ISSN 1009-3079
CN 14-1260/R

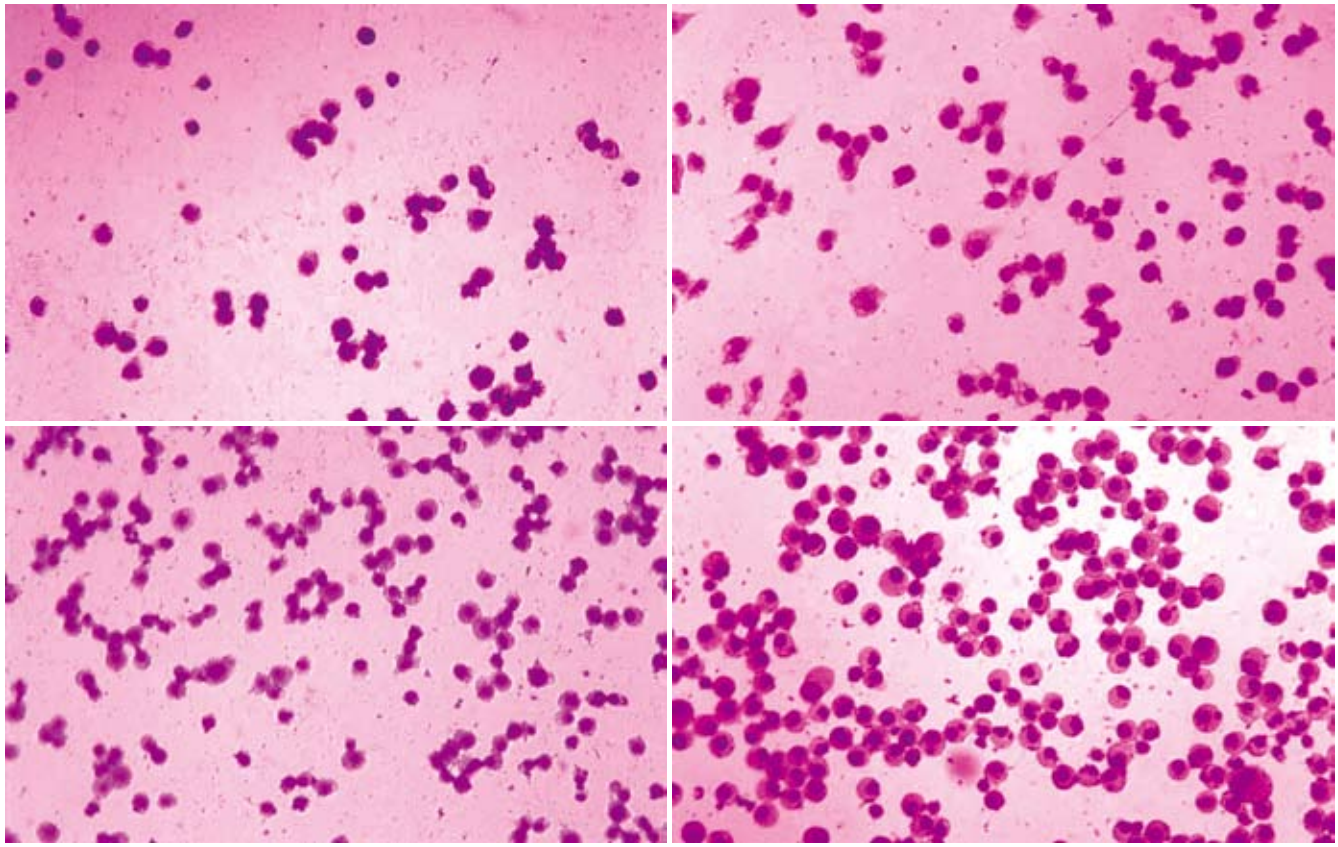
世界华人消化杂志

世界华人消化杂志®

WORLD CHINESE JOURNAL OF DIGESTOLOGY

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

2009 年 10 月 8 日　第 17 卷　第 28 期　(Volume 17 Number 28)



二零零九年十月八日　第十七卷　第二十八期

28 | 2009

ISSN 1009-3079

9 771009 307056 28>

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.

www.wjgnet.com

世界华人消化杂志®

编辑委员会

2009-01-01/2011-12-31
wcjd@wjgnet.com www.wjgnet.com

总顾问

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

名誉总编辑

潘伯荣教授

社长/总编辑

马连生教授

副总编辑

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

常务编委

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

编委

消化内科学

白爱平副教授
苌新明教授
陈洪副教授
陈其奎教授
陈卫昌教授
陈贻胜教授
程斌副教授
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
何松教授
洪天配教授
胡伏莲教授
胡和平主任医师
黄晓东副主任医师
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
刘海林主任医师
刘占举教授
陆伦根教授
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
王承党副教授
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
周国雄主任医师
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
陈立波副教授
陈凛教授
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
李文岗副教授
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
邰升副教授
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

消化中医药学

蔡淦教授
陈治水主任医师
杜群副研究员
黄恒青主任医师
李军祥教授
李康副教授
李勇副教授
李振华教授
刘成海研究员
刘孟安教授
刘平教授
刘绍能主任医师
沈洪教授
唐志鹏研究员
王富春教授
王新月教授
谢鸣教授
徐列明教授
许玲副教授
张声生教授

消化肿瘤学

曹秀峰主任医师
曹志成院士
陈公琰主任医师
李瑗教授
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
扬业发教授
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
田颖刚副研究员
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
阴赖宏研究员
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
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 ●　2009 年 10 月 8 日　第 17 卷　第 28 期　(总第288期)

述　评

2863 丙型肝炎病毒编码蛋白的生物学功能
唐霓

基础研究

2871 SN-38载药纳米微球对人胃癌细胞BGC-823的抑制作用
孙国庆, 胡勇, 李晓林, 孙昊

2877 痘苗病毒辅助的重组丙型肝炎病毒生产体系中生产细胞的选择
舒文, 马强, 董慧敏, 林冠峰, 吴英松

2881 经导管动脉栓塞对肝癌血管生成的影响
梁斌, 郑传胜, 冯敢生, 王勇, 赵辉, 夏向文

2887 入肝血流阻断下射频消融后残余肿瘤细胞HIF-1α及PCNA的表达
韩建波, 仇毓东, 张炜炜, 陈骏

2892 白藜芦醇下调线粒体DNA修复酶对重症急性胰腺炎大鼠胰腺腺泡细胞凋亡的影响
侯伊玲, 薄海, 刘子泉, 夏时海

临床研究

2899 外周血T细胞表面PD-1在慢性乙型肝炎患者干扰素治疗期间的表达
梁雪松, 李成忠 万谟彬, 张迁

2903 MMP-7在肝细胞癌组织中的表达及临床意义
饶雪峰, 刘伟中, 廖传文, 彭贵祖, 单人锋

文献综述

2908 非酒精性脂肪性肝病的代谢发病机制
吴涛, 季光

2915 中药诱导肝癌细胞凋亡的研究进展
郑炜望, 华海清

2919 胰腺及胰腺周围侵及血管的肿瘤手术难点对策与分析
罗地来, 杨成义, 章永恩, 朱栋良, 罗刚

2922 质子泵抑制剂与钙代谢和骨折的关系
周俊, 张玫

研究快报

2927 siRNA沉默TPX2基因对食管癌细胞EC9706的增殖和TPX2基因表达的影响
刘红春, 刘玉含, 赵培荣, 李晟磊

2931 ERK通路对胃癌细胞顺铂敏感性的调节作用
荆薇, 张晔, 刘云鹏, 侯柯佐

2936 旋覆代赭汤对胃窦平滑肌细胞收缩和钙离子浓度的影响
时昭红, 陶春晖, 石拓, 林丽莉, 王湘宁, 韦秀明

临床经验

2940 口服4%碘海醇精粉糊状造影螺旋CT扫描诊断食管癌113例
胡兴荣, 崔显念, 邱妮妮

2944 非酒精性脂肪性肝病患者血清瘦素、脂联素的变化
李异玲, 田忠, 杨淼, 王炳元

2948 胆内瘘临床分析32例
杨建军, 楼晓楼, 刘文勇, 顾岩

2951 I^{125}粒子植入在胰腺恶性肿瘤治疗中的疗效分析
吴汉青, 吴河水, 杨智勇, 王春友, 原伟伟
2955 ERCP在梗阻性黄疸病因鉴别诊断中的应用
任粉玉, 朴熙绪, 崔顺子
2958 无症状平均风险人群大肠癌的筛查
刘国伟, 蔡全才
2964 芳香基硫酸酯酶法对结直肠癌和乳腺癌筛查的价值
张晶, 张青云, 董大海

致　　谢

2968 致谢世界华人消化杂志编委

消　　息

2870 《世界华人消化杂志》正文要求
2876 《世界华人消化杂志》中文摘要要求
2886 汤姆森-路透公布2008年*WJG*影响因子2.081
2891 世界华人消化杂志修回稿须知
2907 2007年内科学类期刊总被引频次和影响因子排序
2926 《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》
2935 《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》
2939 《世界华人消化杂志》数字用法标准
2943 《世界华人消化杂志》参考文献要求
2954 《世界华人消化杂志》英文摘要要求
2963 《世界华人消化杂志》性质、刊登内容及目标

封面故事

Sun H, Ren J, Zhu Q, Kong FZ, Wu L, Pan BR. Effects of lysophosphatidic acid on human colon cancer cells and its mechanisms of action.
World J Gastroenterol 2009; 15(36): 4547-4555
http://www.wjgnet.com/1007-9327/15/4547.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

世界華人消化雜志

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

吴阶平　题写封面刊名
陈可冀　题写版权刊名
(旬刊)
创　刊 1993-01-15
改　刊 1998-01-25
出　版 2009-10-08
原刊名 新消化病学杂志

名誉总编辑 潘伯荣
总　编　辑 马连生
常务副总编辑 张海宁
编辑部主任 张海宁
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

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
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
印刷 北京科信印刷厂
发行 国内: 北京报刊发行局
国外: 中国国际图书贸易总公司
(100044，北京市399信箱)
订购 全国各地邮电局
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

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.

世界华人消化杂志正式开通了在线办公系统(http://wcjd.wjgnet.com)，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.

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.

2009年版权归世界华人消化杂志所有

中国标准连续出版物号 **ISSN** 1009-3079 **CN** 14-1260/**R**　邮发代号 82-262　国外代号 **M** 4481　国内定价 每期24.00元 全年864.00元　广告经营许可证 1401004000050

World Chinese Journal of Digestology

October 2009 Contents in Brief Volume 17 Number 28

EDITORIAL

2863 Biological role of hepatitis C virus proteins
Tang N

BASIC RESEARCH

2871 SN-38-loaded polymeric micelles can inhibit the growth of human gastric adenocarcinoma BGC-823 cells
Sun GQ, Hu Y, Li XL, Sun H

2877 Selection of cell lines for production of recombinant hepatitis C virus using the vaccinia virus expression system
Shu W, Ma Q, Dong HM, Lin GF, Wu YS

2881 Transcatheter arterial embolization promotes angiogenesis in rabbit VX2 liver tumor
Liang B, Zheng CS, Feng GS, Wang Y, Zhao H, Xia XW

2887 Expression of hypoxia-inducible factor-1α and proliferating cell nuclear antigen in the residual tumor in rabbits after radiofrequency ablation of VX2 liver tumor with hepatic inflow occlusion
Han JB, Qiu YD, Zhang WW, Chen J

2892 Resveratrol induces mitochondrial DNA repair enzyme downregulation and promotes pancreatic acinar cell apoptosis in rats with severe acute pancreatitis
Hou YL, Bo H, Liu ZQ, Xia SH

CLINICAL RESEARCH

2899 Dynamic changes in programmed death-1 expression on the surface of T cells in chronic hepatitis B patients undergoing interferon therapy
Liang XS, Li CZ, Wan MB, Zhang Q

2903 Clinical significance of matrix metalloproteinase-7 expression in hepatocellular carcinoma
Rao XF, Liu WZ, Liao CW, Peng GZ, Shan RF

REVIEW

2908 Pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease: a perspective from metabolism
Wu T, Ji G

2915 Advances in research on Chinese medicines that can induce apoptosis of hepatocellular carcinoma cells
Zheng WW, Hua HQ

2919 Surgery for pancreatic and peripancreatic tumors invading blood vessels: problems and management
Luo DL, Yang CY, Zhang YE, Zhu DL, Luo G

2922 Association of proton pump inhibitor use with altered calcium metabolism and bone fractures
Zhou J, Zhang M

RAPID COMMUNICATION

2927 Small interfering RNA-mediated downregulation of targeting protein for Xklp2 suppresses the proliferation of human esophageal carcinoma EC9706 cells
Liu HC, Li YH, Zhao PR, Li SL

2931 Regulatory role of the extracellular signal-regulated kinase signaling pathway in sensitivity of gastric cancer cells to cis-platinum
Jing W, Zhang Y, Liu YP, Hou KZ

2936 Effects of Xuanfu Daizhe Decoction on cell contraction and intracellular calcium concentration in rat gastric antral smooth muscle cells
Shi ZH, Tao CH, Shi T, Lin LL, Wang XN, Wei XM

CLINICAL PRACTICE

2940 Use of pasty iohexol as an oral contrast agent in spiral computed tomography for diagnosis of esophageal cancer: an analysis of 113 cases
Hu XR, Cui XN, Qiu NN

2944 Changes in serum leptin and adiponectin levels in patients with nonalcoholic fatty liver disease
Li YL, Tian Z, Yang M, Wang BY

2948 Internal biliary fistula: an analysis of 32 cases
Yang JJ, Lou XL, Liu WY, Gu Y

2951 Efficacy of iodine-125 seed implantation in pancreatic carcinoma
Wu HQ, Wu HS, Yang ZY, Wang CY, Yuan WW

2955 Diagnostic value of endoscopic retrograde cholangiopancreatography in obstructive jaundice
Ren FY, Piao XX, Cui SZ

2958 Screening for colorectal cancer in an asymptomatic average-risk population
Liu GW, Cai QC

2964 Significance of arylsulphatase activity in the screening of colorectal and breast cancer
Zhang J, Zhang QY, Dong DH

ACKNOWLEDGMENT

2968 Acknowledgments to reviewers of World Chinese Journal of Digestology

COVER

Sun H, Ren J, Zhu Q, Kong FZ, Wu L, Pan BR. Effects of lysophosphatidic acid on human colon cancer cells and its mechanisms of action.
World J Gastroenterol 2009; 15(36): 4547-4555
http://www.wjgnet.com/1007-9327/15/4547.asp

RESPONSIBLE EDITORS FOR THIS ISSUE

Assistant Editor: *Xiao-Fang Liu* Review Editor: *Jun-Liang Li* Electronic Page Editor: *Ji-Cai He*
English Language Editor: *Tian-Qi Wang* Editor-in-Charge: *Jun-Liang Li*
Layout Editor: *Lian-Sheng Ma*

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 October 8, 2009

NAME OF JOURNAL
World Chinese Journal of Digestology

RESPONSIBLE INSTITUTION
Department of Science and Technology of Shanxi Province

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

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

PRINTING
Beijing Kexin Printing House

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

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

HONORARY EDITOR-IN-CHIEF
Bo-Rong Pan

EDITOR-IN-CHIEF
Lian-Sheng Ma

SCIENCE EDITORS
Director: Hai-Ning Zhang

SUBSCRIPTION
RMB 24 Yuan for each issue
RMB 864 Yuan for one year

CSSN
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

COPYRIGHT
© 2009 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 © 2009 by Editorial Department of *World Chinese Journal of Digestology*

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2009年10月8日; 17(28): 2863-2870
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

述评 EDITORIAL

丙型肝炎病毒编码蛋白的生物学功能

唐 霓

唐霓, 重庆医科大学病毒性肝炎研究所 感染性疾病分子生物学教育部重点实验室 重庆市 400016
唐霓, 研究员, 硕士生导师, 主要从事病毒性肝炎发病机制和肝细胞分化发育研究.
国家自然科学基金资助项目, No. 30972586
通讯作者: 唐霓, 研究员, 400016, 重庆市渝中区医学院路1号, 重庆医科大学病毒性肝炎研究所, 感染性疾病分子生物学教育部重点实验室. nitang809@hotmail.com
电话: 023-68486780
收稿日期: 2009-09-15 修回日期: 2009-09-22
接受日期: 2009-09-28 在线出版日期: 2009-10-08

Biological role of hepatitis C virus proteins

Ni Tang

Ni Tang, Key Laboratory of Molecular Biology of Infectious Diseases of the Ministry of Education, Institute for Viral Hepatitis, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China
Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30972586
Correspondence to: Ni Tang, Key Laboratory of Molecular Biology of Infectious Diseases of the Ministry of Education, Chongqing Medical University, 1 Yixueyuan Road, Chongqing 400016, China. nitang809@hotmail.com
Received: 2009-09-15 Revised: 2009-09-22
Accepted: 2009-09-28 Published online: 2009-10-08

Abstract

Hepatitis C virus (HCV) is a major causative agent of chronic hepatitis, liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma. At present, the molecular pathogenesis of HCV-induced liver diseases is largely unknown. This review will highlight recent results providing an idea of how HCV structural and non-structural proteins affect RNA replication, viral particle assembly and release, and how these proteins interfere with the intracellular signaling pathways and finally evade host defense. Elucidation of the molecular mechanism by which HCV regulates host response may facilitate revealing targets for novel therapeutic vaccines and drugs.

Key Words: Hepatitis C virus; Viral protein; Virus-host interaction; Biological role

Tang N. Biological role of hepatitis C virus proteins. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2009; 17(28): 2863-2870

摘要

丙型肝炎是由丙型肝炎病毒(hepatitis C virus, HCV)引起的传染性疾病, 是慢性肝病的主要原因之一. 本文系统阐述病毒编码蛋白通过直接与细胞内重要调节分子结合, 以病毒-宿主细胞相互作用方式影响细胞重要的信号通路, 导致细胞增殖、分化等发生异常, 干扰机体免疫防御功能, 削弱宿主对HCV感染细胞的抗病毒应答, 有利于慢性持续性感染的建立, 最终促使HCV相关肝病的发生和发展. 加强对病毒蛋白生物学功能的研究, 将有助于探讨HCV致病机制和免疫逃逸机制, 对HCV特异靶向药物和治疗性疫苗的研究和开发也具有重要的意义.

关键词: 丙型肝炎病毒; 病毒蛋白; 病毒–宿主相互作用; 生物学功能

唐霓. 丙型肝炎病毒编码蛋白的生物学功能. 世界华人消化杂志 2009; 17(28): 2863–2870
http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/2863.asp

0 引言

丙型肝炎是由丙型肝炎病毒(hepatitis C virus, HCV)引起的传染性疾病, 主要通过血源传播, 是慢性肝病的主要原因之一. 目前全球范围内HCV感染率约3%, 感染总人数超过2亿[1-2], 我国约4000多万人感染HCV. 成年人感染HCV后, 慢性持续性感染高达60%-85%, 远远高于乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)感染慢性化率(5%-10%), 并可进一步发展成肝纤维化、肝癌[3-4], 目前尚无预防HCV感染的疫苗和抗病毒药物, HCV感染已经成为严重威胁人类健康的社会公共卫生问题.

HCV相关的慢性肝损伤发生在病毒感染后多年, 传统观念认为机体免疫反应造成肝细胞的慢性炎症、细胞坏死和肝纤维化等在HCV相关肝病的发病中起主导地位. 随着HCV感染致病机制研究的进一步深入, “宿主因素”占致病主导地位的观念近年来有所改变, 目前更倾向认同“病毒-宿主”相互作用、相互影响最

■背景资料
HCV是有被膜的单股正链RNA病毒, 属黄病毒科丙型肝炎病毒属, 主要在肝细胞中复制, 是引起输血后非甲-非乙型肝炎的主要致病因子. HCV基因组变异大, 主要分为6个基因型, 80多个亚型. HCV相关的慢性肝损伤发生在病毒感染后多年, 传统观念认为机体免疫反应造成肝细胞的慢性炎症、细胞坏死和肝纤维化等在HCV相关肝病的发病中起主导地位. 随着HCV感染致病机制研究的进一步深入, “宿主因素”占致病主导地位的观念近年来有所改变, 目前更倾向认同“病毒-宿主”相互作用、相互影响最终导致疾病的发生. 加强对病毒蛋白生物学功能的研究, 将有助于探讨HCV致病机制和免疫逃逸机制, 对HCV特异靶向药物和治疗性疫苗的研究和开发也具有重要的意义.

■同行评议者
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

■相关报道
最近的研究表明病毒能够以直接的方式, 即通过病毒-宿主细胞相互作用进而影响细胞重要的信号通路, 导致细胞的增殖、分化等发生异常, 干扰机体免疫防御功能, 有利于慢性持续性感染的建立, 最终促使HCV相关肝病的发生和发展.

终导致疾病的发生. 最近的研究表明病毒能够以直接的方式, 即通过病毒-宿主细胞相互作用进而影响细胞重要的信号通路, 导致细胞的增殖、分化等发生异常, 干扰机体免疫防御功能, 有利于慢性持续性感染的建立, 最终促使HCV相关肝病的发生和发展.

1 HCV编码蛋白生物学功能

HCV是有被膜的单股正链RNA病毒, 属黄病毒科丙型肝炎病毒属, 主要在肝细胞中复制, 是引起输血后非甲-非乙型肝炎的主要致病因子. HCV基因组变异大, 主要分为6个基因型, 80多个亚型[5]. HCV基因组全长约9.6 kb, 分为5'非翻译区(UTR), 一个开放阅读框架(ORF)和3'非翻译区. 5'UTR含有内部核糖体进入位点(IRES), 3'UTR与复制起始有关. ORF编码一个约3008-3037个氨基酸的多蛋白前体, 在宿主细胞信号肽酶和病毒蛋白酶的共同作用下加工成至少10种病毒蛋白, 依次为NH2-Core-E1-E2-p7-NS3-NS4A-NS4B-NS5A-NS5B-COOH[6]. 最近发现了一个由Core编码序列的核糖体读码框架移位产生的约17 kDa蛋白, 称为核糖体读框移位替代蛋白(alternative ribosomal frameshift protein, ARFP)或F(frameshift)蛋白[7-8].

1.1 结构蛋白生物学功能

1.1.1 核心蛋白: 核心蛋白位于HCV编码多蛋白前体N端, 下游是被膜蛋白E1、E2; 编码基因由573个核苷酸组成, 编码191个氨基酸的核心蛋白. 加工成熟的核心蛋白约有172-182个残基(P21), 富含脯氨酸、精氨酸和赖氨酸, 亲水性高, 抗原性强, 无糖基化位点, 在病毒株和株之间相对保守[9]. 核心蛋白除主要组成病毒核衣壳外, 还具有多种功能: 能与病毒RNA结合, 调节HCV RNA转录, 参与病毒颗粒装配, 并与宿主细胞糖蛋白相互作用完成病毒颗粒的成熟与分泌[10].

最近的研究表明, HCV核心蛋白同样在细胞信号转导、转录因子调控、细胞凋亡以及细胞的转化过程中发挥了重要作用. HCV核心蛋白具有促进细胞转化功能, HCV核心蛋白的转基因小鼠肝细胞增殖加快, 肝细胞的氧化应激反应性明显增强, 肝纤维化发生率增加[11]. 目前对HCV核心蛋白促细胞增殖效应的作用机制尚不明确, 推测与Cyclin E上调或STAT3磷酸化导致的MAPK通路活化相关, 也有报道HCV核心蛋白转染HepG2细胞后激活NF-κB, 进而增强TGF-α转录活性, 最终活化MAPK/ERK通路刺激细胞增殖[12].

核心蛋白能直接和P53[13]、P73[14]、pRb[15]等肿瘤抑制蛋白结合, 调节Cyclin-依赖激酶(CDK)抑制因子P21/Waf的表达[16], 而P21/Waf是P53的转录调控靶位, 核心蛋白通过直接调节Cyclin/CDK复合物的功能, 参与细胞周期异常改变和肿瘤的发生. 此外, 核心蛋白还能与LZIP蛋白[17]、hnRNP K蛋白[18]、RNA解旋酶DEAD box DDX3蛋白[19]等结合.

在表达核心蛋白的细胞和转基因小鼠模型中证实core能与线粒体蛋白伴侣分子Prohibitin结合[20], 破坏Prohibitin与线粒体DNA编码的细胞色素C氧化酶(COX)的相互作用, 导致COX活性下降, 线粒体功能障碍, 肝细胞氧化应激损伤.

1.1.2 E1和E2: 位于病毒表面的包膜糖蛋白, 介导病毒与细胞表面受体结合和HCV入胞. E1和E2高度糖基化, 形成一个非共价异二聚体. 其中E2是与细胞膜上CD81和清道夫受体B1(SR-B1)结合的主要配体[21-22]. E2与IFN诱导的蛋白激酶PRK结合, 抑制了IFN-γ的产生和NK细胞的细胞毒效应, 是病毒逃逸机体免疫的重要因素之一[23].

1.1.3 P7: 由63个氨基酸组成的疏水多肽, N端和C端均朝向ER腔, 在ER膜上寡聚化并形成具备离子通道功能的疏水孔, P7不直接参与HCV病毒的复制, 但对病毒的组装和释放具有重要作用[24].

1.1.4 ARFP/F蛋白: 生物信息学分析表明HCV核心蛋白编码区存在一段高度保守的基因序列, 最早被认为是维系HCV RNA的二级结构所需. 1998年Walewski *et al*首次利用生物信息学证实核心蛋白读码框-2/+1位重叠有功能可变的开放阅读框[7], 随后在体外无细胞系统中成功鉴定了ARFP/F的表达[8].

体外HCV亚病毒复制子模型实验表明, ARFP/F蛋白对于HCV复制不是必需的, 但F蛋白基因序列中隐藏有保持RNA二级结构完整性的关键核苷酸(Stem-loop, SL47, nt 388-425; SL87, nt 428-508)[25], 一旦破坏了高度保守的RNA茎环结构, 病毒基因组的复制和翻译将被阻断[26].

ARFP/F蛋白能降低内源性P21 cdk的表达水平, 通过与MM-1结合阻断MM-1对c-Myc的抑制作用[27], 增强c-Myc、下调P53的转录活性[28], 增加凋亡相关基因LGALS1, PRKCZ以及原癌基因FHL2的表达水平[29]. 因此ARFP/F蛋白可能

参与感染肝细胞增殖、分化和凋亡调节, 并与HCV感染慢性化和细胞转化、肿瘤的发生密切相关.

研究还发现, ARFP/F蛋白可刺激树突状细胞IL-6, IL-8和MCP-1和MP-1β的产生, 而IL-6, IL-8和MCP-1参与HCV感染慢性肝损伤的发生, 提示ARFP/F蛋白直接与肝纤维化进程中炎症因子异常高表达密切相关[30-31].

前折叠素(prefoldin)与伴侣素(chaperon)结合作为伴侣复合物, 对真核细胞内肌球蛋白和微管蛋白的正确折叠发挥重要作用. HCV 1a F蛋白与细胞内前折叠素2(prefoldin 2, PFD2)相互作用, 干扰PFD复合物的正常功能, 导致微管蛋白细胞骨架的异常装配, 有助于HCV持续性、慢性感染状态的建立[32].

1.2 非结构蛋白

1.2.1 NS2/3蛋白水解酶: NS2/3是翻译的第一个非结构蛋白, 负责NS2和NS3的分子内切割. 其高度疏水性的N端包含了多个跨膜片段, 序列同源性分析表明: NS2/3与GB病毒、牛病毒性腹泻病毒(bovine viral diarrhea virus)NS2/3区域高度同源, 其中H952, E972, C993氨基酸残基在HCV所有基因型的NS2/3区高度保守[33], 提示与蛋白水解酶功能密切相关. 实验证实, NS2仅需NS3前两位氨基酸即能发挥基本水解酶活性, NS3的81-213位氨基酸包含了Zn^{2+}结合位点, 是NS2蛋白水解酶的重要功能辅助区[34].

NS2/3蛋白水解酶对HCV的复制是否必需目前还有一定争议. 用去除NS2/3的HCV感染黑猩猩, 病毒丧失了持续感染的能力; 体外亚病毒复制子系统的复制也需要NS2/3蛋白酶的水解作用. 体外有效复制的嵌合病毒株Con1, H77或J6其结构蛋白与JFH-1非结构蛋白的最佳连接部位均提示位于NS2第1个跨膜域之后[35]. 但在Huh7细胞模型中, 去除NS2/3后HCV同样能够有效复制. 由于HCV复制场所位于NS蛋白组成的膜网复合物中, 而NS2是一种靶向ER的膜内蛋白, 同时与其他NS蛋白的相互作用已被证实[36], 因此推测NS2可能作为一种辅助分子间接参与病毒复制.

蛋白酶水解后的NS2对NS5A超磷酸化形式P58的产生有重要作用[37], NS2还抑制NF-κB、亚铁螯合酶、SV40、CMV、TNF-α等多种报告基因启动子的表达[38], 瞬时转染和稳定表达HCV NS2的细胞增殖率减慢, 细胞周期捕获在S期, 同时细胞周期调节蛋白Cyclin A RNA和蛋白的表达减少[39]. HCV NS2转基因小鼠肝组织内Fas介导的细胞凋亡和caspase3/7的活性被抑制, CIDE-B诱导的细胞凋亡也被抑制(CIDE-B, cell death-inducing DFF-like effector B, 细胞死亡诱导的DFF45样效应分子, 促进细胞死亡和DNA片段化)[40]. NS2还能与致炎因子CCL5/RANTZS的产生密切相关, 通过调节宿主细胞环境, 有利于病毒持续感染, 参与HCV致病机制的发生[41].

1.2.2 NS3: 为69 kDa的多肽分子, 包含2个酶活性部位: N端1/3(1026-1206位氨基酸)为丝氨酸蛋白水解酶, 酶催化三联体为His 1083, Asp 1107以及Ser1165, 该水解酶需要NS4a作为共辅助分子, 切割所有的下游NS蛋白[42]. C端2/3包含RNA解旋酶/核苷三磷酸酶, NS3的蛋白水解酶和解旋酶对于HCV病毒复制至关重要. 此外NS3/4a蛋白水解酶还参与HCV对机体固有免疫应答(innate immune)的逃逸: NS3/4a降解IFN诱导产生的RIG-1经典通路中关键辅助蛋白VISA, MAVS和cardif[43], 切割Toll样受体转换因子TRIF[44], 最终抑制Ⅰ型IFN的产生, 削弱宿主细胞对HCV感染的抗病毒应答.

NS3 C端解旋酶与N端蛋白水解酶在功能上有一定交叉, 是DEXD/H-box解旋酶超家族成员之一[45], 可以解开RNA-RNA底物, 参与病毒的早期装配.

1.2.3 NS4A: 由54个氨基酸组成, 作为NS3蛋白水解酶的共辅助分子, 其跨膜螺旋位于NS4A的N端疏水区, 能将NS3-NS4a复合物锚定于细胞膜内, 便于蛋白的水解和RNA复制[46]. NS4A中心区(21-34 aa)为NS3活化必需区, 而酸性C端通过调节NS5a磷酸化状态参与HCV的复制[47].

1.2.4 NS4B: 为27 kDa的跨膜蛋白, 主要功能是诱导形成特异的“膜网结构”(Membranous web), 为HCV RNA在细胞内的复制场所[48]. NS4B能与NS3相互作用, 其基因多态性影响HCV复制效率. NS4B C端包含GTP结合位点, 初级内涵体蛋白Rab5能与NS4B C端结合, 参与复制复合物形成[49].

1.2.5 NS5A: N端含有3个结构功能域[50], 结构域Ⅰ最大也最为保守, 为预测的RNA结合套状结构, 体外实验证实能与RNA结合. 结构域Ⅱ和Ⅲ在不同基因型序列差异较大, 其中结构域Ⅲ参与病毒的产生和释放: 在HCV cc模型中, 结构域Ⅲ C端缺失或替代突变后, 不能产生感染性病毒颗粒. NS5A的磷酸化状态也与病毒的复制密切相关, 磷酸化NS5A的选择性抑制剂能刺激野生

■**应用要点**
加强对病毒蛋白的生物学功能研究, 将有助于探讨HCV致病机制和免疫逃逸机制, 特别是对HCV特异靶向药物的开发和治疗性疫苗的研究具有重要的意义.

■同行评价
本文对丙型肝炎病毒的结构研究进展进行了系统梳理，引用文献恰当，文笔流畅，对于从事肝病以及病毒学研究的人员无疑起到了很好的参考作用.

表 1 HCV编码蛋白在病毒复制过程中的生物学功能

病毒蛋白	功能	参考文献
Core protein	组成病毒核衣壳; 与病毒RNA结合, 调节HCV RNA转录; 参与病毒颗粒装配; 与LZIP蛋白、hnRNP K蛋白、RNA解旋酶DEAD box DDX3蛋白相互作用 参与病毒颗粒的成熟与分泌.	9–10, 17–19
E1和E2	介导病毒与细胞表面受体结合和HCV入胞.	21–22
P7	参与病毒的组装和释放.	24
ARFP/F蛋白	对HCV复制不是必需的, 但带有保持HCV RNA二级结构完整性的关键核苷酸(SL47和SL87); 与PFD2相互作用, 有利于病毒持续感染状态的建立.	25–26,32
NS2/3	对病毒的复制是否必需存在争议, 可作为一种辅助分子间接参与病毒复制.	35–36
NS3	NS3蛋白水解酶和解旋酶对于HCV病毒复制至关重要, 还参与病毒的早期装配.	42,45
NS4A	为NS3蛋白水解酶的共辅助分子, 将NS3–NS4A复合物锚定于细胞膜内, 便于蛋白的水解和RNA复制; 通过调节NS5A磷酸化状态参与HCV的复制.	46–47
NS4B	诱导形成膜网结构, 为HCV RNA细胞内复制场所; 与Rab5结合, 参与病毒复制.	48–49
NS5A	NS5A磷酸化状态与病毒的复制密切相关; N端结构域I能与RNA结合, 结构域Ⅲ参与病毒的产生和释放; 与hVAP–A, FBL2等结合, 调节病毒的复制.	50–54
NS5B	RNA依赖的RNA聚合酶, 为病毒复制的关键酶. C端跨膜区与细胞膜的相互作用, 对HCV的复制也非常重要, CyPA(Cyclophilin A)与NS5B结合后可以明显抑制HCV RNA的复制.	58–61

表 2 HCV编码蛋白调控宿主细胞信号通路、参与慢性肝细胞损伤

病毒蛋白	功能	参考文献
Core protein	激活NF–κB通路, 增强TGF–α转录活性, 活化MAPK/ERK通路刺激细胞增殖.	12
	和P53、P73、pRb等肿瘤抑制蛋白结合, 调节Cyclin–D依赖激酶(CDK)抑制因子P21/Waf的表达.	13–16
	肝细胞增殖加快, 肝纤维化发生率增加; 与线粒体蛋白伴侣分子Prohibitin结合, 肝细胞的氧化应激反应性明显增强.	11–12,20
E2	激活MAPK通路, 使ERK和P38磷酸化, 细胞增殖活跃.	63
ARFP/F蛋白	降低内源性P21 cdk的表达水平, 通过与MM–1结合阻断MM–1对c–Myc的抑制作用, 增强P53、c–Myc的转录活性, 增加凋亡相关基因LGALS1, PRKCZ以及原癌基因FHL2的表达水平.	27–29
NS2/3	抑制NF–κB、亚铁螯合酶、SV40、CMV、TNF–α等多种报告基因启动子的表达.	38
	抑制凋亡, 细胞增殖率减慢, 细胞周期调节蛋白Cyclin A表达减少.	39–40
	与致炎因子CCL5/RANTZS的产生密切相关.	41
NS3/4A	激活MAPK, TNF–α, EGF等信号通路, 调控细胞增殖与病毒复制.	64–66
NS4B	激活Akt通路, 增加sterol regulatory element–binding proteins(SREBPs)的转录.	67
NS5A	干扰细胞内重要信号通路调节蛋白如Grb2, PI3K, P53或Raf–1的功能, 还可能调控细胞周期调节基因的表达, 进而影响细胞增殖和凋亡.	55–57
NS5B	与蛋白激酶C相关激酶2(PRK2)结合, 调节NS5b的磷酸化.	59

型HCV RNA的复制[51].

此外, NS5A的磷酸化状态可影响其与囊泡转运蛋白hVAP-A相互作用[52], 并最终调节病毒复制复合物的形成. 宿主细胞的一些结合蛋白, 如FBL2(F-box和亮氨酸富集重复蛋白2), hVAP-B, FKBP8(免疫亲和素家族成员)等[53-54]通过与NS5A的结合, 对病毒复制发挥重要作用. NS5A还通过干扰细胞内重要信号通路调节蛋白如Grb2, PI3K, P53或Raf-1的功能, 调控细胞周期调节基因的表达, 进而影响细胞增殖和凋亡[55-57].

1.2.6 NS5B: 为68 kDa的多肽分子, 为RNA依赖的RNA聚合酶(RdRp), 主要生物学功能为合成HCV基因组互补的负链RNA[58]. NS5B晶体结构提示酶活性部位位于手指及拇指结构域, NS5B C端跨膜区与细胞膜相互作用, 对HCV的复制也非常重要.

蛋白激酶C相关激酶2(PRK2)与NS5B手指结构域结合, 调节NS5A的磷酸化状态[59],

表 3 HCV编码蛋白逃逸机体固有免疫机制

病毒蛋白	功能	参考文献
Core protein	上调蛋白磷酸酶2A和STAT1通路抑制分子PIAS1表达.	68
	干扰IFN传递的JAK/STAT信号通路, 活化抑制分子SOCS-3.	69
	与致炎因子IL-1, IL-2, IL-3, IL-6, IL-8的产生和慢性肝损伤相关.	41
E2	与IFN诱导的蛋白激酶PKR结合, 抑制IFN-γ的产生和NK细胞的细胞毒效应.	23
	减少IFNAR1及IFNAR2膜受体数量, 阻断IFN-α的STAT通路.	70
ARFP/F蛋白	诱导IL-6, IL-8和MCP-1和MP-1β的产生, 参与HCV感染肝损伤的发生.	30-31
	与细胞内前折叠素2(prefoldin 2, PFD2)相互作用, 导致微管蛋白细胞骨架的异常装配.	32
NS3/4A	切割IFN活化经典通路的适配分子IPS-1/MAVS/cardif和TRIF, 抑制IFN信号通路.	43
	切割Toll样受体转换因子TRIF, 抑制I型IFN的产生.	44
	直接与TBK1结合, 抑制IRF-3(干扰素调节因子3)的产生.	71
NS4b	与致炎因子IL-1, IL-2, IL-3, IL-6, IL-8的产生和慢性肝损伤相关.	41
NS5a	含有一段40aa片段, 为IFN敏感区(ISDR), 与IFN治疗反应性密切相关.	72
	直接与PKR结合, 抑制PKR, 干扰2'-5' OAS产生.	73-74
	与致炎因子IL-8产生相关.	75
	抑制TGF-β信号通路.	76

hVAP-B、核仁素的甘氨酸/精氨酸富集区也能与NS5B结合[60], 此外CyPA(Cyclophilin A)与NS5B结合后可以明显抑制HCV RNA的复制[61].

HCV编码蛋白参与病毒复制、调控宿主细胞信号通路、参与慢性肝细胞损伤以及逃逸机体固有免疫的分子机制见表1-3.

2 结论

上述HCV编码蛋白的生物学功能, 仅仅是病毒完成复杂生活周期的一小部分. 加强对病毒蛋白的生物学功能研究, 将有助于探讨HCV致病机制和免疫逃逸机制, 特别是对HCV特异靶向药物的开发和治疗性疫苗的研究具有重要的意义. 比如了解NS3通过降解RIG-1经典通路中关键辅助蛋白以及TRIF抑制Ⅰ型IFN的产生, 从而削弱宿主细胞对HCV感染的抗病毒应答, 已经设计和开发了针对NS3蛋白水解酶的抑制剂Telaprevir和boceprevir. 又如CyPA(Cyclophilin A)与NS5b结合后可以明显抑制HCV RNA的复制, 可以采用CyPA类似药物环孢霉素D(cyclosporin D)可以特异抑制病毒的复制. 再如对病毒复制过程关键酶NS5B晶体结构的详细解析, 对开发特异性阻断病毒复制的药物如R1626, VCH916等具有重要的指导意义[62]. 相信对HCV编码蛋白生物学功能的认识将随着生物信息学、结构生物学、分子病毒学等基础学科的不断发展和更新得到丰富和拓展.

