香, 葛亮. MELD与CTP评分系统在肝硬化失代偿期患者预后评估中的应用. 新疆医科大学学报 2006; 29: 702-703, 706
- 15 李梵, 陈国凤, 邵清, 纪冬, 李永纲, 韩萍, 闫涛, 陈菊梅. 乙型肝炎肝硬化患者108例预后分析. 肝脏 2007; 12: 441-444

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)

趋化因子CXCL8/CXCR1生物轴与结肠癌转移的关系

缪海江, 齐晓光

缪海江, 广和中西医结合医院消化内科 江苏省张家港市 215633

缪海江, 上海交通大学医学院附属瑞金医院消化内科 上海市 200025

齐晓光, 上海交通大学附属第六人民医院消化内科 上海市 200233

作者贡献分布: 缪海江与齐晓光对此文所作贡献均等; 此课题由缪海江设计; 研究过程由缪海江与齐晓光操作完成; 研究所用新试剂及分析工具由缪海江提供; 数据分析由齐晓光完成; 本论文写作由缪海江与齐晓光完成。

通讯作者: 缪海江, 215633, 江苏省张家港市, 广和中西医结合医院消化内科, mhj1977@jssmail.com.cn

电话: 0512-58933426

收稿日期: 2010-04-27 修回日期: 2010-07-03

接受日期: 2010-07-12 在线出版日期: 2010-08-08

Role of CXCL8/CXCR1 in the metastasis of human colon cancer

Hai-Jiang Miao, Xiao-Guang Qi

Hai-Jiang Miao, Department of Gastroenterology, Guanghe Chinese & Western Medicine Hospital, Zhangjiagang 215633, Jiangsu Province, China

Hai-Jiang Miao, Department of Gastroenterology, Ruijin Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200025, China

Xiao-Guang Qi, Department of Gastroenterology, Shanghai Sixth People's Hospital Affiliated to Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200233, China

Correspondence to: Hai-Jiang Miao, Department of Gastroenterology, Guanghe Chinese & Western Medicine Hospital, Zhangjiagang 215633, Jiangsu Province, China. mhj1977@jssmail.com.cn

Received: 2010-04-27 Revised: 2010-07-03

Accepted: 2010-07-12 Published online: 2010-08-08

Abstract

AIM: To investigate the expression of CXCL8 and CXCR1 in colonic mucosa of patients with colon cancer and to analyze their relationship with the metastasis of colon cancer.

METHODS: A total of 106 patients with colon cancer were included in this study. Immunohistochemistry was used to detect the expression of CXCL8 and CXCR1 in colon cancer specimens taken from these patients. The correlation of CXCL8 and CXCR1 expression with clinicopathological data for these patients, including age, sex, tumor size, lymph node metastasis and Duke stage, were analyzed.

RESULTS: The positive rates of CXCL8 and CXCR1 expression were 71.7% (86/106) and 67.0% (78/106) in colon cancer, respectively. A significant correlation was noted between CXCL8/CXCR1 expression and tumor size, lymph node metastasis, and Duke stages (all $P < 0.05$) though no correlation was found between CXCL8/CXCR1 expression and age, sex and pathological differentiation.

CONCLUSION: CXCL8/CXCR1 may be involved in the progression and metastasis of colon cancer and therefore can be used as new diagnostic markers for colon cancer and novel targets for therapeutic intervention of the disease.

Key Words: Cytokine; CXCL8; CXCR1; Colon cancer; Tumor microenvironment; Metastasis

Miao HJ, Qi XG. Role of CXCL8/CXCR1 in the metastasis of human colon cancer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(22): 2379-2383

摘要

目的: 探讨肿瘤微环境中趋化因子CXCL8及其受体CXCR1在结肠癌组织的表达及其临床应用价值。

方法: 选取上海交通大学附属第六人民医院结肠癌患者106例, 记录患者年龄、性别、病理分化程度、肿瘤大小、浸润深度、Duke分期等, 采用免疫组织化学SP法检测CXCL8及其受体CXCR1在结肠癌及其癌旁组织中表达情况, 并分析其表达与临床特征的关系。

结果: 结肠癌组织中CXCL8染色阳性86例, 占71.7%, CXCR1染色阳性78例, 占67.0%, 而癌旁正常结肠黏膜组织中CXCL8及其受体CXCR1染色阳性率分别为19.8%, 16.0%, 两组相比差异具有统计学意义($P < 0.05$); 进一步分析其表达与临床应用价值。结果显示, 结肠癌组织中CXCL8/CXCR1表达与性别、年龄、肿瘤分化程度均无明显相关性, 而与结肠癌肿瘤大小、浸润深度、淋巴转移、Duke分期均呈显著正相关($r = 0.271, P = 0.005$)。

结论: 趋化因子CXCL8/CXCR1生物轴可能在

■背景资料

肿瘤微环境为当前肿瘤学研究的新兴研究领域之一, 而肿瘤微环境中细胞因子在肿瘤的发生、发展中起着至关重要的作用, 本研究正是基于此出发点, 研究细胞因子等在结肠癌发病机制中的作用, 具有重要的临床潜在应用价值。

■同行评议者

杨柏霖, 副主任医师, 南京中医药大学附属医院结直肠外科

■相关报道

Yoshimura等首先发现的一种强有力的中性粒细胞趋化因子和活化因子CXCL8,以往研究发现,其主要生物作用为趋化并激活中性粒细胞,促进中性粒细胞的溶酶体活性和吞噬作用。最近研究显示,CXCL8除具有免疫调节作用外,还能够影响肿瘤的微环境调节和调节肿瘤血管形成。

结肠癌侵袭、转移中起一定作用,进一步为结肠癌免疫治疗提供了新的理论依据。

关键词: 趋化因子; CXCL8; CXCR1; 结肠癌; 肿瘤微环境; 侵袭转移

缪海江, 齐晓光. 趋化因子CXCL8/CXCR1生物轴与结肠癌转移的关系. 世界华人消化杂志 2010; 18(22): 2379-2383
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/2379.asp>

0 引言

结肠癌是消化系常见恶性肿瘤,占胃肠道肿瘤的第3位。近年来虽然其化疗、靶向、手术等治疗方法不断改进,但患者总体预后并无明显改善,总体5年生存率仍不足50%,大约40%的患者在5年内出现腹腔复发和肝转移,而且其发病率逐年上升^[1],寻找更为有效的干预方法及探究预测转移机制是解决问题的关键所在。同其他肿瘤一样,结肠癌是一个复杂的混合体,除癌细胞外还有炎症细胞、免疫细胞、内皮细胞、成纤维细胞、外皮细胞等,这些基质细胞构成了肿瘤细胞的微环境,通过分子信号通路为肿瘤提供生长所需的物质。最近大量研究表明,肿瘤微环境中的多种间质细胞对肿瘤细胞的生长和转移具有多方面的影响,而在此过程中趋化因子及其受体则发挥着至关重要的作用。而一旦发生转移,大多预后不良^[2]。因此,深入探索肿瘤侵袭和转移的关键分子生物学特征和分子调节靶点,建立行之有效的肿瘤转移分子干预方法和应用技术,是当前肿瘤研究中亟待阐明和解决的重大基础和临床问题。本研究采用结肠癌及其癌旁组织标本,研究CXCL8/CXCR1生物轴的表达情况及其与结肠癌转移的关系,探讨反映结肠癌发生、发展和转移的敏感指标,为结肠癌的早期诊断及治疗、病程监控提供一定的客观依据。

1 材料和方法

1.1 材料 选取上海交通大学附属第六人民医院2008-01/2009-12经手术切除的结肠癌标本106例,男54例,女52例,平均年龄56(27-85)岁。根据WHO标准,病理组织学分级:高分化20例,中分化57例,低分化29例。45例有淋巴结转移,61例无淋巴结转移。CXCL8抗体(sc-57269, Santa Cruz, 1:50); CXCR1抗体(MAB330, R&D Systems Inc, 1:200); 免疫组织化学试剂盒购自福州迈新生物技术开发有限公司。

1.2 方法

1.2.1 免疫组织化学法: 采用SP法,检测结肠癌及其癌旁组织中CXCL8、CXCR1表达,具体操作步骤严格按照试剂盒说明书进行。

1.2.2 结果判定: 根据染色程度和染色细胞百分比进行评分。染色程度:基本不着色为0级,着色呈淡黄色为1级,着色呈黄色为2级,着色呈棕褐色为3级。染色阳性细胞百分比:着色阳性细胞占计数细胞百分比 $\leq 5\%$ 为0级,6%-25%为1级,26%-50%为2级, $\geq 51\%$ 为3级。将胞质染色程度分级与染色细胞百分比分级相乘,乘积 ≥ 4 者为表达阳性,0-3为表达阴性。

统计学处理 采用SPSS11.0软件包,其中率的比较采用 χ^2 检验,相关分析采用Spearman等级相关检验, $P < 0.05$ 为有统计学意义。

2 结果

2.1 结肠癌及癌旁组织中CXCL8及其受体CXCR1的表达 CXCL8在结肠癌组织中明显高表达,其对应癌旁组织中表达较低,进一步统计分析显示,结肠癌及其癌旁组织中表达阳性率分别为71.7%、28.3%,且差异具有统计学意义($\chi^2 = 57.49, P = 0.000$); CXCR1在结肠癌及其癌旁组织中表达阳性率分别为67.0%、33.0%,统计分析显示具有显著性差异($\chi^2 = 56.65, P = 0.000$,表1); CXCL8及其受体CXCR1在结肠癌及其癌旁的表达见图1。