3 参考文献

1 Tellinghuisen TL, Evans MJ, von Hahn T, You S, Rice CM. Studying hepatitis C virus: making the best of a bad virus. *J Virol* 2007; 81: 8853-8867

2 Bacon BR, McHutchison JG. Into the light: strategies for battling hepatitis C. *Am J Manag Care* 2007; 13 Suppl 12: S319-S326

3 Chisari FV. Unscrambling hepatitis C virus-host interactions. *Nature* 2005; 436: 930-932

4 Gale M Jr, Foy EM. Evasion of intracellular host defence by hepatitis C virus. *Nature* 2005; 436: 939-945

5 Tan SL, He Y, Huang Y, Gale M Jr. Strategies for hepatitis C therapeutic intervention: now and next. *Curr Opin Pharmacol* 2004; 4: 465-470

6 Moradpour D, Penin F, Rice CM. Replication of hepatitis C virus. *Nat Rev Microbiol* 2007; 5: 453-463

7 Walewski JL, Keller TR, Stump DD, Branch AD. Evidence for a new hepatitis C virus antigen encoded in an overlapping reading frame. *RNA* 2001; 7: 710-721

8 Xu Z, Choi J, Yen TS, Lu W, Strohecker A, Govindarajan S, Chien D, Selby MJ, Ou J. Synthesis of a novel hepatitis C virus protein by ribosomal frameshift. *EMBO J* 2001; 20: 3840-3848

9 McLauchlan J. Properties of the hepatitis C virus core protein: a structural protein that modulates cellular processes. *J Viral Hepat* 2000; 7: 2-14

10 Ray RB, Ray R. Hepatitis C virus core protein: intriguing properties and functional relevance. *FEMS Microbiol Lett* 2001; 202: 149-156

11 Moriya K, Nakagawa K, Santa T, Shintani Y, Fujie H, Miyoshi H, Tsutsumi T, Miyazawa T, Ishibashi K, Horie T, Imai K, Todoroki T, Kimura S, Koike K. Oxidative stress in the absence of inflammation in a mouse model for hepatitis C virus-associated hepatocarcinogenesis. *Cancer Res* 2001; 61: 4365-4370

12 Aravalli RN, Steer CJ, Cressman EN. Molecular mechanisms of hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2008; 48: 2047-2063

13 Levrero M. Viral hepatitis and liver cancer: the case

of hepatitis C. *Oncogene* 2006; 25: 3834-3847
14 Alisi A, Giambartolomei S, Cupelli F, Merlo P, Fontemaggi G, Spaziani A, Balsano C. Physical and functional interaction between HCV core protein and the different p73 isoforms. *Oncogene* 2003; 22: 2573-2580
15 Cho J, Baek W, Yang S, Chang J, Sung YC, Suh M. HCV core protein modulates Rb pathway through pRb down-regulation and E2F-1 up-regulation. *Biochim Biophys Acta* 2001; 1538: 59-66
16 Wang F, Yoshida I, Takamatsu M, Ishido S, Fujita T, Oka K, Hotta H. Complex formation between hepatitis C virus core protein and p21Waf1/Cip1/Sdi1. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 273: 479-484
17 Jin DY, Wang HL, Zhou Y, Chun AC, Kibler KV, Hou YD, Kung H, Jeang KT. Hepatitis C virus core protein-induced loss of LZIP function correlates with cellular transformation. *EMBO J* 2000; 19: 729-740
18 Koike K. Hepatitis C virus contributes to hepatocarcinogenesis by modulating metabolic and intracellular signaling pathways. *J Gastroenterol Hepatol* 2007; 22 Suppl 1: S108-S111
19 Ariumi Y, Kuroki M, Abe K, Dansako H, Ikeda M, Wakita T, Kato N. DDX3 DEAD-box RNA helicase is required for hepatitis C virus RNA replication. *J Virol* 2007; 81: 13922-13926
20 Tsutsumi T, Matsuda M, Aizaki H, Moriya K, Miyoshi H, Fujie H, Shintani Y, Yotsuyanagi H, Miyamura T, Suzuki T, Koike K. Proteomics analysis of mitochondrial proteins reveals overexpression of a mitochondrial protein chaperon, prohibitin, in cells expressing hepatitis C virus core protein. *Hepatology* 2009; 50: 378-386
21 Pileri P, Uematsu Y, Campagnoli S, Galli G, Falugi F, Petracca R, Weiner AJ, Houghton M, Rosa D, Grandi G, Abrignani S. Binding of hepatitis C virus to CD81. *Science* 1998; 282: 938-941
22 Scarselli E, Ansuini H, Cerino R, Roccasecca RM, Acali S, Filocamo G, Traboni C, Nicosia A, Cortese R, Vitelli A. The human scavenger receptor class B type I is a novel candidate receptor for the hepatitis C virus. *EMBO J* 2002; 21: 5017-5025
23 Taylor DR, Shi ST, Romano PR, Barber GN, Lai MM. Inhibition of the interferon-inducible protein kinase PKR by HCV E2 protein. *Science* 1999; 285: 107-110
24 Steinmann E, Penin F, Kallis S, Patel AH, Bartenschlager R, Pietschmann T. Hepatitis C virus p7 protein is crucial for assembly and release of infectious virions. *PLoS Pathog* 2007; 3: e103
25 McMullan LK, Grakoui A, Evans MJ, Mihalik K, Puig M, Branch AD, Feinstone SM, Rice CM. Evidence for a functional RNA element in the hepatitis C virus core gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; 104: 2879-2884
26 Vassilaki N, Friebe P, Meuleman P, Kallis S, Kaul A, Paranhos-Baccalà G, Leroux-Roels G, Mavromara P, Bartenschlager R. Role of the hepatitis C virus core+1 open reading frame and core cis-acting RNA elements in viral RNA translation and replication. *J Virol* 2008; 82: 11503-11515
27 Ma HC, Lin TW, Li H, Iguchi-Ariga SM, Ariga H, Chuang YL, Ou JH, Lo SY. Hepatitis C virus ARFP/F protein interacts with cellular MM-1 protein and enhances the gene trans-activation activity of c-Myc. *J Biomed Sci* 2008; 15: 417-425
28 Wu WB, Shao SW, Zhao LJ, Luan J, Cao J, Gao J, Zhu SY, Qi ZT. Hepatitis C virus F protein up-regulates c-myc and down-regulates p53 in human hepatoma HepG2 cells. *Intervirology* 2007; 50: 341-346
29 Dou J, Liu P, Wang J, Zhang X. Effect of hepatitis C virus core shadow protein expressed in human hepatoma cell line on human gene expression profiles. *J Gastroenterol Hepatol* 2006; 21: 1794-1800
30 Vassilaki N, Mavromara P. The HCV ARFP/F/core+1 protein: production and functional analysis of an unconventional viral product. *IUBMB Life* 2009; 61: 739-752
31 Fiorucci M, Boulant S, Fournillier A, Abraham JD, Lavergne JP, Paranhos-Baccala G, Inchauspé G, Bain C. Expression of the alternative reading frame protein of Hepatitis C virus induces cytokines involved in hepatic injuries. *J Gen Virol* 2007; 88: 1149-1162
32 Tsao ML, Chao CH, Yeh CT. Interaction of hepatitis C virus F protein with prefoldin 2 perturbs tubulin cytoskeleton organization. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 348: 271-277
33 Welbourn S, Pause A. The hepatitis C virus NS2/3 protease. *Curr Issues Mol Biol* 2007; 9: 63-69
34 Schregel V, Jacobi S, Penin F, Tautz N. Hepatitis C virus NS2 is a protease stimulated by cofactor domains in NS3. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009; 106: 5342-5347
35 Ikeda M, Yi M, Li K, Lemon SM. Selectable subgenomic and genome-length dicistronic RNAs derived from an infectious molecular clone of the HCV-N strain of hepatitis C virus replicate efficiently in cultured Huh7 cells. *J Virol* 2002; 76: 2997-3006
36 She Y, Han T, Ye L, Wu Z. Hepatitis C virus NS2/3 protease regulates HCV IRES-dependent translation and NS5B RdRp activity. *Arch Virol* 2009; 154: 1465-1473
37 Liu Q, Bhat RA, Prince AM, Zhang P. The hepatitis C virus NS2 protein generated by NS2-3 autocleavage is required for NS5A phosphorylation. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 254: 572-577
38 Kaukinen P, Sillanpää M, Kotenko S, Lin R, Hiscott J, Melén K, Julkunen I. Hepatitis C virus NS2 and NS3/4A proteins are potent inhibitors of host cell cytokine/chemokine gene expression. *Virol J* 2006; 3: 66
39 Yang XJ, Liu J, Ye L, Liao QJ, Wu JG, Gao JR, She YL, Wu ZH, Ye LB. HCV NS2 protein inhibits cell proliferation and induces cell cycle arrest in the S-phase in mammalian cells through down-regulation of cyclin A expression. *Virus Res* 2006; 121: 134-143
40 Erdtmann L, Franck N, Lerat H, Le Seyec J, Gilot D, Cannie I, Gripon P, Hibner U, Guguen-Guillouzo C. The hepatitis C virus NS2 protein is an inhibitor of CIDE-B-induced apoptosis. *J Biol Chem* 2003; 278: 18256-18264
41 Sillanpää M, Kaukinen P, Melén K, Julkunen I. Hepatitis C virus proteins interfere with the activation of chemokine gene promoters and downregulate chemokine gene expression. *J Gen Virol* 2008; 89: 432-443
42 Johnson CL, Owen DM, Gale M Jr. Functional and therapeutic analysis of hepatitis C virus NS3.4A protease control of antiviral immune defense. *J Biol*

Chem 2007; 282: 10792-10803
43 Foy E, Li K, Sumpter R Jr, Loo YM, Johnson CL, Wang C, Fish PM, Yoneyama M, Fujita T, Lemon SM, Gale M Jr. Control of antiviral defenses through hepatitis C virus disruption of retinoic acid-inducible gene-I signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102: 2986-2991
44 Li K, Foy E, Ferreon JC, Nakamura M, Ferreon AC, Ikeda M, Ray SC, Gale M Jr, Lemon SM. Immune evasion by hepatitis C virus NS3/4A protease-mediated cleavage of the Toll-like receptor 3 adaptor protein TRIF. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102: 2992-2997
45 Beran RK, Pyle AM. Hepatitis C viral NS3-4A protease activity is enhanced by the NS3 helicase. *J Biol Chem* 2008; 283: 29929-29937
46 Wölk B, Sansonno D, Kräusslich HG, Dammacco F, Rice CM, Blum HE, Moradpour D. Subcellular localization, stability, and trans-cleavage competence of the hepatitis C virus NS3-NS4A complex expressed in tetracycline-regulated cell lines. *J Virol* 2000; 74: 2293-2304
47 Lindenbach BD, Prágai BM, Montserret R, Beran RK, Pyle AM, Penin F, Rice CM. The C terminus of hepatitis C virus NS4A encodes an electrostatic switch that regulates NS5A hyperphosphorylation and viral replication. *J Virol* 2007; 81: 8905-8918
48 Egger D, Wölk B, Gosert R, Bianchi L, Blum HE, Moradpour D, Bienz K. Expression of hepatitis C virus proteins induces distinct membrane alterations including a candidate viral replication complex. *J Virol* 2002; 76: 5974-5984
49 Stone M, Jia S, Heo WD, Meyer T, Konan KV. Participation of rab5, an early endosome protein, in hepatitis C virus RNA replication machinery. *J Virol* 2007; 81: 4551-4563
50 Tellinghuisen TL, Marcotrigiano J, Gorbalenya AE, Rice CM. The NS5A protein of hepatitis C virus is a zinc metalloprotein. *J Biol Chem* 2004; 279: 48576-48587
51 Evans MJ, Rice CM, Goff SP. Phosphorylation of hepatitis C virus nonstructural protein 5A modulates its protein interactions and viral RNA replication. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101: 13038-13043
52 Hamamoto I, Nishimura Y, Okamoto T, Aizaki H, Liu M, Mori Y, Abe T, Suzuki T, Lai MM, Miyamura T, Moriishi K, Matsuura Y. Human VAP-B is involved in hepatitis C virus replication through interaction with NS5A and NS5B. *J Virol* 2005; 79: 13473-13482
53 Wang C, Gale M Jr, Keller BC, Huang H, Brown MS, Goldstein JL, Ye J. Identification of FBL2 as a geranylgeranylated cellular protein required for hepatitis C virus RNA replication. *Mol Cell* 2005; 18: 425-434
54 Zhang Z, Harris D, Pandey VN. The FUSE binding protein is a cellular factor required for efficient replication of hepatitis C virus. *J Virol* 2008; 82: 5761-5773
55 Tan SL, Nakao H, He Y, Vijaysri S, Neddermann P, Jacobs BL, Mayer BJ, Katze MG. NS5A, a nonstructural protein of hepatitis C virus, binds growth factor receptor-bound protein 2 adaptor protein in a Src homology 3 domain/ligand-dependent manner and perturbs mitogenic signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96: 5533-5538
56 Bürckstümmer T, Kriegs M, Lupberger J, Pauli EK, Schmittel S, Hildt E. Raf-1 kinase associates with Hepatitis C virus NS5A and regulates viral replication. *FEBS Lett* 2006; 580: 575-580
57 Street A, Macdonald A, Crowder K, Harris M. The Hepatitis C virus NS5A protein activates a phosphoinositide 3-kinase-dependent survival signaling cascade. *J Biol Chem* 2004; 279: 12232-12241
58 Burton JR Jr, Everson GT. HCV NS5B polymerase inhibitors. *Clin Liver Dis* 2009; 13: 453-465
59 Kim SJ, Kim JH, Kim YG, Lim HS, Oh JW. Protein kinase C-related kinase 2 regulates hepatitis C virus RNA polymerase function by phosphorylation. *J Biol Chem* 2004; 279: 50031-50041
60 Shimakami T, Honda M, Kusakawa T, Murata T, Shimotohno K, Kaneko S, Murakami S. Effect of hepatitis C virus (HCV) NS5B-nucleolin interaction on HCV replication with HCV subgenomic replicon. *J Virol* 2006; 80: 3332-3340
61 Yang F, Robotham JM, Nelson HB, Irsigler A, Kenworthy R, Tang H. Cyclophilin A is an essential cofactor for hepatitis C virus infection and the principal mediator of cyclosporine resistance in vitro. *J Virol* 2008; 82: 5269-5278
62 Sakamoto N, Watanabe M. New therapeutic approaches to hepatitis C virus. *J Gastroenterol* 2009; 44: 643-649
63 Zhao LJ, Zhao P, Chen QL, Ren H, Pan W, Qi ZT. Mitogen-activated protein kinase signalling pathways triggered by the hepatitis C virus envelope protein E2: implications for the prevention of infection. *Cell Prolif* 2007; 40: 508-521
64 Hassan M, Ghozlan H, Abdel-Kader O. Activation of c-Jun NH2-terminal kinase (JNK) signaling pathway is essential for the stimulation of hepatitis C virus (HCV) non-structural protein 3 (NS3)-mediated cell growth. *Virology* 2005; 333: 324-336
65 Brenndörfer ED, Karthe J, Frelin L, Cebula P, Erhardt A, Schulte am Esch J, Hengel H, Bartenschlager R, Sällberg M, Häussinger D, Bode JG. Nonstructural 3/4A protease of hepatitis C virus activates epithelial growth factor-induced signal transduction by cleavage of the T-cell protein tyrosine phosphatase. *Hepatology* 2009; 49: 1810-1820
66 Hassan M, Selimovic D, Ghozlan H, Abdel-Kader O. Induction of high-molecular-weight (HMW) tumor necrosis factor(TNF) alpha by hepatitis C virus (HCV) non-structural protein 3 (NS3) in liver cells is AP-1 and NF-kappaB-dependent activation. *Cell Signal* 2007; 19: 301-311
67 Li S, Ye L, Yu X, Xu B, Li K, Zhu X, Liu H, Wu X, Kong L. Hepatitis C virus NS4B induces unfolded protein response and endoplasmic reticulum overload response-dependent NF-kappaB activation. *Virology* 2009; 391: 257-264
68 Duong FH, Filipowicz M, Tripodi M, La Monica N, Heim MH. Hepatitis C virus inhibits interferon signaling through up-regulation of protein phosphatase 2A. *Gastroenterology* 2004; 126: 263-277
69 Bode JG, Ludwig S, Ehrhardt C, Albrecht U, Erhardt A, Schaper F, Heinrich PC, Häussinger D. IFN-alpha antagonistic activity of HCV core protein involves induction of suppressor of cytokine signaling-3. *FASEB J* 2003; 17: 488-490
70 Lin W, Choe WH, Hiasa Y, Kamegaya Y, Blackard JT, Schmidt EV, Chung RT. Hepatitis C virus expression suppresses interferon signaling by

degrading STAT1. *Gastroenterology* 2005; 128: 1034-1041
71 Sklan EH, Charuworn P, Pang PS, Glenn JS. Mechanisms of HCV survival in the host. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2009; 6: 217-227
72 Hayashi K, Katano Y, Honda T, Ishigami M, Itoh A, Hirooka Y, Nakano I, Urano F, Yoshioka K, Toyoda H, Kumada T, Goto H. Mutations in the interferon sensitivity-determining region of hepatitis C virus genotype 2a correlate with response to pegylated-interferon-alpha 2a monotherapy. *J Med Virol* 2009; 81: 459-466
73 Giménez-Barcons M, Wang C, Chen M, Sánchez-Tapias JM, Sáiz JC, Gale M Jr. The oncogenic potential of hepatitis C virus NS5A sequence variants is associated with PKR regulation. *J Interferon Cytokine Res* 2005; 25: 152-164
74 Kriegs M, Bürckstümmer T, Himmelsbach K, Bruns M, Frelin L, Ahlén G, Sällberg M, Hildt E. The hepatitis C virus non-structural NS5A protein impairs both the innate and adaptive hepatic immune response in vivo. *J Biol Chem* 2009; 284: 28343-28351
75 Polyak SJ, Khabar KS, Paschal DM, Ezelle HJ, Duverlie G, Barber GN, Levy DE, Mukaida N, Gretch DR. Hepatitis C virus nonstructural 5A protein induces interleukin-8, leading to partial inhibition of the interferon-induced antiviral response. *J Virol* 2001; 75: 6095-6106
76 Choi SH, Hwang SB. Modulation of the transforming growth factor-beta signal transduction pathway by hepatitis C virus nonstructural 5A protein. *J Biol Chem* 2006; 281: 7468-7478

编辑 李军亮 电编 何基才

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2009年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

《世界华人消化杂志》正文要求

本刊讯 本刊正文标题层次为 0引言; 1 材料和方法, 1.1 材料, 1.2 方法; 2 结果; 3 讨论; 4 参考文献. 序号一律左顶格写, 后空1格写标题; 2级标题后空1格接正文. 以下逐条陈述: (1)引言 应包括该研究的目的和该研究与其他相关研究的关系. (2)材料和方法 应尽量简短, 但应让其他有经验的研究者能够重复该实验. 对新的方法应该详细描述, 以前发表过的方法引用参考文献即可, 有关文献中或试剂手册中的方法的改进仅描述改进之处即可. (3)结果 实验结果应合理采用图表和文字表示, 在结果中应避免讨论. (4)讨论 要简明, 应集中对所得的结果做出解释而不是重复叙述, 也不应是大量文献的回顾. 图表的数量要精选. 表应有表序和表题, 并有足够具有自明性的信息, 使读者不查阅正文即可理解该表的内容. 表内每一栏均应有表头, 表内非公知通用缩写应在表注中说明, 表格一律使用三线表(不用竖线), 在正文中该出现的地方应注出. 图应有图序、图题和图注, 以使其容易被读者理解, 所有的图应在正文中该出现的地方注出. 同一个主题内容的彩色图、黑白图、线条图, 统一用一个注解分别叙述. 如: 图1 萎缩性胃炎治疗前后病理变化．A: …; B: …; C: …; D: …; E: …; F: …; G: …. 曲线图可按●、○、■、□、▲、△顺序使用标准的符号. 统计学显著性用: $^{a}P<0.05$, $^{b}P<0.01$($P>0.05$不注). 如同一表中另有一套P值, 则$^{c}P<0.05$, $^{d}P<0.01$; 第3套为$^{e}P<0.05$, $^{f}P<0.01$. P值后注明何种检验及其具体数字, 如$P<0.01$, t = 4.56 *vs* 对照组等, 注在表的左下方. 表内采用阿拉伯数字, 共同的计量单位符号应注在表的右上方, 表内个位数、小数点、±、-应上下对齐.“空白”表示无此项或未测, “-”代表阴性未发现, 不能用同左、同上等. 表图勿与正文内容重复. 表图的标目尽量用t/min, c/(mol/L), p/kPa, V/mL, t/℃表达. 黑白图请附黑白照片, 并拷入光盘内; 彩色图请提供冲洗的彩色照片, 请不要提供计算机打印的照片. 彩色图片大小7.5 cm×4.5 cm, 必须使用双面胶条黏 贴在正文内, 不能使用浆糊黏贴. (5)致谢 后加冒号, 排在讨论后及参考文献前, 左齐. (科学编辑: 李军亮 2009-10-08)

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2009年10月8日; 17(28): 2871-2876
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

基础研究 BASIC RESEARCH

SN-38载药纳米微球对人胃癌细胞BGC-823的抑制作用

孙国庆, 胡 勇, 李晓林, 孙 昊

孙国庆, 江苏职工医科大学医学护理系 江苏省南京市 210005
胡勇, 南京大学材料科学与工程系 江苏省南京市 210093
李晓林, 南京大学医学院附属鼓楼医院肿瘤科 江苏省南京市 210008
孙昊, 南京医科大学第一附属医院急诊医学中心 江苏省南京市 210000
孙国庆, 副教授, 主要从事消化系统肿瘤药物治疗及作用机制的研究.
作者贡献分布: 此课题由孙国庆、胡勇及李晓林设计; 研究过程由孙国庆、胡勇及李晓林操作完成; 研究所用新试剂由胡勇与李晓林提供; 数据分析由孙昊完成; 本论文写作由孙国庆、胡勇、李晓林及孙昊完成.
通讯作者: 孙国庆, 副教授, 210005, 江苏省南京市, 江苏职工医科大学医学护理系. sgq-929@163.com
电话: 025-86663557 传真: 025-86510950
收稿日期: 2009-07-30 修回日期: 2009-09-25
接受日期: 2009-09-28 在线出版日期: 2009-10-08

SN-38-loaded polymeric micelles can inhibit the growth of human gastric adenocarcinoma BGC-823 cells

Guo-Qing Sun, Yong Hu, Xiao-Lin Li, Hao Sun

Guo-Qing Sun, Department of Nursing Science, Jiangsu Staff Medical University, Nanjing 210005, Jiangsu Province, China
Yong Hu, National Laboratory of Solid State Microstructure, Department of Material Science and Engineering, Nanjing University, Nanjing 210093, Jiangsu Province, China
Xiao-Lin Li, Department of Oncology, Nanjing Drum Tower Hospital, Nanjing Medical University, Nanjing 210008, Jiangsu Province, China
Hao Sun, Department of Emergency Medicine, the First Affiliated Hospital with Nanjing Medical University, Nanjing 210000, Jiangsu Province, China
Correspondence to: Professor Guo-Qing Sun, Department of Nursing Science, Jiangsu Staff Medical University, Nanjing 210005, Jiangsu Province, China. sgq-929@163.com
Received: 2009-07-30 Revised: 2009-09-25
Accepted: 2009-09-28 Published online: 2009-10-08

Abstract

AIM: To investigate the characteristics of SN-38-loaded polymeric micelles and compare their inhibitory effect on human gastric adenocarcinoma BGC-823 cells with that of free SN-38.

METHODS: SN-38/PCL-PEG nanoparticles (SN-38-NP) were synthesized by solvent diffusion method. The morphology of nanoparticles were detected by atomic force microscopy and transmission electron microscopy. The drug loading content, encapsulation efficiency, and *in vitro* release of SN-38-NP were evaluated by ultraviolet spectrophotometry and high-performance liquid chromatography (HPLC). The effects of SN-38-NP on the proliferation of BGC-823 cells were examined by methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) assay. The level of reactive oxygen species (ROS) was detected by dichlorofluorescein (DCF) assay.

RESULTS: The average diameter of drug-loaded nanoparticles was less than 100 nm. The drug-loaded nanoparticles had higher drug loading content (about 11%) and encapsulation efficiency (about 80%) than free SN-38. SN-38 could be effectively incorporated into nanoparticles with core-shell structure to act as a water-soluble controlled release drug delivery system. The results of MTT assay showed that the half maximal inhibitory concentration (IC_{50}) of SN-38-NP was obviously lower than that of free SN-38 at 24 and 72 h after treatment ($P < 0.05$) though there was no significant difference at 48 h. Although both free SN-38 and SN-38 nanoparticles could increase ROS production, the SN-38-NP induced more ROS at low concentrations ($P < 0.05$).

CONCLUSION: SN-38-NP could be effectively incorporated into core-shell nanoparticles to act as a water-soluble controlled release drug delivery system. SN-38-NP is superior to free SN-38 in restraining the growth of tumor cells even at low concentrations.

Key Words: SN-38; Nanoparticle; Gastric cancer; BGC-823; Oxidative stress

Sun GQ, Hu Y, Li XL, Sun H. SN-38-loaded polymeric micelles can inhibit the growth of human gastric adenocarcinoma BGC-823 cells. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2009; 17(28): 2871-2876

摘要

目的: 检测喜树碱活性代谢产物SN-38载药纳米微球(SN-38-np)的各项特征, 比较该载药纳

■背景资料
羟基喜树碱活性代谢产物SN-38, 是喜树碱经化学结构改进而制得的衍生物, 具有抗癌作用强、活性高等特点. 为了提高SN-38及其他喜树碱衍生物的水溶性并延长其体内半衰期, 学者已开始对其剂型进行改造.

■同行评议者
李军祥, 教授, 北京中医药大学附属东方医院消化内科

■研发前沿
近年来, 两亲嵌段共聚物微球逐渐成为生物医学工程以及药物、基因等领域研究较多的材料之一, 聚己内酯-聚乙二醇(PCL-PEG)作为载体高分子材料制备SN-38纳米微球, 具有良好的水溶性和缓释作用, 并且可以使药物的使用浓度降低.

米微球与裸药抗人胃癌肿瘤细胞BGC-823的效果.

方法: 用溶剂分散法制备SN-38/PCL-PEG纳米微球. 原子力显微镜和透射电子显微镜观察纳米微球形态, 采用高效液相色谱法(HPLC)测定SN-38浓度并计算该载药微球载药量、包封率及描绘其体外释放曲线. 采用MTT法观察该微球对人胃癌细胞株BGC-823的生长抑制效果, 荧光显微镜检测细胞内活性氧(ROS)水平.

结果: 微球为不规则的圆形, 平均粒径小于100 nm. 载药量11%左右, 包封率80%左右; SN-38纳米微球可稳定溶解于水中且具有良好的缓释特性; MTT结果显示, 较低浓度的SN-38载药纳米微球在72 h抑制肿瘤效果明显优于SN-38裸药, 同时计算IC_{50}发现SN-38载药纳米微球在24 h和72 h的IC_{50}明显低于SN-38裸药($P<0.05$), 两者48 h时间点的IC_{50}相当; 细胞内活性氧(ROS)检测结果显示: 裸药和载药微球均可明显诱导ROS产生, 在较低作用浓度时, SN-38载药纳米微球可比裸药诱导产生更多的细胞内ROS产物.

结论: SN-38载药纳米微球可使细胞内达到并维持有效药物浓度, 即使在较低作用浓度下亦可持续有效的抑制肿瘤细胞生长, 效果明显优于相同浓度下SN-38裸药.

关键词: SN-38; 纳米; 胃癌; BGC-823; 氧化应激

孙国庆, 胡勇, 李晓林, 孙昊. SN-38载药纳米微球对人胃癌细胞BGC-823的抑制作用. 世界华人消化杂志 2009; 17(28): 2871-2876
http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/2871.asp

0 引言

喜树碱(camptothecin, CPT)是一种从珙桐科植物喜树中分离得到的细胞毒性生物碱, 因其对哺乳细胞中DNA和RNA的合成有明显的抑制作用而获得临床的广泛重视[1]. 大规模临床试验均证实了其对消化系恶性肿瘤, 如胃癌, 肠癌等以及急慢性粒细胞白血病、膀胱癌等有较好的疗效[2-3]. 但由于他能引起骨髓抑制、呕吐、腹泻和严重出血等不良反应限制其在临床的进一步应用[4]. 羟基喜树碱(7-乙基, 10-羟基喜树碱, hydroxycamptothecin, HCPT)的活性代谢产物SN-38, 是喜树碱经化学结构改进而制得的衍生物, 具有抗癌作用强、抗癌活性高, 在多种人肿瘤移植细胞中显示出潜在的活性, 可与多种抗肿瘤药物配伍产生协同作用且无交叉耐药等特点[5], 其作用机制主要是通过抑制DNA拓扑异构酶Ⅰ(TopoⅠ)抑制细胞分裂, 同时诱导细胞内活性氧产物增多诱导多个凋亡相关途径[6]. 由于SN-38存在E-内酯环闭环结构而极难溶于水, 目前临床使用的SN-38是经过碱化开环后溶于水的羧酸盐注射液, 但是其质量不稳定、开环后活性降低、体内半衰期短、代谢较快等缺陷严重影响疗效. 为了提高SN-38及其他喜树碱衍生物的水溶性并延长其体内半衰期, 学者已开始对其剂型进行改造[7]. 近年来, 两亲嵌段共聚物(amphiphilic block polymer)微球药物剂型逐渐成为生物医学工程以及药物、基因[8]等领域研究较多的材料之一, 尤其是在药物的控释、缓释、靶向以及智能药物缓释系统中的应用受到了广泛的关注[9]. 他由亲水和疏水链节组成球形芯-壳微球结构. 疏水嵌段组成的微球的芯可以用为微药库, 而围绕芯核的亲水嵌段构成水合性外壳可保护内核逃避肝脏吞噬细胞的吞噬, 其粒径小, 可在体内缓释, 延长药物的体内半衰期并产生独特分布[10-11]. 因此, 本实验选用美国FDA批准可用于人体的聚己内酯-聚乙二醇(PCL-PEG)作为载体高分子材料制备SN-38纳米微球, 并对其性能, 表征以及体外抑瘤效果等进行了考察.

1 材料和方法

1.1 材料 SN-38, 聚己内酯(使用前用CaH_2干燥后减压蒸馏), 单甲氧基聚乙二醇(mPEG, 相对分子质量为4000 Da), MTT试剂, 2, 7二氯二氢荧光素乙酰乙酸(DCFDA)均购自美国Sigma公司; 人胃癌BGC-823细胞株购自中国科学院上海细胞生物所; RPMI 1640培养基、胎牛血清(FBS)购自美国Invitrogen公司; 其他试剂为进口或国产分析纯. 激光粒径测定仪(美国Brookheaven公司), 红外测定仪(美国Brookheaven公司), 原子力显微镜(日本Seiko公司), 透射电子显微镜(美国Brookheaven公司), 荧光显微镜(日本Nikon公司).

1.2 方法

1.2.1 载体材料的合成以及SN-38纳米微球的制备: 用开环聚合法制备PCL-PEG二嵌段共聚物[12], 其中PCL为相对分子质量20000 Da, PEG为相对分子质量4000 Da. 采用溶剂分散法制备SN-38微球: 将一定量的SN-38与PCL-PEG溶于丙酮, 将得到的溶液滴入正在搅拌的水中, 透析除去其中所含的丙酮即得到SN-38纳米微球. 空白纳

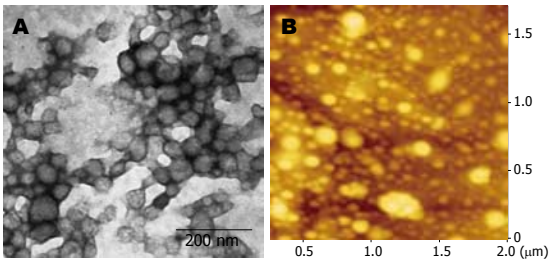


图 1 所制备的微球形态. A: 电镜; B: 原子力显微镜.

表 1 SN-38纳米微球的主要性质 (mean ± SD)

微球	粒径(nm)	多分散性	载药量(%)	包封率(%)
空白微球	78.3 ± 0.9	0.14 ± 0.04	NA	NA
SN-38微球	90.1 ± 2.5	0.15 ± 0.06	11.5 ± 2.2	80 ± 6.5

米微球的制备采用相同的方法但只不加SN-38.

1.2.2 SN-38纳米微球的形态观察以及粒径分布: 用原子力显微镜和透射电子显微镜观察SN-38纳米微球的形态, 并用动态光散射仪测定纳米微球的粒径.

1.2.3 SN-38纳米微球的载药量以及包封率的测定: 取出一定量的载药微球的分散液在40℃下真空干燥, 残留物经准确称质量后溶解于一定量的流动相, 高效液相色谱(HPLC)测定微球中SN-38的含量[13]. SN-38流动相为磷酸二氢钠(pH3.1, 25 mmol/L)和乙腈胺50∶50体积比配制. 在紫外波长微265 nm处测定吸光度, 根据标准曲线求出溶液中的SN-38含量, 进而根据以下公式得出载药量(loading capacity)和包封率(encapsulation efficiency): 载药量 = 载药纳米微球中所含的药物量(MSN-38)/微球的总质量(MSN-38+MPEG-PBLG)×100%; 包封率 = 载药纳米微球中所含的药物量(MSN-38)/投入的总药量(MSN-38投药量)×100%.

1.2.4 SN-38纳米微球的体外释放实验: 将一定量的SN-38微球溶液放入透析袋中(Cut-off相对分子质量为12000 Da), 然后将透析袋完全浸入0.01 mol/L PBS, pH7.4, 整个释放实验于37℃下进行. 分别于1、2、5、9、24、36、48、75、90、100 h时间点取出外液, 并加入新的等量PBS. 所得到的不同时间点的外液用HPLC法测定SN-38浓度, 并描绘体外累积释放特征. 色谱测定方法同上.

1.2.5 SN-38纳米微球作用的细胞增殖实验: 细胞在含100 mL/L胎牛血清的RPMI 1640培养液中培养. 在96孔板中每孔接种细胞10^3/100 μL, 37℃, 50 mL/L CO_2, 连续培养24 h后吸弃上清液, 加入含不同浓度SN-38的培养基每孔100 μL, 继续培养至不同时间点, 逐孔中加入MTT溶液(5 g/L)20 μL, 4 h后去上清, 加入150 μL DMSO振荡10 min后比色, 选择 490 nm波长处测定吸光值(酶标仪, Bio-Rad680, 美国). 计算SN-38的半数抑制浓度IC_{50}值.

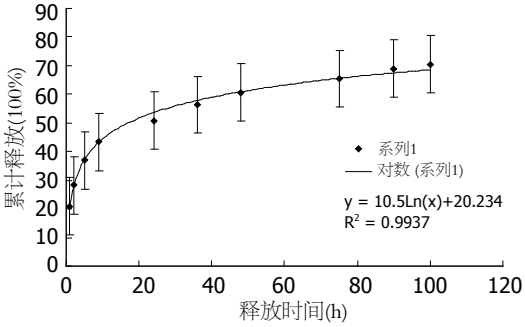


图 2 载药纳米微球的体外释放曲线.

1.2.6 SN-38纳米微球对细胞内活性氧(ROS)水平的影响: 采用荧光探针2, 7-二氯二氢荧光素乙酰乙酸(DCFDA)检测细胞内活性氧的含量. 设置SN-38裸药组, SN-38微球组及相应的对照组. 转种人胃癌细胞株BGC-823细胞于6孔培养板中, 待细胞生长至70%汇合时更换培养液, 加入SN-38裸药与SN-38纳米微球(剂量均对应于SN-38裸药, 15 μg/L)干预相应时间, 于实验结束前30 min加入4 μmol/L DCFDA, 继续37℃孵育30 min, PBS洗2次, 应用荧光显微镜检测荧光(激发光492 nm, 发射光530 nm), 于培养板不同位置随机选择6处成像, 荧光图片通过Image-Pro Plus version 6.0软件分析细胞内荧光强度, 荧光强度与ROS产物水平成正相关.

统计学处理 所有统计分析均通过SPSS11.5统计软件完成. 正态分布的资料应用*t*检验和方差分析比较差异. 数据均用mean±SD表示. $P<0.05$为有统计学意义.

2 结果

2.1 SN-38纳米微球的表征及载药量, 包封率的测定 可见所得到的微球为不规则的圆形, 表面光滑, 其平均粒径小于100 nm. 通过调整投料比, 从初始投药比5∶1, 提高到10∶4, 所测的载药量在11%左右, 包封率则在80%左右(图1, 表1).

2.2 SN-38纳米微球的体外释放实验 SN-38纳米微球具有良好的体外突释-缓释特性, 在最初的6 h内, 大约有35%的SN-38释放, 而在随后的3 d内, 总共释放出了62%左右的SN-38(图2). 由此可以

■相关报道

有研究表明, 聚乙二醇修饰的微球能够减少网状内皮系统(RES)对于微球的摄取从而使微球在体内能存留更长的时间, 避免其在血清中迅速代谢, 更容易达到肿瘤组织发挥药效; 同时药物被高分子材料负载成为载药纳米粒子具有裸药所不能比拟的低毒性.

■应用要点
通过剂型改造，SN-38纳米微球药物性质更稳定，杀伤肿瘤细胞的效果更佳. 这些优势为SN-38载药纳米微球未来临床应用提供了支持，同时特异性肿瘤靶向的纳米载体将是我们今后努力的方向.

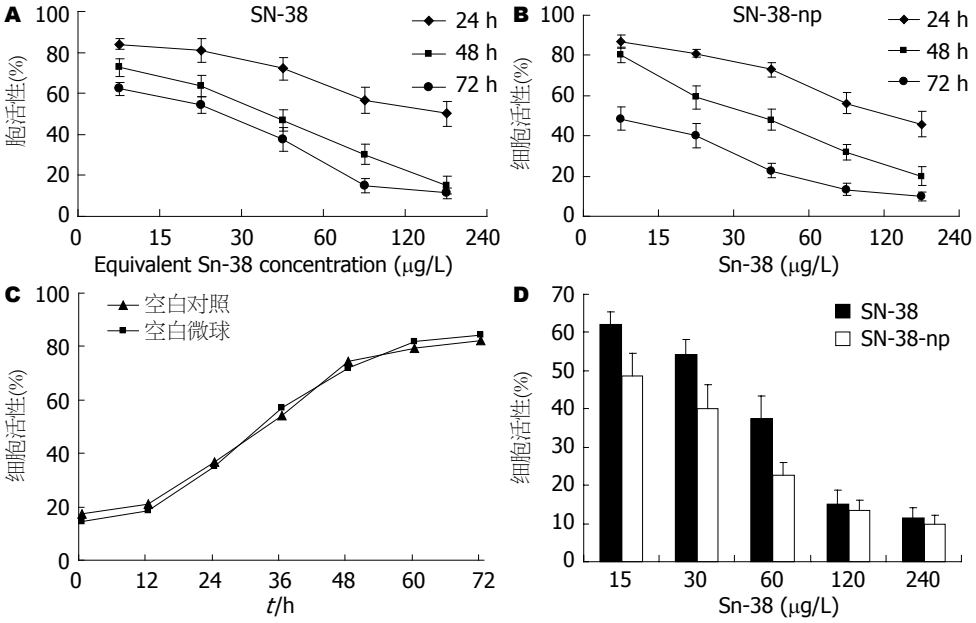


图 3 SN-38载药纳米微球对人胃癌细胞BGC-823抗肿瘤作用. A: SN-38裸药; B: SN-38纳米微球; C: 空白纳米微球; D: SN-38裸药及SN-38纳米微球对BGC-823细胞不同浓度下作用72 h($^aP<0.05$ *vs* SN-38-np, $n = 3$).

表 2 两组在不同时间的IC_{50}值比较

IC_{50}(μg/L)	24 h	48 h	72 h
SN-38裸药	245.08 ± 11.34	49.09 ± 7.62	30.27 ± 4.41
SN-38微球	198.83 ± 6.88	54.07 ± 10.04	12.88 ± 4.57

发现SN-38被载入纳米微球后，可以达到一个长时释放的效果，同时由于两亲嵌段高分子共聚物的特性，即一端疏水，一端亲水，使得SN-38在开始的几小时内有一个突释效应，随后则表现为缓释的特点. 这样使得该微球在体内发挥疗效时可以通过最初的突释来达到一个较高的血药浓度，而随后的长时释放则为保持一定的有效浓度提供了保证，从而达到了长效缓释的抗肿瘤效果.

2.3 SN-38纳米微球对细胞增殖活性的影响 对于人胃癌细胞株BGC-823细胞，SN-38纳米微球与SN-38裸药都具有明显的杀伤作用，且都具有浓度以及时间依赖性(图3A-B)；空白载药微球则对细胞生长基本无毒性(图3C)；较低浓度的SN-38载药纳米微球在72 h抑制肿瘤效果明显优于SN-38裸药(图3D)；同时计算IC_{50}发现SN-38载药纳米微球在24 h和72 h的IC_{50}明显低于SN-38裸药，两者48 h的IC_{50}相当(表2).

2.4 SN-38纳米微球对细胞内ROS水平的影响 SN-38引起ROS增多是SN-38作用下的早期变化之一，而细胞内ROS的增多则提示细胞凋亡的发生. 由于SN-38可以显著诱导产生大量ROS，在高浓度药物干预下可能会湮没差异，因此我们通过文献[6]及预实验结果，选择15 μg/L这个轻微抑制肿瘤生长的浓度作为ROS检测的干预浓度. 结果显示：载药微球组和裸药组细胞内ROS水平均明显升高(与对照组比较，$P<0.05$)并呈现时间依赖性特征(图4A-B)；而纳米材料对细胞内ROS水平并没有影响(图4C)；24 h时，载药微球组细胞内ROS水平与裸药组无明显差异，但随着时间的进行，我们发现载药微球于48、72 h诱导产生的ROS产物显著高于裸药($P<0.05$，图4D)，进一步说明SN-38载药纳米微球良好的缓释特性.

3 讨论

本研究选用聚己内酯与聚乙二醇合成的二嵌段共聚物(PCL-PEG)作为药物载体制备纳米级的SN-38载药微球，聚己内酯与聚乙二醇均为美国FDA批准医用的材料，具有可生物降解性的特点. 载药两亲嵌段共聚物纳米微球是一种新型的药物缓释系统，聚己内酯作为疏水端，可以使脂溶性的药物更容易被载入微球；聚乙二醇作为亲水端在水中自组装成较小粒径的纳米粒子，有研究表明聚乙二醇修饰的微球能够减少网状内皮系统(RES)对于微球的摄取从而使微球在体内能存留更长的时间，避免其在血清中迅速代谢，更容易达到肿瘤组织发挥药效[14]；同时药物被高分子材料负载成为载药纳米粒子具有裸

■同行评价
本研究设计合理, 方法先进, 具有较好的实用性.

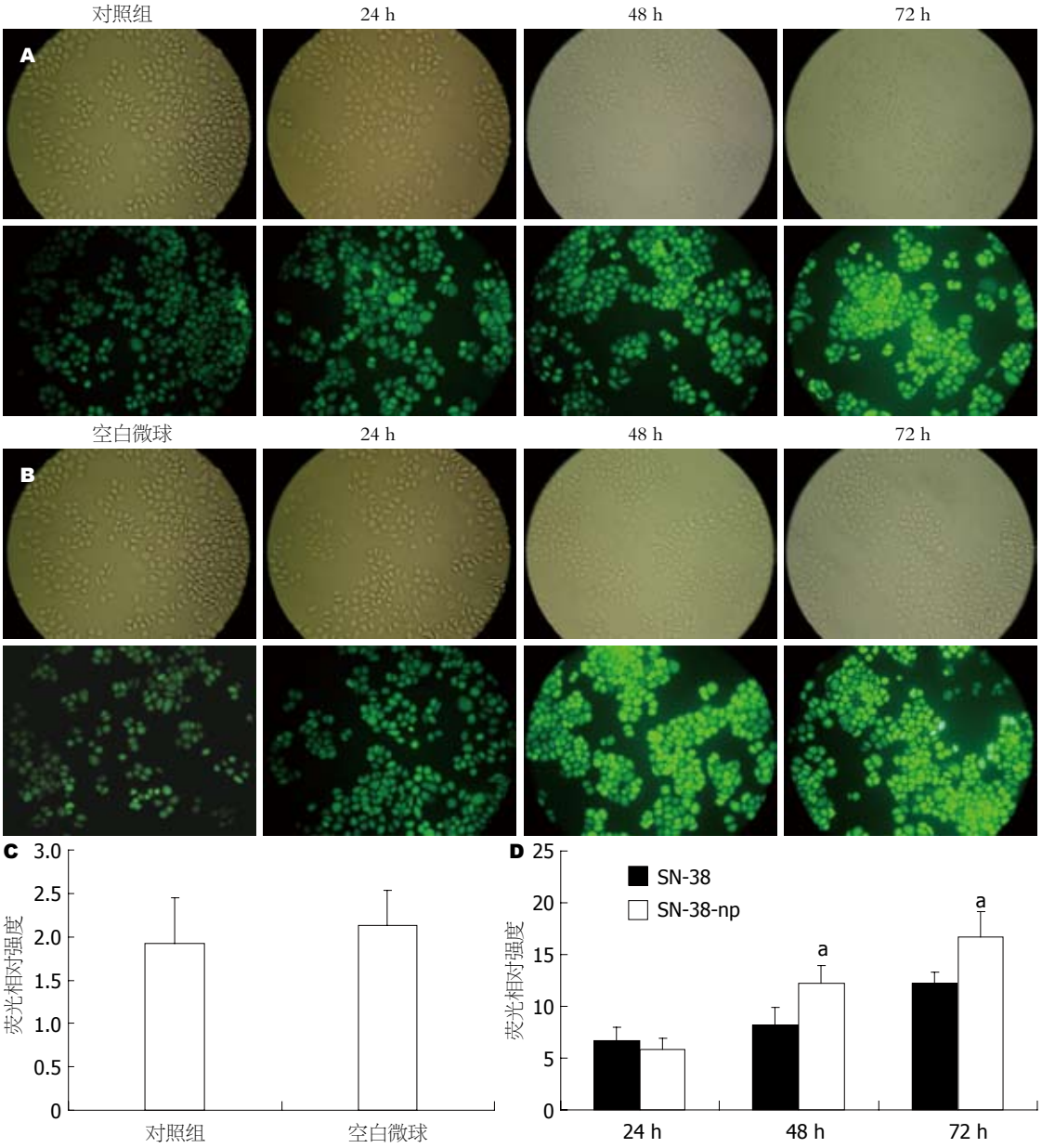


图 4 SN-38纳米微球对细胞内ROS水平的影响. A: SN-38裸药(15 μg/L, DCF染色); B: SN-38纳米微球(15 μg/L, DCF染色); C: 纳米微球对细胞ROS水平的影响(n = 6); D: ROS水平统计结果, 以相应对照的荧光值为参照, 结果以和参照的比值表示. (^aP<0.05 *vs* SN-38-np, n = 3).

药所不能比拟的低毒性, 这为在以后的使用中增加药物的使用剂量而不引起毒性反应提供了依据[15-16]. 为临床提供高效低毒的抗肿瘤药物新载体奠定了基础.

本实验中二嵌段共聚物(PCL-PEG)作为载体进行物理包埋获得了不错的载药效率, 所制备的SN-38纳米微球的载药量达到了11%左右, 包封率达到80%左右.

细胞活力实验和ROS水平检测结果证实通过载药纳米微球的改造, 使得SN-38具有良好的水溶性和缓释作用, 并且可以使药物的使用浓度降低, 同时能够较长时间保持在有效杀伤肿瘤细胞的水平, 继而达到了优于裸药的效果. 纳米改造后的SN-38在较低的药物浓度下即可诱导产生大量的细胞内ROS产物, 一方面与纳米微球的缓释特性有关, 另一方面与纳米微球进入细胞方式有关: 细胞通过高效的胞吞作用摄取纳米微球药物[17], 从而在低浓度作用时也能达到比较高的胞内药物浓度, 从而高效持续的诱导细胞内活性氧产生参与细胞的凋亡或死亡.

比较SN-38纳米改造前后, SN-38纳米微球药物性质更稳定, 杀伤肿瘤细胞的效果更佳. 这些优势为SN-38载药纳米微球未来临床应用提供了支持, 同时特异性肿瘤靶向的纳米载体将

是我们今后努力的方向.

4 参考文献

1 Cook CE, Whichard LP, Turner B, Wall ME, Egley GH. Germination of Witchweed (Striga lutea Lour.): Isolation and Properties of a Potent Stimulant. *Science* 1966; 154: 1189-1190

2 Kaneda N, Hosokawa Y, Yokokura T, Awazu S. Plasma pharmacokinetics of 7-ethyl-10-hydroxycamptothecin (SN-38) after intravenous administration of SN-38 and irinotecan (CPT-11) to rats. *Biol Pharm Bull* 1997; 20: 992-996

3 孙元珏, 赵晖, 郭跃武, 林峰, 蔡讯, 唐晓春, 汤丽娜, 姚阳. 草酸铂及羟基喜树碱联合亚叶酸钙和氟尿嘧啶治疗进展期结直肠癌的比较. 世界华人消化杂志 2006; 14: 1889-1894

4 Moertel CG, Schutt AJ, Reitemeier RJ, Hahn RG. Phase II study of camptothecin (NSC-100880) in the treatment of advanced gastrointestinal cancer. *Cancer Chemother Rep* 1972; 56: 95-101

5 Lavergne O, Demarquay D, Bailly C, Lanco C, Rolland A, Huchet M, Coulomb H, Muller N, Baroggi N, Camara J, Le Breton C, Manginot E, Cazaux JB, Bigg DC. Topoisomerase I-mediated antiproliferative activity of enantiomerically pure fluorinated homocamptothecins. *J Med Chem* 2000; 43: 2285-2289

6 Kishida O, Miyazaki Y, Murayama Y, Ogasa M, Miyazaki T, Yamamoto T, Watabe K, Tsutsui S, Kiyohara T, Shimomura I, Shinomura Y. Gefitinib ("Iressa", ZD1839) inhibits SN38-triggered EGF signals and IL-8 production in gastric cancer cells. *Cancer Chemother Pharmacol* 2005; 55: 393-403

7 Williams J, Lansdown R, Sweitzer R, Romanowski M, LaBell R, Ramaswami R, Unger E. Nanoparticle drug delivery system for intravenous delivery of topoisomerase inhibitors. *J Control Release* 2003; 91: 167-172

8 Ghobrial IM, Witzig TE, Adjei AA. Targeting apoptosis pathways in cancer therapy. *CA Cancer J Clin* 2005; 55: 178-194

9 Del Bufalo D, Biroccio A, Trisciuoglio D, Bruno T, Floridi A, Aquino A, Zupi G. Bcl-2 has differing effects on the sensitivity of breast cancer cells depending on the antineoplastic drug used. *Eur J Cancer* 2002; 38: 2455-2462

10 Romberg B, Hennink WE, Storm G. Sheddable coatings for long-circulating nanoparticles. *Pharm Res* 2008; 25: 55-71

11 Li Y, Taulier N, Rauth AM, Wu XY. Screening of lipid carriers and characterization of drug-polymer-lipid interactions for the rational design of polymer-lipid hybrid nanoparticles (PLN). *Pharm Res* 2006; 23: 1877-1887

12 杨觅, 丁义涛, 黄兆琦, 钱晓萍, 禹立霞, 刘宝瑞. 顺铂温敏载药粒子的制备表征. 无机化学学报 2007; 23: 205-210

13 Xuan T, Zhang JA, Ahmad I. HPLC method for determination of SN-38 content and SN-38 entrapment efficiency in a novel liposome-based formulation, LE-SN38. *J Pharm Biomed Anal* 2006; 41: 582-588

14 Lu X, Ji C, Xu H, Li X, Ding H, Ye M, Zhu Z, Ding D, Jiang X, Ding X, Guo X. Resveratrol-loaded polymeric micelles protect cells from Abeta-induced oxidative stress. *Int J Pharm* 2009; 375: 89-96

15 Zheng D, Li X, Xu H, Lu X, Hu Y, Fan W. Study on docetaxel-loaded nanoparticles with high antitumor efficacy against malignant melanoma. *Acta Biochim Biophys Sin* (Shanghai) 2009; 41: 578-587

16 Li X, Li R, Qian X, Ding Y, Tu Y, Guo R, Hu Y, Jiang X, Guo W, Liu B. Superior antitumor efficiency of cisplatin-loaded nanoparticles by intratumoral delivery with decreased tumor metabolism rate. *Eur J Pharm Biopharm* 2008; 70: 726-734

17 Liu B, Yang M, Li X, Qian X, Shen Z, Ding Y, Yu L. Enhanced efficiency of thermally targeted taxanes delivery in a human xenograft model of gastric cancer. *J Pharm Sci* 2008; 97: 3170-3181

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2009年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

《世界华人消化杂志》中文摘要要求

本刊讯 本刊中文摘要必须在350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). (科学编辑: 李军亮 2009-10-08)

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2009年10月8日; 17(28): 2877-2880
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

基础研究 BASIC RESEARCH

痘苗病毒辅助的重组丙型肝炎病毒生产体系中生产细胞的选择

舒 文, 马 强, 董慧敏, 林冠峰, 吴英松

舒文, 马强, 董慧敏, 林冠峰, 吴英松, 南方医科大学抗体工程研究所 广东省广州市 510515
舒文, 南方医科大学在读硕士, 主要从事丙型肝炎病毒体外大规模培养技术的研究平台的建立及疫苗的实验室研究.
国家自然科学基金资助项目, No. 30872244
作者贡献分布: 实验设计由吴英松与舒文完成; 研究过程由舒文与林冠峰完成; 数据整理, 统计分析及文章写作由舒文完成; 马强指导实验; 文章审阅由马强与吴英松完成; 实验试剂准备由董慧敏完成.
通讯作者: 吴英松, 教授, 510515, 广东省广州市, 南方医科大学抗体工程研究所. wg@fimmu.com
电话: 020-61648321
收稿日期: 2009-06-20 修回日期: 2009-08-27
接受日期: 2009-09-07 在线出版日期: 2009-10-08

Selection of cell lines for production of recombinant hepatitis C virus using the vaccinia virus expression system

Wen Shu, Qiang Ma, Hui-Min Dong, Guan-Feng Lin, Ying-Song Wu

Wen Shu, Qiang Ma, Hui-Min Dong, Guan-Feng Lin, Ying-Song Wu, Institute of Antibody Engineering, Southern Medical University, Guangzhou 510515, Guangdong Province, China
Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30872244
Correspondence to: Professor Ying-Song Wu, Institute of Antibody Engineering, Southern Medical University, Guangzhou 510515, Guangdong Province, China. wg@fimmu.com
Received: 2009-06-20 Revised: 2009-08-27
Accepted: 2009-09-07 Published online: 2009-10-08

Abstract

AIM: To compare the yield of recombinant hepatitis C virus (HCV) in different cell lines.

METHODS: BHK-21, HepG2 and SMMC7721 cells were co-transfected with recombinant plasmid pT7HCV and pVHCV, respectively, followed by infection with vTF7-3 vaccinia viruses. Ninety-six hours later, the presence of HCV RNA in culture supernatants was detected by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). The titers of HCV were measured by fluorescent quantitative PCR (FQ-PCR). The expression of HCV antigens was detected by Western blot.

RESULTS: HCV RNA was detectable in all culture supernatants. The titers of HCV in BHK-21, HepG2 and SMMC7721 cells were (2.97 ± 0.28) × 10^7, (1.99 ± 0.17) × 10^5, (1.19 ± 0.17) × 10^5 (copies/mL), respectively. The expression of HCV E2, NS3 and NS5 antigens could be detected in all the three cell lines.

CONCLUSION: Recombinant HCV can be produced in BHK-21, HepG2 or SMMC7721 cells. The yield of recombinant HCV is highest in BHK-21 cells.

Key Words: Hepatitis C virus; Vaccinia virus; Fluorescent quantitative PCR

Shu W, Ma Q, Dong HM, Lin GF, Wu YS. Selection of cell lines for production of recombinant hepatitis C virus using the vaccinia virus expression system. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2009; 17(28): 2877-2880

摘要

目的: 探讨痘苗病毒辅助的重组丙型肝炎病毒制备体系中生产细胞的选择.

方法: 将已构建好的质粒pT7HCV及pVHCV分别共转染BHK_{21}, HepG2, SMMC7721细胞株, 4 h后用痘苗病毒感染细胞, 96 h后用RT-PCR检测HCV的RNA表达, 用荧光定量PCR方法检测培养上清中RNA的拷贝数, 并用Western blot检测结构蛋白E2以及非结构蛋白NS5的表达.

结果: RT-PCR检测到各细胞株培养上清中均有HCV的RNA的存在, 定量PCR显示RNA的拷贝数在BHK_{21}, HepG2, SMMC7721细胞中的产量分别为(2.97±0.28)×10^7, (1.99±0.17)×10^5, (1.19±0.17)×10^5(copies/mL). Western blot检测到在这3种生产细胞中均有HCV非结构蛋白NS5的表达.

结论: BHK_{21}, HepG2, SMMC7721细胞株均可

■**背景资料**
丙型肝炎病毒(HCV)体外不易培养, 导致HCV药物研发进展缓慢. 本研究拟通过优化痘苗病毒辅助生产体系达到规模化体外培养HCV病毒颗粒的目的.

■**同行评议者**
谭德明, 教授, 中南大学湘雅医院感染病科

■研发前沿
目前该领域的研究热点是如何建立HCV大规模体外培养体系，为药物的研发以及疫苗的研制提供条件. 目前，关于HCV感染的机制、复制的方式还存在许多尚未解决的问题.

生产出重组丙型肝炎病毒颗粒，且以BHK_{21}为生产细胞株时产量最高.

关键词: 重组丙型肝炎病毒; 痘苗病毒; 荧光定量聚合酶链式反应

舒文, 马强, 董慧敏, 林冠峰, 吴英松. 痘苗病毒辅助的重组丙型肝炎病毒生产体系中生产细胞的选择. 世界华人消化杂志 2009; 17(28): 2877–2880
http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/2877.asp

0 引言

HCV感染是慢性肝病和肝癌的主要致病原因之一. 然而，由于缺乏有效的HCV体外培养体系，针对HCV的药物研发工作进展受到严重制约，目前还没有一种可以用于广泛接种预防HCV的特异性药物投入生产. 本实验室目前已经初步建立了以痘苗病毒辅助的重组HCV体外生产的体系，同时，为了便利该体系规模化应用，我们拟尝试性使用该制备体系以多种细胞系为生产细胞体外培养HCV，为该体系规模化应用提供客观依据.

1 材料和方法

1.1 材料 DMEM, opti-MEM培养基购自Gibco公司; 脂质体Lipofectamine™ 2000购自Invitrogen公司; 小牛血清购自Hyclone公司; 胰蛋白酶、无RNA酶的DNA酶、无DNA酶的RNA酶和蛋白酶K均购自Promega公司; DNase Ⅰ购自TaKaRa; 抗NS5蛋白的鼠多克隆抗体购自Biodesign公司; HRP-兔抗鼠IgG购自博士德生物技术公司; QIAamp® Viral RNA提取试剂盒自Qiagen公司; HCV核酸扩增(PCR)荧光检测试剂盒购自广州达安试剂公司. AMV Reverse Transcriptase购自Promega公司. RNAsin购自ToYoBo公司. 重组质粒pT7HCV和pVHCV由本室构建; 重组痘苗病毒vTF7-3由冯愈博士惠赠; BHK_{21}, HepG2, SMMC7721细胞由本室保存. GeneAmp PCR system 2400(PE公司), 自动凝胶成像分析仪(英国Syngene公司), DYY-Ⅲ-5型电泳仪, DYCP-31D型电泳槽(北京六一仪器厂); 荧光定量PCR ABI Prism7000; Beckman Coulter Optima™ L-100XP Ultracentrifuge.

1.2 方法

1.2.1 重组HCV的培养: 在六孔板中每空接种5×10^5个BHK_{21}, HepG2, SMMC7721细胞，用DMEM10培养基在37℃、50 mL/L CO_2培养箱中培养过夜. 第2天按脂质体Lipofectamine™ 2000说明书步骤将pT7HCV和pVHCV共转染细胞，其中pT7HCV含有T7启动子和终止子控制下的HCV的全长cDNA. pVHCV含有痘苗病毒晚起启动子控制下的HCV前体蛋白开放阅读框架序列. 4 h后，每孔加入100 μL重组痘苗病毒vTF7-3(10^{12} PFU/L)，此重组痘苗病毒表达T7RNA聚合酶，直接指导PT7HCV转录HCV RNA，并且直接指导前体蛋白的表达. 2 h后，吸去培养上清，用无血清DMEM洗涤3次，每孔加入4 mL DMEM2.5, 37℃, 50 mL/L CO_2培养箱中培养. 细胞培养96 h后，收集培养上清，1000 r/min离心10 min，分离上清与沉淀，分别于-20℃冻存并检测.

1.2.2 RT-PCR检测重组HCV基因组RNA: 取细胞培养上清用0.22 μm的滤膜过滤，取滤过培养上清200 μL，加入10 U的DNA酶和20 U的RNA酶，37℃水浴中孵育1 h，加蛋白酶K至终浓度为100 mg/L, 37℃孵育30 min. 处理后的细胞培养上清用Qiagen病毒RNA提取试剂盒提取HCV基因组RNA，提取物用RNAFREE的DNase于37℃水浴处理30 min以除去可能的DNA污染. 用HCV 5'-UTR的特异性引物进行PCR鉴定，以证实质粒DNA是否彻底去除. 将提取的病毒RNA进行逆转录反应，引物采用随机引物Random Primer 9. 应用HCV 5'-UTR的特异性引物，将逆转录的cDNA进行PCR反应，上游引物为5'-GCA CAA ATC CAA AAC CCC AAA GAA AAA-3'(nt 346-372)，下游引物为5'-GAC GAG CGG AAT GTA CCC CAT GAG GTC GGC-3'(nt 761-732). 反应条件: 94℃ 5 min; 94℃ 30 s, 55℃ 30 s, 72℃ 30 s; 35个循环，72℃延伸10 min.

1.2.3 Western blot检测重组HCV蛋白在细胞中的表达: 培养后的细胞用胰蛋白酶消化后，用15 mL离心管离心沉淀，用TBST缓冲液洗涤细胞3次; 每1×10^6个细胞加入40 μL SDS上样缓冲液，100℃煮沸10 min裂解细胞，用39 g/L浓缩胶、120 g/L分离胶进行SDS-PAGE电泳; 将电泳后的SDS-PAGE胶在冷却条件下45 V、2 h转印PVDF膜; 转印后的PVDF膜用含50 g/L脱脂奶粉的TBST缓冲液室温封闭2 h; 封闭后的PVDF膜用TBST缓冲液洗涤3×10 min，加1∶100稀释的抗HCV非结构蛋白NS5多抗以及加1∶5000稀释的抗HCV结构蛋白E2多抗作为一抗，4℃孵育过夜; 然后用TBST洗涤，加1∶5000稀释的HRP-兔抗鼠IgG室温孵育1 h; 然后用TBST洗涤3×10

■相关报道
Heller *et al*已构建了较先进的HCV核酶表达系统，该法操作简单，但生产体系欠稳定，产量不高.

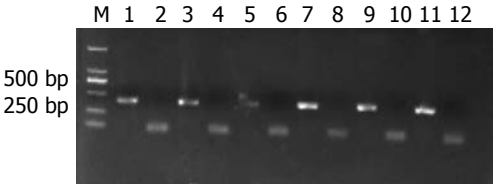


图 1 人工构建的质粒PT7 HCV及PV HCV共转染BHK_{21}, HepG2, SMMC7721细胞株后, 培养上清中HCV RNA的PCR产物凝胶电泳图. M: DL2000; 1: BHK_{21}上清未用DNA酶处理; 2−3: BHK_{21}上清用DNA酶处理后; 4: 正常BHK_{21}上清; 5: HepG2上清未用DNA酶处理; 6−7: 转染后HepG2上清用DNA酶处理后; 8: 正常HepG2上清; 9: SMMC7721上清未用DNA酶处理; 10−11: 转染后SMMC7721上清用DNA酶处理; 12: 正常SMMC7721上清.

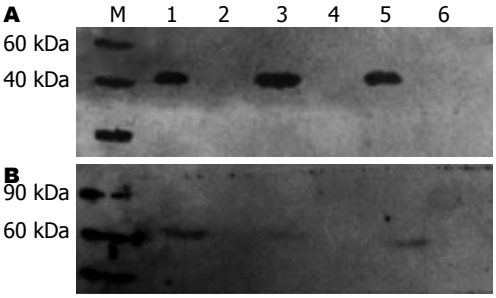


图 2 HCV蛋白NS5及E2在BHK_{21}, HepG2, SMMC7721细胞中的表达. A: NS5; B: E2. M: 蛋白Marker; 1: 共转染pT7HCV和pVHCV的BHK_{21}细胞; 2: BHK_{21}细胞; 3: 共转染pT7HCV和pVHCV的HepG2细胞; 4: HepG2细胞; 5: 共转染pT7HCV和pVHCV的SMMC7721细胞; 6: SMMC7721细胞.

min, ECL显色.

1.2.4 荧光定量PCR检测细胞培养上清中重组HCV的拷贝数: 收集细胞培养上清, RNA酶处理后取160 μL, 用Qiagen病毒RNA提取试剂盒提取HCV基因组RNA, 提取物用RNAFREE的DNase于37℃水浴处理30 min以除去可能的DNA污染, 使用丙型肝炎病毒荧光定量PCR检测试剂盒, 用HCV 5'-UTR的特异性引物和探针PCR反应, 检测HCV基因组RNA拷贝数.

2 结果

2.1 各种细胞培养上清中HCV RNA的表达 人工构建的质粒PT7 HCV及PV HCV共转染BHK_{21}, HepG2, SMMC7721细胞株, 4 h后用痘苗病毒感染细胞, 96 h后用RT-PCR检测HCV的RNA表达. 培养上清提取RNA前后均用DNase消化, PCR鉴定是否彻底除去质粒DNA的污染. 结果显示: 培养上清用DNase消化前可以检测到质粒DNA的存在, DNase消化后未检测到质粒DNA. 3种细胞培养上清均可以检测到HCV RNA, 而对照组细胞上清中未发现HCV RNA(图1).

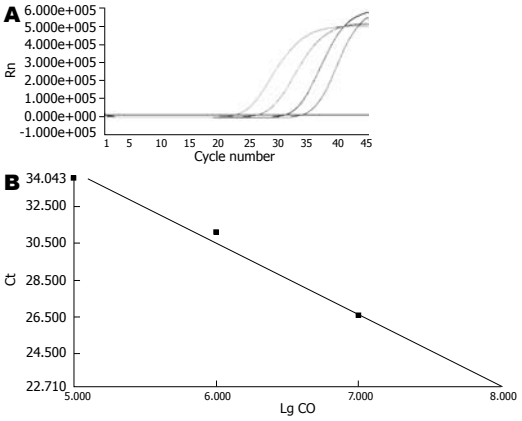


图 3 FQ-PCR方法测定各种细胞培养上清中HCV的拷贝数. A: 检测丙型肝炎病毒质粒标准品中丙型肝炎病毒脱氧核糖核酸的荧光值Rn循环数变化曲线; B: 标准曲线.

2.2 各种细胞HCV结构蛋白E2和非结构蛋白NS5的免疫印迹结果 收集病毒培养细胞及上清进行蛋白质印迹鉴定, 由图2可观察到, 收集的病毒培养细胞的E2蛋白呈阳性(只感染痘苗病毒的细胞作为阴性对照), 收集的病毒培养上清的NS5蛋白呈阳性(只感染痘苗病毒的细胞上清作为阴性对照), 表明在收集的培养细胞中存在NS5蛋白, 收集的培养上清中存在E2蛋白.

2.3 FQ-PCR方法测定各种细胞培养上清中HCV的拷贝数 BHK_{21}, HepG2, SMMC7721作为HCV的生产细胞, 各细胞培养上清中HCV的拷贝数分别为$(2.97\pm0.28)\times10^7$ copies/mL, $(1.99\pm0.17)\times10^5$ copies/mL, $(1.19\pm0.17)\times10^5$ copies/mL(图3).

3 讨论

HCV是输血后非甲非乙型肝炎的主要病因, 丙型肝炎呈全球性流行, 是终末期肝病的最主要原因. 目前在HCV分子生物学方面[1-6]的研究已有很大进步, 但体外大规模培养及其感染的机制、复制的方式及疫苗研制[7]等问题尚未完全明确和解决. 首先研究人员建立了复制子体外培养体系[8-12], 但是病毒复制水平不高, 随后构建HCV的嵌合体[13-16], 目前较先进的核酶表达系统[17-18]体系产量仅可以达到1×10^5 copies/mL. 并且生产细胞颇具局限性, 主要以Huh-7为主, 使得体系产量在很大程度上受到生产细胞的制约. 此外, Huh-7细胞不易培养, 以此系统为基础的生产体系产量欠稳定, 比较耗时[10,17-18]. 以Huh-7.5细胞株为生产细胞时, 体系产量会更高[19], 但仍存在细胞不易培养的问题.

本研究小组已经利用并改造VV/T7[20]瞬时

■创新盘点
本研究通过比较BHK_{21}, HepG2, SMMC7721三个生产细胞株, 拟探索生产HCV最适合的细胞株, 本系统同时也为其他RNA病毒的生产提供了一个技术平台.

■应用要点
本研究通过比较几株常用细胞株, 发现在BHK_{21}细胞中, HCV病毒颗粒产量最高, 由此为本系统的进一步应用提供客观依据.

■同行评价
本研究选题新颖, 结果明确, 结论可靠, 具有较好的学术价值.

表达系统, 初步建立了痘苗病毒辅助的重组丙型肝炎病毒生产体系[21,23]. 此体系采用BHK_{21}为生产细胞, 然而由于痘苗病毒表达对于宿主细胞选择性较低[22], 为了便利该体系的病毒制备方式, 我们拟尝试性使用多种细胞株作为生产细胞, 探索该体系生产HCV时的产量高低.

目前, 本实验室利用BHK_{21}, HepG2, SMMC7721作为生产细胞, 生产重组丙型肝炎病毒. 对病毒培养上清用DNase和RNase进行处理, 去除破碎细胞中释放的质粒DNA和未被包膜蛋白包装的HCV RNA, 只有当RNA被包膜蛋白包裹才能不被RNA酶降解, 由此可以推断在培养上清中存在HCV颗粒. DNase和RNase处理后培养上清RT-PCR结果为阳性. 荧光定量PCR检测到BHK_{21}, HepG2, SMMC7721上清中HCV的拷贝数分别为$(2.97\pm0.28)\times10^7$ copies/mL, $(1.99\pm0.17)\times10^5$ copies/mL, $(1.19\pm0.17)\times10^5$ copies/mL. 本系统在以BHK_{21}为生产细胞时, 所得到的HCV的拷贝数最高, 显示本系统以BHK_{21}为生产细胞最佳, 可能BHK_{21}易于培养和繁殖, 痘苗病毒容易在该细胞中复制.

通过此研究探索, 我们发现使用比较通用的肝癌细胞系时, 该系统均有可能生产出HCV病毒颗粒, 但以BHK_{21}细胞产量最高, 提示该系统制备病毒颗粒对细胞选择性低, 由此为本系统的进一步应用提供客观依据.

4 参考文献

1 Masante C, Mahias K, Lourenço S, Dumas E, Cahour A, Trimoulet P, Fleury H, Astier-Gin T, Ventura M. Seven nucleotide changes characteristic of the hepatitis C virus genotype 3 5' untranslated region: correlation with reduced in vitro replication. *J Gen Virol* 2008; 89: 212-221

2 Pfingsten JS, Costantino DA, Kieft JS. Structural basis for ribosome recruitment and manipulation by a viral IRES RNA. *Science* 2006; 314: 1450-1454

3 赵四海, 寻萌, 楚雍烈, 朱彤, 薛欣, 徐琨, 宋娟, 邵明明. HCV全基因组培养细胞的比较蛋白组学研究. 高等学校化学学报 2008; 11: 2174-2177

4 杨华凤, 潘明洁, 吕敏, 李越希. 丙型肝炎病毒C端截短21个氨基酸NS5B蛋白的克隆、表达及鉴定. 药物生物技术 2008; 15: 86-89

5 Kieft JS. Viral IRES RNA structures and ribosome interactions. *Trends Biochem Sci* 2008; 33: 274-283

6 Diviney S, Tuplin A, Struthers M, Armstrong V, Elliott RM, Simmonds P, Evans DJ. A hepatitis C virus cis-acting replication element forms a long-range RNA-RNA interaction with upstream RNA sequences in NS5B. *J Virol* 2008; 82: 9008-9022

7 杨振. 丙型肝炎疫苗的研制. 中国生物制品学杂志 2008; 21: 823-826

8 刘艳, 张贺秋, 凌世淦, 祁自柏. 丙型肝炎病毒(HCV)培养模型的研究进展. 细胞与分子免疫学杂志 2005; 21: 125-127

9 高月求, 郑亚江, 王灵台. 丙型肝炎病毒细胞和动物模型研究进展. 临床肝胆病杂志 2006; 22: 398-399

10 Bartenschlager R. Hepatitis C virus molecular clones: from cDNA to infectious virus particles in cell culture. *Curr Opin Microbiol* 2006; 9: 416-422

11 Ali S, Pellerin C, Lamarre D, Kukolj G. Hepatitis C virus subgenomic replicons in the human embryonic kidney 293 cell line. *J Virol* 2004; 78: 491-501

12 Pietschmann T, Kaul A, Koutsoudakis G, Shavinskaya A, Kallis S, Steinmann E, Abid K, Negro F, Dreux M, Cosset FL, Bartenschlager R. Construction and characterization of infectious intragenotypic and intergenotypic hepatitis C virus chimeras. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103: 7408-7413

13 Scheel TK, Gottwein JM, Jensen TB, Prentoe JC, Hoegh AM, Alter HJ, Eugen-Olsen J, Bukh J. Development of JFH1-based cell culture systems for hepatitis C virus genotype 4a and evidence for cross-genotype neutralization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 105: 997-1002

14 King RW, Zecher M, Jeffries MW, Carroll DR, Parisi JM, Pasquinelli C. A cell-based model of HCV-negative-strand RNA replication utilizing a chimeric hepatitis C virus/reporter RNA template. *Antivir Chem Chemother* 2002; 13: 353-362

15 张帆, 王小红. HCV的新型体外细胞模型: 复制子系统. 第四军医大学学报 2005; 26: 89-92

16 Mateu G, Donis RO, Wakita T, Bukh J, Grakoui A. Intragenotypic JFH1 based recombinant hepatitis C virus produces high levels of infectious particles but causes increased cell death. *Virology* 2008; 376: 397-407

17 Kato T, Matsumura T, Heller T, Saito S, Sapp RK, Murthy K, Wakita T, Liang TJ. Production of infectious hepatitis C virus of various genotypes in cell cultures. *J Virol* 2007; 81: 4405-4411

18 Heller T, Saito S, Auerbach J, Williams T, Moreen TR, Jazwinski A, Cruz B, Jeurkar N, Sapp R, Luo G, Liang TJ. An in vitro model of hepatitis C virion production. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102: 2579-2583

19 Blight KJ, McKeating JA, Rice CM. Highly permissive cell lines for subgenomic and genomic hepatitis C virus RNA replication. *J Virol* 2002; 76: 13001-13014

20 Moss B. Genetically engineered poxviruses for recombinant gene expression, vaccination, and safety. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93: 11341-11348

21 Wu YS, Feng Y, Dong WQ, Zhang YM, Li M. A vaccinia replication system for producing recombinant hepatitis C virus. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 2670-2674

22 Wyatt LS, Moss B, Rozenblatt S. Replication-deficient vaccinia virus encoding bacteriophage T7 RNA polymerase for transient gene expression in mammalian cells. *Virology* 1995; 210: 202-205

23 周志涛, 吴英松, 李明. 重组丙型肝炎病毒在7721细胞中的复制. 第一军医大学学报 2005; 25: 387-390

编辑 李军亮 电编 何基才

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2009年10月8日; 17(28): 2881-2886
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

基础研究 BASIC RESEARCH

经导管动脉栓塞对肝癌血管生成的影响

梁 斌, 郑传胜, 冯敢生, 王 勇, 赵 辉, 夏向文

梁斌, 郑传胜, 冯敢生, 王勇, 赵辉, 夏向文, 华中科技大学同济医学院附属协和医院放射科 湖北省武汉市 430022
梁斌, 在读博士, 主要从事肝癌介入治疗研究.
国家自然科学基金资助项目, No. 30970804
作者贡献分布: 梁斌与郑传胜对此文所作贡献均等; 此课题由梁斌、郑传胜及冯敢生设计; 研究过程由梁斌、王勇、赵辉及夏向文操作完成; 研究所用新试剂及分析工具由郑传胜与冯敢生提供; 数据分析由梁斌与赵辉完成; 本论文写作由梁斌与郑传胜完成.
通讯作者: 郑传胜, 副教授, 430022, 湖北省武汉市, 华中科技大学同济医学院附属协和医院放射科. hqzcsxh@sina.com
电话: 027-85726432
收稿日期: 2009-07-23 修回日期: 2009-09-10
接受日期: 2009-09-21 在线出版日期: 2009-10-08

Transcatheter arterial embolization promotes angiogenesis in rabbit VX2 liver tumor

Bin Liang, Chuan-Sheng Zheng, Gan-Sheng Feng, Yong Wang, Hui Zhao, Xiang-Wen Xia

Bin Liang, Chuan-Sheng Zheng, Gan-Sheng Feng, Yong Wang, Hui Zhao, Xiang-Wen Xia, Department of Radiology, Wuhan 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. 30970804
Correspondence to: Professor Chuan-Sheng Zheng, MD, Department of Radiology, Wuhan Union Hospital, Tongji Medical College of Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, Hubei Province, China. hqzcsxh@sina.com
Received: 2009-07-23 Revised: 2009-09-10
Accepted: 2009-09-21 Published online: 2009-10-08

Abstract

AIM: To investigate the effect of transcatheter arterial embolization (TAE) on angiogenesis in rabbit VX2 liver tumor.

METHODS: VX2 tumors were implanted in the liver of 20 New Zealand White rabbits. The animals were then divided into two groups: rabbits undergoing TAE with 150-250-μm polyvinyl alcohol particles (TAE group, n = 10) and those undergoing sham embolization with distilled water (control group, n = 10). The animals were sacrificed six hours or three days after TAE, and tumor samples were harvested. Immunohistochemistry was performed to evaluate vascular endothelial growth factor (VEGF) protein expression and microvessel density (MVD). Real-time reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) was performed to examine the expression of VEGF mRNA.

RESULTS: TAE-treated tumors showed incomplete central necrosis with residual viable tumor cells in the periphery. The levels of VEGF protein and mRNA and mean MVD were significantly higher in the TAE group than in the control group (P = 0.001, 0.000 and 0.001, respectively). The expression level of VEGF protein was positively correlated with MVD in residual viable tumor cells (r = 0.677, P = 0.001).

CONCLUSION: TAE can promote angiogenesis in residual rabbit VX2 liver tumor after TAE perhaps in a VEGF-dependent manner.

Key Words: Embolization; Vascular endothelial growth factor; Angiogenesis; Pathology; Liver tumor

Liang B, Zheng CS, Feng GS, Wang Y, Zhao H, Xia XW. Transcatheter arterial embolization promotes angiogenesis in rabbit VX2 liver tumor. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2009; 17(28): 2881-2886

摘要

目的: 探讨肝癌经导管动脉栓塞(transcatheter arterial embolization, TAE)对残存肿瘤血管生成的影响.

方法: 建立20只兔VX2肝癌模型. TAE处理组(n = 10), 接受150-250 μm聚乙烯醇经导管肝动脉栓塞; 对照组(n = 10), 接受蒸馏水经导管肝动脉注入模拟TAE. 栓塞后6 h或3 d, 处死实验兔进行肿瘤组织取样, 采用免疫组织化学方法评价样本的血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)蛋白表达和微血管密度(microvessel density, MVD), 微血管标记采用CD31抗体, 实时PCR检测VEGF mRNA表达.

结果: TAE处理组肿瘤呈不完全性中央坏死,

■**背景资料**
TAE是肝癌经导管介入治疗技术的重要组成部分. 该治疗技术通过栓塞肿瘤供血动脉诱导肿瘤缺血缺氧性坏死, 达到控制肝癌的目的. 然而, TAE作为肝癌姑息性治疗方法, 其近期疗效显著, 但远期疗效仍不够理想. 肝癌TAE后肿瘤复发和转移是限制其疗效的主要因素.

■**同行评议者**
丁惠国, 主任医师, 首都医科大学附属北京佑安医院肝病消化科

■研发前沿
血管生成在肿瘤的生长和浸润转移等关键生物学方面发挥重要作用. 肝癌属于富血管肿瘤, 了解栓塞与血管生成的关系对阐明TAE治疗肝癌的确切疗效具有重要意义.

坏死区周围可见肿瘤细胞存活. TAE处理组肿瘤的VEGF蛋白、mRNA水平和平均MVD均显著高于对照组(P = 0.001, 0.000, 0.001). VEGF蛋白水平与MVD呈显著性正相关(r = 0.677, P = 0.001).

结论: 肝癌TAE可激活残存肿瘤血管生成, VEGF在TAE相关性血管生成中发挥重要调节作用.

关键词: 栓塞; 血管内皮生长因子; 血管生成; 病理性; 肝肿瘤

梁斌, 郑传胜, 冯敢生, 王勇, 赵辉, 夏向文. 经导管动脉栓塞对肝癌血管生成的影响. 世界华人消化杂志 2009; 17(28): 2881-2886
http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/2881.asp

0 引言

经导管动脉栓塞(transcatheter arterial embolization, TAE)是肝癌经导管介入治疗技术的重要组成部分. 该治疗技术通过栓塞肿瘤供血动脉诱导肿瘤缺血缺氧性坏死, 当结合动脉内灌注化疗药物(即化疗栓塞)或放射性物质(即放疗栓塞), 则可导致更广泛的肿瘤坏死[1]. 以栓塞为基础的介入疗法已成为目前治疗不可切除性肝癌的主要方法. 然而, 二十余年的临床应用结果发现, 介入栓塞作为肝癌姑息性治疗方法, 其近期疗效显著, 但远期疗效仍不够理想. 肝癌栓塞后肿瘤复发和转移是限制其疗效的主要因素[2-3]. 研究证实, 肝癌作为典型的富血管肿瘤[4], 肿瘤血管生成在肝癌的生长和浸润转移等肿瘤生物学方面发挥重要作用[5]. 了解栓塞与血管生成的关系对阐明TAE治疗肝癌的确切疗效具有重要意义. 因此, 我们采用兔VX2肝癌模型研究TAE对肝癌血管生成的影响.

1 材料和方法

1.1 材料 新西兰大白兔, ♂, 体质量3.0-3.5 kg, 购于华中科技大学同济医学院动物学部. VX2瘤株购于中国典型培养物保藏中心. MR成像采用1.5 T MR成像仪(Magnetom Avanto; Siemens medical solutions, Germany). 介入监视采用DSA仪(Angiostar Plus, Siemens medical solutions, Germany). 介入器械均购自泰尔茂公司(Terumo, Japan). 对比剂为欧乃派克(Omnipaque 350; GE Healthcare, Shanghai, China). 二抗试剂盒采用EnVision™非生物素检测系统(Dako, Glostrup, Denmark). 一抗分别为小鼠抗VEGF(Millipore, Billerica, USA)、小鼠抗CD31(Dako, Glostrup, Denmark)单克隆抗体. 实时PCR所用试剂包括RNA保存液(Applygen, China)、TRIzol(Invitrogen, Carlsbad, USA)、cDNA第一键合成酶(Toyobo, Japan)和SYBR Green Realtime PCR master mix (Toyobo, Japan).

1.2 方法

1.2.1 动物模型、MR成像和实验分组: 新西兰大白兔, 雌雄不限, 体质量3.0-3.5 kg, 动物麻醉采用戊巴比妥钠, 静脉注射, 剂量30 mg/kg体质量. 兔VX2肝癌模型制作: 先将VX2瘤从用于传代的荷瘤兔中取出, 剪成1 mm×1 mm×1 mm大小的瘤组织块, 再将实验用兔全麻后无菌手术下开腹、暴露肝脏, 将瘤组织块直接植入肝左叶内, 植入深度距肝包膜约10 mm. 肿瘤移植后17-18 d, 采用MR成像仪监测VX2癌成瘤情况. 所有动物取仰卧位, 选用6通道体部相控阵线圈联合2通道脊柱相控阵线圈, 进行T2加权MR成像, 参数: TR 3700 ms, TE 87 ms, 层厚4 mm, 层间距15%, 带宽 168 Hz, 视野200×200 mm^2, 矩阵320×320. 成功建立兔VX2肝癌模型20只, 将其分为2组: TAE处理组(n = 10), 采用150-250 μm聚乙烯醇栓塞; 对照组(n = 10), 采用蒸馏水代替聚乙烯醇模拟TAE. 再根据处死时间, 将每组实验兔分成2个亚组: A亚组(TAE处理组5只, 对照组5只), TAE后6 h处死动物; B亚组(TAE处理组5只, 对照组5只), TAE后3 d处死动物.

1.2.2 TAE操作: TAE在DSA监测下进行. 实验兔全麻固定, 无菌手术下切开腹股沟皮肤, 暴露股动脉, 直视下采用18G穿刺针穿刺股动脉成功后, 交换导丝, 引入4 F血管鞘, 先采用4 F Cobra导管选择性插入腹腔干, 手推对比剂进行腹腔干造影用以了解腹腔干内脏血管解剖, 再采用2.7 F同轴微导管相继超选择性插入肝总动脉、肝固有动脉和肝左动脉内. 先进行肝固有动脉或肝左动脉选择性血管造影证实移植瘤血供来源于肝左动脉, 之后实施栓塞处理. 栓塞剂采用150-250 μm大小的聚乙烯醇颗粒, 每瓶聚乙烯醇以10 mL对比剂进行混悬, 在透视监测下将0.1-0.4 mL聚乙烯醇混悬液经导管注入肝左动脉内, 栓塞程度以顺行血流的完全停滞为准. 对照组经导管注入0.4 mL蒸馏水代替栓塞剂.

1.2.3 免疫组织化学: TAE后6 h、3 d, 采用静脉注射过量戊巴比妥钠(100 mg/kg体质量)的方法处死实验兔, 肿瘤取样(包括最大层面的肿瘤组

■相关报道
以往相关研究的结果存在争议, 如Gupta *et al*采用大鼠NF13762肝肿瘤模型进行实验, 发现经TAE处理的动物血清VEGF水平和肿瘤组织MVD较未经TAE处理的肝癌明显升高; 而Li *et al*报道栓塞并不增加大鼠Walker-256肝肿瘤的血管生成水平.

表 1 不同处死时间点两组间VEGF蛋白、VEGF mRNA和MVD的比较

分组	VEGF蛋白水平				*P*值	VEGF mRNA (mean ± SD)	*P*值	MVD (mean ± SD)	*P*值
	0	+	++	+++					
6 h									
TAE组(n = 5)	0	0	3	2	0.031	3.51 ± 2.16	0.009	20.40 ± 6.39	0.094
对照组(n = 5)	0	3	2	0		0.62 ± 0.28		14.44 ± 2.83	
3 d									
TAE组(n = 5)	0	0	2	3	0.020	4.64 ± 2.27	0.009	33.04 ± 7.99	0.009
对照组(n = 5)	0	3	2	0		0.63 ± 0.26		13.80 ± 3.52	
合计									
TAE组(n = 10)	0	0	5	5	0.001	4.07 ± 2.17	0.000	26.72 ± 9.54	0.001
对照组(n = 10)	0	6	4	0		0.63 ± 0.25		14.12 ± 3.03	

■创新盘点
本研究采用标准TAE技术处理兔VX2肝肿瘤模型, 动态研究TAE后残存肿瘤组织的VEGF mRNA、蛋白水平及MVD, 并对VEGF蛋白与MVD进行相关分析, 用于评价TAE对肝癌血管生成的影响, 以及了解VEGF在TAE相关性肿瘤血管生成中的作用.

织和少量癌旁肝组织), 标本中性甲醛固定, 石蜡包埋, 制成4 μm切片用于组织学染色. 切片采用H-E染色和免疫组织化学染色. 免疫组织化学染色采用EnVision™非生物素检测系统(Dako, Denmark). 简单步骤如下: 柠檬酸盐缓冲液(0.01 mol/L, pH6.0)微波抗原修复, 3%的H_2O_2孵育10 min阻断内源性过氧化物酶, 分别滴加小鼠抗VEGF(工作浓度, 1∶50)和小鼠抗CD31(工作浓度, 1∶20) mAb, 4℃孵育过夜, EnVision™二抗育温孵育30 min, DAB显色, 苏木素复染. 磷酸盐缓冲液代替一抗作阴性对照. 免疫组织化学染色由2位病理科医师采用盲法进行评价, 差异采用商讨显微镜方式解决. 所有切片均在光镜下全面观察. 根据所有视野内阳性染色细胞的百分比, 将VEGF蛋白水平分为4级: -, 无染色; +, <10%的细胞出现胞质染色; ++, 10%-50%的胞质染色; +++, >50%的胞质染色[6]. MVD采用Weidner *et al*介绍的方法进行评价: 首先在低倍镜(×40)下预览切片, 找出血管密集区(即热点), 然后在高倍镜(×200)下分别计数5个不同视野内的微血管, 任一被CD31染色的与邻近组织成分区分开的内皮细胞或细胞束均被视为一支血管数, 以5个高倍视野的微血管平均数作为该切片的MVD值[7].

1.2.4 实时PCR: VEGF mRNA表达采用实时PCR进行检测. 实验兔处死后, 收集肿瘤标本并置于RNA保存液中-70℃保存. TRIzol提取细胞总RNA, 各样本取1 μg总RNA, 用cDNA第一链合成酶逆转录成第一链cDNA. PCR引物序列如下: VEGF, 5'-GCAGAAGAAGGAGACAATAAACC-3', 5'-GCACGCAGGAAGGCTTGAATA-3'; β-actin, 5'-CGAGATCGTGCGGGACAT-3', 5'-CAGGAAGGAGGGCTGGAAC-3'. 实时PCR反应采用SYBR Green Realtime PCR master mix, 反应体系25 μL. PCR程序: 50℃ 2 min, 1次循环; 95℃ 2 min, 1次循环; 95℃ 15 s, 60℃ 15 s, 72℃ 45 s, 40次循环; 收集荧光, 绘制解离曲线. 每个标本PCR重复3次, 取均值. 采用$2^{-\Delta\Delta Ct}$方法分析VEGF相对基因表达[8].

统计学处理 采用SPSS13.0统计软件, *t*检验比较TAE-处理组与对照组之间肿瘤直径的差异, Mann-Whitney *U*检验比较两组间VEGF mRNA及其蛋白和MVD的差异, Spearman's相关分析检测VEGF蛋白与MVD的关系. $P<0.05$为差异有统计学意义.

2 结果

2.1 VX2肿瘤模型、TAE MR图像显示所有移植肿瘤生长于兔肝左叶内(图1). TAE处理组和对照组肿瘤的直径分别1.24±0.25 cm和1.33±0.26 cm, 两组间差异无统计学意义(P = 0.439). 20只实验动物成功实施TAE(图2).

2.2 组织病理学 TAE处理组肿瘤的坏死程度明显大于对照组. 尽管TAE处理组肿瘤显示了大范围的中央性坏死, 但周边区域仍可见肿瘤细胞存活. VEGF蛋白呈浆染色. 该蛋白主要表达于分布在坏死区周围和肿瘤边缘的存活肿瘤细胞内(图3), 然而在血管内皮细胞和癌旁肝细胞内也发现有VEGF蛋白表达. TAE处理组肿瘤的VEGF蛋白水平明显高于对照组(表1). 肿瘤内微血管呈不均匀分布, 血管密集区位于肿瘤侵犯缘(图4). TAE处理组肿瘤的平均MVD明显高于对照组. 尽管6 h处死的处理组肿瘤MVD较对照组升高, 但差异无统计学意义; 相比之下, 3 d处死的肿瘤两组间MVD差异显著(表1).

2.3 VEGF mRNA TAE处理组和对照组VX2肿瘤

■应用要点
肝癌TAE可通过上调VEGF表达激活残存肿瘤血管生成. 因此, 有必要采用TAE与抗血管生成的综合治疗策略, 以提高肝癌介入疗效.

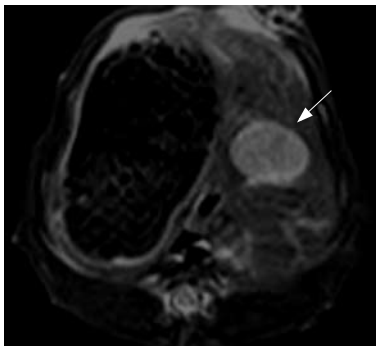


图 1 VX2瘤MR图像. T2加权MR像示兔肝左外叶内高信号病灶(箭).

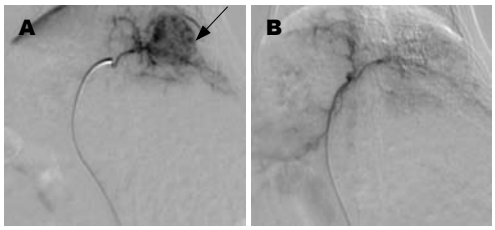


图 2 TAE处理的VX2瘤DSA图像. A: TAE前选择性左肝动脉造影实质期示兔肝左外叶内富血管病灶(箭); B: TAE后选择性肝固有动脉造影示原病灶不显影, 证实肿瘤栓塞成功.

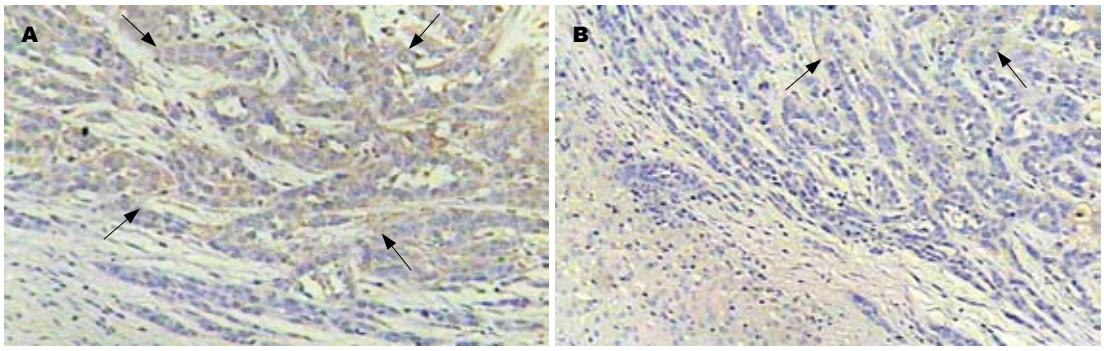


图 3 VX2瘤VEGF免疫组织化学图像(×100). A: 处理组肿瘤显示大量的VEGF阳性表达细胞(箭); B: 对照组肿瘤显示散在的VEGF阳性细胞(箭).

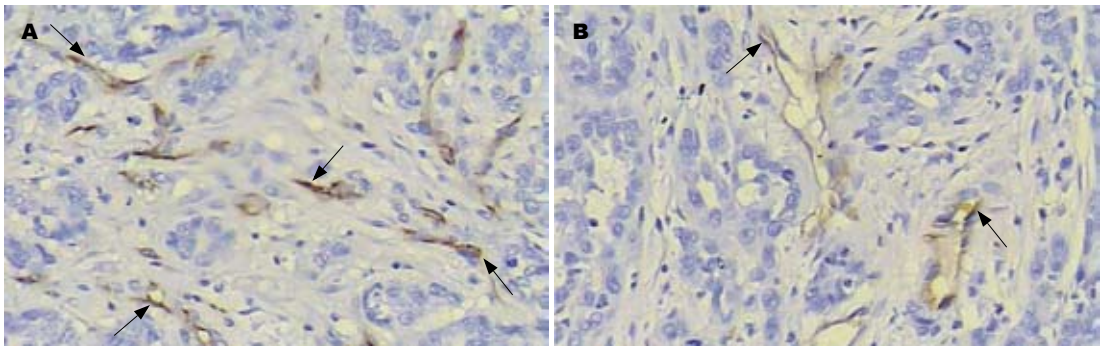


图 4 VX2瘤MVD免疫组织化学图像(CD31标记×200). A: 处理组肿瘤显示丰富的肿瘤血管(箭); B: 对照组肿瘤内血管稀少(箭).

均检测有VEGF mRNA表达. TAE处理组VEGF mRNA表达水平明显高于对照组(表1).

2.4 VEGF蛋白与MVD的关系 VX2肿瘤VEGF蛋白水平与MVD呈正相关($r = 0.677$, $P = 0.001$).

3 讨论

TAE通过栓塞肿瘤供血动脉可诱导肿瘤缺血缺氧以及后继的肿瘤坏死, 当结合动脉内灌注化疗药物(即化疗栓塞)或放射性物质(即放疗栓塞), 则可导致更广泛的肿瘤坏死[9]. 以栓塞为基础的经导管介入技术已成为目前治疗不可切除性肝癌的主要方法[1]. TAE治疗肝癌的目的在于祛除肿瘤血管, 但是由于肝癌血供的复杂性以及TAE技术的局限性, 栓塞肿瘤供养血管是不可能完全的[10-12]. 这使得TAE后肝癌病灶坏死不够彻底, 在肿瘤周边常有不同程度的肿瘤细胞存活[13]. 这些残存的肿瘤细胞很可能会产生适应性基因改变并调整其生物学进程, 如激活肿瘤血管生成, 以避免肿瘤缺血缺氧性损伤.

VEGF是血管生成的重要启动子, 而MVD标志血窦毛细血管化状态, 两者最常用于评价肿瘤血管生成[5]. 有关TAE对肝癌血管生成的影响已经在人肝细胞癌及几种动物肝癌模型中得到研究. 然而研究结果存在争议. 大多数研究发现经TAE处理的肝癌VEGF表达和MVD较未经TAE处理的肝癌明显升高[14-18]. 但也有报道显示

TAE并不增加肝癌VEGF表达和MVD[19].

与以往大多数研究结果一样, 本研究发现TAE处理组VX2肿瘤VEGF mRNA、蛋白水平及平均MVD较对照组明显升高, 并且肿瘤的VEGF蛋白表达与MVD相关. 这些数据表明肝癌TAE激活残存肿瘤血管生成可能是更为普遍的现象, 而VEGF在TAE相关性血管生成中发挥重要调节作用.

根据对不同处死时间点血管生成的观察, 我们发现TAE后6 h和3 d两组间的VEGF mRNA和蛋白水平存在显著性差异; 然而, 尽管两组间MVD在不同处死时间点均有差异, 但差异仅在TAE后3 d有统计学意义. 我们推测本结果可能与缺氧诱导血管生成的机制有关. 众所周知, VEGF是缺氧反应基因之一, 其表达受缺氧诱导, 反应迅速, 并可持续高水平表达直到缺氧刺激解除[20]. 肝癌TAE后残存肿瘤细胞由于血供相对减少而处于缺血缺氧状态, 存活的肿瘤细胞可以感受缺氧并上调VEGF基因表达. 本实验显示VEGF在TAE后6 h及3 d的高表达很可能是TAE产生的肿瘤内缺氧引起的. 相比之下, MVD作为血窦毛细血管化的标志, 代表血管化程度. 肝癌中的血管生成同样遵循血管生成的基本原理, 即包括内皮细胞的激活、增殖和迁移, 以及后续的新生肿瘤血管的形成、稳定和成熟, 该过程通常需要在受到血管源性因子的调节后数小时才能完成[5]. 本实验显示MVD的动态变化, 很可能与检测时间点的选择有关. 很可能6 h期限不足以让残存肝癌形成足够数量的新生血管, 而3 d代表适合的时间点采用免疫组织化学方法检测肿瘤新生血管化情况.