2.2 CXCL8及其受体CXCR1表达与临床、病理参数的意义 结肠癌组织中CXCL8及其受体CXCR1表达与性别、年龄、肿瘤分化程度均无明显相关性,而随着结肠癌进展,如肿瘤大小、浸润深度、淋巴转移、Duke分期等,其阳性表达率亦逐渐提高,统计分析显示差异具有统计学意义($P < 0.05$),提示CXCL8及其受体CXCR1与结肠癌转移密切相关(表2,3)。

2.3 结肠癌组织中CXCL8及其受体CXCR1表达的相关性分析 为进一步分析CXCL8及其受体CXCR1表达相关性,对两者进行Pearson相关性分析,统计显示呈正相关($r = 0.271, P = 0.005$,表4)。

3 讨论

趋化因子的主要作用是趋化细胞的迁移,细胞沿着趋化因子浓度增加的信号向趋化因子源处的迁徙。早期研究主要集中其在抗炎症等反应中的作用,最近研究发现,趋化因子作为肿瘤微环境中关键信号分子,在肿瘤的侵袭及转移等

■应用要点

本研究结果与先前的研究结果基本一致, 即CXCL8/CXCR1生物轴与结肠癌肿瘤大小、浸润深度、淋巴转移、Duke分期等均呈显著正相关, 提示CXCL8/CXCR1生物轴在结肠癌转移中起着至关重要的作用。检测他们的表达情况, 有助于临床分期诊断及治疗方案的选择。

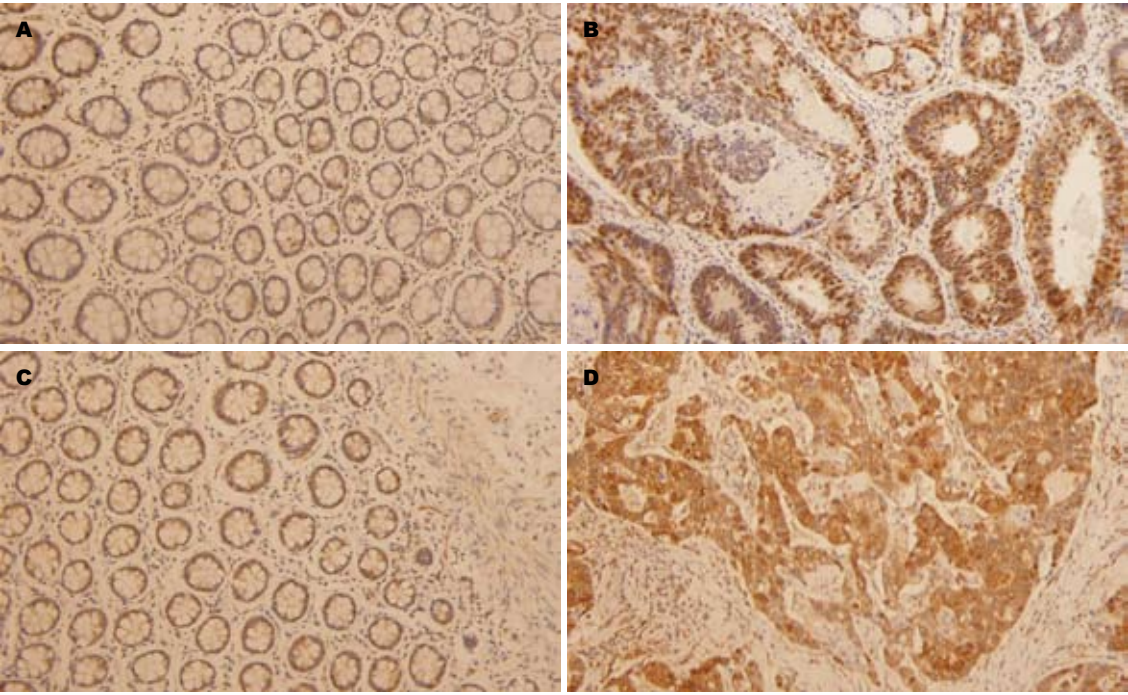


图 1 CXCL8及其受体CXCR1在结肠癌及其癌旁组织中的表达(× 200). A: CXCL8结肠癌旁; B: CXCL8结肠癌; C: CXCR1结肠癌旁; D: CXCR1结肠癌.

表 1 结肠癌及其癌旁组织中CXCL8/CXCR1的表达

	CXCL8表达				CXCR1表达			
	阳性(n)	阴性(n)	χ^2 值	P值	阳性(n)	阴性(n)	χ^2 值	P值
结肠癌组织	76	30	212	0.000	71	35	212	0.000
结肠癌旁组织	21	85			17	89		

方面起重要作用. 而肿瘤侵袭、转移不仅是临床手术治疗中的难点, 而且往往是导致患者死亡的主要原因. 肿瘤微环境中趋化因子CXCL8/CXCR1是否参与结肠癌发生、发展, 是本研究探讨的问题之一.

CXCL8是1986年Yoshimura等^[3]首先发现的一种强有力的中性粒细胞趋化因子和活化因子, 以往研究发现, 其主要生物作用为趋化并激活中性粒细胞, 促进中性粒细胞的溶酶体活性和吞噬作用^[4]. 最近研究显示^[5], CXCL8除具有免疫调节作用外, 还能够影响肿瘤的微环境调节和调节肿瘤血管形成. 本研究采用结肠癌及其癌旁组织对照研究, 结果显示, 与对应的癌旁组织相比, CXCL8在结肠癌中表达阳性率明显较高, 且进一步研究发现, 虽然CXCL8表达水平与结肠癌患者的年龄、性别及病理分级等无关($P>0.05$), 但CXCL8表达水平与肿瘤大小、浸润深度、淋巴转移及TNM分期等密切相关(均 $P<0.05$), 提示CXCL8能促进结肠癌细胞的增殖

和转移; Li等^[6]分析比较不同侵袭潜能的结肠癌细胞株, 结果表明, CXCL8及其受体CXCR1表达与结肠癌细胞株侵袭能力呈正相关, 亦提示CXCL8/CXCR1参与了结肠癌增殖、转移等恶性转化过程. Doll等^[7]在细胞水平研究证实, CXCL8在结肠癌细胞中高表达与转移、侵袭能力的关系, 该研究同时指出, 其导致结肠癌转移机制可能与上调EGFR有关. 以上研究均提示, CXCL8在结肠癌中高表达, 且其表达水平与结肠癌转移等生物学特性密切相关, 与我们在组织水平的研究结果一致; 另外在其他肿瘤, 比如: 卵巢肿瘤^[8]、前列腺癌^[9]、胃癌^[10]等的研究中也均发现肿瘤组织的血管形成与CXCL8表达的升高有关, 亦提示CXCL8的表达与肿瘤细胞侵袭、转移能力密切相关.

以上结果显示, CXCL8在结肠癌的增殖和转移起重要作用, 那么其具体机制如何? 为此, 本研究进一步深入探讨CXCL8在结肠癌转移中的下游靶点, 研究结果发现, 作为CXCL8重要受

■同行评价

本文选题新颖, 研究设计较为科学, 结果可信.

表 2 结肠癌组织中CXCL8表达的临床意义

	<i>n</i>	CXCL8表达		%	<i>P</i> 值
		阳性	阴性		
年龄(岁)					
≥50	89	58	31	65.2	0.158
<50	17	8	9	47.1	
性别					
男	55	37	18	67.3	0.294
女	51	39	12	76.5	
病理分级					
I	20	15	5	75.0	0.179
II	57	31	26	54.4	
III	29	20	9	69.0	
肿瘤大小(cm)					
≥5	47	29	18	61.7	0.041
<5	59	47	12	79.7	
浸润深度					
T1-T2	76	49	27	64.5	0.009
T3-T4	30	27	3	90.0	
淋巴转移					
有	45	37	8	82.2	0.039
无	61	39	22	63.9	
Duke分期					
A/B	49	28	21	57.1	0.002
C/D	57	48	9	84.2	

表 3 结肠癌组织中CXCR1表达的临床意义

	<i>n</i>	CXCR1表达		%	<i>P</i> 值
		阳性	阴性		
年龄(岁)					
≥50	89	61	28	68.5	0.435
<50	17	10	7	58.8	
性别					
男	55	39	16	70.9	0.372
女	51	32	19	62.7	
病理分级					
I	20	14	6	70.0	0.885
II	57	37	20	64.9	
III	29	20	9	69.0	
肿瘤大小(cm)					
≥5	47	30	17	63.8	0.538
<5	59	41	18	69.5	
浸润深度					
T1-T2	76	45	32	58.4	0.015
T3-T4	30	25	5	83.3	
淋巴转移					
有	45	36	9	80.0	0.014
无	61	35	26	57.4	
Duke分期					
A/B	49	24	25	49.0	0.000
C/D	57	47	10	82.5	

体之一的CXCR1亦在结肠癌中明显高表达, 且CXCR1表达水平与肿瘤大小、浸润深度、TNM分期等呈正相关. 其可能机制为, CXCL8参与了对循环肿瘤细胞的选择过程^[11], CXCL8的外分泌特征导致瘤细胞CXCR1的表达升高, 在循环瘤细胞转变为转移性瘤细胞、转移性瘤细胞的定位和增殖有重要作用, 进而参与结肠癌的发生、发展. Bates等^[12]亦研究发现, 在结肠癌上皮-间质转化和转移过程中, 化学趋化因子受体CXCR1, 而不是CXCR-2伴随增加, 同时该研究通过抗体抑制试验证实, CXCL8和CXCR1在结肠癌细胞化学趋化和转移中起重要作用, 同样提示, CXCL8及其受体CXCR1在结肠癌转移中的潜在作用, 与我们在组织中研究结果一致. 以上结果提示, CXCL8/CXCR1生物轴可能在结肠癌转移中起关键作用, 有望成为结肠癌的治疗新的靶点.

总之, 本试验中研究CXCL8/CXCR1生物轴与结肠癌转移关系, 不仅有助于发现肿瘤微环境、炎症与结肠癌发生的新关联, 而且为CXCL8/CXCR1在结肠癌治疗作为重要靶点提供新的理论依据, 为结肠癌免疫治疗等开辟了

表 4 CXCL8及其受体CXCR1在结肠癌组织中表达的相关性(*n*)

CXCL8	CXCR1		总计
	阳性	阴性	
阳性	57	19	76
阴性	14	16	30
总计	71	35	106

新的途径, 寻找治疗结肠癌更有效的治疗方法.

4 参考文献

- 1 Terzić J, Grivnenkov S, Karin E, Karin M. Inflammation and colon cancer. *Gastroenterology* 2010; 138: 2101-2114.e5
- 2 Tanaka T, Bai Z, Srinoulprasert Y, Yang BG, Hayasaka H, Miyasaka M. Chemokines in tumor progression and metastasis. *Cancer Sci* 2005; 96: 317-322
- 3 Yoshimura T, Matsushima K, Oppenheim JJ, Leonard EJ. Neutrophil chemotactic factor produced by lipopolysaccharide (LPS)-stimulated human blood mononuclear leukocytes: partial characterization and separation from interleukin 1 (IL 1). 1987. *J Immunol* 2005; 175: 5569-5574
- 4 Huber AR, Kunkel SL, Todd RF 3rd, Weiss SJ. Regulation of transendothelial neutrophil migration by endogenous interleukin-8. *Science* 1991; 254:

- 99-102
- 5 Belperio JA, Keane MP, Arenberg DA, Addison CL, Ehler JE, Burdick MD, Strieter RM. CXC chemokines in angiogenesis. *J Leukoc Biol* 2000; 68: 1-8
- 6 Li A, Varney ML, Singh RK. Expression of interleukin 8 and its receptors in human colon carcinoma cells with different metastatic potentials. *Clin Cancer Res* 2001; 7: 3298-3304
- 7 Doll D, Keller L, Maak M, Boulesteix AL, Siewert JR, Holzmann B, Janssen KP. Differential expression of the chemokines GRO-2, GRO-3, and interleukin-8 in colon cancer and their impact on metastatic disease and survival. *Int J Colorectal Dis* 2010; 25: 573-581
- 8 Kassim SK, El-Salahy EM, Fayed ST, Helal SA, Helal T, Azzam Eel-D, Khalifa A. Vascular endothelial growth factor and interleukin-8 are associated with poor prognosis in epithelial ovarian cancer patients. *Clin Biochem* 2004; 37: 363-369
- 9 Kim SJ, Uehara H, Karashima T, Mccarty M, Shih N, Fidler IJ. Expression of interleukin-8 correlates with angiogenesis, tumorigenicity, and metastasis of human prostate cancer cells implanted orthotopically in nude mice. *Neoplasia* 2001; 3: 33-42
- 10 Kitadai Y, Takahashi Y, Haruma K, Naka K, Sumii K, Yokozaki H, Yasui W, Mukaida N, Ohmoto Y, Kajiyama G, Fidler IJ, Tahara E. Transfection of interleukin-8 increases angiogenesis and tumorigenesis of human gastric carcinoma cells in nude mice. *Br J Cancer* 1999; 81: 647-653
- 11 Kunkel M, Reichert TE, Benz P, Lehr HA, Jeong JH, Wieand S, Bartenstein P, Wagner W, Whiteside TL. Overexpression of Glut-1 and increased glucose metabolism in tumors are associated with a poor prognosis in patients with oral squamous cell carcinoma. *Cancer* 2003; 97: 1015-1024
- 12 Bates RC, DeLeo MJ 3rd, Mercurio AM. The epithelial-mesenchymal transition of colon carcinoma involves expression of IL-8 and CXCR-1-mediated chemotaxis. *Exp Cell Res* 2004; 299: 315-324

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 •

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)

腹壁无瘢痕腹腔镜直肠癌根治术的3种标本取出途径

王超, 王权, 曹雪源, 孙东辉

■背景资料

随着微创技术的发展, 腹腔镜下结直肠癌手术的应用已在世界范围内广泛开展。其手术的简单、安全、可行、切除的根治性及近远期疗效已得到了证实。

王超, 王权, 曹雪源, 孙东辉, 吉林大学第一医院胃肠结直肠外科 吉林省长春市 130021

作者贡献分布: 王超与王权对此文所作贡献均等; 此课题由王超与曹雪源设计; 研究过程由王超、王权、曹雪源及孙东辉操作完成; 研究所用器械及工具由王权提供; 数据分析由王超、王权及曹雪源完成; 本论文写作由王超、王权及曹雪源完成。

通讯作者: 王权, 副教授, 130021, 吉林省长春市, 吉林大学第一医院胃肠结直肠外科。wangquan-jlcc@hotmail.com
收稿日期: 2010-04-20 修回日期: 2010-06-13
接受日期: 2010-06-22 在线出版日期: 2010-08-08

Three routes for specimen extraction during scarless laparoscopic radical rectal cancer surgery

Chao Wang, Quan Wang, Xue-Yuan Cao, Dong-Hui Sun

Chao Wang, Quan Wang, Xue-Yuan Cao, Dong-Hui Sun, Department of General Surgery, the First Hospital of Jilin University, Changchun 130021, Jilin Province, China
Correspondence to: Associate Professor Quan Wang, Department of General Surgery, the First Hospital of Jilin University, Changchun 130021, Jinlin Province, China. wangquan-jlcc@hotmail.com
Received: 2010-04-20 Revised: 2010-06-13
Accepted: 2010-06-22 Published online: 2010-08-08

Abstract

AIM: To investigate the routes for specimen extraction during scarless laparoscopic radical rectal cancer surgery.

METHODS: A total of 11 patients with rectal cancer undergoing scarless laparoscopic radical rectal cancer resection were included in the study. During the surgery, specimens were extracted through three different routes. The operation time, hospital stay, and the incidence rates of anastomotic fistula and other complications were recorded.

RESULTS: The surgery was successful in all the 11 patients. The operation time ranged from 180 to 300 min, and the hospital stay from 4 to 10 d. No abdominal incision, abdominal infection, anastomotic leakage and other complications occurred.

CONCLUSION: Scarless laparoscopic radical rectal cancer surgery is effective and safe in the

management of patients with rectal cancer.

Key Words: Laparoscopy; Rectal cancer surgery; Scarless abdominal surgery

Wang C, Wang Q, Cao XY, Sun DH. Three routes for specimen extraction during scarless laparoscopic radical rectal cancer surgery. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(22): 2384-2386

摘要

目的: 探讨腹腔镜直肠癌根治术后腹壁无瘢痕标本取出的可行性。

方法: 直肠癌患者11例行腹腔镜直肠癌根治术后经不同途径取出标本, 总结手术时间, 住院时间以及吻合口瘘等并发症的发生。

结果: 患者11例均顺利完成手术, 手术时间180-300 min, 住院日期4-10 d, 无腹壁辅助切口、腹腔感染、吻合口瘘及各种并发症发生。

结论: 腹壁无瘢痕的腹腔镜直肠癌根治术具备安全性及可行性。

关键词: 腹腔镜; 直肠癌根治术; 腹壁无瘢痕

王超, 王权, 曹雪源, 孙东辉. 腹壁无瘢痕腹腔镜直肠癌根治术的3种标本取出途径. *世界华人消化杂志* 2010; 18(22): 2384-2386
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/2384.asp>

0 引言

随着微创技术的发展, 腹腔镜下结直肠癌手术的应用已在世界范围内广泛开展, 其手术的简单、安全、可行、切除的根治性及近远期疗效已得到了证实。其技术可行, 优点得到越来越多的临床医生及患者的接受, 腹腔镜直肠癌根治术的优势地位已逐步确立, 有望成为直肠癌手术的金标准^[1]。我们于2008-09/2009-04对11例直肠癌患者经应用腹腔镜技术完成及标本取出途径进行改良, 疗效令人满意, 现报道如下。

1 材料和方法

1.1 材料 本组直肠癌患者共11例, 男4例, 女7例,

■同行评议者

戴冬秋, 教授, 中国医科大学附属第一医院肿瘤外科

年龄43-56(平均46.7)岁,肿瘤位于直肠距齿线上5 cm以上6例,以下5例.病理类型:直肠高分化腺癌0例,中分化腺癌9例,低分化腺癌2例.