另外, 本研究发现大量VEGF阳性细胞位于肿瘤坏死区周围, 进一步证实了VEGF的过表达与TAE产生的肿瘤内缺氧有关, 因为研究已经证实肿瘤坏死周围区域距离血管最远, 代表最大程度的缺氧[21]. 然而在肿瘤边缘也可见到成簇的VEGF阳性细胞. 我们认为这种现象与TAE诱导缺氧肿瘤VEGF表达的推断并不矛盾, 因为研究发现可变的缺氧带可出现在远离坏死的肿瘤区域[22]. 是否这些出现VEGF阳性表达的肿瘤边缘区域存在缺氧; 或是否有独立于缺氧的其他因素(如生长因子、细胞因子和激素等)作用导致VEGF在这些区域表达[23], 有待进一步研究证实. 另一方面, 本研究显示肿瘤新生血管密集区主要位于肿瘤对外侵犯缘, 该发现可能与VEGF是通过旁分泌方式刺激肿瘤血管生成的机制有关[24].

总之, 本研究结果表明肝癌TAE可诱导残存肿瘤VEGF过表达, 进而促进肿瘤新生血管形成. 这可能对TAE治疗肝癌的疗效产生负面影响. 因此, 有必要采用TAE与抗血管生成的综合治疗策略, 以提高肝癌介入疗效.

■同行评价

本研究选题新颖, 设计合理, 对进一步提高原发性肝癌的治疗效果具有一定的指导意义.

4 参考文献

1 Brown DB, Gould JE, Gervais DA, Goldberg SN, Murthy R, Millward SF, Rilling WS, Geschwind JF, Salem R, Vedantham S, Cardella JF, Soulen MC. Transcatheter therapy for hepatic malignancy: standardization of terminology and reporting criteria. *J Vasc Interv Radiol* 2007; 18: 1469-1478

2 Lee JK, Chung YH, Song BC, Shin JW, Choi WB, Yang SH, Yoon HK, Sung KB, Lee YS, Suh DJ. Recurrences of hepatocellular carcinoma following initial remission by transcatheter arterial chemoembolization. *J Gastroenterol Hepatol* 2002; 17: 52-58

3 Liou TC, Shih SC, Kao CR, Chou SY, Lin SC, Wang HY. Pulmonary metastasis of hepatocellular carcinoma associated with transarterial chemoembolization. *J Hepatol* 1995; 23: 563-568

4 Breedis C, Young G. The blood supply of neoplasms in the liver. *Am J Pathol* 1954; 30: 969-977

5 Semela D, Dufour JF. Angiogenesis and hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 2004; 41: 864-880

6 Yamaguchi R, Yano H, Iemura A, Ogasawara S, Haramaki M, Kojiro M. Expression of vascular endothelial growth factor in human hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 1998; 28: 68-77

7 Weidner N, Semple JP, Welch WR, Folkman J. Tumor angiogenesis and metastasis--correlation in invasive breast carcinoma. *N Engl J Med* 1991; 324: 1-8

8 Schmittgen TD, Zakrajsek BA, Mills AG, Gorn V, Singer MJ, Reed MW. Quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction to study mRNA decay: comparison of endpoint and real-time methods. *Anal Biochem* 2000; 285: 194-204

9 Liapi E, Georgiades CC, Hong K, Geschwind JF. Transcatheter arterial chemoembolization: current technique and future promise. *Tech Vasc Interv Radiol* 2007; 10: 2-11

10 Goseki N, Nosaka T, Endo M, Koike M. Nourishment of hepatocellular carcinoma cells through the portal blood flow with and without transcatheter arterial embolization. *Cancer* 1995; 76: 736-742

11 Kim HC, Chung JW, Lee W, Jae HJ, Park JH. Recognizing extrahepatic collateral vessels that supply hepatocellular carcinoma to avoid complications of transcatheter arterial chemoembolization. *Radiographics* 2005; 25 Suppl 1: S25-S39

12 Charnsangavej C, Chuang VP, Wallace S, Soo CS, Bowers T. Angiographic classification of hepatic arterial collaterals. *Radiology* 1982; 144: 485-494

13 Kim YB, Park YN, Park C. Increased proliferation activities of vascular endothelial cells and tumour cells in residual hepatocellular carcinoma following transcatheter arterial embolization. *Histopathology*

2001; 38: 160-166
14 Li X, Feng GS, Zheng CS, Zhuo CK, Liu X. Expression of plasma vascular endothelial growth factor in patients with hepatocellular carcinoma and effect of transcatheter arterial chemoembolization therapy on plasma vascular endothelial growth factor level. *World J Gastroenterol* 2004;10:2878-2882
15 Suzuki H, Mori M, Kawaguchi C, Adachi M, Miura S, Ishii H. Serum vascular endothelial growth factor in the course of transcatheter arterial embolization of hepatocellular carcinoma. *Int J Oncol* 1999; 14: 1087-1090
16 Liao XF, Yi JL, Li XR, Deng W, Yang ZF, Tian G. Angiogenesis in rabbit hepatic tumor after transcatheter arterial embolization. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 1885-1889
17 Gupta S, Kobayashi S, Phongkitkarun S, Broemeling LD, Kan Z. Effect of transcatheter hepatic arterial embolization on angiogenesis in an animal model. *Invest Radiol* 2006; 41: 516-521
18 Wang B, Xu H, Gao ZQ, Ning HF, Sun YQ, Cao GW. Increased expression of vascular endothelial growth factor in hepatocellular carcinoma after transcatheter arterial chemoembolization. *Acta Radiol* 2008; 49: 523-529
19 Li X, Feng GS, Zheng CS, Zhuo CK, Liu X. Influence of transarterial chemoembolization on angiogenesis and expression of vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor in rat with Walker-256 transplanted hepatoma: an experimental study. *World J Gastroenterol* 2003; 9: 2445-2449
20 Shweiki D, Neeman M, Itin A, Keshet E. Induction of vascular endothelial growth factor expression by hypoxia and by glucose deficiency in multicell spheroids: implications for tumor angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; 92: 768-772
21 Kaur B, Khwaja FW, Severson EA, Matheny SL, Brat DJ, Van Meir EG. Hypoxia and the hypoxia-inducible-factor pathway in glioma growth and angiogenesis. *Neuro Oncol* 2005; 7: 134-153
22 Helmlinger G, Yuan F, Dellian M, Jain RK. Interstitial pH and pO2 gradients in solid tumors in vivo: high-resolution measurements reveal a lack of correlation. *Nat Med* 1997; 3: 177-182
23 Hoeben A, Landuyt B, Highley MS, Wildiers H, Van Oosterom AT, De Bruijn EA. Vascular endothelial growth factor and angiogenesis. *Pharmacol Rev* 2004; 56: 549-580
24 Dumont DJ, Fong GH, Puri MC, Gradwohl G, Alitalo K, Breitman ML. Vascularization of the mouse embryo: a study of flk-1, tek, tie, and vascular endothelial growth factor expression during development. *Dev Dyn* 1995; 203: 80-92

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2009年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

汤姆森－路透公布 2008 年 *WJG* 影响因子 2.081

本刊讯 据汤姆森-路透科技信息集团2009-06-19发布《期刊引证报告》(*Journal Citation Reports*)的统计结果: *World Journal of Gastroenterology*(*WJG*)的总被引次数(TC): 10 822; 影响因子(IF): 2.081; 即年指数: 0.274; 论文数量: 1112; 半衰期: 3.1; 特征因子(EF): 0.05006. 特征因子这个指标是今年期刊引证报告里新加的一个指标. 与影响因子不同的是, 这个指标不仅考察了引文的数量, 而且考虑了施引期刊的影响力, 即: 某期刊如果越多地被高影响力的期刊引用, 则该期刊的影响力也越高. 正如Google考虑超链接的来源, 特征因子也充分考虑引文的来源, 并在计算中赋予不同施引期刊的引文以不同的权重. 特征因子分值的计算基于过去5年中期刊发表的论文在期刊引证报告统计当年的被引用情况. 与影响因子比较, 期刊特征因子分值的优点主要有: (1)特征因子考虑了期刊论文发表后5年的引用时段, 而影响因子只统计了2年的引文时段, 后者不能客观地反映期刊论文的引用高峰年份; (2)特征因子对期刊引证的统计包括自然科学和社会科学, 更为全面、完整; (3)特征因子的计算扣除了期刊的自引; (4)特征因子的计算基于随机的引文链接, 通过特征因子分值可以较为合理地测度科研人员用于阅读不同期刊的时间. 在55种国际胃肠病学和肝病学期刊中, *WJG*的EF, TC和IF分别名列第6, 9, 32位. (*WJG*编辑部主任: 程剑侠 2009-10-08)

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2009年10月8日; 17(28): 2887-2891
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

基础研究 BASIC RESEARCH

入肝血流阻断下射频消融后残余肿瘤细胞HIF-1α及PCNA的表达

韩建波, 仇毓东, 张炜炜, 陈 骏

韩建波, 南京市第二医院 江苏省南京市 210029
仇毓东, 张炜炜, 陈骏, 南京医科大学鼓楼临床医学院 南京市鼓楼医院 江苏省南京市 210029
韩建波, 硕士, 主要研究方向为肝脏肿瘤的微创和综合治疗.
作者贡献分布: 此课题由韩建波、仇毓东及张炜炜设计; 研究过程由韩建波与陈骏操作完成; 数据分析由韩建波与仇毓东完成; 论文写作由韩建波与仇毓东完成.
通讯作者: 仇毓东, 副教授, 210029, 江苏省南京市, 南京医科大学鼓楼临床医学院, 南京市鼓楼医院. yudongqiu510@163.com
电话: 025-83106666
收稿日期: 2009-07-15 修回日期: 2009-08-14
接受日期: 2009-08-17 在线出版日期: 2009-10-08

Expression of hypoxia-inducible factor-1α and proliferating cell nuclear antigen in the residual tumor in rabbits after radiofrequency ablation of VX2 liver tumor with hepatic inflow occlusion

Jian-Bo Han, Yu-Dong Qiu, Wei-Wei Zhang, Jun Chen

Jian-Bo Han, the Second Hospital of Nanjing, Nanjing 210029, Jiangsu Province, China
Yu-Dong Qiu, Wei-Wei Zhang, Jun Chen, Nanjing Drum Tower Hospital, Nanjing Medical University, Nanjing 210029, Jiangsu Province, China
Correspondence to: Professor Yu-Dong Qiu, Nanjing Drum Tower Hospital, Nanjing Medical University, Nanjing 210029, Jiangsu Province, China. yudongqiu510@163.com
Received: 2009-07-15 Revised: 2009-08-14
Accepted: 2009-08-17 Published online: 2009-10-08

Abstract

AIM: To evaluate the expression of hypoxia-inducible factor-1α (HIF-1α) and proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in the residual tumor in rabbits after radiofrequency ablation (RFA) of VX2 liver tumor with hepatic inflow occlusion.

METHODS: A rabbit VX2 liver tumor model was established by implantation of VX2 tumor fragment into the liver. The model rabbits were divided into two groups: rabbits undergoing RFA alone (control group) and those undergoing RFA with hepatic inflow occlusion (experimental group). Radiofrequency lesions were created *in vivo* using a cool-tip radiofrequency electrode (parameters: burn time, 8 min; power, 30 W). The animals were sacrificed one week later. HIF-1α and PCNA expression in the residual tumor was examined by immunohistochemistry.

RESULTS: The expression of HIF-1α in the residual tumor was weakly and moderately positive in 4 and 3 rabbits in the control group, respectively. In contrast, the number of rabbits showing weakly, moderately and strongly positive HIF-1α expression were 1, 2 and 4 in the experimental group, respectively. The expression intensity of HIF-1α protein in the residual tumor was significantly higher in the experimental group than in the control group ($P < 0.05$). The expression of PCNA in the residual tumor was weakly, moderately and strongly positive in 3, 2 and 2 rabbits in the control group, while the number of rabbits showing weakly, moderately and strongly positive PCNA expression were 2, 4 and 1 in the experiment group, respectively. No significant difference was noted in the expression intensity of PCNA in the residual tumor between the two groups.

CONCLUSION: HIF-1α expression is upregulated in the residual tumor in rabbits after RFA of VX2 liver tumor with hepatic inflow occlusion, which may have an impact on the invasion and metastasis of residual tumor.

Key Words: Radiofrequency ablation; Hepatic inflow occlusion; VX2; Hypoxia-inducible factor-1α; Proliferating cell nuclear antigen

Han JB, Qiu YD, Zhang WW, Chen J. Expression of hypoxia-inducible factor-1α and proliferating cell nuclear antigen in the residual tumor in rabbits after radiofrequency ablation of VX2 liver tumor with hepatic inflow occlusion. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2009; 17(28): 2887-2891

摘要

目的: 评价血流阻断射频术后残余肿瘤细胞的缺氧诱导因子-1α(HIF-1α)及细胞增殖核抗

■**背景资料**
射频消融是一种局部热疗措施, "热流失效应"影响射频毁损灶的大小. 入肝血流阻断联合射频可以减少"热流失"效应, 扩大消融范围, 但术中将会因为阻断入肝血流而发生"缺血再灌注损伤".

■**同行评议者**
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

■相关报道
van der Bilt *et al*研究发现, 缺血再灌注后肿瘤周围微环境将会发生失平衡, 对术后残余肿瘤生长和转移有一定的促进作用, 其可能与HIF-1α的表达密切相关.

原(PCNA)的表达.

方法: 兔VX2肝肿瘤接种成功后分为2组: 单独射频组和射频联合入肝血流阻断组(联合射频组). 射频采用冷循环射频消融治疗(参数设定为30 W、8 min); 联合射频组的消融同单独组, 在射频消融同时采用Pringle法射阻断入肝血流. 1 wk后处死动物, 通过免疫组织化学方法检测肿瘤细胞HIF-1α及PCNA的表达.

结果: 射频术后HIF-1α的表达: 单独射频组弱阳性(+)4例, 阳性(++)3例; 联合射频组弱阳性(+)1例, 阳性(++)2例, 强阳性(+++)4例; 联合射频组残余肿瘤细胞HIF-1α的表达水平较单独射频组高, 且差异有统计学意义(P<0.05). 射频术后PCNA的表达: 单独射频组弱阳性(+)3例, 阳性(++)2例, 强阳性(+++)2例; 联合射频组弱阳性(+)2例, 阳性(++)4例, 强阳性(+++)1例; 联合射频组残余肿瘤细胞PCNA的表达与单独射频组之间差异无统计学意义.

结论: 射频联合血流阻断增加射频后残留肿瘤细胞HIF-1α的表达, 其可能影响残余肿瘤细胞的侵袭和转移.

关键词: 射频消融; 血流阻断; VX2; 缺氧诱导因子-1α; 细胞增殖核抗原

韩建波, 仇毓东, 张炜炜, 陈骏. 入肝血流阻断下射频消融后残余肿瘤细胞HIF-1α及PCNA的表达. 世界华人消化杂志 2009; 17(28): 2887-2891
http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/2887.asp

0 引言

射频消融是一种局部热疗措施, “热流失效应”影响射频毁损灶的大小, 研究发现, 入肝血流阻断可以减少热流失[1-4], 扩大消融范围, 但是术中将会因为阻断入肝血流而发生“缺血再灌注损伤”. van der Bilt *et al*研究[5]发现, 缺血再灌注后肿瘤周围微环境将会发生失平衡, 对术后残余肿瘤生长和转移有一定的促进作用. 进一步研究发现, 微环境的失平衡与肿瘤周围的缺氧及其缺氧诱导因子-1α(hypoxia-inducible factor-1α, HIF-1α)的表达密切相关. 但是, 以往对于入肝血流阻断下局部消融治疗后残余肿瘤细胞的生物学改变研究较少, 本研究目的是了解入肝血流阻断下进行射频消融后, 残余肿瘤细胞内反应缺血再灌注损伤的HIF-1α及细胞增殖的细胞增殖核抗原(proliferating cell nuclear antigen, PCNA)变化, 初步探讨对血流阻断联合射频术后残余肿瘤复发转移的影响.

1 材料和方法

1.1 材料 新西兰大白兔14只, 雌雄不限, 体质量为2.6-3.2 kg, 由南京大学附属鼓楼医院动物中心提供. 荷瘤VX2种兔由东南大学附属中大医院放射科滕皋军教授惠赠. 冷循环射频治疗仪(Cool-tip RF system)由美国Radionics公司制造. 小鼠抗兔HIF-1α mAb购自美国Abcam公司, 小鼠抗兔PCNA mAb购自武汉博士德生物工程有限公司, PV-6002非生物素二步法免疫组织化学试剂盒购自北京中山金桥生物工程公司.

1.2 方法

1.2.1 兔VX2肝肿瘤模型的建立: 氯胺酮与氟哌利多(1∶1)静脉麻醉荷瘤种兔, 无菌条件下取出VX2肿瘤, 于超净台剔除瘤周组织、肿瘤包膜和坏死组织, 选取靠近瘤体边缘的质嫩灰白色鱼肉样组织, 用眼科剪剪成约1.5 mm×1.5 mm×1.5 mm大小的瘤块备用. 参照文献[6]中的方法, 略加改进. 6 mL氯胺酮与6 mL氟哌利多加入500 mL生理盐水中静脉滴入维持麻醉, 麻醉成功后取仰卧位固定, 常规上腹部剪毛、备皮及消毒, 经腹白线正中切口进腹, 暴露肝脏左前叶, 轻压腹部将其挤出, 用盐水纱布拉出体外. 将2-3块备用瘤组织塞入16号针头, 后接1 mL注射器, 在距肝脏下缘约1.0-1.5 cm处斜向下插入约1.5 cm. 将瘤组织注入后拔出, 盐水纱布压迫至不再出血后用1号丝线两层关腹. 所有实验动物术前12 h禁食、不禁水. 术后连续3 d后肢肌肉注入青霉素40万单位、硫酸阿米卡星0.1 g预防感染.

1.2.2 分组和操作: 2 wk后种植VX2兔肝脏可形成直径约1.5 cm的单发肿瘤, 模型建立成功后随机分为2组: 单独射频组和射频联合肝脏血流阻断组(联合射频组).

术前准备及麻醉同上, 兔双后肢内侧备皮后贴电极板, 上腹部常规消毒、铺巾, 原切口进腹. 冷盐水纱布将荷瘤肝叶与周围的脏器分开. 射频采用射频针垂直插入肿瘤中心, 射频参数设定为30 W、8 min, 肝脏血流阻断采用Pringle法即绕扎肝十二指肠韧带阻断入肝血流. 确定无活动性出血及周围脏器损伤后关腹. 射频术后腹腔灌洗生理盐水50 mL补充丢失的水分. 术后抗生素应用同上.

1.2.3 HE染色及免疫组织化学检查: 术后1 wk处死动物, 切取荷瘤肝叶置于40 g/L甲醛中固定至少24 h. 将石蜡包埋标本切成5 μm厚的组织片,

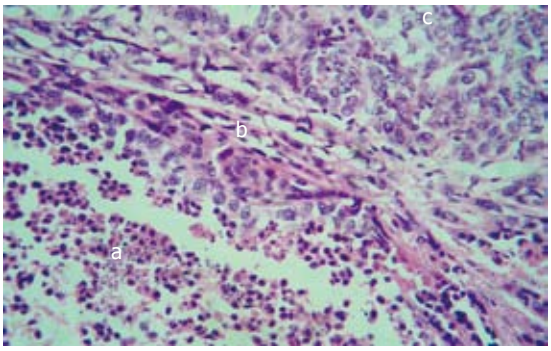


图 1 射频术后肿瘤组织学(HE × 100). a: 毁损肿瘤细胞; b: 边缘带; c: 残余肿瘤细胞.

常规病理切片行HE染色及免疫组织化学检查. 石蜡切片于梯度二甲苯中脱蜡, 梯度酒精至水; 30 mL/L H_2O_2去离子水中孵育10 min, 以阻断内源性过氧化物酶; 微波炉内抗原热修复; 滴加适当比例稀释的小鼠抗兔HIF-1α及PCNA mAb 50 μL, 4℃过夜; 滴加山羊抗小鼠IgG抗体-HRP多聚体, 37℃孵育20 min; DAB显色, 显微镜下控制显色时间; 以上步骤均用PBS冲洗3次, 每次2 min. 每张切片在镜下对残余肿瘤组织进行免疫组织化学评分. 高倍镜下观察肿瘤细胞以胞核出现棕色或棕黄色为阳性细胞, 无论其颜色深浅均认为阳性细胞, 无棕色或棕黄色的为阴性细胞. HIF-1α及PCNA的表达根据染色强度和阳性细胞数分为4级: 阴性(-): 无阳性细胞; 弱阳性(+): 细胞轻度着色染成淡黄色, 阳性细胞数<25%; 阳性(++): 细胞着色成黄色, 阳性细胞数25%-50%; 强阳性(+++): 细胞明显着色, 呈棕黄色, 阳性细胞数>50%.

统计学处理 采用SPSS11.5统计学软件进行分析, HIF-1α及PCNA的表达差异采用秩和检验, $P<0.05$认为具有统计学意义.

2 结果

2.1 *病理学变化* 毁损肿瘤细胞与残余肿瘤细胞之间的边缘带内可见大量红染的纤维结缔组织. 残余肿瘤细胞呈癌巢聚集, 细胞形态不规则, 结构完整, 胞质很少, 胞核较大, 呈圆形或椭圆形, 核内可见深染的染色质. 毁损肿瘤细胞基本的细胞结构消失, 胞核浓缩深染, 核内见不到染色质, 胞质模糊一片红染(图1).

2.2 *射频术后残余肿瘤细胞HIF-1α及PCNA的表达* HIF-1α染色阳性细胞为肿瘤细胞核内出现棕色或棕黄色颗粒. HIF-1α主要在肿瘤组织中表达, 其主要位于肿瘤细胞核中(图2). 在残余肿瘤组织中的HIF-1α表达不均匀, 靠近毁损灶周边的肿瘤细胞HIF-1α表达最强. 射频术后HIF-1α的表达: 单独射频组弱阳性(+)4例, 阳性(++)3例; 联合射频组弱阳性(+)1例, 阳性(++)2例, 强阳性(+++)4例; 联合射频组残余肿瘤细胞HIF-1α的表达明显强于单独射频组残余肿瘤细胞, 且两者之间差异有统计学意义($P = 0.025$). 残余肿瘤细胞中细胞核有黄色标志物的为PCNA阳性细胞(图3). 射频术后PCNA的表达: 单独射频组弱阳性(+)3例, 阳性(++)2例, 强阳性(+++)2例; 联合射频组弱阳性(+)2例, 阳性(++)4例, 强阳性(+++)1例; 本实验研究发现两治疗组残余肿瘤细胞的增殖活性之间的差异没有统计学意义($P = 0.945$, 表1).

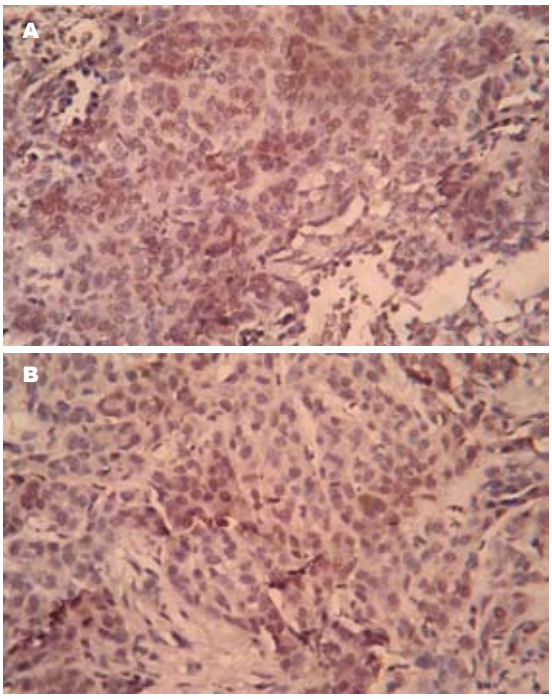


图 2 射频术后残余肿瘤细胞HIF-1α的表达(× 100). A: 实验组; B: 对照组.

3 讨论

恶性肿瘤射频的局部复发率为2%-60%[7], 肿瘤大于3-4 cm、血管周围的肿瘤、肿瘤多发是肿瘤复发的危险因素[7-8], 肿瘤的复发被解释为肿瘤的局部消融不完全. 实验证明Pringle联合射频将会增加射频的毁损面积, 减少肿瘤的局部残留, 但是因为残余的肿瘤细胞都被留在体内, Pringle联合射频对于射频后残余肿瘤细胞的生物学影响研究较少. Pringle法是阻断肝十二指肠韧带, 其后将会发生I/R即缺血再灌注, 动物实验表明缺血再灌注是肝脏肿瘤生长和转移的一个

■创新盘点
本实验从微观评价了血流阻断联合射频治疗这一手术方式对残余肿瘤细胞的影响.

■同行评价
本实验设计较科学，数据可靠，方法传统恰当，文章的科学性、创新性和可读性较好地反映了我国肿瘤病学临床和基础研究的先进水平.

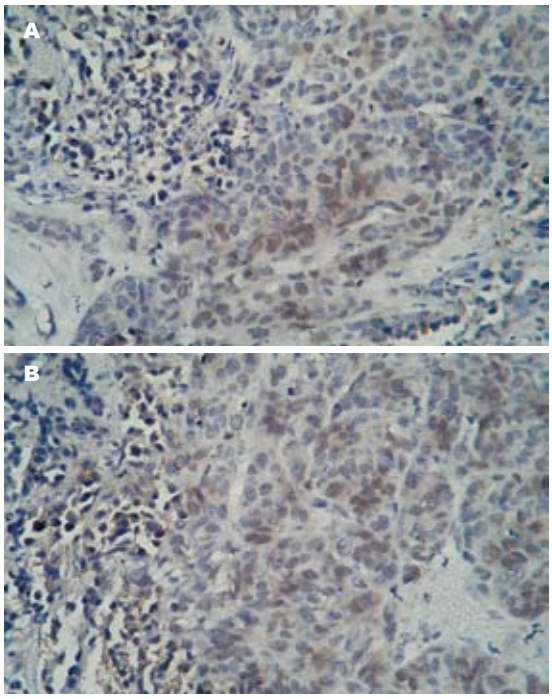


图 3 射频术后残余肿瘤细胞PCNA的表达(×100). A: 实验组; B: 对照组.

重要刺激因素[9]. 同时van der Bilt *et al*[5]发现缺血再灌注术后的肿瘤生长和转移与长时间的肿瘤周围微循环的失平衡有关, 与肿瘤周围的缺氧及其HIF-1α的表达有关. 我们的研究目的即是血流阻断Pringle联合射频是否改变残余肿瘤的相关因子的变化.

HIF-1α是低氧条件下具有转录活性的一类核转录因子, 对缺氧反应基因的转录和激活发挥关键作用, 进而对缺氧状态下血管生成起核心调控作用, HIF-1α参与肿瘤血管生成以及细胞能量代谢等. 在肿瘤的进展和转移中HIF-1α的表达发挥重要作用. PCNA是一种细胞周期特异性相关蛋白, 相对分子质量为36 kDa, 在调节DNA合成和细胞增殖方向起重要作用. 因此, PCNA作为细胞周期的内源性组织标志物, 是反映细胞增殖活性的指标.

本研究表明, HIF-1α在射频后残余肿瘤组织中的表达不均匀, 靠近毁损灶周边的肿瘤细胞HIF-1α表达最强, 这在文献[10-11]中也是有所报道的. 联合射频后残余肿瘤细胞HIF-1α的表达明显强于单独射频组残余肿瘤细胞, 且两者之间差异有统计学意义(P = 0.025). 因此, 血流阻断后射频将会导致残余肿瘤细胞的HIF-1α高表达, HIF-1α的高表达进而调控VEGF的表达增加, 促进肿瘤微血管生成, 从而使残留肿瘤得以生存并促进肿瘤的侵袭和转移, 而HIF-1α的高表达往往是和肿瘤的高侵袭性相关的.

表 1 射频术后残余肝肿瘤细胞HIF-1α及PCNA的表达情况 (n = 7)

分组	HIF-1α表达				PCNA表达			
	−	+	++	+++	−	+	++	+++
单独射频组	0	4	3	0	0	3	2	2
联合射频组	0	1	2	4	0	2	4	1

我们的结论就是如果Pringle联合射频, 肿瘤仍然不能完全被毁损, 残余肿瘤细胞的生物学特性将会发生改变, 这将会导致肿瘤的侵袭和远处转移. 我们的建议是Pringle联合射频消融仅仅用在肿瘤可以完全被毁损, 同时保证一定的安全边缘的情况时. 同时van der Bilt *et al*[5]发现防止缺血再灌注后引起的微环境失平衡, 防止HIF-1α的高表达, 可以降低肿瘤的复发和转移, 其应用17-DMAG减少局部HIF-1α的表达, 可以减少I/R引起的肿瘤侵袭和转移. 肝癌的综合治疗可以提高射频疗效, 这包括射频治疗和针对HIF-1α的生物学治疗相结合. 针对HIF-1α的靶点逐渐被认为是理想的药物靶点[12-13], 包括近年的索拉非尼等用于晚期肝癌患者的药物, 这是否可以在手术前用, 从而减少缺血再灌注引起的肿瘤生长和转移, 这仍需进一步探索. 因为HIF-1α仍然在一些生理反应中有一定作用, 如果应用针对HIF-1α的相应治疗措施, 可能会影响手术后切口及吻合口的愈合, 进而增加死亡率, 更多的实验需要研究这在手术前后应用的可行性.

4 参考文献

1 Rossi S, Garbagnati F, De Francesco I, Accocella F, Leonardi L, Quaretti P, Zangrandi A, Paties C, Lencioni R. Relationship between the shape and size of radiofrequency induced thermal lesions and hepatic vascularization. *Tumori* 1999; 85: 128-132
2 Wiersinga WJ, Jansen MC, Straatsburg IH, Davids PH, Klaase JM, Gouma DJ, van Gulik TM. Lesion progression with time and the effect of vascular occlusion following radiofrequency ablation of the liver. *Br J Surg* 2003; 90: 306-312
3 Chinn SB, Lee FT Jr, Kennedy GD, Chinn C, Johnson CD, Winter TC 3rd, Warner TF, Mahvi DM. Effect of vascular occlusion on radiofrequency ablation of the liver: results in a porcine model. *AJR Am J Roentgenol* 2001; 176: 789-795
4 Chang CK, Hendy MP, Smith JM, Recht MH, Welling RE. Radiofrequency ablation of the porcine liver with complete hepatic vascular occlusion. *Ann Surg Oncol* 2002; 9: 594-598
5 van der Bilt JD, Soeters ME, Duyverman AM, Nijkamp MW, Witteveen PO, van

Diest PJ, Kranenburg O, Borel Rinkes IH. Perinecrotic hypoxia contributes to ischemia/reperfusion-accelerated outgrowth of colorectal micrometastases. *Am J Pathol* 2007; 170: 1379-1388
6 Chen JH, Lin YC, Huang YS, Chen TJ, Lin WY, Han KW. Induction of VX2 carcinoma in rabbit liver: comparison of two inoculation methods. *Lab Anim* 2004; 38: 79-84
7 Mulier S, Ni Y, Jamart J, Ruers T, Marchal G, Michel L. Local recurrence after hepatic radiofrequency coagulation: multivariate meta-analysis and review of contributing factors. *Ann Surg* 2005; 242: 158-171
8 Bleicher RJ, Allegra DP, Nora DT, Wood TF, Foshag LJ, Bilchik AJ. Radiofrequency ablation in 447 complex unresectable liver tumors: lessons learned. *Ann Surg Oncol* 2003; 10: 52-58
9 van der Bilt JD, Kranenburg O, Nijkamp MW, Smakman N, Veenendaal LM, Te Velde EA, Voest EE, van Diest PJ, Borel Rinkes IH. Ischemia/reperfusion accelerates the outgrowth of hepatic micrometastases in a highly standardized murine model. *Hepatology* 2005; 42: 165-175
10 Talks KL, Turley H, Gatter KC, Maxwell PH, Pugh CW, Ratcliffe PJ, Harris AL. The expression and distribution of the hypoxia-inducible factors HIF-1alpha and HIF-2alpha in normal human tissues, cancers, and tumor-associated macrophages. *Am J Pathol* 2000; 157: 411-421
11 Maxwell PH, Dachs GU, Gleadle JM, Nicholls LG, Harris AL, Stratford IJ, Hankinson O, Pugh CW, Ratcliffe PJ. Hypoxia-inducible factor-1 modulates gene expression in solid tumors and influences both angiogenesis and tumor growth. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94: 8104-8109
12 Semenza GL. Development of novel therapeutic strategies that target HIF-1. *Expert Opin Ther Targets* 2006; 10: 267-280
13 Melillo G. HIF-1: a target for cancer, ischemia and inflammation--too good to be true? *Cell Cycle* 2004; 3: 154-155

编辑 李军亮 电编 何基才

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2009年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

世界华人消化杂志修回稿须知

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

1 修回稿信件

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

2 稿件修改

来稿经同行专家审查后, 认为内容需要修改、补充或删节时, 本刊编辑部将把原稿连同审稿意见、编辑意见寄回给作者修改, 而作者必须于15 d内将修改后的稿件及光盘寄回编辑部, 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. (科学编辑: 李军亮 2009-10-08)

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2009年10月8日; 17(28): 2892-2898
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

基础研究 BASIC RESEARCH

白藜芦醇下调线粒体DNA修复酶对重症急性胰腺炎大鼠胰腺腺泡细胞凋亡的影响

侯伊玲, 薄 海, 刘子泉, 夏时海

■背景资料
重症急性胰腺炎(SAP)病情危重, 病死率高. 近年来研究表明细胞凋亡与SAP病程及预后密切相关, SAP的严重程度与胰腺细胞的凋亡呈负相关, 诱导损伤的胰腺细胞凋亡可能成为治疗SAP的一种有效策略. 基础研究及临床实践表明, 白藜芦醇可通过多种途径对SAP发挥治疗效应. 有报道表明白藜芦醇可通过线粒体途径诱导肿瘤细胞凋亡, 因而通过线粒体途径诱导胰腺腺泡细胞凋亡可能是白藜芦醇对SAP治疗的一种途径.

侯伊玲, 天津武警医学院附属医院心血管内科 天津市 300162
薄海, 刘子泉, 天津武警医学院生理学与病理生理学教研室 天津市 300162
夏时海, 天津武警医学院附属医院消化科 天津市 300162
侯伊玲, 主治医师, 主要从事老年病防治研究.
国家自然科学基金资助项目, No. 30772883
作者贡献分布: 此课题由侯伊玲及夏时海设计; 研究过程由侯伊玲、薄海及刘子泉操作完成; 研究所用新试剂及分析工具由薄海与刘子泉提供; 数据分析由侯伊玲完成; 本论文写作由侯伊玲与夏时海完成.
通讯作者: 夏时海, 300162, 天津市河东区成林路, 天津武警医学院附属医院消化科. xiashihaiwj@126.com
电话: 022-60578765
收稿日期: 2009-08-10 修回日期: 2009-09-23
接受日期: 2009-09-28 在线出版日期: 2009-10-08

Resveratrol induces mitochondrial DNA repair enzyme downregulation and promotes pancreatic acinar cell apoptosis in rats with severe acute pancreatitis

Yi-Ling Hou, Hai Bo, Zi-Quan Liu, Shi-Hai Xia

Yi-Ling Hou, Department of Cardiology, the Hospital of Medical College of Chinese People's Armed Police Force, Tianjin 300162, China
Hai Bo, Zi-Quan Liu, Department of Physiology and Pathophysiology, Medical College of Chinese People's Armed Police Force, Tianjin 300162, China
Shi-Hai Xia, Department of Gastroenterology, the Hospital of Medical College of Chinese People's Armed Police Force, Tianjin 300162, China
Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30772883
Correspondence to: Shi-Hai Xia, Department of Gastroenterology, the Hospital of Medical College of Chinese People's Armed Police Force, Tianjin 300162, China. xiashihaiwj@126.com
Received: 2009-08-10 Revised: 2009-09-23
Accepted: 2009-09-28 Published online: 2009-10-08

Abstract

AIM: To investigate the relationship among pancreatic acinar cell apoptosis, mitochondrial apoptosis pathway and mitochondrial DNA repair enzyme in severe acute pancreatitis (SAP).

METHODS: Thirty Sprague-Dawley rats were randomly divided into sham operation group (n = 10), model control group (SAP rats induced by retrograde injection of sodium taurocholate, n = 10), and resveratrol treatment group (SAP rats injected with resveratrol, n = 10). Serum amylase and caspase-3 and -9 activity in pancreatic acinar cells were detected. The level of 8-oxodeoxyguanosine (8-oxodG) in mitochondrial DNA (mtDNA) was measured by high-pressure liquid chromatography (HPLC). Mitochondrial cross-membrane potential (ΔΨ) was measured by monitoring the fluorescence spectrum of rhodamine 123. Pancreatic acinar cell apoptosis was detected by flow cytometry. Cytochrome c release and mitochondrial 8-oxoguanine DNA glycosylase 1 (OGG1) protein expression were determined by Western blot. Pathological damage of pancreatic tissue was scored.

RESULTS: Serum amylase level, mitochondrial cross-membrane potential, mitochondrial OGG1 protein expression level and pancreatic pathological score were lower in the resveratrol treatment group than in the model control group (4761.98 ± 501.45 *vs* 7428.91 ± 526.49, 18.42 ± 2.04 *vs* 22.01 ± 2.93, 73.97 ± 6.49 *vs* 159.46 ± 12.85, and 5.74 ± 0.95 *vs* 12.95 ± 1.54, respectively; all P < 0.05). Pancreatic acinar cell apoptosis index, cytochrome c release, 8-oxodG level and caspase-3 and -9 activity were higher in the resveratrol treatment group than in the model control group (19.63 ± 2.07 *vs* 12.45 ± 1.93, 174.31 ± 15.93 *vs* 100 ± 0.00, 0.0590 ± 0.074 *vs* 0.0336 ± 0.0061, 2.37 ± 0.35 *vs* 1.95 ± 0.19, and 2.07 ± 0.25 *vs* 1.62 ± 0.15, respectively; all P < 0.05).

CONCLUSION: Resveratrol can reduce pancreatic pathological damage in SAP rats possibly by downregulating mitochondrial OGG1 protein expression and inducing pancreatic acinar cell apoptosis.

Key Words: Resveratrol; Severe acute pancreatitis; Apoptosis; OGG1; Mitochondrion

Hou YL, Bo H, Liu ZQ, Xia SH. Resveratrol induces mitochondrial DNA repair enzyme downregulation and promotes pancreatic acinar cell apoptosis in rats with

■同行评议者
宋振顺, 教授, 中国人民解放军第四军医大学西京医院肝胆外科; 陈海龙, 教授, 大连医科大学附属第一医院院办

severe acute pancreatitis. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2009; 17(28): 2892-2898

摘要

目的: 观察白藜芦醇对重症急性胰腺炎(SAP)胰腺细胞凋亡的影响, 探讨线粒体凋亡通路及线粒体DNA修复酶OGG1与SAP腺泡细胞凋亡的关系.

方法: 30只SD大鼠随机分为假手术组(Sham组, 只行开腹术, n = 10), SAP模型组(SAP组, 胆管逆行性注射牛黄胆酸钠制备SAP模型, n = 10), 白藜芦醇治疗组(Res组, SAP模型制作成功后, 注射白藜芦醇溶液, n = 10). 测定各组血清淀粉酶, caspase-3, -9活性, 高压液相色谱法测定线粒体DNA 8-氧鸟嘌呤(8-oxodG)含量, 罗丹明123法测定线粒体膜电位, 流式细胞法检测胰腺腺泡细胞凋亡, Western blot法测定细胞色素C释放及线粒体OGG1蛋白表达, 并对胰腺组织进行病理学评分.

结果: Res组与SAP组比较, 血清胰淀粉酶、线粒体膜电位、线粒体OGG1蛋白表达量及胰腺病理损害评分显著降低(4761.98±501.45 *vs* 7428.91±526.49, 18.42±2.04 *vs* 22.01±2.93, 73.97±6.49 *vs* 159.46±12.85, 5.74±0.95 *vs* 12.95±1.54, 均P<0.05). 胰腺腺泡细胞凋亡指数、线粒体细胞色素C释放、线粒体DNA 8-oxodG含量及caspase-3, -9的活性显著升高(19.63±2.07 *vs* 12.45±1.93, 174.31±15.93 *vs* 100±0.00, 0.0590±0.074 *vs* 0.0336±0.0061, 2.37±0.35 *vs* 1.95±0.19, 2.07±0.25 *vs* 1.62±0.15, 均P<0.05).

结论: 白藜芦醇通过下调胰腺腺泡细胞线粒体DNA修复酶OGG1, 增加SAP胰腺腺泡细胞凋亡以减轻胰腺组织病理损害, 对SAP具有治疗意义.

关键词: 白藜芦醇; 重症急性胰腺炎; 凋亡; 8–氧鸟嘌呤DNA糖基化酶; 线粒体

侯伊玲, 薄海, 刘子泉, 夏时海. 白藜芦醇下调线粒体DNA修复酶对重症急性胰腺炎大鼠胰腺腺泡细胞凋亡的影响. 世界华人消化杂志 2009; 17(28): 2892–2898
http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/2892.asp

0 引言

重症急性胰腺炎(severe acute pancreatitis, SAP)病情危重, 并发症多, 病死率高. 胰腺腺泡细胞损伤释放胰酶和炎症介质是其病情危重的关键因素. 近年来人们在SAP发病机制方面的研究注意到细胞凋亡与SAP病程及预后密切相关, 发现SAP的严重程度与胰腺细胞的凋亡呈负相关[1]. 诱导胰腺细胞凋亡可改善胰腺炎的病变发展, 而抑制胰腺细胞凋亡可加重胰腺炎的病变发展[2]. 提示细胞凋亡可能是SAP时宿主自身的保护性反应, 诱导损伤的胰腺细胞凋亡可能成为治疗SAP的一种有效策略. 白藜芦醇(3', 4', 5-三羟基-反-均二苯代乙烯)是中药大黄、虎杖等的活性成分, 具有抗炎、抗癌、诱导肿瘤细胞凋亡等多种药理特性, 其可通过多种途径对SAP发挥治疗效应[3]. 最近, Madan *et al*[4]报道, 白藜芦醇可通过线粒体途径诱导肿瘤细胞凋亡. 我们通过建立大鼠SAP模型, 观察白藜芦醇对SAP胰腺腺泡细胞凋亡的影响以及线粒体相关通路的变化规律, 从而探讨其治疗SAP的机制.

■研发前沿
诱导损伤的胰腺细胞凋亡治疗是治疗SAP的重要途径, 而线粒体结构功能与细胞凋亡发生密切相关, 白藜芦醇对相关通路的作用有待进一步研究.

1 材料和方法

1.1 材料 清洁级健康Sprague-Dawley大鼠30只, ♂, 体质量238-264 g, 由中国人民解放军军事医学科学院实验动物中心提供, 饲养温度为18℃-24℃, 相对湿度为55%-65%. 白藜芦醇、牛磺胆酸钠、8-oxodG标准品、罗丹明123(Sigma公司), caspase-3, -9 Colorimetric Assay Kit试剂盒(江苏碧云天生物技术研究所). 血清淀粉酶试剂盒(北京科美东雅生物技术有限公司). 线粒体DNA提取试剂盒(上海杰美基因医药科技公司). 细胞色素C、COXⅣ、OGG1和actin抗体、ECL发光底物(Santa Cruz公司). 辣根过氧化物酶标记的羊抗兔IgG(H+L)(TBD公司).

1.2 方法

1.2.1 分组及SAP模型制备: 实验大鼠随机分为白藜芦醇治疗组(RES组, n = 10)、SAP模型组(SAP组, n = 10)和假手术对照组(Sham组, n = 10). 各组大鼠术前禁食24 h, 禁水6 h. (1)Sham组: 仅进行开腹手术, 轻轻翻动十二指肠和胰腺数次后关腹; (2)SAP组: 按照本组前期方法[5], 腹腔注射4 g/L戊巴比妥拉钠(60 mg/kg体质量)腹腔麻醉, 上腹部正中切口进腹, 找到大鼠十二指肠和胆胰管后, 用无创血管夹夹闭胆胰管肝端, 用钝头针头经十二指肠浆膜层行胆胰管逆行穿刺, 穿刺成功后, 微量注射器逆行胆胰管内注射50 g/L牛磺胆酸钠(1 mL/kg体质量), 推注速度0.20 mL/min, 推药后用无创血管夹夹闭胆胰管入十二指肠处, 确认大鼠胃、十二指肠间的胰腺组织出现异常, 颜色变为砖红色或出现出血

■相关报道
前期研究表明，白藜芦醇可通过包括诱导胰腺腺泡细胞凋亡在内的多种机制改善SAP中胰腺的病理损伤. 如白藜芦醇能通过上调Bax、Bcl-2及FasL蛋白的表达，在SAP早期诱导胰腺细胞凋亡. 近几年线粒体DNA修复系统逐渐为研究者认识并重视，其与细胞凋亡发生在肿瘤细胞中有报道，但在SAP发生及治疗中的变化规律尚未见报道.

点后拔出针头，去除血管夹后关腹; (3)RES组: 具体操作同SAP组, 在SAP模型制备成功后5 min内将10 g/L白藜芦醇溶液(1 mL/kg体质量)通过阴茎背静脉注入. 术后15 min Sham组和SAP组以与RES组相同方式注射等体积无菌生理盐水. 制模后6 h大鼠麻醉下打开腹腔, 腹主动脉采血, 静置后离心, 留取血清-20℃保存待测淀粉酶; 迅速切取部分胰腺组织, 其中50 mg, -80℃保存待Western blot实验, 其余立即分离胰腺腺泡细胞和线粒体, 检测相关指标; 切取剩余部分胰腺组织, 置于10%中性磷酸盐缓冲液-甲醛中固定, 石蜡包埋.