1.2 方法 经阴道取出2例:先行腹腔镜直肠癌根治术,远端直肠腹腔镜下闭合切断,近端直肠断端留置腹腔.再由妇科行子宫切除,并经阴道将子宫和近端直肠拖出,体外切除肿瘤,将吻合器钉砧置入近段直肠,行荷包缝合,经阴道送回腹腔,行镜下吻合,同时缝合阴道断端.经肛门取出5例:腹腔镜下完成TME游离,确定肿瘤上下切缘,切断相应系膜,切线以丝线结扎闭合肠管,经肛门置入肛管,1:5 000洗必泰反复冲洗远端直肠,助手牵拉直肠,超声刀首先切断远端肠管,边切割肠管,边以2-0 proline缝线贯穿肠壁全层行荷包缝合,近端肠管直接切断后荷包缝合,扩肛置入塑料标本袋,切除直肠装入袋中,以环钳经肛门拖出标本,置入相应大小吻合器,进入腹腔后松脱钉砧,置入近端肠管,收紧荷包线,完成端端吻合.经括约肌间取出4例:首先经腹行全直肠系膜切除术(total mesorectal excision, TME),游离至肛提肌,会阴组消毒,肛周四方向缝合牵引线,充分暴露肛门,肛门黏膜皮肤汇合处开始以电刀切割一圈,暴露内外括约肌间沟,循此间隙向上以电刀锐性分离,切除肛管及直肠下端内括约肌,穿过肛提肌,进入腹腔,经此拖出肠管,切断肠管,直视下将直肠全层与肛周皮肤间断缝合,术后3 mo控便能力恢复正常.

2 结果

11例手术均成功完成,无1例中转开腹.无术中直肠破裂,无吻合口出血、吻合口漏、吻合口狭窄,无手术相关死亡发生.

3 讨论

目前,腹腔镜微创手术范围已扩大到外科的各个领域^[2].结直肠恶性肿瘤应用腹腔镜手术切除,已被世界范围认可及广泛应用,与传统手术相比取得了明显优势^[3].

随着微创技术的发展,腹壁无瘢痕手术(scarless surgery)成为人们追求的新的目标^[4].其基本思路是经自然腔道手术(natural orifice transluminal endoscopic surgery, NOTES),即经自然腔道(胃、结直肠或阴道)取出标本组织,从而达到腹壁无瘢痕、术后疼痛更轻、切口愈合更快、更加微创、更加美观的效果^[5].由于NOTES手术对技术及设备要求较高,容易产生腹腔内

感染、穿刺孔瘘等难题^[6],并要求术者对腹部解剖及微创技术的使用有较高的应变能力^[7],故目前在国内尚处于起步阶段.也有学者将经脐入路腔镜手术(transumbilical endoscopic surgery, TUES)作为前NOTES时代的一种替代技术,利用专用的脐孔穿刺器扩大脐孔,可同时置入镜头及多把操作器械,也有报道利用橡胶手套的密封作用自制穿刺器,但此种方法多需要特殊器械,且腹内操作增加难度^[8],目前报道仅局限于阑尾切除,胆囊切除,回盲部良性疾病切除等简单手术^[9],熟练掌握尚需较长学习曲线.本文介绍的3种途径取出标本的方法存在以下优点:(1)完全基于传统腹腔镜辅助直肠癌根治术的技术基础,没有增加任何手术难度,无需任何特殊器械;(2)放弃了传统腹腔镜辅助直肠癌根治术后腹壁的辅助切口,术后腹壁最大的切口仅是右下腹的1 cm的戳卡,将切口疼痛减少到最小^[10];(3)低位直肠癌在腹腔镜下完成TME游离非常容易,但往往在闭合远端肠管时会遇到困难,因为器械进入盆腔的角度问题,经常需要多把闭合器在不同层面下完成切割闭合^[11],造成近端切缘不在一个平面,切缘的安全距离减小,增加术后吻合口复发几率^[12],远端闭合端易形成“dog ear”,增加吻合口瘘的风险,而且增加器械使用费用^[13].

本文介绍的方法是在腹腔内直视下完成肠管的切割,容易掌握切缘的距离和角度,proline缝线结实且光滑,易于抽紧荷包,吻合非常安全.对于超低位直肠癌的经括约肌切除,即保留了肛门,又能最大限度地切除肿瘤,减少了直肠癌术后局部复发的风险,相对于传统经腹应用凯图的极限切除,更安全,更简单.

使用上述方法有一些注意事项:(1)中低位直肠癌肿瘤过大,或患者肥胖,系膜肥厚短缩会增加经肛门拖出的困难^[14];(2)在完成游离,准备切断肠管之前,远近段肠管丝线结扎,暂时闭合肠管,远端肠管经肛门反复冲洗,可以减少术中污染及肿瘤细胞盆腔脱落种植的机会;(3)标本在腹腔内置入塑料袋中,可减少拖出过程中的污染机会,同时增加润滑,易于取出;(4)超低位直肠癌经括约肌切除须严格掌握适应证,术前直肠二期增强CT或内镜超声下准确判断肿瘤的浸润深度,侵及周围脏器,或侵及肛提肌的不可勉强保肛,术中环周切缘可疑阳性需行快速病理,发现肿瘤侵及周围脏器改行腹会阴联合直肠癌根治手术,术后切缘阳性需补救治疗;(5)

■ 相关报道

随着微创技术的发展,腹壁无瘢痕手术成为人们追求的新目标.其基本思路是经自然腔道手术(NOTES),即经自然腔道(胃、结直肠或阴道)取出标本组织,从而达到腹壁无瘢痕、术后疼痛更轻、切口愈合更快、更加微创、更加美观的效果.

■同行评价

本文选题新颖,实用性较好,有一定的临床参考价值。

经阴道取出标本适于同时切除子宫患者,对于老年绝经妇女,可经阴道后穹窿切开,取出标本。在尚不具备NOTES手术的条件下,不需要完全拘泥于NOTES技术及方式,而应该在腹腔镜手术中,灵活实施个体化方案^[15],尽可能减少创伤,降低费用,相信随着技术的发展及设备的进一步完善,NOTES手术和各种基于NOTES理念的微创外科手术将有着广阔的应用前景^[3]。

4 参考文献

- 1 胡继东, 吴保安, 吴波, 赵传庆, 彭沛, 李勇. 腹腔镜下直肠癌根治术35例临床分析. 临床和实验医学杂志 2009; 8: 34-35
- 2 卞正坤, 钟鸣, 唐伟军, 王辉, 丁圣豪, 秦骏, 沈火剑, 吴志勇. 80岁以上高龄结直肠癌患者接受腹腔镜辅助根治手术的围手术期安全性观察. 腹腔镜外科杂志 2009; 14: 41-44
- 3 梁家强, 钟先荣, 卢榜裕, 孔勇, 陈坤, 薛创. 直肠外翻拖出式腹腔镜直肠癌Dixon手术15例. 广西医学杂志 2009; 31: 1330-1331
- 4 张忠涛, 周晓娜. 经自然孔道内镜外科技术发展现状与展望. 中国实用外科杂志 2009; 29: 35-36
- 5 牛军, 宋炜, 刘恩宇, 房向红, 江四峰, 孔祥健, 陈瑞平,

- 樊薇, 牛卫博, 彭程, 林鹏飞, 洪建国, 徐克森, 寿楠海. 国内首例经自然腔道内镜手术(NOTES)-经阴道内镜胆囊切除术. 中国现代普通外科进展 2009; 12: 459
- 6 朱江帆. 腹腔镜无瘢痕手术: 从NOTES到TUES. 中国微创外科杂志 2007; 7: 844
- 7 唐红兰, 潘竞红, 柏红. 腹腔镜下直肠癌改良Welch术15例的手术配合. 中国误诊学杂志 2009; 9: 417-418
- 8 刘贤兵, 卢武. 腹腔镜下直肠癌手术腹壁戳孔道肿瘤种植一例. 华北国防医药杂志 2009; 21: 65
- 9 许政文, 吴建平, 罗文君. 腹腔镜辅助TME直肠癌根治性切除前路吻合术: 附42例报告. 中国普通外科杂志 2009; 18: 847-849
- 10 吴庆华, 王明亮, 郑民华. 腹腔镜技术治疗结直肠癌的新观点及其争议. 中国实用外科杂志 2009; 29: 355-358
- 11 王劲, 刘细平. 腹腔镜直肠癌根治术与其开腹手术的临床对比分析. 医学临床研究 2008; 7: 1283-1285
- 12 郑民华. 腹腔镜结直肠癌手术提高疗效的若干关键技术. 2009国际腔镜外科会议暨第七届北京国际微创外科论坛论文汇编 2009: 17-21
- 13 金留根, 曹华翔, 费伯健. 经自然腔道取出标本的腹腔镜直肠癌根治术16例效果观察. 苏州大学学报(医学版) 2009; 29: 354-355
- 14 郑民华, 张卓. 腹腔镜经脐单孔腹腔镜和NOTES应用现状与评价. 中国实用外科杂志 2009; 29: 33-34
- 15 丁义涛, 孙喜太. NOTES与微创外科. 中国微创外科杂志 2009; 9: 577-578

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32400余万篇次(2003-2005年), 涉及期刊12400余种. 本版还加大了专家评审力度, 5500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1980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)

胃肠道肿瘤患者外周血人类斯钙素基因的检测及其意义

张海蓉, 郝卫刚, 段丽平

张海蓉, 郝卫刚, 段丽平, 昆明医学院第一附属医院消化内科 云南省昆明市 650031

云南省教育厅科学研究基金资助项目, No. 06Y273C

作者贡献分布: 本课题由张海蓉与段丽平设计; 研究操作过程、数据分析、论文撰写由张海蓉与郝卫刚完成; 段丽平指导、修改论文。

通讯作者: 段丽平, 教授, 650031, 云南省昆明市, 昆明医学院第一附属医院消化内科。zhr919@sina.com

电话: 0871-5379141 传真: 0871-5387669

收稿日期: 2010-04-08 修回日期: 2010-07-05

接受日期: 2010-07-08 在线出版日期: 2010-08-08

Clinical significance of detection of stanniocalcin 1 expression in peripheral blood of patients with gastrointestinal cancer

Hai-Rong Zhang, Wei-Gang Hao, Li-Ping Duan

Hai-Rong Zhang, Wei-Gang Hao, Li-Ping Duan, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Kunming Medical College, Kunming 650031, Yunnan Province, China

Supported by: the Scientific Research Foundation of Yunnan Provincial Education Department, No. 06Y273C

Correspondence to: Professor Li-Ping Duan, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Kunming Medical College, Kunming 650031, Yunnan Province China. zhr919@sina.com

Received: 2010-04-08 Revised: 2010-07-05

Accepted: 2010-07-08 Published online: 2010-08-08

Abstract

AIM: To detect the expression of stanniocalcin 1 mRNA (STC1) in peripheral blood of patients with gastrointestinal cancer and to analyze its relationship with tumor micrometastasis.

METHODS: RT-PCR was performed to detect the expression of STC1 mRNA in peripheral blood samples obtained from 40 patients with gastrointestinal cancer, 10 patients with gastrointestinal inflammatory disease and 10 healthy blood donors, and in tumor tissue and tumor-adjacent normal intestinal tissue samples taken from 2 patients with gastric cancer and 6 patients with colorectal cancer.

RESULTS: The positive rate of STC1 mRNA expression was 60% (24/40) in peripheral blood

from patients with gastrointestinal cancer, 100% (6/6) in tumor tissue and 16.7% (1/6) in tumor-adjacent normal intestinal tissue from patients with gastric cancer or colorectal cancer. STC1 mRNA expression was undetectable in peripheral blood from patients with gastrointestinal inflammatory disease or healthy blood donors.

CONCLUSION: Detection of STC1 mRNA expression in peripheral blood can be used to predict early micrometastasis and therefore represents an objective indicator for evaluation of tumor metastasis and recurrence and therapeutic efficacy in patients with gastrointestinal cancer.

Key Words: Stanniocalcin 1; Gastrointestinal cancer; Micrometastasis

Zhang HR, Hao WG, Duan LP. Clinical significance of detection of stanniocalcin 1 expression in peripheral blood of patients with gastrointestinal cancer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(22): 2387-2391

摘要

目的: 探讨胃肠道恶性肿瘤患者外周血人类斯钙素基因表达及其与肿瘤微转移的关系。

方法: 采用RT-PCR方法检测胃肠道恶性肿瘤患者40例, 消化系炎症性疾病患者10例和正常健康捐赠者10例的外周血, 以及患者6例(胃癌2例、大肠癌4例), 同时于术中取肿瘤组织及正常肠道组织的hSTC-1 mRNA。

结果: 在胃肠道恶性肿瘤患者40例中, 外周血hSTC-1 mRNA的表达的阳性率为60%(24/40例), 肿瘤组织6例均为阳性, 癌旁正常组织仅1例为阳性, 其余健康成人10例及消化系炎症性疾病患者10例均为阴性。

结论: 在胃肠道肿瘤患者的外周血中检测hSTC-1 mRNA的表达是判定肿瘤早期微转移的一种较好的方法, 他可以作为肿瘤转移和复发以及疗效观察的客观指标之一。

关键词: 人类斯钙素-1; 胃肠道肿瘤; 肿瘤微转移

张海蓉, 郝卫刚, 段丽平. 胃肠道肿瘤患者外周血人类斯钙

■背景资料

斯钙素(STC-1)是一种存在于硬骨鱼, 继而在人和哺乳动物中发现的糖蛋白激素, 他主要的生理作用是抑制Ca²⁺的吸收和促进磷酸盐的重吸收。近年来发现hSTC-1 mRNA在多种肿瘤组织内普遍高表达, 越来越多的研究表明STC的表达在人类肿瘤的发生发展过程中起着重要的作用。

■同行评议者

王晓艳, 副教授, 湖南长沙中南大学湘雅三医院消化内科

■研究前沿

本研究采用RT-PCR方法检测胃癌、大肠癌患者外周血中hSTC-1 mRNA水平及相应肿瘤组织中hSTC1的表达状况,同时分析hSTC-1 mRNA表达水平与临床病理特征的关系,明确胃肠道肿瘤患者外周血中hSTC-1 mRNA的表达及其诊断价值,以鉴定其是否为胃癌及肠癌的肿瘤标志物。

素基因的检测及其意义. 世界华人消化杂志 2010; 18(22): 2387-2391
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/2387.asp>

0 引言

斯钙素(stanniocalcin, STC)是一种首先在硬骨鱼类中发现, 并已被充分阐明的糖蛋白激素. 近年来在人和哺乳动物中发现也存在类似的蛋白. STC1以旁分泌和自分泌的方式参与机体的多种生理功能, 他不但可以通过肾脏和肠道系统来调节钙和磷酸盐的代谢, 而且在促进脑神经元的终末分化^[1], 防止因大脑局部缺血造成脑神经元损害^[2], 调节免疫细胞功能^[3], 以及影响骨骼和肌肉的结构和功能^[1]等方面也有重要作用. 近年来越来越多的研究表明STC的表达在人类肿瘤的发生发展过程中起着十分重要的作用, 但有关STC1与消化系肿瘤发生的报道较少. 本研究对2009-02/2009-04昆明医学院第一附属医院肿瘤治疗中心和胃肠外科住院的恶性肿瘤患者40例, 采用RT-PCR检测不同病理分期的患者的外周血和部分组织中STC1 mRNA表达的水平, 研究STC1在临床患者中的检测能否提高胃肠道肿瘤的诊断率, 并研究其与消化系恶性肿瘤微转移的关系.

1 材料和方法

1.1 材料 收集2009-02/2009-04昆明医学院第一附属医院肿瘤治疗中心和胃肠外科经病理科确诊的胃癌、大肠癌住院患者40例, 其中胃癌10例, 大肠癌30例, 年龄36-82(平均59.6)岁, 取术前外周血, 6例患者(胃癌2例、大肠癌4例)同时于术中取肿瘤组织及正常肠道组织, 以及10例胃肠道炎症疾病和10例正常健康捐赠者的外周血, 并收集相关临床资料. 本试验将患者性别、年龄、细胞分化、浸润程度、临床分期、有无淋巴结转移和远处转移进行分类列表探讨基因表达规律. 根据年龄分为 ≥ 60 岁、 < 60 岁2组; 根据性别分为男性、女性2组; 根据病理肿瘤分化程度分为高-中分化和低分化2组, 以及根据淋巴结及远处转移的有无对两组进行讨论. TRIzol为美国Invitrogen公司产品, cDNA第一链合成试剂盒由北京天根生物技术公司提供, PCR扩增试剂为美国Promega公司产品, PCR仪为德国Eppendorf公司产品, 琼脂糖凝胶电泳及Doc-1000型凝胶成像设备为美国Bio-rad生产. 引物合成由北京三博志远生物科技有限公司完成.