1.2.2 指标检测: (1)血清淀粉酶测定: 严格按照试剂盒说明书操作, CX9全自动生化分析仪(Beckman公司)检测血清淀粉酶. (2)胰腺组织病理学评分: 胰腺组织蜡块行4 μm连续切片, 常规苏木素-伊红(HE)染色. 请两名病理医师按双盲法分别阅片, 每片随机选取5个高倍视野(200倍), 参照Sha *et al*[6]镜下病理评分标准对5个单项(水肿、炎性细胞浸润、脂肪坏死、实质坏死、出血灶)进行评分, 5项之和为该标本的病理学评分. (3)胰腺腺泡细胞提取: 参照文献[7], 新鲜胰腺组织迅速放入由4% BSA加0.2 g/L Ⅺ型胶原酶配成的消化液5 mL中, 眼科剪剪碎胰组织, 消化10 min后离心3 min(500 r/min), 弃上清, 收集沉积物PBS液反复清洗3次, 通过200目的铜网过滤和离心(100 *g*离心)共3次分离得到胰腺腺泡细胞. (4)胰腺腺泡细胞线粒体制备: 参照本组前期方法[8], 将胰腺腺泡细胞800 *g*离心5 min. 弃沉淀, 上清液于12 000 *g*离心10 min. 沉淀用介质(120 mmol/L KCl, 20 mmol/L Hepes, 5 mmol/L $MgCl_2$, 1 mmol/L EDTA, pH7.4)悬浮, 以上操作均在冰浴中进行. 线粒体蛋白含量用考马斯亮蓝法测定. (5)流式细胞法检测胰腺腺泡细胞凋亡指数: 取胰腺腺泡细胞, 用冷PBS调至细胞为5×10^6/L. 加入0.8 mL含RNase的碘化丙啶(PI), 4℃避光15 min. 流式细胞仪检测腺泡细胞凋亡率. (6)线粒体膜电位(ΔΨ)测定: 参照本组前期方法[8], 采用罗丹明123(Rhodamine123)作为荧光探针测定. 在2 mL反应介质(0.25 mol/L Succose, 3.0 mmol/L Hepes, 0.5 mmol/L EDTA, pH7.4)内加入2 μL的0.8 μmol/L Rhodamine123, 荧光分光光度计上设定激发波长500 nm、发射波长525 nm, 检测基础荧光值F1, 测定加入0.5 mg线粒体, 25℃孵育15 min, 测定荧光值F2, 计算ΔF = (F1-F2), 即用线粒体跨膜电位淬灭Rhodamine123的荧光强度量反映ΔΨ. (7)线粒体DNA 8-氧鸟嘌呤(8-oxodG)含量测定: 严格按照试剂盒说明书提取mtDNA. 参照文献[9], 高效液相色谱法(HPLC)检测mtDNA中8-oxodG含量. 色谱柱采用粒径4 μm的C_{18}反相柱(250 mm×4.6 mm), 流动相采用6%甲醇, 12.5 mmol/L柠檬酸, 30 mmol/L氢氧化钠, 25 mmol/L醋酸钠, 10 mmol/L醋酸, 流速0.8 mL/min, 检测波长为260 nm. 称取8-oxodG标准品制备标准应用液, 上述同样条件绘制标准曲线. 计算各样品中8-oxodG的浓度(mg/L). (8)caspase-3, -9活性测定: 严格按照按试剂盒说明书操作, 将提取的胰腺腺泡细胞加入10倍体积的低张力缓冲液, 冰上裂解20 min, 4℃ 3000 *g*离心5 min, 取上清, 4℃ 10 000 *g*离心20 min, 取上清, 考马斯亮蓝法测定蛋白含量, 280 nm下读取吸光度值. 再加入1 mL蛋白分析缓冲液和20 μL caspase底物, 37℃避光水浴2 h, 405 nm下读取吸光度值. caspase活性 = A_{405nm}/A_{280nm}.

1.2.3 Western blot法检测细胞色素C的释放: 参照文献[10], 提取细胞质(含细胞核)将提取的胰腺腺泡细胞悬液低速离心于2000 *g*离心5 min, 使细胞沉淀, 加入500 μL细胞裂解液(250 mmol/L蔗糖, 50 mmol/L Tris-HCl, 1 mmol/L EDTA, 1 mmol/L EGTA, 1 mmol/L二硫苏糖醇, 1 mmol/L PMSF, pH7.4), 冰上裂解30 min, 超声(3-5 s/次, 3次)破碎细胞, 冰浴5 min, 4℃ 10 000 *g*离心20 min, 取上清, 考马斯亮蓝法测定蛋白含量. 10 μg蛋白质样品经15% SDS-PAGE分离后, 转移于PVDF膜上. 1∶1000兔抗大鼠细胞色素C抗体4℃静置孵育过夜, PBS洗涤3次, 再以1∶1000辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG(H+L)抗体室温孵育1 h, PBS充分洗涤后, 在暗室使用ECL试剂盒发光显影, X光胶片压片曝光. 采用ChampGel 2000凝胶系统分析软件, 扫描定量各条带的相对灰度值, 以SAP组条带灰度值为100%, 其他两组条带灰度值与对照组条带灰度值的比值, 即为其相对表达量(%).

1.2.4 Western blot法检测腺泡细胞线粒体OGG1蛋白表达量: 将提取的胰腺腺泡细胞或线粒体根据样品浓度不同加入2×SDS上样缓冲液, 混合液100℃加热5 min, 冰浴冷却. SDS-PAGE凝胶电泳及Western杂交条件同方法1.2.3. 以Sham组条带灰度值为100%, 其他两组条带灰度值与Sham条带灰度值的比值, 即为其相对表达量(%).

统计学处理 采用SPSS11.0统计分析软件进行处理, 所有结果均以mean±SD表示, 样本间均

表 1 各组血清淀粉酶、ΔΨ和线粒体DNA 8-oxodG含量比较 (mean ± SD)

分组	血清淀粉酶(U/L)	ΔΨ	8-oxodG(mg/L)
Sham组	995.25 ± 106.25	25.72 ± 2.35	0.0031 ± 0.0005
SAP组	7428.91 ± 526.49[b]	22.01 ± 2.93[a]	0.0336 ± 0.0061[b]
RES组	4761.98 ± 501.45[ac]	18.42 ± 2.04[ac]	0.0590 ± 0.0074[bc]

[a]P<0.05, [b]P<0.01 *vs* Sham组; [c]P<0.05 *vs* SAP组.

■创新盘点
本研究发现, 白藜芦醇可能通过抑制OGG1等线粒体DNA修复酶的修复能力, 增加mtDNA损伤, 引起线粒体功能障碍, 从而激活线粒体凋亡途径, 以诱导损伤胰腺腺泡细胞凋亡, 从而达到对SAP的治疗效果.

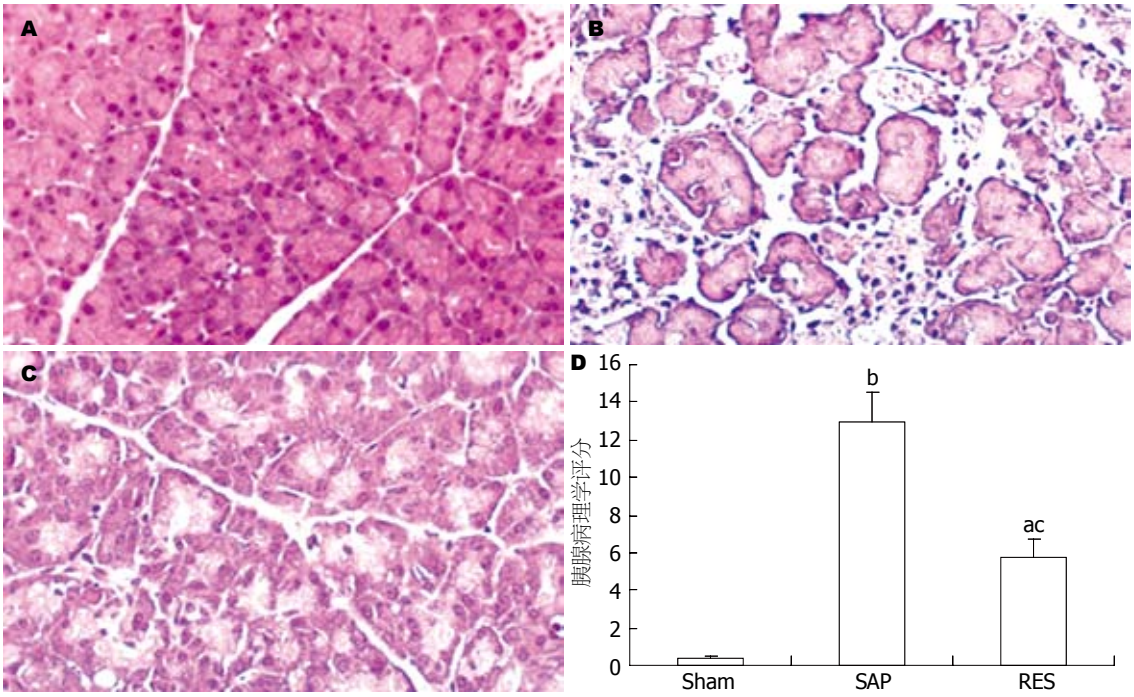


图 1 各组大鼠胰腺病理学变化及评分. A: Sham组; B: SAP组; C: RES组; D: 各组病理评分比较. [a]P<0.05, [b]P<0.01 *vs* Sham组; [c]P<0.05 *vs* SAP组.

数比较采用单因素方差分析, P<0.05为具有统计学意义.

2 结果

2.1 白藜芦醇对SAP各项指标的影响 与Sham组比较, SAP组和RES组血浆淀粉酶及线粒体DNA 8-oxodG含量均显著升高, 而ΔΨ显著降低. 与SAP组比较, RES组血浆淀粉酶水平及ΔΨ显著降低, 而8-oxodG含量均显著升高(表1).

2.2 光镜下胰腺组织病理学改变 Sham组胰腺未见炎性改变, 腺泡细胞形态结构正常, 排列紧密. SAP组胰腺大量炎性细胞浸润, 可见部分腺泡结构消失, 小叶结构破坏, 细胞核大量固缩、溶解, 实质出血, 血管扩张, 可见片状脂肪变性、坏死. RES组胰腺组织充血、水肿、炎症细胞浸润、脂肪变性等均较SAP组明显减轻(图1).

2.3 白藜芦醇对SAP腺泡细胞凋亡相关指标的影响 与Sham组比较, SAP组和RES组caspase-3, -9活性及胰腺腺泡细胞凋亡率显著升高. 与SAP组比较, 以上指标均显著升高(表2).

表 2 各组caspase-3, -9活性和胰腺腺泡细胞凋亡率结果 (mean ± SD)

分组	caspase-3	caspase-9	细胞凋亡率(%)
Sham组	1.04 ± 0.02	1.03 ± 0.03	2.15 ± 0.43
SAP组	1.95 ± 0.19[a]	1.62 ± 0.15[a]	12.45 ± 1.93[a]
RES组	2.37 ± 0.35[ac]	2.07 ± 0.25[ac]	19.63 ± 2.07[bc]

[a]P<0.05, [b]P<0.01 *vs* Sham组; [c]P<0.05 *vs* SAP组.

2.4 白藜芦醇对SAP腺泡细胞线粒体细胞色素C释放的影响 Sham组无明显细胞色素C的释放, 蛋白条带仅有清淡显影. SAP组及RES组可见明显细胞色素C释放进入胞质, 且RES组更为显著. 3组胞质中基本无线粒体内膜蛋白COXⅣ检出, 表明本研究提纯的胞质中基本不含线粒体(图2).

2.5 白藜芦醇对SAP腺泡细胞线粒体OGG1蛋白

■应用要点
本研究进一步证明并揭示白藜芦醇对SAP的治疗作用及具体机制，提出抑制线粒体DNA修复系统可能是治疗SAP的新靶点，为临床正确使用白藜芦醇及开发新药提供实验依据.

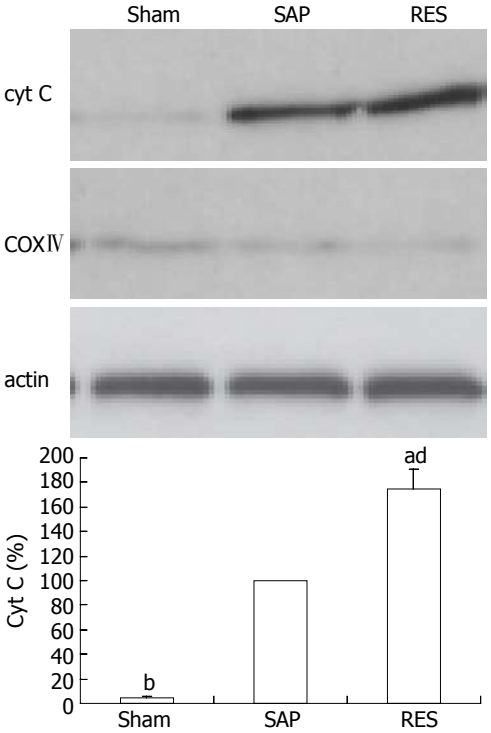


图 2 各组大鼠腺泡细胞线粒体细胞色素C释放量的变化. $^{a}P<0.05$, $^{b}P<0.01$ *vs* SAP组; $^{d}P<0.01$ *vs* Sham组.

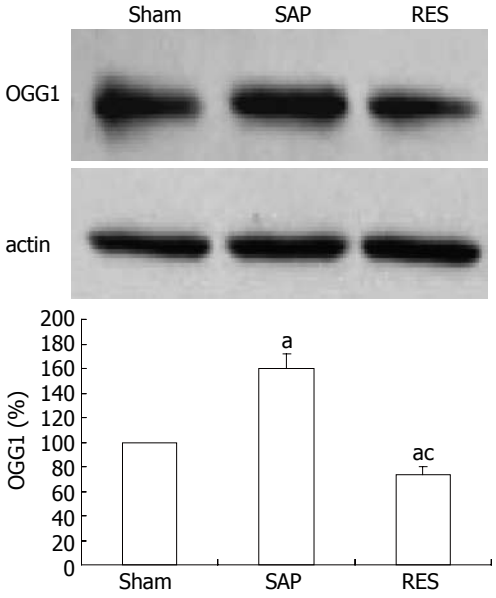


图 3 各组大鼠腺泡细胞线粒体OGG1蛋白表达量的变化. $^{a}P<0.05$ *vs* Sham组; $^{c}P<0.05$ *vs* SAP组.

含量的影响 与Sham组比较, SAP组OGG1蛋白表达量显著升高($P<0.05$), 而RES组OGG1蛋白表达量显著降低($P<0.05$, 图3).

3 讨论

SAP发生时最早的病理变化是出现在胰腺腺泡内, 而腺泡细胞的死亡方式与胰腺炎的病情变化有密切的关系[11]. 凋亡和坏死均是细胞受创后的死亡方式, 他们的本质区别在于凋亡不释放细胞内容物和炎症介质, 不引起炎症反应, 而坏死引起强烈炎症反应[12]. 目前较多实验均支持这样一种假说, 即胰腺腺泡细胞的凋亡与胰腺炎的严重程度呈负相关[1]. Luge *et al*发现抑制腺泡细胞凋亡后, 坏死细胞明显增多, 胰腺炎的严重程度明显加重[13]. 纪涛 *et al*[14]发现, TNF-α抑制剂可通过上调caspase-3蛋白表达促进SAP胰腺细胞凋亡, 明显改善炎症反应和组织病理学评分. 以上提示诱导胰腺细胞凋亡可能是治疗SAP的一种有效途径.

线粒体异常与胰腺炎的发病密切相关, 线粒体通过影响腺泡细胞钙稳态、能量代谢紊乱及产生活性氧等途径参与SAP的发生及预后[15]. 线粒体是细胞凋亡调控的活动中心. 是细胞凋亡信号途径的重要感受者与放大者. 在细胞凋亡早期, 核染色体DNA还未改变之前, 线粒体即已出现结构和功能的变化, 说明线粒体在细胞凋亡过程中起重要的早期启动作用. 研究表明, 线粒体细胞色素C的释放是凋亡重要的早期事件[16]. 在本研究中, 与Sham组比较, SAP组胰腺腺泡细胞凋亡率增加, 线粒体Δψ显著降低, 细胞色素C释放增加, caspase-3及caspase-9活化增加. 这与Sung *et al*[17]的研究结果基本一致, 他们的研究还发现, 胰腺腺泡细胞ATP水平与P53、BAX、caspase-3, 9等凋亡因子的表达水平负相关. 这表明线粒体功能失调、线粒体细胞色素C的释放, 激活caspase-3这条凋亡通路参与了SAP胰腺腺泡细胞凋亡. 研究表明, 病理条件下受损的腺泡细胞发生凋亡可以减少因坏死释放的活性胰酶, 减轻炎症介质的瀑布样级联释放, 这可能是急性胰腺炎时机体的自我保护机制之一[18].

线粒体DNA(mtDNA)是具有复制、转录、翻译等半自主功能的细胞器DNA, 有13种ATP酶和细胞色素氧化酶的编码基因. mtDNA无内含子, 因此任何突变都会影响到其编码的重要功能基因. mtDNA缺乏组蛋白保护, 复制频率高, 且离活性氧(ROS)产生位点极近, 因此对内外环境改变极为敏感. mtDNA突变引起线粒体功能紊乱, 活性氧产生增加, 线粒体膜电位或线粒体膜通透性发生改变, 从而引起细胞凋亡[19]. 在诸多类型的氧化碱基修饰中, 8-氧鸟嘌呤(8-oxo-7, 8-dihydroguanine, 8-oxodG)是最常见也是在诱发突变中有重要意义的一种碱基的氧化修饰. 8-oxodG可以引起复制过程中的dAMP的错配,

从而导致C/G→A/T的颠换突变, 因此与衰老、肿瘤、退行性病变等许多疾病相关[20]. 本研究中, SAP组胰腺腺泡细胞线粒体8-oxodG含量显著高于Sham组, 表明mtDNA氧化损伤参与了SAP的病理过程. 近年来发现, 线粒体内亦存在DNA损伤修复机制, mtDNA中8-oxodG的修复主要通过碱基切除修复(BER)途径[21]. BER过程中首先通过DNA糖基化酶特异性识别氧化碱基. 8-氧鸟嘌呤DNA糖基化酶(8-oxoguanine DNA glycosylase, OGG1)是哺乳动物线粒体最主要的8-oxodG酶[22]. OGG1缺陷小鼠成纤维细胞mtDNA 8-oxodG含量比野生型小鼠高8倍[23]. 线粒体特异性OGG1-α基因突变可导致包括胰腺癌在内的多种恶性肿瘤发生几率增加[24]. 一般认为mtDNA损伤修复是一有益的过程, 对维护细胞正常的生物学功能非常关键. 但近年来的研究表明, mtDNA修复酶表达过高亦会引起恶性病理变化. Li *et al*[25]研究发现, 对放射治疗抵抗的骨肉瘤其BER另一个关键限速酶脱嘌呤脱嘧啶核酸内切酶-1(APE1)线粒体转位出现较早, 且增加幅度较大. Phadnis *et al*[26]报道, 线粒体的另外一种糖基化酶Ntg1p过表达并未降低酵母mtDNA点突变率, 反而增加了mtDNA中致突变中介物的表达. mtDNA修复对衰老及退行性疾病的意义尚在广泛争论中. 我们认为在不同的组织, 不同的病程中, mtDNA修复的效应和意义存在差异. 在本研究中, SAP胰腺腺泡细胞线粒体OGG1表达显著升高(P<0.01), 这可能与8-oxodG升高造成组织损伤后激活了机体自我修复机制有关. 抑制胰腺细胞凋亡可加重胰腺炎的病变发展, 因而本研究中OGG1表达升高抑制了腺泡细胞凋亡, 在后期反而增加了SAP的严重程度. 最近Ueta *et al*[27]的研究表明, 线粒体OGG1过表达增加了口腔鳞癌细胞对γ射线放疗的抵抗性, 而通过RNA干扰技术抑制OGG1、DNA聚合酶γ(POLG)及线粒体转录因子A(Tfam)等线粒体DNA修复相关物质, 可通过促进口腔鳞癌细胞凋亡提高肿瘤放疗效果. 我们推测在SAP治疗中, 抑制线粒体DNA修复系统可能是一个有效的措施.

临床实践及实验研究表明, 白藜芦醇可通过多种机制改善SAP中胰腺的病理损伤, 其中一个重要机制是通过诱导胰腺腺泡细胞凋亡[3,28]. 研究发现, 白藜芦醇能通过上调Bax、Bcl-2及FasL蛋白的表达, 在SAP早期诱导胰腺细胞凋亡[29]. 但目前对于白黎芦醇诱导SAP胰腺腺泡细胞凋亡的具体机制尚不清楚. 本研究中, RES组胰腺腺泡细胞凋亡率显著高于SAP组和Sham组, 线粒体Δψ显著降低, 细胞色素C释放和caspase-3活化进一步增加, 胰腺病理损害明显减轻. 这表明白藜芦醇对重症急性胰腺炎具有治疗作用, 且这种治疗作用可能与通过线粒体凋亡途径促进胰腺细胞凋亡有关. 进一步研究表明, RES组腺泡细胞线粒体8-oxodG较SAP组进一步升高, 而OGG1表达显著低于SAP组. Robb *et al*[30]报道, 白藜芦醇作用人肺成纤维细胞72h后, 线粒体DNA修复酶中的POLGβ活性显著降低, 这与本研究的结论一致. 白藜芦醇可调控多种组织细胞凋亡[31]. Kao *et al*[32]报道, 白藜芦醇可通过促进畸胎瘤CD133细胞凋亡, 增加其放疗敏感性. 最近的研究表明, 白藜芦醇可通过抑制JAK/STAT通路和增强线粒体凋亡通路, 诱导人表皮样癌细胞凋亡, 发挥其治疗作用[4]. 因而我们推测, 白藜芦醇可能通过抑制OGG1等线粒体DNA修复酶的修复能力, 增加mtDNA损伤, 引起线粒体功能障碍, 从而激活线粒体凋亡途径, 以诱导损伤胰腺腺泡细胞凋亡, 从而达到对SAP的治疗效果. 抑制线粒体DNA修复系统有望成为治疗SAP的新靶点. 白藜芦醇下调OGG1表达的信号通路以及对于其他线粒体修复酶的影响尚需进一步研究.

■同行评价
本研究设计合理, 结果可靠, 具有较好的学术价值.

4 参考文献

1 Fortunato F, Bürgers H, Bergmann F, Rieger P, Büchler MW, Kroemer G, Werner J. Impaired autolysosome formation correlates with Lamp-2 depletion: role of apoptosis, autophagy, and necrosis in pancreatitis. *Gastroenterology* 2009; 137: 350-360, 360.e1-360.e5

2 张桂信, 陈海龙, 宫爱霞, 张利. 胰腺腺泡细胞凋亡与急性胰腺炎及其治疗策略. 世界华人消化杂志 2007; 15: 1115-1120

3 Szabolcs A, Varga IS, Varga C, Berkó A, Kaszaki J, Letoha T, Tiszlavicz L, Sári R, Lonovics J, Takács T. Beneficial effect of resveratrol on cholecystokinin-induced experimental pancreatitis. *Eur J Pharmacol* 2006; 532: 187-193

4 Madan E, Prasad S, Roy P, George J, Shukla Y. Regulation of apoptosis by resveratrol through JAK/STAT and mitochondria mediated pathway in human epidermoid carcinoma A431 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2008; 377: 1232-1237

5 邸瑶, 夏时海, 佟长青. 银杏苦内酯B对重症急性胰腺炎大鼠血浆细胞因子的影响. 世界华人消化杂志 2006; 14: 2169-2173

6 Sha H, Ma Q, Jha RK, Xu F, Wang L, Wang Z, Zhao Y, Fan F. Resveratrol ameliorates hepatic injury via the mitochondrial pathway in rats with severe acute pancreatitis. *Eur J Pharmacol* 2008; 601: 136-142

7 范志宁, 刘训良, 熊观瀛, 文卫, 缪林. 急性梗阻性胰腺炎大鼠胰腺腺泡细胞凋亡的变化. 世界华人消化杂志

2006; 14: 912-915
8 Bo H, Jiang N, Ma G, Qu J, Zhang G, Cao D, Wen L, Liu S, Ji LL, Zhang Y. Regulation of mitochondrial uncoupling respiration during exercise in rat heart: role of reactive oxygen species (ROS) and uncoupling protein 2. *Free Radic Biol Med* 2008; 44: 1373-1381
9 Takai D, Park SH, Takada Y, Ichinose S, Kitagawa M, Akashi M. UV-irradiation induces oxidative damage to mitochondrial DNA primarily through hydrogen peroxide: analysis of 8-oxodGuo by HPLC. *Free Radic Res* 2006; 40: 1138-1148
10 李光明, 谢青, 周霞秋, 俞红, 郭清, 廖丹, 李定国. 牛磺酸脱氧胆酸损伤线粒体诱导HepG2细胞凋亡. 世界华人消化杂志 2003; 11: 1148-1151
11 Yu JH, Seo JY, Kim KH, Kim H. Differentially expressed proteins in cerulein-stimulated pancreatic acinar cells: implication for acute pancreatitis. *Int J Biochem Cell Biol* 2008; 40: 503-516
12 Algül H, Treiber M, Lesina M, Nakhai H, Saur D, Geisler F, Pfeifer A, Paxian S, Schmid RM. Pancreas-specific RelA/p65 truncation increases susceptibility of acini to inflammation-associated cell death following cerulein pancreatitis. *J Clin Invest* 2007; 117: 1490-1501
13 Lugea A, Nan L, French SW, Bezerra JA, Gukovskaya AS, Pandol SJ. Pancreas recovery following cerulein-induced pancreatitis is impaired in plasminogen-deficient mice. *Gastroenterology* 2006; 131: 885-899
14 纪涛, 汤志刚, 黄强, 许戈良, 陈炯, 李建生. TNF-α抑制剂对重症急性胰腺炎细胞凋亡及Caspase-3表达的影响. 世界华人消化杂志 2008; 16: 3324-3327
15 Mukherjee R, Criddle DN, Gukovskaya A, Pandol S, Petersen OH, Sutton R. Mitochondrial injury in pancreatitis. *Cell Calcium* 2008; 44: 14-23
16 Halangk W, Lerch MM. A unique pancreatic mitochondrial response to calcium and its role in apoptosis. *Gut* 2009; 58: 328-330
17 Sung KF, Odinokova IV, Mareninova OA, Rakonczay Z Jr, Hegyi P, Pandol SJ, Gukovsky I, Gukovskaya AS. Prosurvival Bcl-2 proteins stabilize pancreatic mitochondria and protect against necrosis in experimental pancreatitis. *Exp Cell Res* 2009; 315: 1975-1989
18 Zhang XP, Chen L, Hu QF, Tian H, Xu RJ, Wang ZW, Wang KY, Cheng QH, Yan W, Li Y, Li QY, He Q, Wang F. Effects of large dose of dexamethasone on inflammatory mediators and pancreatic cell apoptosis of rats with severe acute pancreatitis. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 5506-5511
19 Liu CY, Lee CF, Hong CH, Wei YH. Mitochondrial DNA mutation and depletion increase the susceptibility of human cells to apoptosis. *Ann N Y Acad Sci* 2004; 1011: 133-145
20 Nakamoto H, Kaneko T, Tahara S, Hayashi E, Naito H, Radak Z, Goto S. Regular exercise reduces 8-oxodG in the nuclear and mitochondrial DNA and modulates the DNA repair activity in the liver of old rats. *Exp Gerontol* 2007; 42: 287-295
21 Druzhyna NM, Wilson GL, LeDoux SP. Mitochondrial DNA repair in aging and disease. *Mech Ageing Dev* 2008; 129: 383-390
22 Akbari M, Otterlei M, Peña-Diaz J, Krokan HE. Different organization of base excision repair of uracil in DNA in nuclei and mitochondria and selective upregulation of mitochondrial uracil-DNA glycosylase after oxidative stress. *Neuroscience* 2007; 145: 1201-1212
23 Bacsi A, Chodaczek G, Hazra TK, Konkel D, Boldogh I. Increased ROS generation in subsets of OGG1 knockout fibroblast cells. *Mech Ageing Dev* 2007; 128: 637-649
24 Trapp C, McCullough AK, Epe B. The basal levels of 8-oxoG and other oxidative modifications in intact mitochondrial DNA are low even in repair-deficient (Ogg1(-/-)/Csb(-/-)) mice. *Mutat Res* 2007; 625: 155-163
25 Li MX, Wang D, Zhong ZY, Xiang DB, Li ZP, Xie JY, Yang ZZ, Jin F, Qing Y. Targeting truncated APE1 in mitochondria enhances cell survival after oxidative stress. *Free Radic Biol Med* 2008; 45: 592-601
26 Phadnis N, Mehta R, Meednu N, Sia EA. Ntg1p, the base excision repair protein, generates mutagenic intermediates in yeast mitochondrial DNA. *DNA Repair* (Amst) 2006; 5: 829-839
27 Ueta E, Sasabe E, Yang Z, Osaki T, Yamamoto T. Enhancement of apoptotic damage of squamous cell carcinoma cells by inhibition of the mitochondrial DNA repairing system. *Cancer Sci* 2008; 99: 2230-2237
28 Wang L, Ma Q, Chen X, Sha H, Ma Z. Effects of resveratrol on calcium regulation in rats with severe acute pancreatitis. *Eur J Pharmacol* 2008; 580: 271-276
29 Li ZD, Ma QY, Luo YH. [Effect of resveratrol-induced FasL up-regulation on the apoptosis of pancreatic acinar cells in rats with severe acute pancreatitis] *Nanfang Yike Daxue Xuebao* 2009; 29: 454-457
30 Robb EL, Page MM, Wiens BE, Stuart JA. Molecular mechanisms of oxidative stress resistance induced by resveratrol: Specific and progressive induction of MnSOD. *Biochem Biophys Res Commun* 2008; 367: 406-412
31 Fulda S, Debatin KM. Resveratrol modulation of signal transduction in apoptosis and cell survival: a mini-review. *Cancer Detect Prev* 2006; 30: 217-223
32 Kao CL, Huang PI, Tsai PH, Tsai ML, Lo JF, Lee YY, Chen YJ, Chen YW, Chiou SH. Resveratrol-induced apoptosis and increased radiosensitivity in CD133-positive cells derived from atypical teratoid/rhabdoid tumor. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2009; 74: 219-228

编辑 李军亮 电编 何基才

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2009年10月8日; 17(28): 2899-2902
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

临床研究 CLINICAL RESEARCH

外周血T细胞表面PD-1在慢性乙型肝炎患者干扰素治疗期间的表达

梁雪松, 李成忠, 万谟彬, 张 迁

梁雪松, 李成忠, 万谟彬, 张迁, 上海长海医院感染科 上海市 200433
梁雪松, 医学博士, 主要从事病毒性肝炎免疫发病机制研究.
作者贡献分布: 此课题由梁雪松与万谟彬设计; 研究过程由梁雪松、李成忠、万谟彬及张迁共同操作完成; 研究标本由李成忠与张迁提供, 研究所用的试剂和分析工具由万谟彬提供; 数据分析由梁雪松完成; 本论文写作由梁雪松与万谟彬完成.
通讯作者: 万谟彬, 教授, 200433, 上海市, 上海长海医院感染科. mobinwan@yahoo.com
电话: 021-81873504
收稿日期: 2009-06-19 修回日期: 2009-08-26
接受日期: 2009-09-07 在线出版日期: 2009-10-08

Dynamic changes in programmed death-1 expression on the surface of T cells in chronic hepatitis B patients undergoing interferon therapy

Xue-Song Liang, Cheng-Zhong Li, Mo-Bin Wan, Qian Zhang

Xue-Song Liang, Cheng-Zhong Li, Mo-Bin Wan, Qian Zhang, Department of Infectious Diseases, Changhai Hospital of Shanghai, Shanghai 200433, China
Correspondence to: Professor Mo-Bin Wan, Department of Infectious Diseases, Changhai Hospital of Shanghai, Shanghai 200433, China. mobinwan@yahoo.com
Received: 2009-06-19 Revised: 2009-08-26
Accepted: 2009-09-07 Published online: 2009-10-08

Abstract

AIM: To investigate the expression of PD-1 on the surface of T cells in CHB patients in immune clearance phase and the dynamic changes in PD-1 expression on the surface of T cells in CHB patients during IFN-alpha 2b therapy, and analyze the prognostic significance of PD-1 expression in CHB infection patients after antiviral therapy.

METHODS: Twenty CHB patients with long-term elevated serum alanine aminotransferase (ALT) level were enrolled. All the patients underwent IFN-alpha 2b therapy (1.5 μg/kg, once a week) for 6 months. PD-1 expression on the surface of total peripheral $CD8^+$ and $CD4^+$ T cells was evaluated using flow cytometry at different time points during the therapy.

RESULTS: The positive rates and mean fluorescence intensity (MFI) of PD-1 expression on $CD4^+$ and $CD8^+$ T cells were significantly higher in CHB patients in immune clearance phase than in normal controls (all $P < 0.05$). During IFN-alpha 2b therapy, the positive rate of PD-1 expression on $CD8^+$ T cells declined significantly over time. In CHB patients undergoing IFN-alpha 2b therapy, the positive rate of PD-1 expression on $CD8^+$ T cells was positively correlated with both serum ALT level and HBV DNA level.

CONCLUSION: PD-1 is upregulated on total peripheral T cells in CHB patients in immune clearance phase. Interferon treatment-induced suppression of HBV replication results in a significant reduction in PD-1 expression on the surface of $CD8^+$ T cells.

Key Words: Hepatitis B; Programmed death-1; Interferon; Antiviral therapy

Liang XS, Li CZ, Wan MB, Zhang Q. Dynamic changes in programmed death-1 expression on the surface of T cells in chronic hepatitis B patients undergoing interferon therapy. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2009; 17(28): 2899-2902

摘要

目的: 观察慢性HBV感染(CHB)免疫清除期PD-1的表达状态以及干扰素抗病毒治疗期间T细胞PD-1的表达, 明确免疫清除期CHB患者PD-1表达的临床意义.

方法: 伴有长期ALT反复升高的CHB患者20例被纳入本研究, 所有病例均接受为期6 mo的Peg干扰素(1.5 μg/kg)抗病毒治疗, 每周1次. 应用流式细胞术对所有患者抗病毒治疗不同时间点(0、12、24 wk)的外周血总$CD8^+$ T细胞和$CD4^+$ T细胞PD-1表达百分比和表达强度进行检测.

结果: 免疫清除期CHB患者外周血总$CD8^+$ T细胞和$CD4^+$ T细胞PD-1阳性率和PD-1表达荧光强度均明显高于健康对照组($P<0.05$); PEG干扰素治疗早期$CD8^+$ T细胞PD-1阳性率呈现明显下降, 且$CD8^+$ T细胞PD-1表达阳性率同

■背景资料
在慢性HBV感染进程中, 宿主免疫反应特别是细胞免疫反应在病毒清除中起重要作用. 慢性乙型肝炎(CHB)患者宿主免疫特点为严重的HBV特异性T细胞功能缺陷, 其中程序型坏死因子1(PD-1)是CHB进程中T细胞功能缺陷原因之一.

■同行评议者
李靖, 副教授, 中国人民解放军第三军医大学附属新桥医院肝胆外科

■相关报道
Evans *et al*对直接抑制HBV复制抗病毒药物治疗期间宿主T细胞表面PD-1表达研究中也发现, 在抗病毒治疗诱导病毒明显下降后, 可以见到CD8$^+$ T细胞表面PD-1表达明显下降, 同时伴有功能恢复.

ALT水平和病毒水平均呈现明显正相关(R^2 = 0.22, 0.357, P = 0.001, 0.002).

结论: CHB患者外周血T细胞PD-1呈高表达; 干扰素治疗诱导的病毒水平下降可导致CD8$^+$ T细胞PD-1表达明显下降.

关键词: 慢性乙型肝炎; 程序性坏死因子; 干扰素; 抗病毒治疗

梁雪松, 李成忠, 万谟彬, 张迁. 外周血T细胞表面PD-1在慢性乙型肝炎患者干扰素治疗期间的表达. 世界华人消化杂志 2009; 17(28): 2899-2902
http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/2899.asp

0 引言

HBV感染引起的乙型病毒性肝炎是一种常见的严重肝脏疾病. 在慢性HBV感染进程中, 宿主免疫反应特别是细胞免疫反应在病毒清除中起重要作用. 慢性乙型肝炎(chronic hepatitis B, CHB)患者宿主免疫特点为严重的HBV特异性T细胞功能缺陷, 其中程序型坏死因子1(programmed death 1, PD-1)是CHB进程中T细胞功能缺陷原因之一[1-7]. 为了明确干扰素(interferon, IFN)抗病毒治疗对宿主T细胞PD-1表达影响, 本研究对20例免疫清除期CHB患者Peg(polyethylene glycol, Peg)IFN治疗中T细胞PD-1表达进行了检测.

1 材料和方法

1.1 材料 2007-09/2008-09长海医院感染科收治的CHB患者20例, 其中男15例, 女5例, 年龄21-41(平均29.6±5.9)岁, 所有患者均处于免疫清除期(ALT≥2倍). 诊断符合2000年修订《病毒性肝炎防治方案》标准. 所有患者排除其他肝炎病毒现症感染及合并自身免疫性肝炎、酒精性肝病等, 同时在入组前6 mo内未经任何抗病毒及免疫抑制治疗. 所有患者均接受为期6 mo的Peg IFN-α2b抗病毒治疗, 剂量为1.5 μg/kg, 每周1次. 分别在3个时间点进行了随访和检测: 基线(T1), 治疗12 wk(T2), 治疗24 wk(T3). 另选年龄和性别与患者相匹配的健康献血员10例为正常对照组. 所有病例均签署了知情同意, 并且本研究获得本院伦理委员会同意; FITC-CD4流式抗体、APC-CD8流式抗体购自美国eBiosciences公司、PD-1-PE流式抗体购自美国BD公司; HBV DNA荧光定量PCR法为罗氏Amplifier COBAS; FACSCalibur流式细胞仪为美国BD公司.

1.2 方法

1.2.1 外周血总T细胞PD-1表达水平的检测: 应用流式细胞术对20例免疫清除期CHB患者接受抗病毒治疗前和10例健康献血员外周血总T细胞PD-1表达状态进行检测. 取50 μL抗凝血, 加抗-CD4-FITC、抗-CD8-APC和抗-PD-1-PE流式抗体各5 μL, 常温避光孵育20 min标记, 用流式细胞裂解液1 mL常温避光裂解10 min, 1500 r/min常温离心5 min, 弃去上清并用PBS 1 mL冲悬沉淀, 1500 r/min常温离心5 min洗沉淀1次, 标记处理好后, 将细胞收集冲悬在400 μL PBS中, 避光放置待上机, 上机浓度为10^6/mL. 激光器波长为488 nm与635 nm, 用Cellquest(Becton Dickinson Rutherford, NJ)软件获取和分析数据.

1.2.2 病毒检测: 抗HAV、抗HCV、抗HDV、抗HEV、抗EB、抗CMVIgM和HBV病毒学指标用第3代ELISA法进行检测(SABC公司). 血清HBV DNA水平应用罗氏Amplifier COBAS法检测. 肝功指标和血清HBV DNA水平在住院期间每周和随访期1年内每月门诊进行检测.

统计学处理 统计学处理采用SPSS12.0软件, 数据进行样本均数t检验和两变量相关性分析, 以及线性相关性分析.

2 结果

2.1 临床转归 9例患者在治疗12 wk时病毒载量水平较基线平均下降1.5个Log, 治疗24 wk时, 其中5例达到了完全病毒学应答, 发生eAg血清学转归和病毒载量水平下降为500拷贝以下, 且ALT水平复常. 根据eAg转变将病例分为eAg转换组和eAg阳性组. 其中两组病毒载量水平和ALT变化见表1. 治疗12 wk时，病毒载量下降幅度两组差异具有统计学差异(P<0.05).

2.2 免疫清除期CHB患者外周血总T细胞PD-1表达 其阳性表达率波动在6.24%到63.5%之间, 平均14.64%±5.38%; 外周血总CD4$^+$ T细胞PD-1阳性表达率波动在6.07%到16.19%之间, 平均为11.03%±2.83%, 都明显高于健康对照组(均P<0.05). 免疫清除期CHB外周血总CD8$^+$ T细胞和CD4$^+$ T细胞PD-1单细胞表达强度(MFI)分别为5.04±1.09与4.16±0.66, 健康对照为3.64±0.76与3.46±0.38, CHB组明显高于对照组(均P<0.05).

2.3 Peg IFN-α2b抗病毒治疗期间外周血T细胞PD-1表达 治疗12 wk时CD4$^+$ T细胞PD-1表达阳性率明显升高, 由基线的11.03%±2.83%上升到25.03%±14.18%(P<0.01), 治疗12-24 wk期间CD4$^+$ T细胞PD-1阳性率基本趋于稳定(25.03%±14.18% *vs* 25.24%±14.22%)(图1A); Peg INF-α2b治疗期间CD8$^+$ T细胞PD-1表达阳性率随着

表 1 不同治疗应答组抗病毒治疗期间的变化比较

分组	基线HBV DNA Log10(IU/mL)	HBV DNA水平(Log10 IU/mL)		基线ALT(IU/mL)	ALT水平	
		T1–T2	T2–T3		T1–T2	T2–T3
eAg血清转换组	7.94 ± 0.51	3.15 ± 1.94[a]	0.27 ± 1.48	311.2 ± 204.6	193.4 ± 264.3	40.6 ± 67.5
eAg阳性组	7.42 ± 1.06	0.78 ± 1.18	0.92 ± 1.79	298.4 ± 204.6	189.8 ± 192.3	46.6 ± 82.3

[a]$P<0.05$ *vs* eAg阳性组.

■应用要点

本研究结果更进一步明确了HBV复制同T细胞功能缺陷的关系. 病毒载量水平和$CD8^+$ T细胞PD-1表达之间具有明显相关性, 抗病毒治疗诱导的病毒载量水平下降可导致$CD8^+$ T细胞PD-1表达的明显下降.

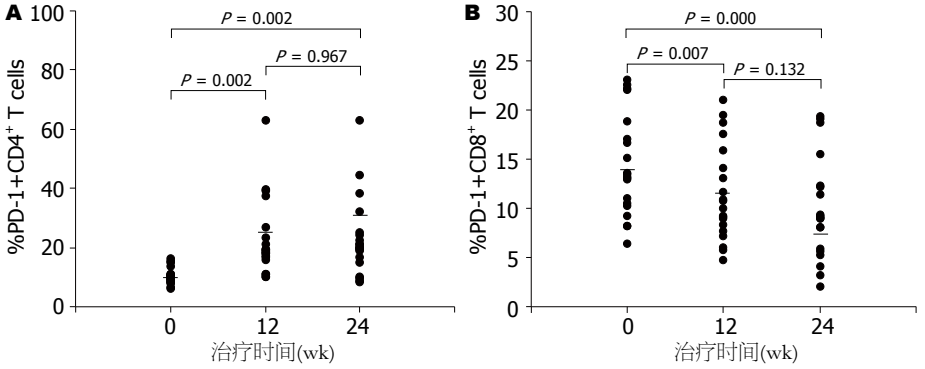


图 1 Peg IFN-α2b治疗不同时间外周血T细胞PD-1阳性率. A: $CD4^+$ T细胞; B: $CD8^+$ T细胞.

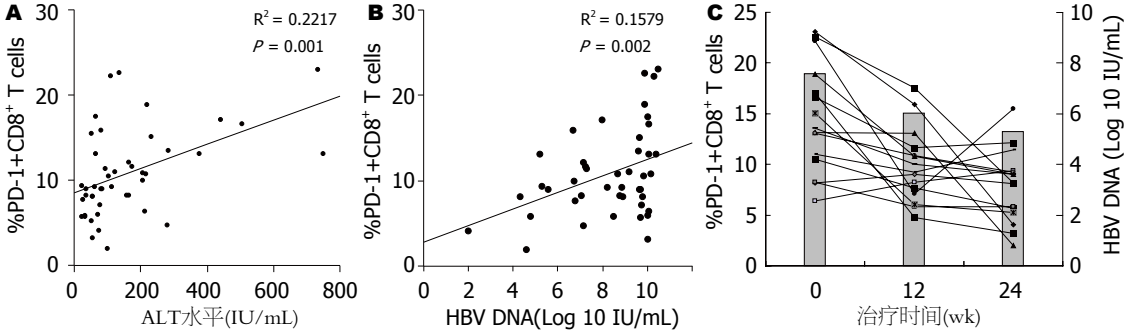


图 2 Peg IFN-α2b治疗$CD8^+$ T细胞PD-1表达与ALT和病毒载量变化关系.

治疗时间呈现下降趋势, 基线到治疗12 wk时PD-1阳性$CD8^+$ T细胞比例由14.64%±5.38%下降为9.84%±3.62%, 显著降低($P<0.01$), 治疗12-24 wk期间$CD8^+$ T细胞PD-1阳性率略有下降, 但未见统计学意义(图1B).

2.4 Peg IFN-α2b治疗期间$CD8^+$ T细胞PD-1表达与ALT和病毒载量 Peg IFN治疗基线T细胞PD-1表达水平同ALT水平之间未见明显相关性, 且在治疗结束时发生完全病毒学应答组和未获得组相比T细胞PD-1表达水平无明显差异($P>0.05$). 然而, Peg IFN抗病毒治疗期间$CD8^+$ T细胞PD-1表达阳性率却同ALT水平呈正相关($R^2 = 0.22$, $P = 0.001$)(图2A); 经单因素线性回归分析, IFN治疗期间$CD8^+$ T细胞PD-1阳性率同病毒载量呈现正相关, 且具有统计学意义($R^2 = 0.357$, $P = 0.002$)(图2B). 另外, 治疗12 wk时同基线相比, 病毒载量水平明显下降, 同时$CD8^+$ T细胞表面PD-1表达水平也发生明显变化(均$P<0.05$)见图2C; 但治疗12 wk到24 wk病毒载量水平下降幅度减弱, 同时$CD8^+$ T细胞PD-1表达水平变化也明显减弱, 甚至个别病例还出现PD-1表达水平回升($P>0.05$, 图2C).

2.5 Peg IFN-α2b治疗早期T细胞PD-1表达与抗病毒治疗 基于IFN抗病毒期间前12 wk T细胞PD-1变化明显的发现, 我们进一步对IFN治疗基线到12 wk期间$CD8^+$ T细胞PD-1表达阳性率变化对疗效预测作用进行了分析. $CD8^+$ T细胞PD-1变化对疗效无明显预测作用($F = 1.43$, $P = 0.25$).

3 讨论

本研究结果显示CHB患者免疫活动期T细胞表面PD-1表达水平较对照组明显升高. 抗病毒治疗诱导病毒载量水平明显下降的早期, $CD8^+$ T细胞表面PD-1明显下降, 但$CD4^+$ T细胞表面PD-1

■同行评价
本文本研究立题有一定创新，指标稍显单一，若能设立不同抗病毒治疗对CHB患者PD-1的影响，可能更有临床意义.

水平却明显升高. Evans *et al*对直接抑制HBV复制抗病毒药物治疗期间宿主T细胞表面PD-1表达研究中也发现[6-7]，在抗病毒治疗诱导病毒明显下降后，可以见到CD8$^+$ T细胞表面PD-1表达明显下降，同时伴有功能恢复.