1.2 方法

1.2.1 样本处理与RNA的提取: 抽取患者外周静脉血3 mL, 采集后血样本于4 °C下保存时间不超过2 h, 以3 500 r/min, 离心10 min, 将上层血浆吸出, 加入与吸出血浆相等体积的灭菌生理盐水, 混匀. 将6 mL淋巴细胞分离液加入灭菌的10 mL离心管中. 将血细胞悬液缓慢加入淋巴细胞分离液液面上, 以1 500 r/min, 离心20 min, 收集界面上的白细胞层, 放入灭菌的1.5 mL离心管中, 以10 000 r/min, 离心5 min, 吸掉上清. 加入1 mL TRIzol反复抽吸混匀保存于-80 °C超低温冰箱. 在胃肠道肿瘤患者手术切除肿瘤组织离体后马上取材, 采用一次性无菌手套及高压消毒处理过的手术切片, 切除癌组织及正常组织各100 mg, 两种组织切除过程中, 分别采用各自的手术刀片, 先取远癌切端正常组织(术后病理证实切缘无癌细胞者, 所取组织入选), 再取癌组织, 切除癌组织时注意尽量不要接触癌组织. 所取组织即刻放入-80 °C超低温冰箱保存. 组织解冻后, 取一小块组织, 约100 mg放于研钵中, 加入1 mL TRIzol, 迅速研磨, 尽量将组织磨碎, 室温静置5 min后, 在低温高速离心机中10 000 r/min, 离心10 min, 吸取上清液转移至新的离心管中. 以上血液及组织提取物均加入0.2 mL氯仿, 充分振荡. 12 000 r/min离心10 min. 将上层清液转入一新的1.5 mL离心管, 加入等体积异丙醇, 轻柔颠倒混匀十几次, 室温放置20 min. 12 000 r/min离心10 min. 弃上清. 沉淀用1 mL冰的无水乙醇洗1次, 12 000 r/min离心5 min. 弃上清. 室温干燥, 用灭菌的DEPC水50 μ L溶解沉淀. 取3 μ L RNA, 1.5%琼脂糖凝胶进行电泳, 在紫外投射灯上观察以鉴定提取的总RNA的完整性. 总RNA完整, 进行下续试验.

1.2.2 逆转录: 在冰浴的无核酸酶的离心管中加入如下反应混合物: RNA: 10 μ L, Oligo(dT)₁₈: 2 μ L, dNTP: 2 μ L, 70 °C加热5 min, 冰上骤冷2 min, 简短离心收集反应液后加入以下组分: 5 \times First-Strand Buffer: 4 μ L, MDTT: 1 μ L, RNasin: 0.5 μ L, TIANScript M-MLV(200 U): 1 μ L, 42 °C加热50 min, 95 °C加热5 min终止反应, 以RNase-free ddH₂O将反应体系稀释总体积至50 μ L.

1.2.3 RT-PCR: 扩增体系: cDNA: 1 μ L, 上下引物(10 μ m)各2 μ L, 10 \times 反应缓冲液: 2 μ L, dNTP(2.5 mmol/L): 2 μ L, Taq DNA聚合酶0.5 μ L, 加灭菌去离子双蒸水15 μ L至总体积25 μ L. hSTC-1引物、内参照 β -actin序列见表1. 循环参

表 1 RT-PCR引物信息

名称		引物序列	长度(bp)
hSTC-1	上游	5'-CACACCCACGAGCTGACTTC-3'	139
	下游	5'-TCTCCCTGGTTATGCACTCTCA-3'	
β -actin	上游	5'-CCCTGGACTTCGAGCAAGAGAT-3'	530
	下游	5'-GTTTCTGCGCAAGTTAGG-3'	

数如下: β -actin: 94 °C 预变性5 min, 94 °C 变性30 s, 58 °C 退火30 s, 72 °C 延伸1 min, 28个循环, 72 °C 延伸10 min. hSTC-1: 94 °C 预变性5 min, 94 °C 变性30 s, 62 °C 退火30 s, 72 °C 延伸1 min, 28个循环, 72 °C 延伸10 min.

1.2.4 RT-PCR产物鉴定: 扩增产物加样于1.5%琼脂糖凝胶进行电泳, 紫外光凝胶成像系统扫描. 以肉眼明确判定139 bp处有亮带为阳性标准.

统计学处理 采用SPSS软件分析各组数据, 以 $P < 0.05$ 为显著性差异.

2 结果

2.1 提取的总RNA完整 可见18S和28S两条主带, 28S : 18S = 2 : 1, 提取的总RNA完整, 没有降解(图1).

2.2 胃肠道恶性肿瘤外周血hSTC-1 mRNA的表达 在40例胃肠道恶性肿瘤患者中, hSTC-1 mRNA的表达的阳性率为60%(24/40例), 6例肿瘤组织均为阳性, 癌旁正常组织仅1例为阳性, 其余10例健康成人及10例消化系炎症性疾病患者均为阴性(图2). 胃肠道恶性肿瘤外周血hSTC-1 mRNA表达与临床病理资料之间的相关性分析见表2.

3 讨论

1995年Wanger等^[4]首先发现在人类组织中存在STC, 随后Chang等^[5]克隆出人类编码STC的cDNA, 并在1998年通过原位分子杂交和双色荧光原位分子杂交技术发现hSTC-1基因定位于染色体的8p11.2-p21带上, 且由4个外显子组成. 目前认为hSTC-1主要存在于肾、十二指肠、脑、子宫、前列腺、卵巢等组织中, 以旁分泌和自分泌方式分泌, 在外周血循环中不存在, De Niu等^[6]推测可能是血液中存在特殊的清除机制, 使得在人体外周血循环中没有发现hSTC-1的存在. 随着对hSTC-1研究的不断深入, 越来越多的研究表明hSTC-1的表达与人类癌症的发展过程相关, 有学者认为hSTC-1调节 Ca^{2+} /Pi浓度可能

■ 相关报道

肿瘤患者外周血中hSTC-1 mRNA的表达对诊断恶性肿瘤性疾病具有较高的敏感性和特异性, hSTC-1 mRNA可能成为一个新的肿瘤标志物, 与肿瘤微转移有关.

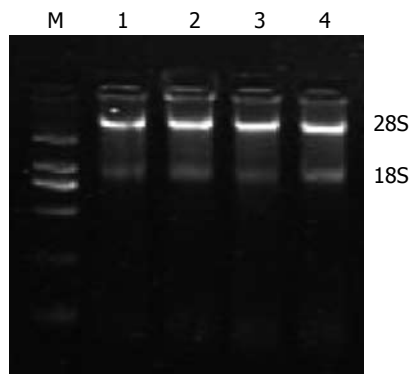


图 1 RNA琼脂糖变性凝胶电泳. M: DNA Marker; 1-4: 外周血总RNA.

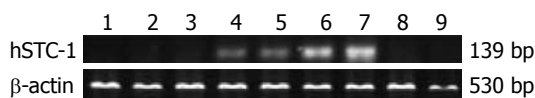


图 2 外周血hSTC-1 mRNA的表达. 1-3: 消化道肿瘤患者(-); 4-7: 消化道肿瘤患者(+); 8: 消化系炎症性疾病患者(-); 9: 健康成人(+).

是肿瘤细胞增殖^[7]、侵袭和转移必要的传导信号, 有诱导肿瘤细胞适应低氧环境以维持能量代谢的稳定^[8,9], 调节内皮细胞功能, 促进新生血管的成熟^[10]等作用. hSTC-1 mRNA在多种肿瘤组织内普遍的高表达, 且在非血液系统源性肿瘤人群的骨髓和外周血中不表达, 使得hSTC-1 mRNA可能成为一个新的肿瘤标志物^[11].

非血液系统的恶性肿瘤在发展过程中, 具有转移潜能的肿瘤细胞在术前或术时已脱离原发灶, 以非常少的数量播散并存活于淋巴结、骨髓、血液或远处器官中, 常无任何临床表现, 普通检测手段亦不能发现, 称为肿瘤微转移. 肿瘤细胞在外周血中的微转移是肿瘤复发和转移的重要起始步骤. 近年来随着分子生物学技术的发展, 用RT-PCR方法检测肿瘤特异性mRNA的表达已被证明是检查外周血、骨髓、淋巴结中循环细胞的敏感方法, PCR方法可以在 10^7 单核细胞中检测出1-10个肿瘤细胞, 这已被证明是检查外周血、骨髓、淋巴结中循环细胞的敏感方法.

■应用要点

在肿瘤患者的外周血中检测hSTC-1 mRNA的表达以判定肿瘤早期的微转移为一种较好的方法,可能成为肿瘤转移和复发以及疗效观察的客观指标之一。

表 2 外周血hSTC-1 mRNA表达与临床病理资料之间的相关性

临床资料	胃癌		大肠癌		合计	
	<i>n</i>	阳性 n (%)	<i>n</i>	阳性 n (%)	<i>n</i>	阳性 n (%)
性别						
男	6	2(33.3)	17	11(64.7)	23	13(56.5)
女	4	3(75.0)	13	8(61.5)	17	11(64.7)
年龄(岁)						
≥60	5	4(80.0)	21	15(71.4)	26	19(73.1) ^a
<60	5	1(20.0)	9	4(44.4)	14	5(35.7)
分化程度						
中高	2	0(0.00)	22	14(58.3)	24	14(58.3)
低	8	5(62.5)	8	5(62.5)	16	10(62.5)
浸润深度						
T1-T2	3	1(33.3)	6	3(50.0)	9	4(44.4)
T3-T4	7	4(57.1)	24	16(66.7)	31	20(64.5)
淋巴结转移						
有	5	3(60.0)	14	11(78.6)	19	14(73.7) ^a
无	5	2(40.0)	16	8(50.0)	21	10(47.6)
远处转移						
有	1	0(0.00)	7	5(71.4)	8	5(62.5)
无	9	5(55.6)	23	14(60.9)	32	19(59.3)
TNM分期						
0-II	5	2(40.0)	16	8(50.0)	21	10(47.6) ^a
III-IV	5	3(60.0)	14	11(78.6)	19	14(73.7)
合计	10	5(50.0)	30	19(63.3)	40	24(60.0)

^a $P<0.05$ vs 年龄<60, 淋巴结无转移, TNM分期 III-IV.