我们发现在IFN抗病毒治疗过程中CD4$^+$ T细胞和CD8$^+$ T细胞PD-1表达具有不同的模式，且CD4$^+$ T细胞PD-1表达同病毒载量水平之间呈现负相关，该研究结果同Evans *et al*[7]的报道相悖，原因可能是两个研究设计差异导致；IFN抗病毒治疗过程中虽然总体病毒载量水平随抗病毒时间呈现下降趋势，但一些病例病毒载量水平基本未变，甚至还有上升，因此不能很好确定CD4$^+$ T细胞PD-1表达同病毒载量变化之间的因果关系；随着病毒水平下降，无论是否发生eAg血清转换，CD8$^+$ T细胞PD-1表达均明显下降，但是未发现CD8$^+$ T细胞PD-1表达水平下降同eAg血清转换之间具有相关性. Cooksley *et al*发现在阿德福韦酯抗病毒治疗患者，eAg转阴会伴随HBV DNA水平的明显下降，及CD4$^+$ T细胞功能恢复，这些结果提示PD-1表达下降可能不足以完全恢复T细胞功能[8-10].

抗病毒治疗基线ALT水平对抗病毒疗效具有很好的预测作用[11-15]. 如果ALT是宿主针对HBV病毒免疫反应的标志，那么在基线ALT水平和PD-1表达之间就应该存在一定的相关性，本研究却未发现存在这种关系. 可能部分源于不同的患者基线PD-1表达水平存在很大差异. 抗病毒治疗期间随着病毒水平下降，ALT水平复常，CD8$^+$ T细胞PD-1表达也呈现下降趋势，并同ALT水平变化之间呈正相关性，这在一定程度上提示：ALT可能更多的是代表病毒复制启动的针对肝细胞的炎症反应程度.

总之，本研究结果更进一步明确了HBV复制同T细胞功能缺陷的关系. 病毒载量水平和CD8$^+$ T细胞PD-1表达之间具有明显相关性，抗病毒治疗诱导的病毒载量水平下降可导致CD8$^+$ T细胞PD-1表达的明显下降.

4 参考文献

1 Barber DL, Wherry EJ, Masopust D, Zhu B, Allison JP, Sharpe AH, Freeman GJ, Ahmed R. Restoring function in exhausted CD8 T cells during chronic viral infection. *Nature* 2006; 439: 682-687

2 Klenerman P, Hill A. T cells and viral persistence: lessons from diverse infections. *Nat Immunol* 2005; 6: 873-879

3 Day CL, Kaufmann DE, Kiepiela P, Brown JA, Moodley ES, Reddy S, Mackey EW, Miller JD, Leslie AJ, DePierres C, Mncube Z, Duraiswamy J, Zhu B, Eichbaum Q, Altfeld M, Wherry EJ, Coovadia HM, Goulder PJ, Klenerman P, Ahmed R, Freeman GJ, Walker BD. PD-1 expression on HIV-specific T cells is associated with T-cell exhaustion and disease progression. *Nature* 2006; 443: 350-354

4 Petrovas C, Casazza JP, Brenchley JM, Price DA, Gostick E, Adams WC, Precopio ML, Schacker T, Roederer M, Douek DC, Koup RA. PD-1 is a regulator of virus-specific CD8+ T cell survival in HIV infection. *J Exp Med* 2006; 203: 2281-2292

5 Trautmann L, Janbazian L, Chomont N, Said EA, Gimmig S, Bessette B, Boulassel MR, Delwart E, Sepulveda H, Balderas RS, Routy JP, Haddad EK, Sekaly RP. Upregulation of PD-1 expression on HIV-specific CD8+ T cells leads to reversible immune dysfunction. *Nat Med* 2006; 12: 1198-1202

6 Ye P, Weng ZH, Zhang SL, Zhang JA, Zhao L, Dong JH, Jie SH, Pang R, Wei RH. Programmed death-1 expression is associated with the disease status in hepatitis B virus infection. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 4551-4557

7 Evans A, Riva A, Cooksley H, Phillips S, Puranik S, Nathwani A, Brett S, Chokshi S, Naoumov NV. Programmed death 1 expression during antiviral treatment of chronic hepatitis B: Impact of hepatitis B e-antigen seroconversion. *Hepatology* 2008; 48: 759-769

8 Cooksley H, Chokshi S, Maayan Y, Wedemeyer H, Andreone P, Gilson R, Warnes T, Paganin S, Zoulim F, Frederick D, Neumann AU, Brosgart CL, Naoumov NV. Hepatitis B virus e antigen loss during adefovir dipivoxil therapy is associated with enhanced virus-specific CD4+ T-cell reactivity. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; 52: 312-320

9 Lau GK, Cooksley H, Ribeiro RM, Powers KA, Shudo E, Bowden S, Hui CK, Anderson J, Sorbel J, Mondou E, Rousseau F, Lewin S, Perelson AS, Locornini S, Naoumov NV. Impact of early viral kinetics on T-cell reactivity during antiviral therapy in chronic hepatitis B. *Antivir Ther* 2007; 12: 705-718

10 You J, Sriplung H, Geater A, Chongsuvivatwong V, Zhuang L, Li YL, Lei H, Liu J, Chen HY, Tang BZ, Huang JH. Impact of viral replication inhibition by entecavir on peripheral T lymphocyte subpopulations in chronic hepatitis B patients. *BMC Infect Dis* 2008; 8: 123

11 Perrillo RP, Liaw YF, Schiff ER, Heathcote EJ, Atkins M, Gardner SD. Predictors of HBeAg loss after lamivudine treatment for chronic hepatitis B. *Hepatology* 2002; 36: 186-194

12 纪冬, 成军, 董菁, 王建军. 拉米夫定在免疫受损慢性乙型肝炎患者抗病毒治疗中的应用. 世界华人消化杂志 2004; 12: 1667-1669

13 Hou J, Yin YK, Xu D, Tan D, Niu J, Zhou X, Wang Y, Zhu L, He Y, Ren H, Wan M, Chen C, Wu S, Chen Y, Xu J, Wang Q, Wei L, Chao G, Constance BF, Harb G, Brown NA, Jia J. Telbivudine versus lamivudine in Chinese patients with chronic hepatitis B: Results at 1 year of a randomized, double-blind trial. *Hepatology* 2008; 47: 447-454

14 Tseng TC, Liu CJ, Wang CC, Chen PJ, Lai MY, Kao JH, Chen DS. A higher alanine aminotransferase level correlates with earlier hepatitis B e antigen seroconversion in lamivudine-treated chronic hepatitis B patients. *Liver Int* 2008; 28: 1034-1041

15 Tseng TC, Liu CJ, Wang CC, Chen PJ, Lai MY, Chen DS, Kao JH. Association of baseline viral factors with response to lamivudine therapy in chronic hepatitis B patients with high serum alanine aminotransferase levels. *Antivir Ther* 2009; 14: 203-210

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2009年10月8日; 17(28): 2903-2907
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

临床研究 CLINICAL RESEARCH

MMP-7在肝细胞癌组织中的表达及临床意义

饶雪峰, 刘伟中, 廖传文, 彭贵祖, 单人锋

饶雪峰, 刘伟中, 廖传文, 江西省人民医院普外科 江西省南昌市 330006
彭贵祖, 单人锋, 南昌大学一附医院普外科 江西省南昌市 330006
饶雪峰, 主治医师, 主要从事普通外科方面的研究.
作者贡献分布: 饶雪峰、刘伟中、廖传文、彭贵祖及单人锋对此文均作贡献; 此课题由饶雪峰设计; 刘伟中与彭贵祖指导; 研究过程由饶雪峰、廖传文及单人锋操作完成; 研究所用新试剂及分析工具由饶雪峰提供; 数据分析由饶雪峰完成; 本论文写作由饶雪峰、刘伟中、廖传文、彭贵祖及单人锋完成.
通讯作者: 饶雪峰, 主治医师, 330006, 江西省南昌市爱国路92号, 江西省人民医院普外一科. raoxf2003@yahoo.com.cn
电话: 0791-6896220
收稿日期: 2009-07-27 修回日期: 2009-09-13
接受日期: 2009-09-21 在线出版日期: 2009-10-08

Clinical significance of matrix metalloproteinase-7 expression in hepatocellular carcinoma

Xue-Feng Rao, Wei-Zhong Liu, Chuan-Wen Liao, Gui-Zu Peng, Ren-Feng Shan

Xue-Feng Rao, Wei-Zhong Liu, Chuan-Wen Liao, Department of General Surgery, the Jiangxi Provincial People's Hospital, Nanchang 330006, Jiangxi Province, China
Gui-Zu Peng, Ren-Feng Shan, Department of General Surgery, the First Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang 330006, Jiangxi Province, China
Correspondence to: Xue-Feng Rao, Department of General Surgery, the Jiangxi Provincial People's Hospital, 92 Aiguo Road, Nanchang 330006, Jiangxi Province, China. raoxf2003@yahoo.com.cn
Received: 2009-07-27 Revised: 2009-09-13
Accepted: 2009-09-21 Published online: 2009-10-08

Abstract

AIM: To investigate the clinical significance of matrix metalloproteinase-7 (MMP-7) expression in hepatocellular carcinoma (HCC) and analyze the correlation of MMP-7 expression with some pathologic parameters in HCC.

METHODS: Sixty-three HCC specimens, 10 hepatic cirrhosis specimens and 10 normal liver tissue specimens were used in the study. Immunohistochemistry was used to detect MMP-7 expression and microvessel density in these specimens. The correlation of MMP-7 expression with some pathologic parameters in HCC was analyzed.

RESULTS: MMP-7 expression level was significantly higher in HCC than in hepatic cirrhosis and normal liver tissue (χ^2 = 21.19, P < 0.05). MMP-7 expression was correlated with tumor size and number, vascular cancer embolus, invasion, tumor stage and angiogenesis (χ^2 = 7.1, 14.55, 4.24, 4.49 and 7.11, respectively; t = 4.30, all P < 0.05), but was not correlated with serum alpha-fetoprotein, age and sex (all P > 0.05).

CONCLUSION: MMP-7 may play a critical role in the development, progression, metastasis and angiogenesis of HCC. MMP-7 expression can be used as an important prognostic factor for HCC.

Key Words: Hepatocellular carcinoma; Matrix metalloproteinase-7; Microvessel density

Rao XF, Liu WZ, Liao CW, Peng GZ, Shan RF. Clinical significance of matrix metalloproteinase-7 expression in hepatocellular carcinoma. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2009; 17(28): 2903-2907

摘要

目的: 探讨基质金属蛋白酶7(MMP-7)与肝细胞癌(HCC)生物学行为及预后的关系, 试图阐明HCC的发生发展和微转移机制, 并了解其预后.

方法: 应用Elivision™ plus二步法(AB法)免疫组织化学检测CD34和MMP-7单克隆抗体在63例HCC、10例肝硬化和10例正常肝组织标本的表达, 分析MMP-7表达与HCC临床病理因素之间的关系.

结果: MMP-7在HCC组织中的表达明显高于肝硬化和正常肝组织, 差异有显著性统计学意义(χ^2 = 21.19, P<0.05); MMP-7的表达与HCC的大小、病灶数目、浸润、血管癌栓、临床分期和肿瘤血管生成具有相关性(χ^2 = 7.1, 14.55, 4.24, 4.49, 7.11, t = 4.30, 均P<0.05).

结论: MMP-7可能在HCC的发生发展过程中起重要作用. MMP-7促进HCC浸润转移和血管生成, 可成为临床判定预后的良好指标.

关键词: 肝细胞癌; 基质金属蛋白酶7; 微血管密度

■背景资料
MMP-7在正常细胞或肿瘤细胞都以无活性的酶原(pro-MMP-7)形式存在, 能被多种因素所激活, 如胰蛋白酶, 白细胞弹性蛋白酶和组织蛋白酶; 同时MMPs之间也能通过相互作用调节自身活性, 降解细胞外基质(ECM). MMP-7区别于其他MMP家族成员的另一特点是在基质细胞中并不表达, 而仅表达于肿瘤细胞内和肿瘤细胞邻近的血管内皮细胞中.

■同行评议者
郑鹏远, 教授, 郑州大学第二附属医院消化科

■相关报道
Crawford *et al*在鼠模型胰腺癌细胞中发现, MMP-7不但可以裂解FasL抗凋亡, 而且可能诱导抗凋亡蛋白Bcl-2抑制凋亡, 并提出MMP-7可以通过水解蛋白激活潜在的营养因子抑制化生的细胞凋亡.

饶雪峰, 刘伟中, 廖传文, 彭贵祖, 单人锋. MMP-7在肝细胞癌组织中的表达及临床意义. 世界华人消化杂志 2009; 17(28): 2903-2907
http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/2903.asp

0 引言

基质金属蛋白酶7(matrix metalloproteinase 7, MMP-7)属于基质金属蛋白酶基因家10族的成员之一, 其基因定位于11q-22q, DNA长1.6 kb, 编码267个氨基酸[1], 在其家族中相对分子质量最小(28 kDa), 为锌依赖肽链内切酶, 具有消化特定的细胞外基质成分作用; MMP-7分子结构中缺乏与基质金属蛋白酶组织抑制剂(tissue inhibitor of metalloproteinases, TIMPs)相互作用的区域. 因此, MMP-7具有强大的基质降解活性和广泛的底物特异性, 如Ⅳ型胶原、层黏蛋白、纤维结合素、蛋白多糖、Ⅰ型明胶和可溶性弹性蛋白等底物, 而受TIMP的负调节较小. MMP-7在正常细胞或肿瘤细胞都以无活性的酶原(pro-MMP-7)形式存在, 能被多种因素所激活, 如胰蛋白酶, 白细胞弹性蛋白酶和组织蛋白酶; 同时MMPs之间也能通过相互作用调节自身活性, 降解细胞外基质(extracellular matrix, ECM). MMP-7区别于其他MMP家族成员的另一特点是在基质细胞中并不表达, 而仅表达于肿瘤细胞内和肿瘤细胞邻近的血管内皮细胞中. 实体肿瘤是一个典型的血管依赖性疾病, 他的生长和转移等生物行为与其间质的血管形成密切相关. 组织标本微血管计数(microvessel count, MVD)检测是血管形成的量化指标, 是评价肿瘤内血管生成的标准. 近年来, 国内外学者研究[2]发现MVD定量高者易发生转移或复发, 且预后较差. 随着对肿瘤血管生成的深入研究, MVD被作为肿瘤浸润、转移和预后判断的重要参考指标. CD34抗原是近年来人们发现的一种新的与小血管相关的抗原, 他在各种血管源性肿瘤及多种肿瘤间质小血管中的表达已得到证实. 故血管标志物CD34 mAb可被用于标记癌组织血管内皮细胞, 计算MVD[3].

1 材料和方法

1.1 材料 收集2005-01/2007-12江西省人民医院和南昌大学一附医院经病理确诊为HCC的患者63例, 病例具有肿瘤原发病灶组织的蜡块, 手术前未经过放疗、化疗、微波刀等针对肿瘤的任何治疗, 并有手术前后完整的病案资料. 63例患者均有HBV感染; 其中男54例、女9例, 比例6∶1; 年龄18-69(平均年龄44.8)岁; AFP≥400组29例, AFP<400组34例; 肿瘤直径>5 cm组32例, 直径≤5 cm组31例(HCC单病灶时取最大直径, 多个病灶时取直径之和); 肿瘤数单个组44例, 肿瘤数多个组19例; 有血管癌栓(门静脉、肝静脉、下腔静脉)组15例, 无血管癌栓组48例; 有远处转移5例(膈肌、壁腹膜、网膜、胃、肺的转移各1例); 采用2001年第八届全国肝癌学术会议制定的分期标准: Ⅰ期22例, Ⅱ期29例, Ⅲ期12例. 鼠抗人MMP-7 mAb(美国NEOMARKERS公司)、CD34抗体和浓缩型DAB试剂盒(福州迈新生物技术有限公司).

1.2 方法

1.2.1 分组: 符合以上条件的63例HCC标本作为实验组; 同时取10例肝硬化(来自肝硬化门脉高压手术)和10例正常肝组织(来自肝内胆管结石行肝叶切除的肝组织)作为对照组. 实验组和对照组中每例样本均做MMP-7、CD34的免疫组织化学检测.

1.2.2 免疫组织化学染色Elivision^{TM} plus二步法(AB法): 采用二步法(AB法)检测MMP-7的表达. 切片脱蜡至水, PBS液(pH7.4)洗3次每次5 min. 0.3% H_2O_2中室温孵育10 min以阻断内源性过氧化物酶. 先将0.01 mol/L枸橼酸钠缓冲液(pH6.0)于压力锅中加热至沸腾后, 将切片置于高温塑料切片架上, 放入已沸腾的缓冲液中, 盖上锅盖扣上压力阀, 继续加热至喷气, 计时3 min. 室温冷却30 min. 滴加一滴(50 μL)一抗鼠抗人MMP-7Ab, 4℃过夜. 滴加一滴聚合物增强剂(试剂A), 37℃孵育30 min. 滴加一滴酶抗鼠聚合物(试剂B), 室温孵育30 min. 切片浸入修复液经高档微波处理10 min修复抗原. 显色液(终浓度为0.05% DAB, 0.3% H_2O_2, 用PBS新鲜配制)显色后用苏木精稍稍衬染、脱水、透明、封片等. 上述各步未加说明者, 皆为室温条件. 免疫组织化学检测CD34的表达, 步骤同上(CD34无需抗原修复).

1.2.3 MMP-7阳性结果判定标准: MMP-7表达以细胞质出现棕黄色颗粒、且其着色强度高于背景非特异性染色者判定为阳性, 以每例切片中阳性癌细胞占全部癌细胞的比例计算, 完全阴性或阳性率<5%者为(-), 阳性细胞占5%-35%、36%-65%、66%分别评为1、2、3分, 根据细胞内黄色的深浅将无显色、淡黄色、橘黄色和棕黄色分别评为0、1、2、3分, 以上两者之和最高为6, 0-2视为阴性, 3-6视为阳性[4].

1.2.4 MVD: 按照Weidner *et al*的判评标准, 计算

表 1 MMP-7的表达与肝细胞肝癌临床病理参数之间的关系

临床病理参数	n	MMP-7(n) +	MMP-7(n) −	阳性率(%)	χ^2值	P值
性别						
男	54	32	22	59.3	0.44	>0.05
女	9	5	4	55.6		
年龄(岁)						
>44	34	20	14	58.8	0.00	>0.05
≤44	29	17	12	58.6		
AFP						
≥400	29	16	13	55.2	0.28	>0.05
<400	34	21	13	61.8		
肿瘤大小(cm)						
>5	32	24	8	75.0	7.10	<0.05
≤5	31	13	18	41.9		
肿瘤数目						
单个	44	19	25	43.2	14.55	<0.05
多个	19	18	1	94.7		
血管癌栓						
有	16	13	3	81.3	4.49	<0.05
无	47	24	23	51.1		
被膜浸润						
有	43	29	14	67.4	4.24	<0.05
无	20	8	12	40.0		
分期						
Ⅰ期	22	8	14	36.4		
Ⅱ期	29	20	9	69.0	7.11	<0.05
Ⅲ期	12	9	3	75.0		

肿瘤内着色的毛细血管和微小血管. 凡呈现棕色单个内皮细胞或细胞群者均作为一个血管计数, 但肌层较厚及管腔面积大于8个细胞直径的血管不计在内. 计数方法: 每张染色切片先在低倍镜(×100)下全面观察切片以确定肿瘤内血管密度最高处; 再在高倍镜(×400)下计算微血管密度, 以与周围肿瘤细胞和结缔组织成分明显区别的任何一个棕色的内皮细胞或细胞丛作为一个血管计数, 记录5个视野内微血管数, 取其平均数作为MVD值.

统计学处理 统计学分析采用SPSS10.0统计软件进行, 计量资料用t检验, 计数资料用χ^2检验, P≤0.05认为有统计学差异.

2 结果

2.1 MMP-7分别在HCC、肝硬化和正常肝组织中的表达 MMP-7在HCC组织中的表达阳性者光学显微镜下观察癌细胞胞质染色呈棕黄色(图1A); 63例HCC组织中MMP-7阳性表达者37例, 阴性表达者26例, 阳性率为58.7%; MMP-7在肝硬化和正常肝组织中均未表达, 阳性率为0.00%. 经χ^2检验(χ^2 = 21.19, P<0.05) MMP-7在HCC组织中的阳性表达率与肝硬化和正常肝组织中的阳性表达率有显著性差异(P<0.05).

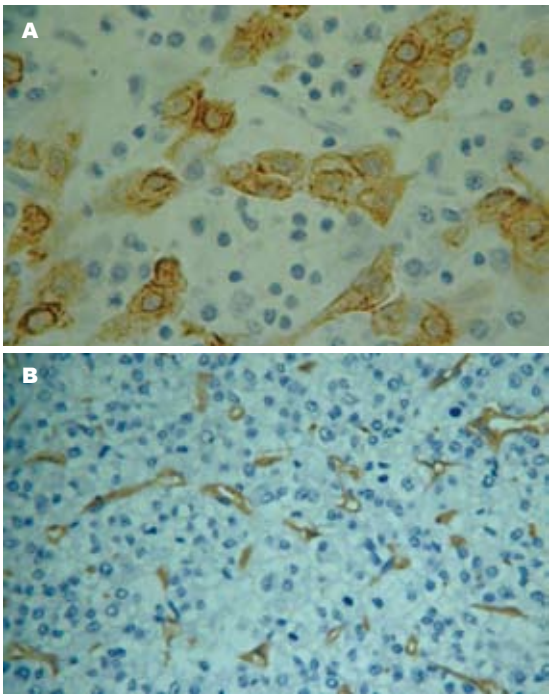


图 1 HCC中MMP-7和CD34的表达(AB × 100). A: MMP-7; B: CD34.

2.2 MMP-7的表达与HCC临床病理参数之间的关系 HCC组织中MMP-7的表达与患者性别、年龄和AFP均无明显相关性(P>0.05). MMP-7的表达与肿瘤大小、肿瘤数为单个或多个、血管癌栓、被膜浸润及临床分期具有相关性(P<0.05); 肿瘤直径大于5 cm组MMP-7表达率(75.0%)高于肿瘤直径小于或等于5 cm组(41.9%); 肿瘤数多个组MMP-7表达率(94.7%)高于肿瘤数单个组(43.2%), 有血管癌栓组MMP-7表达率(81.3%)高于无血管癌栓组(51.1%); 有被膜浸润组MMP-7表达率(67.4%)高于无被膜浸润组(40.0%), 差异有显著性意义; MMP-7表达临床分期越晚其表达率越高, Ⅱ、Ⅲ期比Ⅰ期高, Ⅰ期为36.4%, Ⅱ期为69.0%, Ⅲ期为75.0%, 具有显著性差异(表1).

2.3 MVD在HCC、肝硬化和正常肝组织中的表达及与MMP-7的关系 CD34在HCC毛细血管和微小血管染棕黄色(图1B); 肝硬化和正常肝组织中无染色. 63例HCC中MVD范围24.8-68.2, MVD平均值44.73±9.75. MMP-7的表达与MVD具有相关性, MMP-7阳性组MVD值高于阴性组; 63例HCC中, MMP-7阳性组MVD平均值48.63±8.81, MMP-7阴性组MVD平均值39.16±8.29. 差

■应用要点
MMP-7促进HCC浸润转移和血管生成, 可成为临床判定预后的良好指标.

■同行评价
本文通过检测基质金属蛋白酶7在肝细胞癌组织中的表达, 对基质金属蛋白酶7与肝细胞癌生物学行为及预后的关系进行探讨研究, 选题准确, 具有一定的临床价值.

别具有显著性意义($t = 4.30$, $P<0.05$).

3 讨论

MMP-7在肿瘤的发生发展过程起重要作用. Takeuchi *et al*[5]研究MMP-7 mRNA在散发性和家族性大肠腺瘤中的表达时发现, MMP-7 mRNA在散发性大肠腺瘤中表达水平与腺瘤的增生程度和大小具有相关性, 而在大部分家族性大肠腺瘤性息肉病中, MMP-7 mRNA表达水平与腺瘤的增生程度和大小无相关性. MMP-7表达于具有恶性潜能的腺瘤中, 提示MMP-7可能促进腺瘤向恶性肿瘤转变的过程, 参与大肠癌的发生过程. Crawford *et al*[6]在鼠模型胰腺癌细胞中发现, MMP-7不但可以裂解FasL抗凋亡, 而且可能诱导抗凋亡蛋白Bcl-2抑制凋亡, 并提出MMP-7可以通过水解蛋白激活潜在的营养因子抑制化生的细胞凋亡.

本研究结果显示: MMP-7在HCC组织中呈过表达, 63例HCC组织中MMP-7阳性表达者37例, 阳性率为58.7%; MMP-7在肝硬化和正常肝组织中均未见阳性表达, 提示MMP-7的过表达可能是HCC发生发展的重要因素, MMP-7分解细胞外基质结构促进肿瘤增生, 这与Rath *et al*[7]在结肠组织的研究结果一致.

MMP-7不但在肿瘤的发生发展过程起作用, 而且促进肿瘤血管形成和侵犯转移. 早期HCC常被纤维囊包裹, 因而ECM的降解是肿瘤侵犯和转移的重要一步. MMP-7可以水解ECM成分, 破坏机体防御肿瘤浸润与转移的自然屏障, 导致肿瘤细胞自身黏附能力下降, 细胞脱落, 穿过ECM侵犯正常组织, 进入淋巴管或血管, 黏附驻留在内皮细胞的适应部位, 诱导肿瘤血管形成, 最终在远隔部位形成转移灶. 同时, 在内皮细胞中MMP-7表达的蛋白水解松散了血管的结构, 肿瘤细胞更容易浸润血管; 在细胞外基质降解的同时, MMP-7有助于为新的血管生长提供空间. Noë *et al*[8]发现MMP-7通过裂解细胞表面的上皮细胞钙黏蛋白(E-cadherin), 释放可溶性E-cadherin片段, 这种可溶性E-cadherin片段能够竞争性抑制E-cadherin的作用. 由于E-cadherin在肿瘤的浸润与转移中发挥了重要的抑制作用, 所以MMP-7也间接地促进了肿瘤浸润与转移.

本研究结果显示, 在HCC组织中, 肿瘤直径大于5 cm组MMP-7表达率高于肿瘤直径小于或等于5 cm组, 肿瘤数多个组的MMP-7表达率高于肿瘤数单个组, 有血管癌栓组MMP-7表达率高于无血管癌栓组, 有被膜浸润组的MMP-7表达率高于无被膜浸润组, MMP-7表达临床分期越晚其表达率越高, 表明MMP-7在HCC早期阶段的发生、后期阶段的浸润转移和发展中起关键作用, 可作为判断HCC预后的指标, 这与Ozaki *et al*[9]和Ishii *et al*[10]研究结果一致; MMP-7表达和MVD有关, MMP-7阳性组MVD值高于阴性组, 与Huachuan *et al*[11]在胃癌组织的研究结果一致, 提示MMP-7和HCC的血管形成密切相关, 可能参与肿瘤血管的形成和转移. 本实验显示: HCC组织中MMP-7的表达与患者性别、年龄和AFP均无相关性($P>0.05$); MMP-7在HCC组织中表达具有显著性意义, 通过降解ECM, 参与HCC血管形成过程和肿瘤的生长侵袭过程.

总之, MMP-7在HCC组织中的表达明显高于肝硬化和正常肝组织, 提示MMP-7可能在HCC的发生发展过程中起重要作用. MMP-7的表达与HCC的大小、病灶数目、肿瘤被膜浸润、血管癌栓、临床分期和肿瘤血管生成具有正相关性; 因此认为他促进HCC浸润转移和血管生成, 可成为临床判定预后的良好指标.

4 参考文献

1 Knox JD, Boreham DR, Walker JA, Morrison DP, Matrisian LM, Nagle RB, Bowden GT. Mapping of the metalloproteinase gene matrilysin (MMP7) to human chromosome 11q21-->q22. *Cytogenet Cell Genet* 1996; 72: 179-182

2 邵珠营, 马涛, 王丹丹. 直肠癌中MMP-7和MVD的表达及其与肿瘤转移和预后的相关性研究. 中国医药导报 2009; 6: 42-44

3 王桂兰, 陈莉, 李杏玉, 王酉, 钱铮. NET-1、Ki67和CD34在胃癌组织中的表达及其临床病理意义. 肿瘤防治研究 2009; 36: 216-220

4 高宝辉, 谢丽辉, 祁旦己, 赵志光, 谢小志, 王宗敏. MMP-7、MVO在子宫内膜样腺癌中的表达. 实用肿瘤学杂志 2004; 18: 343-346

5 Takeuchi N, Ichikawa Y, Ishikawa T, Momiyama N, Hasegawa S, Nagashima Y, Miyazaki K, Koshikawa N, Mitsuhashi M, Shimada H. Matrilysin gene expression in sporadic and familial colorectal adenomas. *Mol Carcinog* 1997; 19: 225-229

6 Crawford HC, Scoggins CR, Washington MK, Matrisian LM, Leach SD. Matrix metalloproteinase-7 is expressed by pancreatic cancer precursors and regulates acinar-to-ductal metaplasia in exocrine pancreas. *J Clin Invest* 2002; 109: 1437-1444

7 Rath T, Roderfeld M, Graf J, Wagner S, Vehr AK, Dietrich C, Geier A, Roeb E. Enhanced expression of MMP-7 and MMP-13 in inflammatory bowel disease: a precancerous potential? *Inflamm Bowel Dis* 2006; 12: 1025-1035

8 Noë V, Fingleton B, Jacobs K, Crawford HC, Vermeulen S, Steelant W, Bruyneel E, Matrisian LM, Mareel M. Release of an invasion promoter E-cadherin fragment by matrilysin and stromelysin-1. *J Cell Sci* 2001; 114: 111-118

9 Ozaki I, Yamamoto K, Mizuta T, Setoguchi Y, Morito F, Sakai T. Detection of matrix

metalloproteinase gene expression by reverse transcription-polymerase chain reaction in human hepatocellular carcinoma. *Int Hepatol Commun* 1996; 6: 36-42
10 Ishii Y, Nakasato Y, Kobayashi S, Yamazaki Y, Aoki T. A study on angiogenesis-related matrix metalloproteinase networks in primary hepatocellular carcinoma. *J Exp Clin Cancer Res* 2003; 22: 461-470
11 Huachuan Z, Xiaohan L, Jinmin S, Qian C, Yan X, Yinchang Z. Expression of matrix metalloproteinase-7 involving in growth, invasion, metastasis and angiogenesis of gastric cancer. *Chin Med Sci J* 2003; 18: 80-86

编辑 李军亮 电编 何基才

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2009年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

2007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	19	44	−0.98	0.059	44	−0.89
G275	WORLD JOURNAL OF GASTROENTEROLOGY	4431	1	3.46	0.745	10	0.38
G803	肝脏	467	28	−0.53	0.537	17	−0.01
G938	国际呼吸杂志	521	25	−0.48	0.386	32	−0.29
G415	国际内分泌代谢杂志	654	20	−0.34	0.520	19	−0.04
G939	国际脑血管病杂志	662	19	−0.33	0.480	22	−0.11
G501	临床肝胆病杂志	497	26	−0.50	0.318	36	−0.41
G291	临床骨科杂志	689	18	−0.31	0.455	25	−0.16
G658	临床荟萃	1169	13	0.18	0.233	40	−0.57
G257	临床内科杂志	651	21	−0.35	0.367	34	−0.32
G855	临床消化病杂志	292	36	−0.71	0.394	30	−0.27
G261	临床心血管病杂志	866	17	−0.13	0.474	24	−0.12
G293	临床血液学杂志	341	34	−0.66	0.347	35	−0.36
G491	岭南心血管病杂志	157	41	−0.84	0.110	43	−0.79
G662	内科急危重症杂志	276	37	−0.72	0.318	36	−0.41
G746	实用肝脏病杂志	297	35	−0.70	1.100	3	1.04
G190	**世界华人消化杂志**	**2353**	**5**	**1.37**	**0.568**	**15**	**0.05**
G800	胃肠病学	376	33	−0.62	0.372	33	−0.31
G326	胃肠病学和肝病学杂志	468	27	−0.53	0.399	29	−0.26
G451	现代消化及介入诊疗	84	43	−0.92	0.230	41	−0.58
G083	心肺血管病杂志	214	40	−0.78	0.206	42	−0.62
G419	心血管病学进展	467	28	−0.53	0.419	27	−0.23
G260	心脏杂志	523	24	−0.47	0.392	31	−0.28
G610	胰腺病学	223	38	−0.78	0.282	38	−0.48
G234	中国动脉硬化杂志	869	16	−0.13	0.521	18	−0.04
G422	中国脑血管病杂志	223	38	−0.78	0.503	21	−0.07
G267	中国实用内科杂志	2121	7	1.13	0.601	13	0.11
G211	中国糖尿病杂志	1284	11	0.29	0.931	7	0.72
G203	中国心脏起搏与心电生理杂志	616	23	−0.38	0.599	14	0.11
G633	中国血液净化	449	31	−0.55	0.478	23	−0.12
G119	中国循环杂志	643	22	−0.35	0.411	28	−0.24
G231	中华肝脏病杂志	2746	4	1.76	1.056	4	0.95
G235	中华高血压杂志	982	15	−0.01	0.757	9	0.40
G639	中华老年多器官疾病杂志	143	42	−0.86	0.235	39	−0.57
G876	中华老年心脑血管病杂志	465	30	−0.53	0.431	26	−0.20
G150	中华老年医学杂志	1010	14	0.02	0.510	20	−0.06
G155	中华内分泌代谢杂志	1548	9	0.56	1.032	5	0.91
G156	中华内科杂志	3238	3	2.26	0.847	8	0.57
G161	中华肾脏病杂志	1477	10	0.49	1.018	6	0.88
G285	中华消化内镜杂志	1271	12	0.28	0.607	12	0.12
G168	中华消化杂志	2249	6	1.26	1.123	2	1.08
G892	中华心率失常学杂志	384	32	−0.61	0.568	15	0.05
G170	中华心血管病杂志	3705	2	2.73	1.217	1	1.25
G172	中华血液学杂志	1632	8	0.64	0.633	11	0.17
	平均值	994			0.541		

以上数据摘自《中国科技期刊引证报告》(2008年版). 科学技术文献出版社, 160-161.

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2009年10月8日; 17(28): 2908-2914
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

文献综述 REVIEW

非酒精性脂肪性肝病的代谢发病机制

吴涛, 季光

■背景资料
肝脏是机体代谢的枢纽, 承担了大部分的合成、分解、转化和排泄等代谢过程, 其中某些酶系和功能是肝脏所特有的. 从代谢的角度对肝脏和肝脏疾病进行系统研究十分重要.

吴涛, 上海中医药大学中医方证和系统生物学研究中心 上海市 201203
季光, 上海中医药大学脾胃病研究所 上海中医药大学附属龙华医院消化内科 上海市 200032
国家自然科学基金资助项目, No. 30873260
上海市教委重点学科基金资助项目, No. J50305
上海市优秀学科带头人计划基金资助项目, No. 09XD1403800
上海高校优秀青年教师科研专项基金资助项目, No. 08063
作者贡献分布: 本文综述由吴涛完成; 季光审校.
通讯作者: 季光, 教授, 主任医师, 200032, 上海市宛平南路725号, 上海中医药大学脾胃病研究所, 上海中医药大学附属龙华医院消化内科. jiliver@vip.sina.com
电话: 021-64286261 传真: 021-64286261
收稿日期: 2009-07-31 修回日期: 2009-09-13
接受日期: 2009-09-21 在线出版日期: 2009-10-08

Pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease: a perspective from metabolism

Tao Wu, Guang Ji

Tao Wu, Center of Chinese Medicine Therapy and Systems Biology, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China
Guang Ji, Department of Gastroenterology, Longhua Hospital, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200032, China
Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30873260; the Shanghai Leading Academic Discipline Project, No. J50305; the Program of Shanghai Subject Chief Scientist, No. 09XD1403800; and the Scientific Research Special Foundation for Outstanding Young Teachers in Higher Education Institutions in Shanghai, No. 08063
Correspondence to: Professor Guang Ji, Institute of Spleen and Stomach Diseases, Department of Gastroenterology, Longhua Hospital, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, 725 Wanping South Road, Shanghai 200032, China. jiliver@vip.sina.com
Received: 2009-07-31 Revised: 2009-09-13
Accepted: 2009-09-21 Published online: 2009-10-08

Abstract
Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) is one of the most common chronic liver diseases. As NAFLD is frequently associated with many insulin resistance-related diseases such as obesity, hyperglycosemia, hyperlipidemia, hyperinsulinism and hypertensive disease, it is greatly threatening human health. In this article, we will review the association of NAFLD with glucose and lipid metabolism from a perspective of metabolic network. Furthermore, we suggest that metabonomics could be used to clarify the pathogenesis of NAFLD to provide a basis for diagnosis and treatment of the disease.

Key Words: Non-alcoholic fatty liver disease; Metabolism; Pathogenesis

Wu T, Ji G. Pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease: a perspective from metabolism. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2009; 17(28): 2908-2914

摘要
非酒精性脂肪性肝病(non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD)是常见的慢性肝脏疾病, 往往与肥胖、高血糖症、高脂血症、高胰岛素血症、高血压病等胰岛素抵抗相关性疾病并存, 严重威胁着人类的健康. 本文主要从代谢网络调控角度探讨NAFLD与机体糖、脂代谢间的相关性, 并提出运用现代代谢组学的方法研究两者之间的可能内在关系, 旨在为临床诊断和治疗提供依据.

关键词: 非酒精性脂肪性肝病; 代谢; 发病机制

吴涛, 季光. 非酒精性脂肪性肝病的代谢发病机制. 世界华人消化杂志 2009; 17(28): 2908-2914
http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/2908.asp

0 引言
非酒精性脂肪性肝病(non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD)是遗传-环境-代谢应激相关性疾病, 包括单纯性脂肪肝以及由其演变的脂肪性肝炎(non-alcoholic steatohepatitis, NASH)和肝硬化. NAFLD往往与肥胖、高血糖症、高脂血症、高胰岛素血症、高血压病等胰岛素抵抗相关性疾病并存, 严重威胁着人类的健康[1-2]. Day *et al*[3]在1998年提出了“二次打击”学说, 初次打击主要是胰岛素抵抗(insulin resistance, IR)[4-5]. 在此阶段, 由于机体组织适应性反应机制的抗氧化、抗细胞凋亡、瘦素的抗脂肪毒性等防御功能可与之相抗衡, 故大多数单纯性脂肪肝的结构和功能改变是可逆的[6]. 二次打击主要是反

■同行评议者
王炳元, 教授, 中国医科大学附属第一医院消化内科

应性氧化代谢产物增多, 导致脂质过氧化伴细胞因子、线粒体解偶联蛋白及Fas配体被诱导活化, 使脂肪变性的肝细胞发生变性、坏死, 甚至发生坏死性肝纤维化[7]. 在脂肪的演变中, 发生肿瘤坏死因子-瘦素-胰岛素反馈轴改变, IR进一步削弱了抗葡萄糖变性和抗脂肪变性的能力, 适应性反应出现缺陷, 细胞防御机制减弱. 另外, 缺氧、内毒素、药物等作为附加因素实行多重打击. 虽然对该疾病的发病机制和治疗研究有所进展, 但目前NAFLD的发病机制仍然未能完全阐明[8]. 肝脏是糖、脂代谢的主要场所, 本文主要从代谢网络调控角度探讨NAFLD与机体糖、脂代谢间的相关性, 解析NAFLD的代谢发病机制, 并提出运用现代代谢组学的方法研究两者之间的可能内在关系, 旨在为临床诊断和治疗提供依据.

1 NAFLD与糖代谢异常

当肝脏受损肝功能异常时, 可干扰葡萄糖的生成(糖原分解、糖原异生)或利用糖原合成、甘油三酯(triglyceride, TG)合成的机制, 引起低血糖或葡萄糖耐量降低而血糖升高. 一般肝细胞损害超过80%时, 几乎均伴有糖代谢异常, 其中70%表现为低血糖[9].

肝脏脂肪代谢与许多调节能量代谢维持组织完整性的代谢产物、激素、细胞因子和神经介质的作用相关. 脂肪肝不仅仅是代谢障碍的受害者, 他也能触发信号使得肝内脂肪代谢正常化, 这样就不可避免也改变了在其他组织中调节脂肪代谢的细胞因子、激素和神经介质的活性. 这些因素相互作用, 引起神经体液和免疫系统的功能障碍, 导致IR、代谢综合征的发生. IR是发生发展的基础, 随着肝脏疾病的慢性进展, 肝细胞反复受损伤, 肝纤维化程度加重, 同时糖代谢异常及IR的发生率逐渐增高,常伴有高血糖和高胰岛素血症[10]. 这种现象与肝脏对血糖摄取、糖原合成及分解功能障碍及高血糖刺激胰岛素分泌, 肝脏摄取、降解胰岛素的作用减弱等因素有关. 不同糖代谢状态人群均存在IR, 且通过高胰岛素正常葡萄糖钳夹实验等方法发现, NAFLD患者几乎都存在IR. Knobler *et al*[11]研究发现, NAFLD与IR综合征(insulin resistance syndrome, IRS)共同表现为糖耐量异常, 高胰岛素血症, 总胆固醇增高, 高密度脂蛋白胆固醇(high-density lipoprotein cholesterol, HDL-C)下降, 高血压, 肥胖. Chitturi *et al*[12]研究表明, IR对于NASH肝组织学改变至关重要. NAFLD、2型糖尿病、肥胖之间共同之处是肝脏胰岛素敏感性减低, 伴随有胰岛素对糖脂代谢的调节效应减低, 提示NAFLD已存在肝IR, 并不是伴发于IRS.

然而NAFLD的发生与糖代谢调节受损的发生是否同步? 从NAFLD形成的可能机制看, IR患者之代谢紊乱先于糖代谢. 首先, 脂肪分解、葡萄糖的处置、脂肪β氧化通路对IR的敏感性不同, 常常是依次降低. IR时首先是胰岛素的抑制脂肪效应受损, 产生大量的游离脂肪酸(free fatty acids, FFA), 并被肝脏摄取, 同时存在从先利用糖氧化向先利用脂质氧化转变, 由于脂质β氧化通路对胰岛素的敏感性最小, IR时肝细胞的FFA的β氧化相对正常或升高, 从而产生大量的肝脂质过氧化物, 并伴随有线粒体损伤. 其次, NAFLD形成过程中有瘦素抵抗的参与. 胰岛素受体底物-2(insulin receptor substrate, IRS-2)基因缺乏引起肝脏IR, 导致高胰岛素形成, 脂肪组织的糖和脂质摄取增高, 脂肪细胞增生肥大, 后者最终导致下丘脑的瘦素抵抗, 可见脂肪细胞改变先于瘦素抵抗, 瘦素可增高外周组织的糖摄取及更新. 瘦素抵抗时, 上调固醇调节元件结合蛋白(sterol regulatory element-binding proteins, SREBP-c)基因的表达, 引起脂肪肝[13].

再次, 许多研究探讨了NAFLD与糖代谢异常的关系. Jimba *et al*[14]发现在1950例体检者中有599例NAFLD患者(29%),其中27%正常血糖, 43%空腹血糖升高, 62%诊断为糖尿病. Haukeland *et al*[15]研究发现糖耐量异常可能提示NAFLD患者进展为脂肪性肝炎和纤维化. 也有学者认为, NAFLD可能是糖尿病前的一个阶段[16]. Xu *et al*[17]研究显示NAFLD患者糖代谢异常的发生率高达53.4%, 且随着糖代谢异常的发生肝功能损伤更加明显, 高敏C反应蛋白(high-sensitivity C-reactive protein, hsCRP)水平升高. hsCRP是一种敏感、非特异性的炎症标志物, 近年来已被公认为是糖代谢异常的独立危险因素[18-19]. Temelkova-Kurktschiev *et al*[20]和Festa *et al*[21]研究结果已经证实, CRP与血糖相关的原因与高血糖及胰岛素水平异常等状态导致血管内皮细胞损伤, 引起炎症反应有关, 通过检测血清hsCRP可以判断NAFLD患者肝脏炎症与合并糖代谢异常的情况. 陈阳[13]探讨了不同糖代谢状态与NAFLD相关性, 结果显示: 随着糖耐量受损的加重, NAFLD患病增加, 且在空腹血糖受损(impaired fasting blood glucose, IFG)、2型糖尿病状态处存在高峰点, 表明IFG、2型糖尿病时IR及胰岛β细胞功能受损程度相关. Tripathy *et al*[22]研究了IFG与正常葡萄糖

■**研发前沿**
NAFLD与糖、脂质代谢紊乱有关, 他们互为因果、互相影响. 目前NAFLD和IR间谁是因谁是果未能明确, NAFLD、IR和糖脂代谢间的相互关系亟待进一步研究.

■相关报道
Cusi *et al*研究发现甘油二酯酰基转移酶1(DGAT1)和DGAT2, 作为合成TG的最后一步的酶类, 在肝脏TG的代谢中起着重要的作用. 细胞和鼠类NAFLD模型中DGAT酶类表达的变化, 提示这些酶在肝脏脂肪变性中起着重要的作用, 可作为NAFLD新的治疗靶点.

耐量两组NAFLD患者, 发现前者年龄、体质量指数(body mass index, BMI)、总胆固醇、TG显著增高, HDL-c降低. 表明在不同糖耐量状态IR及β细胞功能受损程度不同, NAFLD始终与IR伴随并平行发展, 最终导致糖尿病. 李锋 *et al*[23]为探讨NAFLD对代谢异常及多元代谢紊乱发病的影响, 选取随访4-7年的NAFLD及其对照人群作为研究对象, 证实NAFLD促进高血压、高脂血症、IFG、糖尿病以及多元代谢紊乱的发生, 而且这种作用不依赖肥胖. 阎彩凤 *et al*[24]评价不同程度肝脏脂质浸润对糖脂代谢的影响, 结果发现随着NAFLD并发NASH和(或)合并糖代谢异常可以进一步加重机体代谢紊乱, NAFLD患者尽管具有与正常对照组相似的BMI, 但腰围和IR指数仍明显增加. Su *et al*[25]研究了23例脂肪肝患者的糖代谢情况, 结果发现ALT/AST异常组(13例)r-GT、空腹胰岛素、空腹瘦素、自我平衡模型分析法(homeostasis model assessment, HOMA)-IR、HOMA-IR β细胞功能明显较ALT/AST正常组高; C肽水平较之低. OGTT实验显示, 在0、30、60、90 min血糖水平无明显差异, 但是2 h血糖两组均有升高, 且ALT/AST异常组高于ALT/AST正常组. 提示脂肪肝是发生2型糖尿病的危险信号, 尤其在转氨酶升高时. 丁钢 *et al*[26]用丹参素和熊去氧胆酸培养脂肪肝模型鼠肝细胞, 细胞经1 wk培养后, 再调整培养液中糖至13.9 mmol/L和胰岛素至250 mU/L 2 h和24 h测定糖含量, 24 h测定胰岛素含量. 结果表明脂肪肝模型鼠肝细胞经丹参素培养后, 对胰岛素的摄取、结合能力提高, 糖代谢能力增强. 虽然目前关于糖耐量异常与NAFLD的研究较多, 但两者的风险关系以及孰前孰后, 至今未完全明了.

2 NAFLD与脂质代谢异常

血脂主要包括胆固醇(游离胆固醇、胆固醇酯)、TG、磷脂、HDL和低密度脂蛋白(low density lipoprotein, LDL)的载脂蛋白. 血脂只有与蛋白质结合合成脂蛋白, 才能呈溶解状态并在血浆中转运. HDL是唯一通过胆固醇的逆向转运来产生抗动脉硬化作用的脂蛋白, 可以有效地防护心脑血管硬化及血栓形成[27]. HDL的载脂蛋白是在肝脏合成, 在肝内具有激活卵磷脂-胆固醇酰基转移酶(lecithin cholesterol acyltransferase, LCAT), 参与胆固醇逆向运转及HDL受体识别等作用. 肝脏是体内脂肪代谢的重要场所, 如果肝内脂质长期堆积, 引起肝细胞变性, 可能导致肝功能异常或脂肪性肝纤维化、肝硬化[28].

许多研究结果显示NAFLD患者存在明显的脂代谢紊乱和IR[29-32]. Lee *et al* [33]发现NAFLD患者存在相对增高的内脏脂肪. 肝脏脂质代谢是一个复杂的过程与体内多种物质转化有关, 因而脂肪肝与多种疾病存在着内在联系. 肝细胞中TG、极低密度脂蛋白(very low density lipoprotein, VLDL)合成和排出不平衡是形成脂肪肝的主要原因. 当进入肝脏的脂肪量超过肝脏的脂质和氧化能力, 或肝脏合成LDL障碍, 肝脏合成的内源性TG就不能以脂蛋白的形式进出肝脏, 则在肝细胞内外堆积形成脂肪肝. 而脂肪肝病变又影响脂代谢, 加重高血脂而形成恶性循环[34]. 以TG为主的脂肪在肝内沉积是发展为NAFLD的绝对必要条件, 远距离产生的内分泌激素以及局部产生的激素和细胞因子共同调控着肝脏的脂肪代谢. 但也有人认为, 当肝功能损伤或不全时, 脂质合成和代谢的酶系损伤或功能不全, 血清TG及胆固醇均会降低[35].

几乎所有的NAFLD患者都存在周围组织和肝脏的IR, 而且不一定伴有糖耐量异常或肥胖, 但IR的严重程度与NAFLD的病程进展及预后相关[36]. 目前研究认为, IR是由于脂肪在胰岛素敏感组织如骨骼肌[37]和肝脏等部位的蓄积, 使该组织对胰岛素的敏感性下降所致. IR主要通过两个途径导致脂肪在肝细胞内储积: 脂质过多症和高胰岛素血症. IR导致血清中FFA增多, 而肝细胞对脂肪酸的高摄入导致线粒体氧化超载, 加重肝细胞内脂肪酸的储存; 增多的FFA又可通过抑制胰岛素的信号传导并减少胰岛素的清除, 加重IR. 高胰岛素血症是糖降解增加, 从而增加脂肪酸的合成, 减少ApoB的合成, 使TG储积增加. 当脂肪细胞内脂肪过度堆积时, 可使脂肪细胞的代谢效应和内分泌功能下降, 正常的脂肪合成及氧化途径减弱, 结果脂肪通过FFA形式由脂肪细胞向肝细胞等非脂细胞流动, 从而导致脂肪异位沉积[31].

NAFLD时与IR伴随的主要的代谢异常是周围组织脂解作用的增加, 肝糖原排出增加, 导致糖原异生和脂质过氧化增加[38-39]. 脂蛋白脂肪酶(lipoprotein lipase, LPL)与肝酯酶(hepatic lipase, HL)是血循环中与内源性TG代谢有关的两种关键酶. LPL为TG水解酶, 由肝外细胞合成, 分泌后附着于周围组织毛细血管表面, 尤其是脂肪组织; 主要分解TG, 并在脂蛋白之间转移胆固醇、磷脂及载脂蛋白. HL由肝实质细胞合成仅存在于肝

内皮细胞表面; HL具有两种生物功能, 血液中HL能水解TG, 是TG分解的限速酶; 肝细胞膜上HL与细胞膜上的硫酸乙酰肝素多糖结合, 在脂蛋白与肝细胞膜间起“桥梁”作用, 有利于肝细胞摄取血中脂质. 此二酶活性降低, 可以引起高脂血症, 与脂肪肝形成密切相关[40]. 近期研究发现, 甘油二酯酰基转移酶1(diacylglycerol acyltransferase, DGAT1)和DGAT2, 作为合成TG的最后一步的酶类, 已经被证实在肝脏TG的代谢中起着重要的作用[41]. 细胞和鼠类NAFLD模型中DGAT酶类表达的变化, 提示这些酶在肝脏脂肪变性中起着重要的作用, 可作为NAFLD新的治疗靶点.

LXR-α(liver X receptor α)是一种与脂类代谢有关的核受体, 调控着胆固醇和脂肪酸的代谢[42], 摄入过多的胆固醇与NAFLD发病相关. Higuchi *et al*[43]研究表明LXR通过调节SREBP-1c的表达调控着NAFLD患者的脂质代谢. Nakamuta *et al*[44]检测了NAFLD患者肝组织中胆固醇代谢相关基因的表达, 结果发现在NAFLD中存在胆固醇代谢失调, 且胆固醇的过多产生会导致LDL的升高、LXR-α及SREBP-1c的活化, 脂肪酸合成的增加. 许多动物实验证明摄入磷脂类物质能刺激胆汁酸和胆固醇的分泌, 并能影响血清和脂蛋白的水平, 但这一有效性仍然需要大量对照临床实验去证明[45].

不少研究认为, FFA过多是NAFLD重要的发病机制之一. 这是因为FFA是具有很强细胞毒性的分子, 增多的FFA除了介导IR参与第1次打击外, 还作为去垢剂损害细胞质、线粒体和溶酶体膜等, 且能加强TNF-α等细胞因子的毒性, 加剧生物膜的损伤, 导致肝细胞线粒体肿胀和通透性增加, 肝细胞变性、坏死和炎细胞浸润. 虽然增多的FFA仅占肝脏脂质的极少部分, 但有实验证明, 极低浓度的FFA即有可能损伤细胞膜[46-47]. Kohjima *et al*检测NAFLD患者活检肝组织中脂肪酸代谢相关基因的表达发现, 脂肪酸的合成和吸收进一步加重了脂肪酸在肝内的聚集, 其机制可能与脂肪酸氧化途径的上调, 脂肪分解的抑制相关[48-49]. 研究表明NAFLD中肝脏的多不饱和脂肪酸(polyunsaturated fatty acid, PUFA)n6∶n3的比例明显的升高; 内源性大麻素结合肝脏的中枢性大麻受体(CB1), 引起了SREBP-1c的过表达[50-51]. 应用CB1受体拮抗剂可以改善肥胖小鼠的脂肪变性和血浆ALT水平[52]. 人类NAFLD内源性大麻素激活的研究尚缺乏. Tanaka *et al*[53]研究显示, NASH患者服用二十碳五烯酸(eicosapentaenoic acid, EPA)(n3 PUFA的主要成分)12 mo, 所有的患者在血浆ALT和FFA水平上均有明显改善, 少数在组织学上有所改善, 但EPA在治疗NASH中起抗脂质作用仍然需要进一步证实. 如何减少脂肪酸及TG在肝脏中的沉积, 使脂肪肝得以逆转或使其发展得以控制, 阻止其向NAFLD的终末阶段进展是临床上研究的热点.

目前对脂肪肝治疗的方法包括如何减少IR, 减少反应性氧化体系的生成增多, 减少肝脂质过氧化等因素, 减少糖和脂质代谢异常的发生, 就有可能阻碍脂肪肝的形成.

■创新盘点

肝脏是糖、脂代谢的主要场所, 本文主要从代谢网络调控角度探讨NAFLD与机体糖、脂代谢间的相关性, 解析NAFLD的代谢发病机制, 并提出运用现代代谢组学的方法研究两者之间的可能内在关系,旨在为临床诊断和治疗提供依据.

3 NAFLD与氨基酸代谢异常

Kalhan *et al*[54]提出脂肪肝影响着甲硫氨酸的代谢. 其作为一种必需氨基酸, 由激素、胰岛素和胰高血糖素和氧化还原状态所调节, 所以甲硫氨酸的代谢容易受环境、营养因素和病理状态的影响. 卢艳华 *et al*[55]通过随机对照临床研究证实, 以复方氨基酸胶囊为主, 配合调脂药对脂肪肝患者具有减轻临床症状、改善肝功能等疗效. 说明在一定程度上, NAFLD存在氨基酸代谢的异常, 但具体的机制需要在以后的研究工作中进一步发现和证实.

4 NAFLD与铁代谢异常

有研究认为NAFLD常伴有铁代谢紊乱. Facchini *et al*[56]研究显示了铁和超高胰岛素血症在NAFLD发病机制中的作用. 此外, 研究发现铁蛋白的增加和转铁蛋白的饱和在脂肪肝患者中常见, 但仅反应了正常饮食的NAFLD患者的铁超负荷[57]. Baptista-Gonzalez *et al*[58]提出铁代谢紊乱与NAFLD的发病机制相关. Mitsuyoshi *et al*[59]通过对74个NAFLD患者活检组织中与脂肪酸代谢和铁代谢相关基因的定量检测表达结果显示, 随着NAFLD的发展, 脂肪变性相关的代谢减弱, 与铁相关的代谢进一步恶化.

但也有学者认为铁的蓄积并未与死亡率和肝硬化的发展相关, 且大部分NAFLD患者未见明显的铁蓄积, 此外铁并未与临床和病理结局相关[60]. Moon *et al*[61]认为肝脏铁沉积并不与肝脏炎症和纤维化的程度相关, 肝脏铁并不是NAFLD肝损伤的独立预测因素. 目前关于铁超负荷与NAFLD的关系不是很清楚[62].

此外, Aigner *et al*[63]研究表明大部分NAFLD患者出现铜缺乏, 铜的状态与铁平衡相关

■应用要点
采用代谢组学的研究方法，在NAFLD乃至肝脏疾病领域必有广阔的应用前景，从而寻找出新的各阶段肝脏疾病的早期特征性标志，为其诊断、治疗及预后评价提供新的客观依据.

联, 提示铜生物利用度降低, 通过降低铁蛋白(ferroprotein-1, FP-1)表达和亚铁氧化酶血浆铜蓝蛋白活性引起了肝脏铁分数增加, 因而阻断了铜缺乏患者的肝脏铁的输出.

5 代谢组学在探讨NAFLD发病机制中的应用

NAFLD与糖、脂质代谢紊乱有关, 他们互为因果、互相影响. 但目前NAFLD和IR间谁是因谁是果未能明确, NAFLD、IR和糖脂代谢间的相互关系还需进一步研究. 肝脏是机体代谢的枢纽, 承担了大部分的合成、分解、转化和排泄等代谢过程, 其中某些酶系和功能是肝脏所特有的. Mitsuyoshi *et al*[59]提出对NAFLD的治疗必须在代谢变化的基础上进行考虑. 因此从代谢的角度对肝脏和肝脏疾病进行系统研究非常重要.

1999年Nicholson博士首次提出代谢组学概念[64-65]. 代谢组学最早应用于发现疾病的分子诊断标志物, 最成功的例子是VLDL、LDL、HDL和胆碱浓度变化区分冠心病患者与正常人[66]. 代谢组学目前在NAFLD中的应用研究不多. Dumas *et al*[67]采用NMR对易患脂肪肝的129S6小鼠进行血清和尿液代谢表型分析, 显示高脂饮食的129S6小鼠NAFLD的形成与体内胆碱代谢紊乱是相伴随的; 129S6小鼠体内微生物群使得胆碱向甲胺转变,并且降低了胆碱的生物利用度, 进而引起NAFLD. van Ginneken *et al*[68]应用代谢组学方法研究了24 h禁食后引起的肝脏脂肪变性大鼠模型. 高效薄层色谱法(high performance thin layer chromatography, HPTLC)发现模型组血浆游离胆固醇(free cholesterol, FC)较正常组增长至192%, TG至456%, 胆固醇脂类(cholesterol esters, CE)至268%; LC-MS方法研究肝组织匀浆中的磷脂酰胆碱(phosphatidylcholine, PC)较正常组降低至90%, CE增长至157%和TG增长至331%. 说明哺乳动物中肝脏脂质是一个动态系统, 容易被如饥饿等环境因素所调节. Debois *et al*[69]采用飞行时间-次级离子质谱分析法(time-of-flight-secondary ion mass spectrometry, TOF-SIMS), 分析了少数NAFLD患者肝组织中的脂质的变化情况, 结果发现TG、甘油二酯、一酰甘油、脂肪酸和豆蔻酸大量积聚, Vit-E丢失和选择性的大空泡性胆固醇出现在脂肪肝的脂肪变性区域. Yang *et al*[70]用HPLC技术结合PCA软件对肝炎、肝硬化和肝癌患者尿液的代谢指纹图谱进行分析, 能够有效地将肝炎、肝硬化患者从肝癌患者中区分开, 降低临床诊断中假阳性比率, 在肝癌诊断方面显示出比传统的肿瘤标志物(甲胎蛋白)更好的相关性. 国内已有学者通过建立GC/MS检测肝病血清代谢谱的方法, 在肝衰竭动物血清中检测到25种内源性代谢物; 建立了UPLC/MS检测肝病血清和尿液代谢组学的方法. 在实验动物研究方面, 已开展NAFLD代谢组学的探索, NAFLD大鼠血浆中类脂(主要是VLDL、LDL)、乳酸等主要代谢物峰较正常组含量明显降低; 模型大鼠尿液中马尿酸、α-酮戊二酸、柠檬酸等较正常组含量明显降低, 而肌酸酐、丙酮等含量明显增高. 这种变化可以被荷叶碱所调节.

6 结论

我们可以借助代谢组学的方法对NAFLD进行研究, 应用现代分析仪器(核磁共振, 色谱质谱联用等), 定性定量研究生物体(包括人类和动物)体液中(包括血清、尿液、组织液、细胞培养液等)的内源性代谢产物, 结合模式识别等信息学技术, 分析生物体在不同状态下(如生理与病理状态、给药前后等)的代谢指纹图谱的差异, 获得相应的生物标志物, 从而揭示生物体在特定时间、环境下的整体功能状态. 诸如, 可以采用以下方法, 临床试验(收集伴有肥胖或非肥胖NAFLD患者的血样和尿样), 动物实验(造模不同程度的NAFLD大鼠或小鼠模型), 细胞实验(脂肪肝模型鼠肝细胞, 收集不同时间段的细胞培养上清液), 进行某种药物干预的临床或者动物实验等等. 但由于代谢组学正处于初步发展阶段, 数据分析手段、各种分析技术仍需进一步完善, 但相信随着技术的进一步革新, 其在NAFLD乃至肝脏疾病领域必有广阔的应用前景, 从而寻找出新的各阶段肝脏疾病的早期特征性标志, 为其诊断、治疗及预后评价提供新的客观依据.

7 参考文献

1 Gupte P, Amarapurkar D, Agal S, Baijal R, Kulshrestha P, Pramanik S, Patel N, Madan A, Amarapurkar A, Hafeezunnisa. Non-alcoholic steatohepatitis in type 2 diabetes mellitus. *J Gastroenterol Hepatol* 2004; 19: 854-858

2 Del Gaudio A, Boschi L, Del Gaudio GA, Mastrangelo L, Munari D. Liver damage in obese patients. *Obes Surg* 2002; 12: 802-804

3 Day CP, James OF. Steatohepatitis: a tale of two "hits"? *Gastroenterology* 1998; 114: 842-845

4 Yu AS, Keeffe EB. Nonalcoholic fatty liver disease. *Rev Gastroenterol Disord* 2002; 2: 11-19

5 van Hoek B. Non-alcoholic fatty liver disease: a brief review. *Scand J Gastroenterol Suppl* 2004; (241): 56-59

6 曾民德. 脂肪肝发病机制“二次打击”的假设. 肝脏

2001; 6: 145
7 阎彩凤, 向红丁, 平凡, 陈伟. 不同类型非酒精性脂肪肝与糖脂代谢的相关分析. 中国慢性病预防与控制 2006; 14: 345-348
8 Cheung O, Sanyal AJ. Recent advances in nonalcoholic fatty liver disease. *Curr Opin Gastroenterol* 2009; 25: 230-237
9 张佳佳, 张全荣, 龚作炯. 重型肝炎患者血糖水平对病情及预后影响的分析. 中西医结合肝病杂志 2007; 17: 206-207
10 Petrides AS, Schulze-Berge D, Vogt C, Matthews DE, Strohmeyer G. Glucose resistance contributes to diabetes mellitus in cirrhosis. *Hepatology* 1993; 18: 284-291
11 Knobler H, Schattner A, Zhornicki T, Malnick SD, Keter D, Sokolovskaya N, Lurie Y, Bass DD. Fatty liver--an additional and treatable feature of the insulin resistance syndrome. *QJM* 1999; 92: 73-79
12 Chitturi S, Abeygunasekera S, Farrell GC, Holmes-Walker J, Hui JM, Fung C, Karim R, Lin R, Samarasinghe D, Liddle C, Weltman M, George J. NASH and insulin resistance: Insulin hypersecretion and specific association with the insulin resistance syndrome. *Hepatology* 2002; 35: 373-379
13 陈阳. 不同糖代谢状态与非酒精性脂肪肝相关性探讨. 中华现代内科学杂志 2005; 2: 488-491
14 Jimba S, Nakagami T, Takahashi M, Wakamatsu T, Hirota Y, Iwamoto Y, Wasada T. Prevalence of non-alcoholic fatty liver disease and its association with impaired glucose metabolism in Japanese adults. *Diabet Med* 2005; 22: 1141-1145
15 Haukeland JW, Konopski Z, Linnestad P, Azimy S, Marit Løberg E, Haaland T, Birkeland K, Bjøro K. Abnormal glucose tolerance is a predictor of steatohepatitis and fibrosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Scand J Gastroenterol* 2005; 40: 1469-1477
16 Sheth SG, Gordon FD, Chopra S. Nonalcoholic steatohepatitis. *Ann Intern Med* 1997; 126: 137-145
17 Xu Y, Whitmer K. C-reactive protein and cardiovascular disease in people with diabetes: high-sensitivity CRP testing can help assess risk for future cardiovascular disease events in this population. *Am J Nurs* 2006; 106: 66-72
18 Leinonen E, Hurt-Camejo E, Wiklund O, Hulten LM, Hiukka A, Taskinen MR. Insulin resistance and adiposity correlate with acute-phase reaction and soluble cell adhesion molecules in type 2 diabetes. *Atherosclerosis* 2003; 166: 387-394
19 Pietri P, Vyssoulis G, Vlachopoulos C, Zervoudaki A, Gialernios T, Aznaouridis K, Stefanadis C. Relationship between low-grade inflammation and arterial stiffness in patients with essential hypertension. *J Hypertens* 2006; 24: 2231-2238
20 Temelkova-Kurktschiev T, Siegert G, Bergmann S, Henkel E, Koehler C, Jaross W, Hanefeld M. Subclinical inflammation is strongly related to insulin resistance but not to impaired insulin secretion in a high risk population for diabetes. *Metabolism* 2002; 51: 743-749
21 Festa A, D'Agostino R Jr, Tracy RP, Haffner SM. Elevated levels of acute-phase proteins and plasminogen activator inhibitor-1 predict the development of type 2 diabetes: the insulin resistance atherosclerosis study. *Diabetes* 2002; 51: 1131-1137
22 Tripathy D, Carlsson M, Almgren P, Isomaa B, Taskinen MR, Tuomi T, Groop LC. Insulin secretion and insulin sensitivity in relation to glucose tolerance: lessons from the Botnia Study. *Diabetes* 2000; 49: 975-980
23 李锋, 范建高, 蔡晓波. 非酒精性脂肪性肝病致代谢异常. 肝脏 2006; 11: 38-41
24 阎彩凤, 向红丁, 平凡, 陈伟. 不同类型非酒精性脂肪肝与糖脂代谢的相关分析. 中国慢性病预防与控制 2006; 14: 345-348
25 Su CC, Wang K, Hsia TL, Chen CS, Tung TH. Association of nonalcoholic fatty liver disease with abnormal aminotransferase and postprandial hyperglycemia. *J Clin Gastroenterol* 2006; 40: 551-554
26 丁钢, 王宝仁, 陈乐明. 丹参素、熊去氧胆酸对大鼠脂肪肝肝细胞糖代谢的影响. 世界华人消化杂志 2005; 13: 1907-1909
27 孟群, 沈颖. 高密度脂蛋白的研究进展. 国外医学・生理、病理科学与临床分册 2001; 21: 411-413
28 王萍玉, 谢书阳, 杜秀娟. 脂肪肝与血脂、血糖、肝功能等因素的Logistic分析. 现代预防医学 2007; 6: 1024-1026
29 邹玲梅. 脂肪肝患者胰岛素抵抗的临床观察. 淮海医药 2004; 22: 375-376
30 刘迎并, 闫自强. 脂代谢异常与脂肪肝相关性分析. 实用医技杂志 2004; 11: 496-497
31 蔡葵, 何玉怡. 非酒精性脂肪肝与脂代谢紊乱及胰岛素抵抗的关系. 实用医技杂志 2006; 13: 2636-2637
32 Choi SS, Diehl AM. Hepatic triglyceride synthesis and nonalcoholic fatty liver disease. *Curr Opin Lipidol* 2008; 19: 295-300
33 Lee JH, Rhee PL, Lee JK, Lee KT, Kim JJ, Koh KC, Paik SW, Rhee JC, Choi KW. Role of hyperinsulinemia and glucose intolerance in the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver in patients with normal body weight. *Korean J Intern Med* 1998; 13: 12-14
34 徐卫, 石娜, 金蝶. 血脂水平与脂肪肝关系的调查. 现代预防医学 2004; 31: 424
35 朱小平. 肝硬化病人血糖和血脂的变化及其临床意义. 中国实验诊断学 2002; 6: 94-95
36 王广华, 刑象斌. 非酒精性脂肪肝发病机制研究进展. 中国康复理论与实践 2004; 10: 243-244
37 Virkamäki A, Korsheninnikova E, Seppälä-Lindroos A, Vehkavaara S, Goto T, Halavaara J, Häkkinen AM, Yki-Järvinen H. Intramyocellular lipid is associated with resistance to in vivo insulin actions on glucose uptake, antilipolysis, and early insulin signaling pathways in human skeletal muscle. *Diabetes* 2001; 50: 2337-2343
38 Haque M, Sanyal AJ. The metabolic abnormalities associated with non-alcoholic fatty liver disease. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2002; 16: 709-731
39 Byrne CD, Olufadi R, Bruce KD, Cagampang FR, Ahmed MH. Metabolic disturbances in non-alcoholic fatty liver disease. *Clin Sci* (Lond) 2009; 116: 539-564
40 张晓刚, 陈运贞. 肝脂酶与脂蛋白代谢. 国外医学・临床生物化学与检验学分册 2002; 23: 52-54
41 Cusi K. Nonalcoholic fatty liver disease in type 2 diabetes mellitus. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 2009; 16: 141-149
42 王素玲, 王切, 姜玲玲. LXR调节肝胆固醇排出代谢的机制. 河北医科大学学报 2007; 28: 221-223 l
43 Higuchi N, Kato M, Shundo Y, Tajiri H, Tanaka M, Yamashita N, Kohjima M, Kotoh K, Nakamuta M, Takayanagi R, Enjoji M. Liver X receptor in cooperation with SREBP-1c is a major lipid synthesis regulator in nonalcoholic fatty liver

■同行评价

本文内容丰富，参考文献引用恰当，具有较好的可读性.

disease. *Hepatol Res* 2008; 38: 1122-1129
44 Nakamuta M, Fujino T, Yada R, Yada M, Yasutake K, Yoshimoto T, Harada N, Higuchi N, Kato M, Kohjima M, Taketomi A, Maehara Y, Nakashima M, Kotoh K, Enjoji M. Impact of cholesterol metabolism and the LXRalpha-SREBP-1c pathway on nonalcoholic fatty liver disease. *Int J Mol Med* 2009; 23: 603-608
45 Cohn JS, Wat E, Kamili A, Tandy S. Dietary phospholipids, hepatic lipid metabolism and cardiovascular disease. *Curr Opin Lipidol* 2008; 19: 257-262
46 徐正婕, 范建高, 王国良. 游离脂肪酸在脂肪性肝炎发病中的作用. 中华肝脏病杂志 2000; 8: 127-128
47 Crouse SF, O'Brien BC, Rohack JJ, Lowe RC, Green JS, Tolson H, Reed JL. Changes in serum lipids and apolipoproteins after exercise in men with high cholesterol: influence of intensity. *J Appl Physiol* 1995; 79: 279-286
48 Kohjima M, Enjoji M, Higuchi N, Kato M, Kotoh K, Yoshimoto T, Fujino T, Yada M, Yada R, Harada N, Takayanagi R, Nakamuta M. Re-evaluation of fatty acid metabolism-related gene expression in nonalcoholic fatty liver disease. *Int J Mol Med* 2007; 20: 351-358
49 Nakamuta M, Kohjima M, Higuchi N, Kato M, Kotoh K, Yoshimoto T, Yada M, Yada R, Takemoto R, Fukuizumi K, Harada N, Taketomi A, Maehara Y, Nakashima M, Enjoji M. The significance of differences in fatty acid metabolism between obese and non-obese patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Int J Mol Med* 2008; 22: 663-667
50 Osei-Hyiaman D, DePetrillo M, Pacher P, Liu J, Radaeva S, Bátkai S, Harvey-White J, Mackie K, Offertáler L, Wang L, Kunos G. Endocannabinoid activation at hepatic CB1 receptors stimulates fatty acid synthesis and contributes to diet-induced obesity. *J Clin Invest* 2005; 115: 1298-1305
51 Sanyal AJ. Mechanisms of Disease: pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol* 2005; 2: 46-53
52 Serrano A, Del Arco I, Javier Pavón F, Macías M, Perez-Valero V, Rodríguez de Fonseca F. The cannabinoid CB1 receptor antagonist SR141716A (Rimonabant) enhances the metabolic benefits of long-term treatment with oleoylethanolamide in Zucker rats. *Neuropharmacology* 2008; 54: 226-234
53 Tanaka N, Sano K, Horiuchi A, Tanaka E, Kiyosawa K, Aoyama T. Highly purified eicosapentaenoic acid treatment improves nonalcoholic steatohepatitis. *J Clin Gastroenterol* 2008; 42: 413-418
54 Kalhan SC. Metabolism of methionine in vivo: impact of pregnancy, protein restriction, and fatty liver disease. *Nestle Nutr Workshop Ser Pediatr Program* 2009; 63: 121-131; discussion 131-133, 259-268
55 卢艳华, 徐智春, 白凤新. 复方氨基酸胶囊联合调脂药治疗脂肪肝临床观察. 中华临床医药 2003; 4: 25-26
56 Facchini FS, Hua NW, Stoohs RA. Effect of iron depletion in carbohydrate-intolerant patients with clinical evidence of nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology* 2002; 122: 931-939
57 Chitturi S, George J. Interaction of iron, insulin resistance, and nonalcoholic steatohepatitis. *Curr Gastroenterol Rep* 2003; 5: 18-25
58 Baptista-Gonzalez H, Chavez-Tapia NC, Zamora-Valdés D, Uribe M, Mendez-Sanchez N. Importance of iron and iron metabolism in nonalcoholic fatty liver disease. *Mini Rev Med Chem* 2008; 8: 171-174
59 Mitsuyoshi H, Yasui K, Harano Y, Endo M, Tsuji K, Minami M, Itoh Y, Okanoue T, Yoshikawa T. Analysis of hepatic genes involved in the metabolism of fatty acids and iron in nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatol Res* 2009; 39: 366-373
60 Younossi ZM, Gramlich T, Bacon BR, Matteoni CA, Boparai N, O'Neill R, McCullough AJ. Hepatic iron and nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 1999; 30: 847-850
61 Moon JH, Park SH, Oh KC, Jung JO, Shin WG, Kim JP, Kim KO, Park CH, Hahn T, Yoo KS, Kim JH, Kim DJ, Lee MS, Park CK, Jun SY. [Association of hepatic iron deposition and serum iron indices with hepatic inflammation and fibrosis stage in nonalcoholic fatty liver disease] *Korean J Gastroenterol* 2006; 47: 432-439
62 Cojocariu C, Trifan A, Stanciu C. [Involvement and role of iron in nonalcoholic steatohepatitis] *Rev Med Chir Soc Med Nat Iasi* 2008; 112: 308-312
63 Aigner E, Theurl I, Haufe H, Seifert M, Hohla F, Scharinger L, Stickel F, Mourlane F, Weiss G, Datz C. Copper availability contributes to iron perturbations in human nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology* 2008; 135: 680-688
64 Nicholson JK, Lindon JC, Holmes E. 'Metabonomics': understanding the metabolic responses of living systems to pathophysiological stimuli via multivariate statistical analysis of biological NMR spectroscopic data. *Xenobiotica* 1999; 29: 1181-1189
65 Goodacre R. Making sense of the metabolome using evolutionary computation: seeing the wood with the trees. *J Exp Bot* 2005; 56: 245-254
66 Brindle JT, Antti H, Holmes E, Tranter G, Nicholson JK, Bethell HW, Clarke S, Schofield PM, McKilligin E, Mosedale DE, Grainger DJ. Rapid and noninvasive diagnosis of the presence and severity of coronary heart disease using 1H-NMR-based metabonomics. *Nat Med* 2002; 8: 1439-1444
67 Dumas ME, Barton RH, Toye A, Cloarec O, Blancher C, Rothwell A, Fearnside J, Tatoud R, Blanc V, Lindon JC, Mitchell SC, Holmes E, McCarthy MI, Scott J, Gauguier D, Nicholson JK. Metabolic profiling reveals a contribution of gut microbiota to fatty liver phenotype in insulin-resistant mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103: 12511-12516
68 van Ginneken V, Verhey E, Poelmann R, Ramakers R, van Dijk KW, Ham L, Voshol P, Havekes L, Van Eck M, van der Greef J. Metabolomics (liver and blood profiling) in a mouse model in response to fasting: a study of hepatic steatosis. *Biochim Biophys Acta* 2007; 1771: 1263-1270
69 Debois D, Bralet MP, Le Naour F, Brunelle A, Laprévote O. In situ lipidomic analysis of nonalcoholic fatty liver by cluster TOF-SIMS imaging. *Anal Chem* 2009; 81: 2823-2831
70 Yang J, Xu G, Zheng Y, Kong H, Pang T, Lv S, Yang Q. Diagnosis of liver cancer using HPLC-based metabonomics avoiding false-positive result from hepatitis and hepatocirrhosis diseases. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2004; 813: 59-65

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2009年10月8日; 17(28): 2915-2918
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

文献综述 REVIEW

中药诱导肝癌细胞凋亡的研究进展

郑炜望, 华海清

郑炜望, 南京中医药大学第一临床医学院 江苏省南京市 210000
华海清, 中国人民解放军第八一医院全军肿瘤中心 江苏省南京市 210002
全军十一五中医药重大临床攻关基金资助项目, No. 2006051005
作者贡献分布: 本文综述由郑炜望完成; 华海清审校.
通讯作者: 华海清, 教授, 主任医师, 210002, 江苏省南京市, 中国人民解放军第八一医院全军肿瘤中心. huahaiqing@csco.org.cn
电话: 025-80864055
收稿日期: 2009-07-29 修回日期: 2009-09-10
接受日期: 2009-09-21 在线出版日期: 2009-10-08

Advances in research on Chinese medicines that can induce apoptosis of hepatocellular carcinoma cells

Wei-Wang Zheng, Hai-Qing Hua

Wei-Wang Zheng, the First Medicine College, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210000, Jiangsu Province, China
Hai-Qing Hua, Cancer Center, the 81st Hospital of Chinese PLA, Nanjing 210002, Jiangsu Province, China
Supported by: the PLA Key Clinical Research Program of TCM during the 11th Five-Year Plan Period, No. 2006051005
Correspondence to: Professor Hai-Qing Hua, Cancer Center, the 81st Hospital of Chinese PLA, Nanjing 210002, Jiangsu Province, China. huahaiqing@csco.org.cn
Received: 2009-07-29 Revised: 2009-09-10
Accepted: 2009-09-21 Published online: 2009-10-08

Abstract

Induction of apoptosis to prevent unlimited growth of tumor cells has become a hot spot in the field of tumor research in recent years. Previous studies have shown that some Chinese medicines and their extracts can induce apoptosis of hepatocellular carcinoma cells, which has aroused widespread concern. In this article, we will provide an overview of recent advances in research on Chinese medicines that can induce apoptosis of hepatocellular carcinoma cells.

Key Words: Chinese medicine; Hepatocellular carcinoma cell; Apoptosis; Progression

Zheng WW, Hua HQ. Advances in research on Chinese medicines that can induce apoptosis of hepatocellular carcinoma cells. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2009; 17(28): 2915-2918

摘要

如何诱导肿瘤细胞凋亡, 以阻止肿瘤的无限生长一直是近年来肿瘤研究领域里的热点. 研究表明, 中药及其提取物对诱导肝癌细胞凋亡具有确切的作用, 已引起学术界的普遍关注. 本文将通过对近年来有关文献的回顾与复习, 就中药及其提取物诱导肝癌细胞凋亡的相关研究进展作一综述.

关键词: 中药; 肝癌细胞; 凋亡; 进展

郑炜望, 华海清. 中药诱导肝癌细胞凋亡的研究进展. 世界华人消化杂志 2009; 17(28): 2915-2918
http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/2915.asp

■背景资料
肝癌是临床常见恶性肿瘤, 起病隐匿, 发病迅速, 预后极差, 死亡率高, 在全球发病率呈上升趋势. 运用药物诱导肝癌细胞凋亡是重要的治疗手段. 中药在这方面作用有其特点, 对其进行探讨有助于为肝癌的治疗提供新的思路和理论基础.

0 引言

细胞凋亡的概念自1972年Kerr和Wyllie提出后, 已成为当前生命科学的研究热点. 近年的研究证实, 凋亡与肿瘤的发生、发展、消退等存在着紧密的联系. 肝癌的发病机制与细胞增殖和凋亡的失衡密切相关. 肝癌的迅速生长是癌细胞增殖旺盛与凋亡减少的结果. 国内外已将细胞凋亡作为评估抗肿瘤药物疗效的一个重要指标. 中药与传统的手术、放疗及化疗相比, 具有多成分、多环节、多靶点效应的特点, 因此成为近年研究的热点. 本文就近年来研究较多的单味中药及其提取物对诱导肝癌细胞凋亡的研究进展作一综述.

1 清热解毒类中药

1.1 苦参碱 苦参碱为豆科植物苦参中提取的有效成分, 为一种生物碱, 其基本结构为苦参次碱-15酮, 具有抗炎、抗氧化、免疫抑制及抗肿瘤等作用. 研究[1]发现, 苦参碱能诱导人肝癌SMMC-7721细胞凋亡. 在苦参碱浓度为1.0 g/L时, 作用48 h的凋亡率为29.6%-32.8%, 机制与下调stat3、stat5的基因表达, 抑制JAK-STAT细胞信号转导通路有关. 程向东 *et al*[2]以HepG2细胞

■同行评议者
王学美, 研究员, 北京大学第一医院中西医结合研究室

■研发前沿
自从发现中药具有明显的抗癌活性后，各种中药及相关单体对肿瘤细胞的作用效果、分子机制就一直是研究的热点，但仍未有统一的认识，需要进一步研究.

为研究对象，发现苦参碱0.5 g/L作用48 h后，凋亡率约为22%. 而苦参碱1.0 g/L作用Bel-7402细胞48 h后，凋亡率仅为18.01%[3]. 进一步的研究表明，其作用可能是通过调节细胞内Bax和Bcl-2蛋白的表达，经线粒体信号转导途径实现的[2]，机制可能与苦参碱能将肝癌细胞周期阻滞在G_0/G_1期有关[3].

1.2 白花蛇舌草 白花蛇舌草为茜草科植物白花蛇舌草的全草，味甘淡，性凉，内含多种类型的化学成分，主要为蒽醌、萜类、多糖、微量元素和甾醇及其苷类化合物，具有清热利湿、解毒抗癌之功效. 研究表明，100 mg/L白花蛇舌草乙醇提取物对SMMC-7721的增殖抑制率达到39.40%，有效靶基因达20条，考虑是其多途径抗肿瘤所致[4]. 白花蛇舌草提取物也可抑制人肝癌细胞Bel-7402的生长，诱导细胞凋亡，且呈剂量依赖性，其机制可能与激活抑癌基因P53、抑制原癌基因Bcl-xL表达、直接影响肿瘤细胞能量代谢有关[5]. 亦有研究显示，在小鼠体内，白花蛇舌草在50 mg/kg时对H22的抑瘤率可达48.6%[6].

1.3 半枝莲 半枝莲又名狭叶韩信草，为唇形科黄芩属植物的干燥全草，性辛、苦、寒，具有清热解毒、活血化瘀、消肿止痛等功效. 半枝莲提取物对肝癌细胞的凋亡率为24.03%-36.3%. 研究表明，其诱导H22细胞凋亡的机制可能与降低肿瘤细胞线粒体膜电位有关[7]. 而对于诱导肝癌SMMC-7721细胞凋亡，研究显示其能够上调caspase-3蛋白表达以及下调Bcl-2和Survivin蛋白的表达[8]. 另外，半枝莲提取物还可诱导HepG2及QGY-7701等细胞发生凋亡[9].

1.4 鸦胆子油乳 鸦胆子系苦木科植物鸦胆子属植物的成熟果实，其醇提取物即为鸦胆子油乳. 油乳主要成分为油酸和亚油酸，具有抗肿瘤及增强机体免疫功能的作用. 鸦胆子油乳对肝癌细胞的抑制率约为20%-30%，可将细胞阻滞于G_0-G_1期，其诱导凋亡的作用与抑制P53和Bcl-2的表达密切相关，其中P53途径起主导作用[10].

1.5 青蒿素 是青蒿叶中分离的抗疟有效成分，具有过氧基团的倍半萜内酯. 近年研究发现，青蒿素及其衍生物包括青蒿琥酯等均对肿瘤细胞有明显的杀伤作用. 青蒿琥酯100 mg/L对肝癌细胞的抑制率约为16%，凋亡率不超过12%. 其分子机制是P53非依赖性的，与凋亡调节基因Bcl-2下调有关[11].

2 扶正祛邪类中药

2.1 人参皂苷 人参是五加科人参属的植物，具有大补元气，补气益肺，安神益智的作用，主要活性成分是人参皂苷. 人参皂苷中有多种有效成分，研究最多的是Rh2和Rg3两种单体. 体外实验显示Rh2在浓度为100 mg/L、作用48 h，对Bel-7404细胞的凋亡率为39.6%，虽与浓度、时间呈正相关，但到达一定浓度后不再随浓度增加而增加. 其作用与上调Bax和下调突变型P53表达有关[12]. 另外，Rh2对SMMC-7721细胞亦有一定的诱导凋亡作用. Rg3是参一胶囊的主要成分，文献[13]报道其对肝癌细胞株抑瘤率不超过67.76%，凋亡率不超过43.39%. 机制可能与其能直接诱导细胞凋亡，并能抗肿瘤血管生成有关. 最近一项研究显示人参皂苷Rg3还可抑制Pim-3(丝/苏氨酸蛋白激酶Pim家族)表达而阻止细胞生长[14].

2.2 黄芪 黄芪为豆科植物蒙古黄芪或膜荚黄芪的干燥根，为补气的代表药物之一. 黄芪含有多种多糖、黄酮、氨基酸、微量元素等物质，具有抗肿瘤、调节免疫、抗辐射等作用，研究[15]表明，黄芪多糖对各种肝癌细胞凋亡率为11.97%-54.76%，可以将细胞周期阻滞于G_1期，上调与凋亡密切相关的wtP53(野生型P53)和Bax基因的表达.

3 活血化瘀类中药

3.1 姜黄素 姜黄素是从姜科姜黄属植物姜黄根茎中提取的一种酚性色素，是姜黄的主要成分. 姜黄素诱导肿瘤细胞凋亡的效应随作用时间延长而衰减，而脂质体-姜黄素则不会衰减，优于一般的姜黄素水溶制剂[16]. 孙立群 *et al*[17]研究表明，姜黄素对肝癌细胞株HepG2细胞有明显的生长抑制作用. 浓度在15 mg/L时对HepG2的抑制率为34.52%，而凋亡率只有5.4%. 其机制与抑制HepG2细胞端粒酶hTERT mRNA的转录可能相关. 而10 mg/L脂质体-姜黄素抑制率为38.67%，凋亡率可达68.9%. 其机制与Bax、Bcl-2的表达无明显相关性，可能与其通过转录后机制和蛋白酶体途径抑制细胞中HIF-1α蛋白表达有关[18].

3.2 莪术 莪术是姜科植物郁金的根茎，性温、味辛苦，有活血破瘀、消积止痛等多种功效. 莪术挥发油中含有多种抗癌有效成分，如榄香烯、莪术醇、莪术酮等. 有研究探讨了莪术油对肝癌细胞生长的抑制作用. 结果显示：细胞凋亡率可达37.8%. 机制是莪术油通过抑制COX-2和VEGF的表达，导致HepG2细胞凋亡[19]. 体内实验观察莪术油对小鼠HepA细胞抑制率超过

50%, 且抑制率随浓度增加而增加, 其强度同5-FU相同, 其机制则与下调Bcl-2表达[20]及上调P16、P21表达[21]有关.

3.3 丹参酮 丹参酮是从丹参中提取的脂溶性有效成分. 丹参具有破癥除瘕的作用, 丹参酮ⅡA是其主要有效成分. 丹参酮ⅡA对肿瘤细胞具有天然的杀伤、诱导分化和凋亡等作用. 其对SMMC-7721的凋亡率在6.59%-24.17%之间, 可能与细胞内TGF-β1、COX-2 mRNA及VEGF的表达水平下调、p38MAPK的表达上调有关[22]. 另一方面, 丹参酮ⅡA对HepG2细胞凋亡率却可达60%[23]. 丹参酮的另一有效成分-丹参酮Ⅰ对HepG2亦有较明显的抑制作用[24].

4 利水消肿类中药

4.1 紫杉醇 紫杉醇是从红豆杉属植物紫杉的树皮和树干中提取并开发利用的天然抗癌新药, 是目前抗肿瘤的代表药物之一. 紫杉醇在诱导肝癌细胞凋亡方面呈现浓度、时间依赖效应. 药物作用24 h, 凋亡率达13.8%-32.62%. 机制是其破坏了微管系统的聚合解聚平衡, 扰乱了有丝分裂, 使细胞周期阻滞于G_2/M期, 并诱导Bax/Bcl-2比率增高. 王海霞[25]研究发现, 紫杉醇的衍生物-多西紫杉醇在诱导肝癌细胞凋亡的过程中存在氧化应急以及氧化-抗氧化失衡, 细胞内活性氧可能参与了细胞凋亡的过程, caspase-3是此过程中的关键分子[26].

4.2 薏苡仁 薏苡仁具有健脾渗湿、除痹止泻、清热排毒的作用, 对多种肿瘤有显著的抗癌活性, 包括肝癌、胃癌、肺癌、鼻咽癌、宫颈癌等[27]. 薏苡仁不仅可以与放疗、化疗起到协同增敏效果, 其单药也有很好的疗效, 并能提高患者免疫功能, 减轻放化疗带来的不良反应, 改善晚期肿瘤患者的生活质量[28].

薏苡仁抗癌谱广, 近年对抑制肝癌细胞增殖的报道不多. 韦长元 *et al*[29]发现薏苡仁提取物对肝癌细胞抑制作用可达30%以上. 其作用机制主要与上调P53基因表达有关.

5 以毒攻毒类中药

5.1 三氧化二砷(As_2O_3) As_2O_3是中药砒霜的主要成分, 以毒攻毒的代表药物, 长期以来被认为是一种致癌剂, 能抑制细胞DNA和RNA的合成, 干扰细胞代谢, 致染色体畸变. 首次应用砷制剂是治疗急性早幼粒细胞白血病, 取得了显著疗效. 进一步的研究证实, As_2O_3应用于肝癌的疗效亦令人满意. As_2O_3可诱导人肝癌细胞株HepG-Ⅱ、Bel-7402与SMMC-7721发生凋亡, 凋亡率随着浓度变化波动在9.74%-77.41%之间, 而抑制率则稳定40%-80%之间[30-31]. 其引起凋亡的机制复杂, 主要是启动凋亡基因Bcl家族、激活caspase酶、抑制端粒酶活性等[32]. 亦有研究[33]认为与上调$P27^{kip1}$蛋白及下调Skp2、CDK2有关.

5.2 华蟾素 华蟾素提取自干蟾皮中的脂溶性成分, 运用蟾毒治疗恶性肿瘤已取得很好的疗效. 顾伟 *et al*[34]通过小鼠实验发现, 给予蟾毒后小鼠的肝癌细胞凋亡显著增加, 1.5 mg/kg蟾毒作用24 h后对癌细胞的抑制率为79.3%, 其机制可能与上调Bax表达有关.

5.3 斑蝥酸钠 斑蝥酸钠为斑蝥素的衍生物, 是从斑蝥中运用现代药理技术提取的抗癌药物. 其对肝癌细胞有明显的凋亡作用, 凋亡率可达40.02%, 机制可能是通过下调Survivin表达和激活caspase-3来实现的[35].

6 其他

除上述药物外, 近年来对守宫、白藜芦醇、吴茱萸碱、雷公藤、甘草黄酮等诱导肝癌细胞亦有少量报道[36-40], 凋亡率多不超过35%.

7 结论

由于中药种类繁多, 成分复杂, 涉及面广, 目前的研究还多集中在单体或主要成分上, 对复方的研究较少; 实验手段和实验条件的差异, 亦影响了实验结果的可重复性, 甚至出现相反的结论, 因此今后如何更系统、科学、客观地深入研究中药诱导肝癌凋亡的机制还有待于我们做深入的探索.