目前,病理学检查仍然是确诊肿瘤最重要的方法,而临床中常用的一些血清学方法如蛋白质类、糖脂类和酶类肿瘤标志物的检测不同程度地存在敏感性和/或特异性不足的问题,并且这些血清学的检测方法对肿瘤有无转移无法做出判断,临床上通常以临床表现和影像学检查作为诊断肿瘤有无转移的依据,这与肿瘤的微转移必然存在一定的时间差,其间包括肿瘤细胞进入血液循环、局部种植、生长等过程,早期发现肿瘤微转移将为指导临床治疗、监测疗效、判断肿瘤预后提供重要参考资料.因此,探索一种早期检查肿瘤微转移的方法具有一定的临床意义.

本研究收集40例消化系恶性肿瘤患者术前以及10例消化系炎症性疾病患者和10例正常健康捐赠者的外周血,其中6例患者同时于术中取肿瘤组织及正常肠道组织,采用RT-PCR方法检测hSTC-1 mRNA的表达.结果6例肿瘤组织均为阳性,癌旁正常组织仅1例为阳性,考虑在肿瘤的发生过程中代谢的改变要先于组织学的变化,其余10例健康成人及10例消化系炎症性疾病患

者均为阴性.

在胃肠道肿瘤患者中,hSTC-1 mRNA的表达的阳性率为60%(24/40例),与所收集的消化系炎症性疾病和健康成人的表达有显著的差异(均 $P<0.01$),在一定程度上说明肿瘤患者外周血中hSTC-1 mRNA的表达对诊断恶性肿瘤性疾病具有较高的敏感性和特异性.进一步结合患者的临床资料发现,hSTC-1 mRNA的表达在年龄≥60岁、低分化、浸润较深、有转移的胃癌和大肠癌患者中年龄<60岁、中高分化、浸润较浅、无转移的患者,两组之间并没有显著的差异.这与国内外相关报道不相一致^[12],考虑与样本量、病理组织取材范围、对肿瘤有无转移的判定所选择的影像学检查的敏感性有差异所致.但综合胃癌和肠癌患者外周血hSTC-1 mRNA的表达发现,在年龄≥60岁、有淋巴结转移和TNM分期III-IV期的胃癌肠癌患者中高于在年龄<60岁、无淋巴结转移和TNM分期0-II期的患者,两组间有统计学差异(均 $P<0.05$).在胃肠道肿瘤患者的外周血中检测hSTC-1 mRNA的表达以判定肿瘤早期的微转移不失为一种较好的

方法, 他可以作为肿瘤转移和复发以及疗效观察的客观指标之一。

4 参考文献

- 1 Filvaroff EH, Guillet S, Zlot C, Bao M, Ingle G, Steinmetz H, Hoeffel J, Bunting S, Ross J, Carano RA, Powell-Braxton L, Wagner GF, Eckert R, Gerritsen ME, French DM. Stanniocalcin 1 alters muscle and bone structure and function in transgenic mice. *Endocrinology* 2002; 143: 3681-3690
- 2 Westberg JA, Serlachius M, Lankila P, Penkowa M, Hidalgo J, Andersson LC. Hypoxic preconditioning induces neuroprotective stanniocalcin-1 in brain via IL-6 signaling. *Stroke* 2007; 38: 1025-1030
- 3 Kanellis J, Bick R, Garcia G, Truong L, Tsao CC, Etemadmoghadam D, Poindexter B, Feng L, Johnson RJ, Sheikh-Hamad D. Stanniocalcin-1, an inhibitor of macrophage chemotaxis and chemokinesis. *Am J Physiol Renal Physiol* 2004; 286: F356-F362
- 4 Wagner GF, Guiraudon CC, Milliken C, Copp DH. Immunological and biological evidence for a stanniocalcin-like hormone in human kidney. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; 92: 1871-1875
- 5 Chang AC, Janosi J, Hulsbeek M, de Jong D, Jeffrey KJ, Noble JR, Reddel RR. A novel human cDNA highly homologous to the fish hormone stanniocalcin. *Mol Cell Endocrinol* 1995; 112: 241-247
- 6 De Niu P, Radman DP, Jaworski EM, Deol H, Gentz R, Su J, Olsen HS, Wagner GF. Development of a human stanniocalcin radioimmunoassay: serum and tissue hormone levels and pharmacokinetics in the rat. *Mol Cell Endocrinol* 2000; 162: 131-144
- 7 Law AY, Lai KP, Lui WC, Wan HT, Wong CK. Histone deacetylase inhibitor-induced cellular apoptosis involves stanniocalcin-1 activation. *Exp Cell Res* 2008; 314: 2975-2984
- 8 Chen C, Jamaluddin MS, Yan S, Sheikh-Hamad D, Yao Q. Human stanniocalcin-1 blocks TNF-alpha-induced monolayer permeability in human coronary artery endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008; 28: 906-912
- 9 Lal A, Peters H, St Croix B, Haroon ZA, Dewhirst MW, Strausberg RL, Kaanders JH, van der Kogel AJ, Riggins GJ. Transcriptional response to hypoxia in human tumors. *J Natl Cancer Inst* 2001; 93: 1337-1343
- 10 Yeung HY, Lai KP, Chan HY, Mak NK, Wagner GF, Wong CK. Hypoxia-inducible factor-1-mediated activation of stanniocalcin-1 in human cancer cells. *Endocrinology* 2005; 146: 4951-4960
- 11 Fujiwara Y, Sugita Y, Nakamori S, Miyamoto A, Shiozaki K, Nagano H, Sakon M, Monden M. Assessment of Stanniocalcin-1 mRNA as a molecular marker for micrometastases of various human cancers. *Int J Oncol* 2000; 16: 799-804
- 12 吴平平, 黄培林, 陈宝安. 大肠癌患者外周血人类斯钙素基因的检测及意义. *中华消化杂志* 2005; 25: 259-261

■同行评价

本文内容新颖, 设计科学, 对胃癌的早期发现治疗具有一定的意义。

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 •

《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)

横结肠深肌层脂肪瘤误诊为结肠恶性间质瘤1例

夏翠锋, 李强, 李云峰, 潘定国, 赵俊卿

■背景资料

脂肪瘤是一种来源于脂肪组织的良性肿瘤, 常发于脂肪聚集的部位, 如腹膜后、皮下组织等。结直肠脂肪瘤是大肠良性肿瘤中仅次于腺瘤的良性肿瘤, 据国外Notaro及Zamboni等报道, 其发病率低于5%。

夏翠锋, 李强, 李云峰, 潘定国, 赵俊卿, 云南省肿瘤医院大肠癌临床研究中心 云南省昆明市 650118

作者贡献分布: 夏翠锋组织论文撰写; 李强、李云峰、潘定国及赵俊卿负责材料的收集与整理。

通讯作者: 夏翠锋, 650118, 云南省昆明市昆州路519号, 云南省肿瘤医院大肠癌临床研究中心. yykxj598@yahoo.cn

电话: 0871-8185656-2132

收稿日期: 2010-01-17 修回日期: 2010-05-19

接受日期: 2010-06-02 在线出版日期: 2010-08-08

Deep muscular lipoma of the transverse colon misdiagnosed as malignant stromal tumor: a report of one case

Cui-Feng Xia, Qiang Li, Yun-Feng Li, Ding-Guo Pan, Jun-Qing Zhao

Cui-Feng Xia, Qiang Li, Yun-Feng Li, Ding-Guo Pan, Jun-Qing Zhao, Colorectal Cancer Research Center, Tumor Hospital of Yunnan Province, Kunming 650118, Yunnan Province, China

Correspondence to: Cui-Feng Xia, Colorectal Cancer Research Center, Tumor Hospital of Yunnan Province, Kunming 650118, Yunnan Province, China. yykxj598@yahoo.cn

Received: 2010-01-17 Revised: 2010-05-19

Accepted: 2010-06-02 Published online: 2010-08-08

Abstract

A lipoma is a benign tumor of adipose tissue and usually arises in adipose-rich regions. Lipoma occurring in the deep muscular layer of the colon is a very rare clinical entity. Here, we report a case of deep muscular lipoma of the transverse colon. As bloody stool was the main symptom in this patient, he was misdiagnosed with malignant stromal tumor. A definite diagnosis was made by postoperative pathological examination.

Key Words: Transverse colon; Lipoma; Misdiagnosis; Stromal tumor

Xia CF, Li Q, Li YF, Pan DG, Zhao JQ. Deep muscular lipoma of the transverse colon misdiagnosed as malignant stromal tumor: a report of one case. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(22): 2392-2393

摘要

脂肪瘤是一种来源于脂肪组织的良性肿瘤, 常

发于脂肪聚集的部位, 而发生于结肠深肌层的脂肪瘤临床上实属罕见, 本例患者降结肠发生脂肪瘤, 以便血为主诉就诊, 临床上极易将其误诊为结肠癌或结肠恶性间质瘤, 临床上确诊的方法为术后病理诊断。

关键词: 横结肠; 脂肪瘤; 误诊; 间质瘤

夏翠锋, 李强, 李云峰, 潘定国, 赵俊卿. 横结肠深肌层脂肪瘤误诊为结肠恶性间质瘤1例. *世界华人消化杂志* 2010; 18(22): 2392-2393

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/2392.asp>

0 引言

脂肪瘤是一种来源于脂肪组织的良性肿瘤, 常发于脂肪聚集的部位, 而发生于结肠深肌层的脂肪瘤临床上实属罕见, 本例患者降结肠深肌层发生脂肪瘤, 以便血为主诉就诊, 临床上极易将其误诊为结肠癌或结肠恶性间质瘤, 确诊的方法为术后病理诊断, 本病的治疗方法可根据肿瘤的分型、直径、生长特点等情况来决定。现报道如下。

1 病例报告

男性, 73岁, 因“反复大便带血4年余入院”。体格检查无阳性体征。CT检查: 横结肠近脾曲肠壁增厚, 结肠癌可能(图1)。纤维结肠镜: 横结肠近脾曲处约4.0 cm×6.0 cm大小球形结节状隆起, 表面黏膜光滑、充血, 病理: 均为黏膜组织, 考虑为间质瘤, 建议行穿刺病理检查(图2)。遂在云南省肿瘤医院行根治性左半结肠切除术, 术后病理: 横结肠深层脂肪瘤(图3)。术后恢复好, 定期随访。

2 讨论

脂肪瘤是一种来源于脂肪组织的良性肿瘤, 常发于脂肪聚集的部位, 如腹膜后、皮下组织等^[1]。结直肠脂肪瘤是大肠良性肿瘤中仅次于腺瘤的良性肿瘤, 据国外Notaro及Zamboni等报道, 其发病率低于5%^[2]。临床上结直肠脂肪瘤较为少见。多数患者均以慢性的腹痛、便血、腹泻等症状来

■同行评议者

蔡三军, 教授, 复旦大学附属肿瘤医院 腹部外科;
王文跃, 主任医师, 中日友好医院 普通外科



图 1 CT示横结肠脾曲肠壁明显增厚.

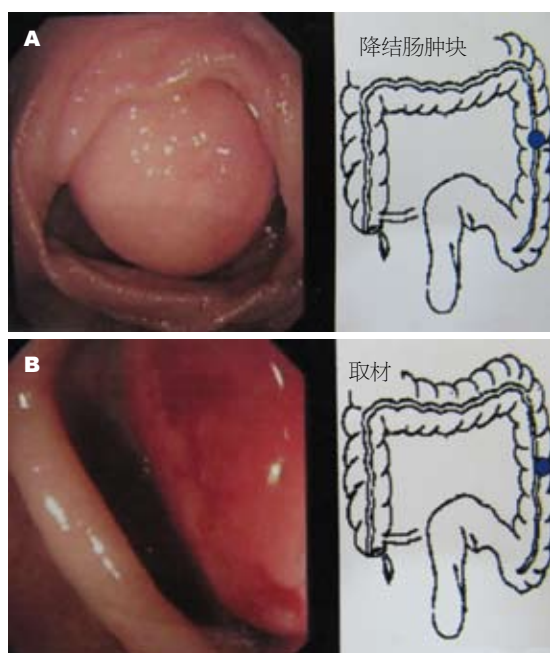


图 2 纤维结肠镜检查. A: 取材前; B: 取材后.

就诊. 结肠脂肪瘤从病理检查方面来分, 可分为黏膜下型、浆膜下型、肌间型、混合型4型, 以黏膜下型为多见^[3]. 查阅近30年的相关文献, 均为黏膜及浆膜下型, 对其治疗均在纤维内镜下无法切除后行结肠肠段切除术, 通过术后病理检查明确诊断. 本例患者根据肠镜及CT等检查确定为混合型, 肿瘤位于结肠深肌层, 位置较深, 实属罕见. 随着对胃肠间质瘤认识的加深, 该病

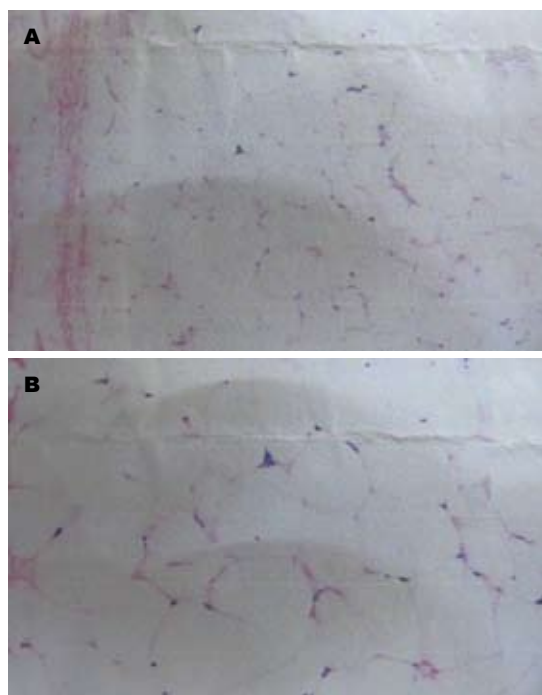


图 3 横结肠深层脂肪瘤病理检查. A: 低倍镜($\times 10$); B: 高倍镜($\times 40$).

仅依靠影像学及内镜检查极易误诊为结肠间质瘤等疾病, 术前很难明确诊断. 该病的诊断只有通过术后病理检查才能确定, 而对于其治疗方法, 有学者提出, 因脂肪瘤导电性的特点, 带蒂的脂肪瘤不宜在电镜下切除^[4]. 我们认为该病的治疗可根据肿瘤的分型、直径、生长特点等情况来决定其治疗方法, 对于电镜下治疗困难的患者, 我们认为可借助超声内镜穿刺病理检查协助诊断, 并建议术中行快速病理检查, 明确诊断后选择手术方式, 尽量减小手术创伤.

3 参考文献

- 1 张芳. 结肠粘膜下脂肪瘤1例. 青岛医药卫生 2002; 34: 51
- 2 赵士彭, 赵发, 郭伶俐, 张峰波. 结肠巨大血管脂肪瘤误诊结肠癌一例报告. 天津医药 1998; 26: 729
- 3 周松, 聂凯, 杨爱国, 陈智勇. 结肠肝曲脂肪瘤二例. 临床外科杂志 2006; 14: 320
- 4 韩宇晶, 王新颖. 结肠浆膜下脂肪瘤误诊为粘膜下脂肪瘤致内镜下切除失败1例. 第一军医大学学报 2003; 23: 676

编辑 李军亮 电编 何基才

■同行评价

本病例较少见, 对临床医师有一定参考价值.

《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 × 10¹²/L, WBC数用1 × 10⁹/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、补充或删节时,本刊编辑部将把原稿连同审稿意见、编辑意见寄回给作者修改,而作者必须于15 d内将单位介绍信、作者符合要点承诺书、版权转让信等书面材料寄回编辑部,同时将修改后的电子稿件上传至在线办公系统;逾期寄回,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!

蔡开琳 副教授

华中科技大学同济医学院附属协和医院普通外科

李瑗 教授

广西肿瘤研究所

陈洪 副教授

东南大学附属中大医院消化科

刘绍能 主任医师

中国中医科学院广安门医院消化科

陈贻胜 教授

福建省立医院消化内科

龙学颖 副主任医师

中南大学湘雅医院放射科

杜雅菊 主任医师

哈尔滨医科大学附属第二医院消化内科

沈柏用 副教授

上海交通大学医学院附属瑞金医院肝胆胰外科中心

范学工 教授

中南大学湘雅医院感染病科

孙诚谊 教授

贵阳医学院附属医院院长办

冯志杰 主任医师

河北医科大学第二医院消化内科

孙殿兴 主任医师

白求恩国际和平医院肝病科

傅春彬 主任医师

吉化集团公司总医院消化内科

唐文富 副教授

四川大学华西医院中西医结合科

高英堂 研究员

天津市第三中心医院 天津市肝胆疾病研究所分子细胞室

王振宁 教授

中国医科大学附属第一医院肿瘤外科

戈之铮 教授

上海交通大学医学院附属仁济医院消化科

王正康 教授

北京中日友好医院普外科

管冬元 副教授

上海中医药大学基础医学院实验中医教研室

肖恩华 教授

中南大学湘雅二医院放射教研室

郝建宇 教授

首都医科大学附属北京朝阳医院消化内科

徐庆 教授

桂林医学院药理教研室

黄恒青 主任医师

福建省第二人民医院消化内科

姚希贤 教授

河北医科大学第二医院消化内科

李刚 教授

北京大学医学部生物化学与分子生物学系

殷正丰 教授

中国人民解放军第二军医大学东方肝胆外科医院

李晟磊 副主任医师

郑州大学第一附属医院病理科、河南省肿瘤病理重点实验室

于颖彦 教授

上海交通大学医学院附属瑞金医院器官移植中心病理室

李瑜元 教授

广州市第一人民医院内科

张进祥 副教授

华中科技大学同济医学院附属协和医院急诊外科