8 参考文献

1 赵军艳, 郑艳敏, 赵红艳, 姚树坤. 苦参碱和氧化苦参碱对肝癌细胞增殖凋亡及JAK-STAT信号通路的影响. 中药药理与临床 2008; 24: 18-20

2 程向东, 杜义安, 黄灵, 郑智国, 姜志明. 苦参碱在调节Bax和Bcl-2蛋白表达诱导HepG2细胞凋亡中的作用. 中国肿瘤临床 2008; 35: 711-713

3 金艳书, 吴学敏, 娄金丽. 苦参碱对人肝癌细胞增殖、细胞周期及细胞凋亡的影响. 中国临床康复 2006; 10: 107-109

4 张硕, 宋衍芹, 周三, 倪同尚, 岳旺. 白花蛇舌草总黄酮抑制人肝癌细胞的靶基因调控. 世界华人消化杂志 2007; 15: 1060-1066

5 孟庆宇, 吕秀芳, 任凤云. 白花蛇舌草多糖对Bel7402细胞基因表达的影响. 中国老年学杂志 2008; 28: 1271-1272

6 张硕, 宋衍芹, 周三, 杨志宏, 刘占涛, 倪同尚, 岳旺. 白花蛇舌草总黄酮对肝癌的体内外抑制作用及对小鼠移植性肝癌H22细胞增殖周期、凋亡、免疫环境的影

■同行评价
本文选题一般, 但内容较新, 具有一定的可读性.

响. 世界华人消化杂志 2007; 15: 1347-1352
7 代志军, 王西京, 薛茜, 纪宗正, 刘小旭, 康华峰, 管海涛, 马小斌, 任宏涛. 半枝莲含药血清对肝癌H22细胞凋亡及线粒体膜电位的影响. 中西医结合学报 2008; 6: 821-826
8 韦鹏涯, 浦洪琴, 韦星, 宾晓芸, 李朝敢. 半枝莲提取物诱导人肝癌SMMC-7721细胞凋亡及其对凋亡相关蛋白表达的影响. 时珍国医国药 2007; 18: 3020-3022
9 林敬明, 刘煜, 罗荣城. 半枝莲抑制人肝癌QGY-7701细胞增殖研究. 南方医科大学学报 2006; 26: 591-593
10 马力, 张月宁. 鸦胆子油乳诱导肝癌细胞凋亡及对相关基因表达的影响. 世界华人消化杂志 2004; 12: 559-562
11 杨小平, 张星. 青蒿酯钠诱导人肿瘤细胞凋亡及其分子机制的探讨. 中草药 2002; 33: 819
12 姜浩, 樊光华. 人参皂甙Rh_2对人肝癌Bel-7404细胞增殖和凋亡的影响. 中国肿瘤临床与康复 2004; 11: 289-292
13 何芳, 曾文铤, 沈浩贤. 人参皂甙Rg3联合三氧化二砷对人肝癌细胞增殖性的影响. 疑难杂病杂志 2007; 6: 724-726
14 简捷, 刘利珍, 李小燕, 胡志方, 王稻, 黄缘. 人参皂苷Rg3对人肝癌细胞Pim-3及Bad凋亡蛋白表达的影响. 世界华人消化杂志 2008; 16: 2229-2233
15 杨雁, 陈敏珠. 黄芪总苷对肝癌细胞凋亡及wtp53基因表达的影响. 中国药理学通报 2001; 17: 447-451
16 李瀚旻, 晏雪生, 明安萍, 彭亚琴, 桂文甲. 脂质体-姜黄素水溶制剂抗肝癌效应的稳定性研究. 中草药 2006; 37: 561-565
17 孙立群, 陈鸥, 赵明, 韩岚. 姜黄素诱导Hep-2细胞凋亡及其对细胞周期各时相的影响. 中国实验诊断学 2006; 10: 45-46
18 孙军, 李岩. 姜黄素对人肝癌细胞BEL-7402中HIF-1α表达的影响. 中国药理学通报 2006; 22: 1379-1383
19 唐渊, 李晓辉. 莪术提取物对肝癌细胞系HepG2的抗癌作用及机制研究. 中国药理学通报 2007; 23: 790-794
20 张维彬, 谭敏, 肖刚, 胡少为. 莪术油诱导小鼠HepA肝癌细胞凋亡及其对bcl-2蛋白表达的影响. 现代中西医结合杂志 2009; 18: 370-371
21 梁朝晖, 张维彬, 胡少为. 莪术油对小鼠原位移植HepA肝癌细胞影响的研究. 陕西中医 2009; 30: 107-109
22 李琦, 王炎, 范忠泽, 冯年平, 高虹, 南艺蕾, 倪雷, 鲍文磊, 隋华. 丹参酮ⅡA及其纳米粒诱导肝癌细胞凋亡及对p38 MAPK、TGFβ_1信号蛋白表达的影响. 肿瘤 2008; 28: 8-12
23 钟志宏, 陈文贵, 柳永和, 李启星, 邱月. 丹参酮ⅡA抑制HepG2细胞生长及诱导其凋亡的实验研究. 中南大学学报(医学版) 2007; 32: 99-103
24 郑国灿, 李智英. 丹参酮I抗肿瘤作用及作用机制的实验研究. 实用肿瘤杂志 2005; 20: 33-35
25 王海霞. 多西紫杉醇诱导SMMC-7721肝癌细胞凋亡中的氧化-抗氧化失衡研究. 肿瘤学杂志 2008; 14: 432-434
26 张浩, 刘小方, 李昱骥, 周建平, 孔凡民, 董明. 多西紫杉醇诱导人肝癌细胞凋亡及其机制的研究. 中华肝胆外科杂志 2008; 14: 901-903
27 杨红亚, 王兴红, 彭谦. 薏苡仁抗肿瘤活性研究进展. 中草药 2007; 38: 附7-附9
28 褚娟红, 叶骞. 薏苡仁的药理及临床研究概况. 辽宁中医药大学学报 2008; 10: 159-160
29 韦长元, 李挺, 唐宗平, 埃高莫·比佐, 刘剑仑, 杨南武. 薏苡仁提取物对人肝癌细胞增殖、凋亡及p53表达的影响. 广西医科大学学报 2001; 18: 397
30 王晓娟, 刘小敏, 曾春亚, 张杨, 梁晓秋. 三氧化二砷诱导人肝癌HepG2细胞凋亡及细胞周期阻滞的研究. 北京中医药大学学报 2008; 31: 404-407
31 李航宇, 钟鑫平, 隋春阳, 孔凡民, 董明, 张浩, 刘金钢. JNK/SAPK信号转导系统在三氧化二砷诱导肝癌细胞凋亡中的作用. 世界华人消化杂志 2007; 15: 688-693
32 聂林, 余卫, 何冬梅, 任玮玮, 张洹, 李弘. 三氧化二砷对肝癌细胞survivin基因和端粒酶活性的影响. 肿瘤 2006; 26: 1064-1068
33 秦军, 钱海鑫, 王酉, 沈爱国, 陈莉, 陆牡丹, 樊勇, 邱晓霞. 三氧化二砷对人肝癌细胞株SMMC-7721中p27kip1及其相关分子Skp2表达的影响. 苏州大学学报(医学版) 2008; 28: 191-193
34 顾伟, 韩克起, 苏永华, 黄雪强, 凌昌全. 蟾毒灵对裸鼠人肝癌移植瘤的抑制作用及对Bcl-2和Bax蛋白表达的影响. 中西医结合学报 2007; 5: 155-159
35 桂尤胜, 曹献英, 陈筠. 斑蝥酸钠体外诱导肝癌细胞凋亡的实验研究. 武汉大学学报(医学版) 2004; 25: 493-496
36 侯新楠, 赓迪, 蔡昂, 王春梅. 壁虎鲜品和炮制品抗肿瘤活性比较研究. 中药材 2008; 31: 957-959
37 李覃, 王伟, 李彤. 白藜芦醇抗肝癌Bel-7402及调节荷瘤鼠IL-8分泌机制的研究. 中药材 2008; 31: 697-702
38 朱丽红, 刘小东, 谭宇蕙, 李杰芬, 杜标炎, 吴映雅. 吴茱萸碱对人肝癌细胞HepG2的生长抑制及诱导凋亡作用. 中国药理学通报 2009; 25: 68-71
39 李瀚旻, 罗春华, 晏雪生, 明安萍, 彭亚琴. 雷公藤甲素对人肝癌Bel-7402细胞增殖及凋亡的影响. 中华中医药学刊 2009; 27: 8-10
40 张世蘋, 周翌婧, 刘艳, 蔡云清. 甘草黄酮诱导肝癌SMMC-7721细胞凋亡及其对相关蛋白survivin表达的影响. 南京医科大学学报(自然科学版) 2008; 28: 330-334

编辑 李军亮 电编 何基才

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2009年10月8日; 17(28): 2919-2921
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

文献综述 REVIEW

胰腺及胰腺周围侵及血管的肿瘤手术难点对策与分析

罗地来, 杨成义, 章永恩, 朱栋良, 罗 刚

罗地来, 杨成义, 章永恩, 朱栋良, 罗刚, 南昌大学第二附属医院肝胆外科 江西省南昌市 330006
通讯作者: 杨成义, 教授, 主任医师, 330006, 江西省南昌市, 南昌大学第二附属医院肝胆外科. ldilai868@163.com
电话: 0791-6300249
收稿日期: 2009-05-15 修回日期: 2009-07-28
接受日期: 2009-08-03 在线出版日期: 2009-10-08

Surgery for pancreatic and peripancreatic tumors invading blood vessels: problems and management

Di-Lai Luo, Cheng-Yi Yang, Yong-En Zhang, Dong-Liang Zhu, Gang Luo

Di-Lai Luo, Cheng-Yi Yang, Yong-En Zhang, Dong-Liang Zhu, Gang Luo, Department of Hepatobiliary Surgery, the Second Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang 330006, Jiangxi Province, China
Correspondence to: Professor Cheng-Yi Yang, Department of Hepatobiliary Surgery, the Second Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang 330006, Jiangxi Province, China. ldilai868@163.com
Received: 2009-05-15 Revised: 2009-07-28
Accepted: 2009-08-03 Published online: 2009-10-08

Abstract
Due to the anatomic location of the pancreas, the surgery for pancreatic and peripancreatic tumors invading blood vessels is very difficult, often leading to massive hemorrhage and even endangering the patient's life. In this article, we will summarize our clinical experience on the management of problems arising from the surgery for pancreatic head carcinoma invading the portal vein and superior mesenteric vein, pancreatic body carcinoma involving the splenic vein and splenic artery, and peripancreatic retroperitoneal malignant tumors involving the inferior vena cava and left renal vein. Use of Peng's multi-functional operative dissector (PMOD), careful and gentle operation, being familiar with the anatomy of the tumor region, better anastomotic skill, and surgical resection of tumors involving blood vessels can help increase the success rate of the surgery and improve the therapeutic effect against pancreatic and peripancreatic tumors invading blood vessels.

Key Words: Pancreatic neoplasm; Blood vessel; Management; Method

Luo DL, Yang CY, Zhang YE, Zhu DL, Luo G. Surgery for pancreatic and peripancreatic tumors invading blood vessels: problems and management. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2009; 17(28): 2919-2921

摘要
由于胰腺位置深在, 部位特殊, 胰腺及胰腺周围侵及血管的肿瘤手术难度大, 极易导致大出血, 危及患者生命. 作者结合自己的经验, 总结了胰头癌侵及门静脉及肠系膜上静脉、胰体癌侵及脾静脉及脾动脉、胰头周围腹膜后恶性肿瘤累及肝下下腔静脉及左肾静脉的手术难点对策与分析, 使用彭氏多功能手术解剖器(Peng's multiple operative dissector, PMOD), 细心操作, 动作轻柔, 熟悉肿瘤区域解剖, 熟练掌握血管吻合技术, 对高难度侵袭血管的肿瘤采用手术切除的方法, 提高了手术切除率. 努力探索解决这些临床问题的方法是进一步提高胰腺及胰腺周围恶性肿瘤治疗效果的关键.

关键词: 胰腺肿瘤; 血管; 对策; 方法

罗地来, 杨成义, 章永恩, 朱栋良, 罗刚. 胰腺及胰腺周围侵及血管的肿瘤手术难点对策与分析. 世界华人消化杂志 2009; 17(28): 2919-2921
http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/2919.asp

0 引言
手术切除仍然是肿瘤治疗的首选, 胰腺位置深在, 且其周围毗邻血管丰富, 肿瘤极易侵犯一根及多根血管, 手术切除的风险极大. 本文结合作者的经验, 总结分析手术的难点与对策.

1 胰头癌侵及门静脉及肠系膜上静脉
胰头癌进展隐匿, 位置深在, 与门静脉(portal vein, PV)及肠系膜上静脉(superior mesenteric vein, SMV)关系密切. 有的胰头癌已侵及PV及SMV, 勉强将肿瘤从血管剥离不仅达不到根治的目的, 而且更存在术中大出血的风险. 肿瘤是否侵犯PV及SMV是影响根治性切除的一个重

■背景资料
胰腺及胰腺周围侵及血管的肿瘤手术难度大, 术前应全面评估患者的全身状况, 对影像学资料进行详尽的解读, 尤其是对侵及的血管进行客观的评估, 评估血管侵及的范围及长度, 制定预手术方案.

■同行评议者
李文岗, 副教授, 福建医科大学附属厦门第一医院肝胆胰血管外科; 韩天权, 教授, 上海交通大学医学院附属瑞金医院外科、上海消化外科研究所

■研发前沿
胰腺位置深在, 且其周围毗邻血管丰富, 肿瘤极易侵犯一根及多根血管, 手术切除的风险极大.

要因素[1-2], 但Leach *et al*[3]认为肿瘤与PV/SMV关系密切可能是其起源临近血管, 并非是恶性生物学行为的表现. Allema *et al*[4]对23例PV和(或)SMV受侵的胰头癌联合切除术进行研究发现, 其切缘阳性率、淋巴结阳性率、肿瘤DNA含量与同期未侵及血管的36例相比均无显著差异, 这些结果提示PV和(或)SMV受侵主要是肿瘤的特殊部位, 而不是预后不良指标. 一般认为术中发现肿瘤与PV及SMV无法分离即认为血管受侵, 但这种情况下尚有37%-52%的患者术后病理证实并无门静脉管壁受累[5-6], 而仅是炎性粘连, 这部分患者手术切除效果好, 若放弃手术则失去根治性治疗的机会. 因此, 联合血管切除的胰十二指肠切除术是胰腺外科工作者追求的极致手术. 如果肿瘤已侵及门静脉腔内, 则不应勉强切除PV及SMV, Fuhrman *et al*主张, 肿瘤侵犯门静脉腔内应视为根治手术的禁忌[7].

联合血管切除的胰十二指肠切除术, 是一种手术时间长、创面大、高风险的手术. 联合切除的过程中, 可能出现难以控制的大出血, 要求术者有良好的胰腺外科和血管外科的基础与技术. 手术的关键在于能分离解剖出胰腺上下缘的门-肠系膜上静脉和切除胰腺, 因肿瘤周围炎症反应或淋巴回流障碍, 局部组织水肿增厚, 正常的解剖间隙不清; 且又因肿瘤侵及及压迫致胰腺周围小血管扩张, 分离时, 不应牵拉过度, 细心操作, 动作轻柔, 门静脉血流阻断时间过长会增加肠道淤血和毒素吸收, 因此阻断门静脉并切除连同血管的肿瘤标本, 应在清扫完成后, 仅留待离断PV/SMV并做好血管吻合准备后再进行, 阻断时间最好控制在45 min内, 吻合血管预留扩展环, 以免吻合口狭窄, 影响PV入肝血流. 本组2002-01起完成联合血管切除的胰十二指肠切除术18例, 其中单独的门静脉(PV)或肠系膜上静脉(SMV)节段性切除为7例和4例, 门静脉及肠系膜上静脉(PV/SMV)同时切除者7例, 围手术期死亡率为5.6%(1/18), 并发症发生率为16.7%(3/18). 获随访的17例胰腺癌患者, 术后生存5-34 mo.

2 胰体部癌侵及脾动脉及脾静脉

胰体部癌由于其在胰腺部位的特殊性, 早期缺乏特异的症状与体征, 一经诊断多为中、晚期癌, 因此, 手术切除率低. 胰体肿瘤紧邻脾动脉及脾静脉, 尤其是脾静脉有被侵及包绕的可能. 对于胰腺外科医师而言, 淋巴结转移和神经浸润与手术的彻底性密切相关[8], 腹腔动脉干及脾动脉周围包绕有大量的神经组织, 胰体癌极易在这些组织中发生“微转移”[9]. 因而脾动脉的“骨骼化”以及脾静脉的节段性切除, 对于切除可能存在“微转移”淋巴管和神经纤维极其重要. 同时, 由于有重要内分泌功能的胰岛细胞其50%分布在尾侧胰腺, 最大限度的保留尾侧胰腺5 cm以上, 同时头尾侧胰腺切缘0.5 cm范围内癌细胞阴性. 联合节段性脾静脉切除的胰体切除术, 对胰腺外科医生提出了更高、更精的要求.

联合节段性脾静脉切除的胰体切除术, 手术难度极大, 联合切除的过程中, 可能出现难以控制的大出血. 首先, 病例的选择应结合患者的全身情况, 影像学评估, 脾静脉受累长度应<3 cm, 而肿瘤未侵犯腹腔动脉干及肠系膜上动脉根部. 手术时应先游离胰体部上缘, 将肝总及脾动脉“骨骼化”. 再于肠系膜上动脉根部以左游离胰体部下缘. 手术的关键在于在肿瘤的胰头侧分离出约1 cm长的汇入门静脉处的脾静脉, 及肿瘤的胰尾侧约1 cm长的脾静脉, 两者之间应<3 cm, 头尾侧胰腺切缘0.5 cm范围内癌细胞阴性. 我们的经验是, 使用PMOD边刮吸边电凝及缝扎小血管的办法, 分支血管一定要缝扎, 细心操作, 控制减少出血, 同时手术游离时, 不应牵拉过度, 动作轻柔. 因此游离完成后, 阻断脾静脉, 联合节段性脾静脉切除的胰体标本一并切除, 重建脾静脉. 本组完成联合节段性脾静脉切除的胰体切除术共3例, 无手术期死亡, 近期疗效较好, 远期疗效还需作进一步观察及病例数的积累.

3 邻近胰头的腹膜后恶性肿瘤累及肝下下腔静脉及左肾静脉

邻近胰头的腹膜后恶性肿瘤呈膨胀性生长. 将第一肝门, 胰腺及门静脉一并向左上方推挤. 同时向右向下压挤肝下下腔静脉及左肾静脉(图1). 肿瘤位置深在, 基底很广, 血液供应丰富, 尤其与肝下下腔静脉及左肾静脉关系密切. 肿瘤早期并无特征性的临床表现, 往往表现为下腔静脉受压引起阴囊, 会阴及下肢水肿, 压迫输尿管引起肾盂积水, 十二指肠肠腔受累引起上消化道梗阻症状. 肿瘤压迫或侵犯神经可产生疼痛和麻木感. 一般不出现胆道及胰腺受压的临床表现. CT扫描是最有价值的影像学定位手段, 他可以清楚地显示肿瘤的大小, 部位, 范围, 与重要器官及大血管的关系, 以及有无肝脏及腹腔内转移等, 对评

图 1 患者的术前影像.

估肿瘤切除的可能性具有很好的参考价值. MRI具有相似的作用, 但他可以作冠状面及矢状面的扫描, 构建肿瘤的三维图像.

手术切除是主要的治疗手段, 其中根治性切除是唯一有希望治愈肿瘤的方法. 手术切除率仅为35%-76%[10], 由于与肝下下腔静脉及左肾静脉的关系紧密, 手术就很复杂, 又由于肿瘤位置深压, 常深及腰椎并从腰椎发出营养肿瘤的血管, 一旦出血, 止血特别困难, 故手术风险极大. 我们的体会是, 首先剪开十二指肠降部外侧腹膜(Kocher切口)在肿瘤胰头侧寻找间隙, 细心操作, 使用PMOD, 细心潜行, 边刮吸边电凝及缝扎小血管的办法, 逐渐将肿瘤与十二指肠降部及胰头部分开. 再于肿瘤的上后缘使用PMOD分离出左肾静脉以上的肝下下腔静脉. 其次在肿瘤的下后缘使用PMOD, 分离出左肾静脉以下的肝下下腔静脉, 在分离后面基底部时使用钳夹、缝扎的方法, 使肿瘤与腰椎分离. 术者左手于分离出的间隙内, 轻柔的提举肿瘤, 与助手协同, 使用PMOD细心分开肿瘤与左肾静脉的粘连, 完整切除肿瘤. 本组完成腹膜后恶心肿瘤切除术5例, 无围手术期死亡, 近期疗效较好, 远期疗效还需作进一步观察及病例数的积累.

4 结论

胰腺及胰腺周围侵及血管的肿瘤手术难度大, 术前应全面评估患者的全身状况, 对影像学资料进行详尽的解读, 尤其是对侵及的血管进行客观的评估, 评估血管侵及的范围及长度, 制定预手术方案. 术中按预手术方案逐步推进, 使PMOD, 细心操作, 动作轻柔, 熟悉肿瘤区域解剖, 熟练掌握血管吻合技术, 在逐步推进过程中, 可能遇到各种困难, 应在保证患者的生命为第一原则的前提下将肿瘤切除, 努力探索进一步提高胰腺及胰腺周围侵及血管的肿瘤的治疗效果.

■同行评价
本文简洁, 但内容具有很好的临床参考价值.

5 参考文献

1 Shibata C, Kobari M, Tsuchiya T, Arai K, Anzai R, Takahashi M, Uzuki M, Sawai T, Yamazaki T. Pancreatectomy combined with superior mesenteric-portal vein resection for adenocarcinoma in pancreas. *World J Surg* 2001; 25: 1002-1005

2 Roder JD, Stein HJ, Siewert JR. Carcinoma of the periampullary region: who benefits from portal vein resection? *Am J Surg* 1996; 171: 170-174; discussion 174-175

3 Leach SD, Lee JE, Charnsangavej C, Cleary KR, Lowy AM, Fenoglio CJ, Pisters PW, Evans DB. Survival following pancreaticoduodenectomy with resection of the superior mesenteric-portal vein confluence for adenocarcinoma of the pancreatic head. *Br J Surg* 1998; 85: 611-617

4 Allema JH, Reinders ME, van Gulik TM, Koelemay MJ, Van Leeuwen DJ, de Wit LT, Gouma DJ, Obertop H. Prognostic factors for survival after pancreaticoduodenectomy for patients with carcinoma of the pancreatic head region. *Cancer* 1995; 75: 2069-2076

5 Aramaki M, Matsumoto T, Etoh T, Ishio T, Himeno Y, Sasaki A, Yada K, Kawano K, Kitano S. Clinical significance of combined pancreas and portal vein resection in surgery for pancreatic adenocarcinoma. *Hepatogastroenterology* 2003; 50: 263-266

6 Nakagohri T, Kinoshita T, Konishi M, Inoue K, Takahashi S. Survival benefits of portal vein resection for pancreatic cancer. *Am J Surg* 2003; 186: 149-153

7 Fuhrman GM, Leach SD, Staley CA, Cusack JC, Charnsangavej C, Cleary KR, El-Naggar AK, Fenoglio CJ, Lee JE, Evans DB. Rationale for en bloc vein resection in the treatment of pancreatic adenocarcinoma adherent to the superior mesenteric-portal vein confluence. Pancreatic Tumor Study Group. *Ann Surg* 1996; 223: 154-162

8 张怡杰, 胡先贵, 金钢, 何天霖, 邵成浩, 李刚, 经纬, 宋彬. 游离肠系膜上动脉对提高胰腺钩突癌切除彻底性的临床意义. 中华胰腺病杂志 2008; 8: 353-356

9 Jin G, Sugiyama M, Tuo H, Oki A, Abe N, Mori T, Masaki T, Fujioka Y, Atomi Y. Distribution of lymphatic vessels in the neural plexuses surrounding the superior mesenteric artery. *Pancreas* 2006; 32: 62-66

10 Serio G, Tenchini P, Nifosi F, Iacono C. Surgical strategy in primary retroperitoneal tumours. *Br J Surg* 1989; 76: 385-389

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2009年10月8日; 17(28): 2922-2926
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

文献综述 REVIEW

质子泵抑制剂与钙代谢和骨折的关系

周 俊, 张 玫

■背景资料
质子泵抑制剂(PPI)为强效抑酸药, 主要用于上胃肠道酸相关性疾病的治疗. 国外已有关于PPI短期使用导致低血钙和长期应用导致骨折可能性增加的研究报道, 国内未见报道和讨论.

周俊, 张玫, 首都医科大学宣武医院消化科 北京市 100053
作者贡献分布: 周俊与张玫对此文有同等的贡献; 此综述由周俊完成文献查阅与撰写; 张玫对此文的知识性内容作批评性审阅.
通讯作者: 周俊, 主治医师, 100053, 北京市宣武区长椿街45号, 首都医科大学宣武医院消化科. zhstrive@yahoo.com.cn
电话: 010-83198321
收稿日期: 2009-08-07 修回日期: 2009-09-17
接受日期: 2009-09-21 在线出版日期: 2009-10-08

Association of proton pump inhibitor use with altered calcium metabolism and bone fractures

Jun Zhou, Mei Zhang

Jun Zhou, Mei Zhang, Department of Gastroenterology, Xuanwu Hospital, Capital University of Medical Sciences, Beijing 100053, China
Correspondence to: Zhou-Jun, Department of Gastroenterology, Xuanwu Hospital, Capital University of Medical Sciences, Beijing 100053, China. zhstrive@yahoo.com.cn
Received: 2009-08-07 Revised: 2009-09-17
Accepted: 2009-09-21 Published online: 2009-10-08

Abstract
Proton pump inhibitors (PPIs) are commonly used to treat acid-related diseases. At present, the mechanisms by which long-term use of PPIs induces bone fracture remain unclear. One possible mechanism is that PPIs can induce acid inhibition, impair intestinal calcium absorption, promote parathyroid hormone (PTH) secretion, and increase bone absorption. Long-term use of high-dose PPIs appears to be associated with an increased risk of hip or vertebral fractures in patients at high risk for bone fractures. Therefore, PPIs should be used for appropriate indications but not at higher doses or for longer durations than necessary to achieve desired outcomes.

Key Words: Proton pump inhibitor; Calcium metabolism; Bone fracture

Zhou J, Zhang M. Association of proton pump inhibitor use with altered calcium metabolism and bone fractures. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2009; 17(28): 2922-2926

摘要
质子泵抑制剂(PPI)是常用于治疗酸相关疾病的药物. PPI长期使用导致骨折的机制尚不清楚. 一个可能的机制是PPI导致酸抑制, 影响肠道钙的吸收, 甲状旁腺素分泌增加, 增加骨吸收. 对于有骨折高危因素的患者PPI长期高剂量应用增加脊柱或髋骨骨折的危险. PPI应该有合适的适应证, 为达到期望的治疗结果而不要超出必要的剂量和疗程.

关键词: 质子泵抑制剂; 钙代谢; 骨折

周俊, 张玫. 质子泵抑制剂与钙代谢和骨折的关系. 世界华人消化杂志 2009; 17(28): 2922-2926
http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/2922.asp

0 引言
质子泵抑制剂(proton pump inhibitor, PPI)为强效抑酸药, 主要用于上胃肠道酸相关性疾病的治疗. PPI的长期使用主要与胃食管反流病的维持治疗有关, 有学者主张消化性溃疡患者为预防复发要长期用药维持治疗, 还有学者认为预防非甾体消炎药的消化系出血等不良反应要长期用PPI维持治疗. 国外已有关于PPI短期使用导致低血钙和长期应用导致骨折可能性增加的研究报道, 国内未见报道和讨论, 现综述如下.

1 PPI短期应用与钙代谢的关系
奥美拉唑(OM)短期使用对钙代谢影响的研究中, 部分研究提示OM能减少肠道钙吸收. Graziani *et al*[1]的交叉试验中, 30例终末期肾病患者每周透析3次, 每次透析4-5 h; 透析前给予1 g钙, OM治疗(20 mg/次, 每8 h 1次)3天, OM治疗者血清钙浓度明显降低, 血清钙高峰时间延迟, 肠道钙吸收减少. Graziani *et al*[2]的交叉安慰剂控制研究中, 8例健康男性试验者, 平均年龄38(36-52)岁, 先进食7 d低钙饮食刺激钙的吸收, OM治疗(20 mg/次, 每8 h 1次)2 d后口服1 g钙负荷量, 继续口服OM治疗1 d, 测定24 h尿中的钙含量和试验餐后的血钙含量; OM治疗组的餐后血钙含量(4.2%±0.7%)低于对照(6.1%

■同行评议者
杜雅菊, 主任医师, 哈尔滨医科大学附属第二医院消化内科; 陈贻胜, 教授, 福建省立医院消化内科

±1%); OM治疗组的尿钙含量(238±15 mg)低于对照(360±21 mg)(P<0.0001). Hardy *et al*[3]的交叉研究, 16个平稳透析患者, 每日平均摄入碳酸钙9.4±4 g, 口服OM(20 mg每8 h 1次)2 mo, 血清钙由2.41±0.18 mmol/L降至2.36±0.16 mmol/L(P = 0.04). O'Connell *et al*[4]的交叉安慰剂控制试验中试验对象为23例年龄为65岁-89岁的健康女性, 18例完成试验, 年龄为76±7岁, 试验中每个受试者每日服用OM 20 mg连续7 d、含有400 U的维生素D的多种维生素、^{45}钙-标记的碳酸钙2 g(含有500单位钙). 安慰剂组的钙吸收为9.1%(6.5%-11.6%), OM组钙吸收为3.5%(1.6%-5.5%)(P = 0.003). Mizunashi *et al*将32个有溃疡病史而用H_2受体拮抗剂(H_2RA)维持治疗的患者分成2组, 分别改为OM和安慰剂治疗; 与对照组相比, OM治疗组的尿羟脯氨酸(一种骨吸收标志物)和尿钙减少. 上述实验提示OM短期用药导致低胃酸, 减少肠道钙的吸收, 血钙降低.

但是也有研究报道OM短期用药对钙的吸收没有影响, Serfaty-Lacrosniere *et al*的实验是灌洗肠道后4 h后给予实验餐, 12 h再次灌洗肠道并测定实验餐中未吸收的矿物质含量. 13个健康个体参与试验, 试验组每日给予40 mg OM(n = 5)、对照组未给予OM(n = 8); 给与不给外源性盐酸的试验组与对照组的钙吸收没有差异. 这个试验中试验组平均年龄为39岁而对照组为59岁, 钙的吸收随年龄增加而降低有可能导致这种没有差异. Kocsis *et al*[5]对34个胃食管反流病或消化不良的儿童患者用OM 20 mg/d治疗14 d, OM治疗后骨转化标志物与基线值相比没有显著改变, 治疗前后儿童的尿钙含量没有变化; 儿童的高骨转化率可能掩盖了PPI对骨骼的作用.

上述研究中的疾病状态可能影响钙的代谢, 部分实验采用非直接或者非侵入性的方法测定钙的吸收[6]. 目前没有PPI的长期应用对肠道钙吸收、血钙水平、骨转化的研究报道, 钙在肠道的吸收减少的机制没有进一步的研究.

2 PPI长期应用与骨折的关系

Vestergaard *et al*[7]的病例对照研究分析了2000年时丹麦的骨折病例(n = 124 655)和对照病例(n = 373 962)的危险因素, 多元回归分析显示PPI是危险因素之一. 与H_2RA相比, 最后1次使用PPI在1年内者发生骨折的危险性有限的升高, 发生各种骨折的危险性OR = 1.18(1.12-1.43); 髋骨骨折的OR = 1.45(1.28-1.65); 脊柱骨折的OR = 1.60(1.25-2.04). 而过去1年内使用H2RA发生骨折的危险性降低[所有骨折OR = 0.88(0.82-0.95)、髋骨骨折OR = 0.69(0.57-0.84)]. 使用其他抗酸剂的髋骨和脊柱骨折的危险性升高. 没有发现PPI剂量与骨折之间的量效关系; 而最后一次使用PPI超过1年以上者的骨折的危险性没有增加. Yang *et al*[8]利用1987-2003年英国GPRD(General Practice Research Database)数据库资料进行病例对照研究(nested case control analysis), 这个数据库包含了英国98%人群中的医学记录资料, 国外的述评和综述文献对此数据库的评价颇高. Yang *et al*[8]分析了50岁以上者发生髋骨骨折的危险因素, 多元回归分析显示PPI是危险因素之一, 有13 556髋骨骨折患者和135 386对照病例, PPI使用超过1年者调整后的OR = 1.44(1.30-1.59); 从剂量效应来看, 平均剂量1.75倍以下组的髋骨骨折OR = 1.40(1.26-1.54), PPI平均剂量1.75倍以上组的髋骨骨折OR = 2.65(1.80-3.90); 使用PPI时间为1年者的髋骨骨折的OR = 1.22(1.15-1.30)、使用PPI时间为2年者的髋骨骨折的OR = 1.41(1.28-1.56)、使用PPI时间为3年者的髋骨骨折的OR = 1.54(1.37-1.73)、使用PPI时间为4年者的髋骨骨折的OR = 1.59(1.39-1.80). H_2RA治疗1年以上者骨折(脊柱、髋骨)发生的危险性轻微增加1.23(1.14-1.39). Yang *et al*[8]认为长期PPI治疗, 尤其是高剂量, 与髋骨骨折的危险性增加有关. 从流行病学的角度看, OR值不是很高; OR值从1.82调整为1.44, 考虑的因素仅仅为数据库中的因素; 如果考虑社会经济因素等的影响, 经过调整的OR值可能就没有统计学意义. Kaye *et al*[9]同样用英国GPRD数据库中1995-2005年的资料进行两期配对病例对照研究(two phase, matched, nested case control study); Ⅰ期研究中的目的是发现髋骨骨折的危险因素, Ⅰ期研究中有4414例髋骨骨折(50-79岁), 这些病例在数据库中至少有2年的病历记录, 每例髋骨骨折患者配对10例对照的非骨折病例, 主要危险因素定义为OR≥2; Ⅱ期则为排除Ⅰ期中所发现的主要危险因素的患者, 研究1098例使用PPI者的髋骨骨折危险性, 对照为10 923例没有髋骨骨折的主要危险因素的患者; 在Ⅱ期中与无PPI治疗组相比, PPI治疗组的髋骨骨折发生的相对危险度(relative risk, RR)为0.9(0.7-1.1); 对于没有骨折危险因素的PPI长期使用并不增加骨折的风险, 没有特殊的制剂发现与髋骨骨折有关. Yang

■相关报道
也有研究报道OM短期用药对钙的吸收没有影响, Serfaty-Lacrosniere *et al*的实验是灌洗肠道后4 h后给予实验餐, 12 h再次灌洗肠道并测定实验餐中未吸收的矿物质含量.

■应用要点
PPI长期使用应有合适的指征、不能长时间超过必要的剂量.

et al[8]和Kaye *et al*[9]的2个试验存在差异, 可能与Yang *et al*的研究没有排除髋骨骨折的危险因素; 而Kaye *et al*[9]排除了髋骨骨折的危险因素, 这些髋骨骨折的危险因素很多, 包括既往骨折病史、外伤、胸痛、踝部水肿、风湿性关节炎、惊厥眩晕、缺铁、肺栓塞、尿失禁、心衰、呕吐、便秘、CVD、酒精依赖、老龄化、痴呆等七十余种疾病状态; 而50岁以上人群很多都合并有髋骨骨折的危险因素. 从临床实用的角度看, 对于有危险因素的患者长期PPI治疗尤其是高剂量PPI治疗与髋骨骨折有关. Targownik *et al*[10]研究1996-2004年加拿大Manitoba健康数据库中50岁以上患者的脊柱、腕和髋骨骨折与PPI的关系, 骨折患者有15 792例, 对照病例有47 289例; 发现PPI治疗1年所有骨折的OR = 0.99(0.90-1.11)、2年的OR = 0.94(0.82-1.07)、3年的OR = 0.92(0.78-1.07)、4年的OR = 1.05(0.86-1.27)、5年的OR = 1.16(0.91-1.46)、6年的OR = 1.28(0.93-1.77)、7年PPI的OR = 1.92(1.16-3.18). PPI使用1年的髋骨骨折OR = 1.22(1.15-1.30)、PPI使用5年的髋骨骨折OR = 1.62(1.02-2.58)、PPI使用7年的髋骨骨折OR = 4.55(1.68-12.29). 作者认为使用PPI后5年的髋骨骨折、7年后的所有骨质疏松相关的骨折的概率增高. 在美国进行的年龄大于65岁的骨质疏松骨折患者的队列研究中, 男性(MrOS研究, n = 5755, 2000-2002年, 6个中心)和女性(SOF研究, n = 5339, 1986-1988年, 4个中心)的骨折危险因素用多因素回归分析研究, 使用PPI的女性的非脊柱骨折的风险增加, 相对危险度(relative hazard, RH) = 1.34(1.10-1.64). 未补充钙剂的男性用PPI的非脊柱骨折的风险增加, RH = 1.49(1.04-2.14). H_2RA使用与非脊柱骨折无关, 男性或女性的H_2RA和PPI使用与髋骨骨折发生率无关[11].

上述研究中有4个回顾性研究发现PPI应用增加了髋骨骨折的危险性, 但有1个回顾性分析显示对于没有骨折主要危险因素的患者PPI应用并不增加髋骨骨折的危险性. 2个病例对照研究发现长期PPI应用导致脊柱骨折增加. 病例对照研究中PPI与骨折的联系强度处于低值, 大部分研究的OR<2, 仅有1个研究中PPI使用7年或以上的髋骨骨折OR = 4.55. Yang *et al*[8]的研究发现PPI与骨折有剂量效应关系, 1.75倍平均剂量以上组的髋骨骨折危险性(OR = 2.65)高于1.75倍平均剂量以下组. 仅有的一个前瞻性研究中, 奥美拉唑(OM)的使用是脊柱骨折的独立的和重要的危险因素(RR = 3.50).

对于回顾性分析发现的PPI与骨折的关系需要前瞻性的随机双盲安慰剂对照实验或队列研究进一步证实. 2009-01 Calcif Tissue Int杂志发表了Roux *et al*[12]的OPUS(The Osteoporosis and Ultrasound Study)研究, 这个研究为5个欧洲中心的前瞻性研究, 参加人群为1999-2001年普通人群中1211名急救的绝经后妇女, 随访至2007-03, 平均随访6.1年. 实验开始时和随访期结束时用X线判断脊柱骨折情况. 实验开始时有61名服用OM, 1150名未服用OM. OM使用者和非使用者的年龄调整的脊柱骨折发生率为1.89和0.60/100年人(P = 0.009); 多因素分析显示OM是脊柱骨折的明显和独立危险因子, RR = 3.10(1.14-8.44)(P = 0.027). 其他的预测因子有年龄>65岁(RR = 2.34, 95%CI: 1.02-5.34). 这个实验的缺点是仅限于绝经后妇女, 服用OM的比例较低, 仅5%. 今后的研究还应该包括有非绝经妇女和男性患者参与的实验.

3 PPI的骨折不良反应分析

在分析药物的不良反应方面, Shakir *et al*[13]认为Austin Bradford-Hill标准有重要的价值. 这个标准包括联系的强度(Strength)、结果的一致性(Consistency)、量效关系(Biological gradient)、合理性(Plausibility)等. 下面对此进行分析.

3.1 联系的强度 在分析药物的不良反应时, Sir Austin Bradford-Hill认为强的联系比弱的联系更有可能成为原因; 从流行病学的角度来看, 相对危险性<2被认为是弱的联系, 可能为偏倚所致. 文献报道的PPI长期应用与骨折的关系时, 大部分实验的OR值<2, 故认为病因学联系比较弱, 可能为偏倚所致[14]; 但从药物流行病学来看存在的问题是很少发现相对危险性>2的药物不良反应, 因为>2的药物因为毒性太强而不能进入市场[13,15]. 但是有学者认为PPI长期治疗与髋骨骨折有明显的相关性, 证据是老年患者长期PPI应用导致维生素B_{12}缺乏, 而维生素B_{12}缺乏与高同型半胱氨酸水平有关, 而同型半胱氨酸是老年患者髋骨骨折的预测因子, 在一个研究中老年男性有高同型半胱氨酸者发生髋骨骨折的危险性增加4倍, 老年女性增加1.9倍; 在一个以人群为基础的前瞻性研究中的OR = 2.42[16].

3.2 结果的一致性 在结果的一致性方面, 发现了PPI长期应用导致骨质疏松性骨折, 4个回顾性分析显示PPI的使用是髋骨骨折的危险因素, 2个回

顾性分析显示PPI的使用是脊柱骨折的危险因素, 一致性的差异可能有其他的影响因素. 唯一的前瞻性研究提示PPI的使用是脊柱骨折的危险因素.

3.3 量效关系 Yang *et al*[8]的研究发现高剂量者[PPI平均剂量1.75倍以上者*OR* = 2.65 (1.80-3.90)]的*OR*高于低剂量者[PPI平均剂量1.75倍以下者为*OR* = 1.40(1.26-1.54)].

3.4 合理性 体外实验中碳酸钙的分解和溶解是pH依赖的, pH上升, 碳酸钙的溶解和分解减慢, 由pH1时的96%降到pH6.1时的23%. 有学者认为近端十二指肠的胃酸和酸性环境对钙的离子化和吸收极为重要, 没有胃酸或者胃酸减少将会延缓食物中钙的吸收. O'Connell *et al*[4]的小样本实验中, 18名65-89岁的健康女性, 用Ca同位素示踪不同肠段钙的吸收, 实验对象每天服用OM 20 mg, 连续7 d, 发现用PPI者的肠道钙吸收减少. PPI长期使用导致骨折的可能机制为: (1)Tcirg1基因编码破骨细胞V-H^+-ATP酶(vacuolar-type H^+-ATPases)和胃的壁细胞质子泵的一部分; 无Tcirg1基因的小鼠分泌胃酸减少, 其低胃酸导致低钙血症、PTH升高、骨吸收增加, 给无Tcirg1基因的小鼠补充钙剂和维生素D能够预防骨质疏松的发生[17-18]. PPI制剂的应用导致胃酸分泌减少, 近端消化系低胃酸, 食物中钙的离子化和吸收减少, 引起血钙浓度降低, 继发性的甲状旁腺功能亢进, 循环中甲状旁腺素(PTH)升高, PTH升高导致破骨细胞活跃, 骨吸收增加, 骨质减少, 增加骨质疏松相关骨折的危险性[19]. 但是目前还没有PPI应用对长期的健康人体的PTH水平的影响的资料. (2)PPI长期使用导致继发性的高胃泌素血症, 高胃泌素血症可能通过高PTH血症而增加骨吸收[20]. 破骨细胞促进骨的吸收, V-H^+-ATP酶在破骨细胞的质膜和囊泡膜上高表达, 抑制V-H^+-ATP酶可以预防骨折的发生. Bafilomycin A1、SB242784是选择性的破骨细胞V-H^+-ATP酶抑制剂, 能够预防实验动物骨折的发生[21]. OM在毫摩尔浓度时抑制胃壁细胞的H^+/K^+-ATP酶, 浓度>100 μmol/L也能够抑制破骨细胞的V-H^+-ATP酶, 抑制人骨吸收[22]. 从这个角度来看, OM治疗应该是有预防骨折的作用. 与此矛盾的是, OM的短期和长期试验提示OM能够降低血钙, 促进骨折的可能.

4 结论

OM短期应用导致血钙降低; PPI长期应用导致髋骨、脊柱等骨折的危险性增加, 但关联不是很强; 服用PPI发生骨折的患者年龄多大于50岁, 使用时间>12 mo; 还有研究提示PPI剂量越高, 发生骨折的*OR*值越高. 因此PPI长期使用应有合适的指征、不能长时间超过必要的剂量.

■同行评价

本文选题较好, 文献引用合理, 具有很好的临床参考价值.

5 参考文献

1 Graziani G, Badalamenti S, Como G, Gallieni M, Finazzi S, Angelini C, Brancaccio D, Ponticelli C. Calcium and phosphate plasma levels in dialysis patients after dietary Ca-P overload. Role of gastric acid secretion. *Nephron* 2002; 91: 474-479

2 Graziani G, Como G, Badalamenti S, Finazzi S, Malesci A, Gallieni M, Brancaccio D, Ponticelli C. Effect of gastric acid secretion on intestinal phosphate and calcium absorption in normal subjects. *Nephrol Dial Transplant* 1995; 10: 1376-1380

3 Hardy P, Sechet A, Hottelart C, Oprisiu R, Abighanem O, Said S, Rasombololona M, Brazier M, Moriniere P, Achard JM, Pruna A, Fournier A. Inhibition of gastric secretion by omeprazole and efficiency of calcium carbonate on the control of hyperphosphatemia in patients on chronic hemodialysis. *Artif Organs* 1998; 22: 569-573

4 O'Connell MB, Madden DM, Murray AM, Heaney RP, Kerzner LJ. Effects of proton pump inhibitors on calcium carbonate absorption in women: a randomized crossover trial. *Am J Med* 2005; 118: 778-781

5 Kocsis I, Arató A, Bodánszky H, Szönyi L, Szabó A, Tulassay T, Vásárhelyi B. Short-term omeprazole treatment does not influence biochemical parameters of bone turnover in children. *Calcif Tissue Int* 2002; 71: 129-132

6 Wright MJ, Proctor DD, Insogna KL, Kerstetter JE. Proton pump-inhibiting drugs, calcium homeostasis, and bone health. *Nutr Rev* 2008; 66: 103-108

7 Vestergaard P, Rejnmark L, Mosekilde L. Proton pump inhibitors, histamine H2 receptor antagonists, and other antacid medications and the risk of fracture. *Calcif Tissue Int* 2006; 79: 76-83

8 Yang YX, Lewis JD, Epstein S, Metz DC. Long-term proton pump inhibitor therapy and risk of hip fracture. *JAMA* 2006; 296: 2947-2953

9 Kaye JA, Jick H. Proton pump inhibitor use and risk of hip fractures in patients without major risk factors. *Pharmacotherapy* 2008; 28: 951-959

10 Targownik LE, Lix LM, Metge CJ, Prior HJ, Leung S, Leslie WD. Use of proton pump inhibitors and risk of osteoporosis-related fractures. *CMAJ* 2008; 179: 319-326

11 Yu EW, Blackwell T, Ensrud KE, Hillier TA, Lane NE, Orwoll E, Bauer DC. Acid-suppressive medications and risk of bone loss and fracture in older adults. *Calcif Tissue Int* 2008; 83: 251-259

12 Roux C, Briot K, Gossec L, Kolta S, Blenk T, Felsenberg D, Reid DM, Eastell R, Glüer CC. Increase in vertebral fracture risk in postmenopausal women using omeprazole. *Calcif Tissue Int* 2009; 84: 13-19

13 Shakir SA, Layton D. Causal association in pharmacovigilance and pharmacoepidemiology: thoughts on the application of the Austin Bradford-

Hill criteria. *Drug Saf* 2002; 25: 467-471
14 Moayyedi P, Cranney A. Hip fracture and proton pump inhibitor therapy: balancing the evidence for benefit and harm. *Am J Gastroenterol* 2008; 103: 2428-2431
15 Laine L. Proton pump inhibitors and bone fractures? *Am J Gastroenterol* 2009; 104 Suppl 2: S21-S26
16 Roblin X, Phelip JM. Biological plausibility between proton pump inhibitory therapy and hip fracture: hyperhomocysteinemia can be the link. *Am J Gastroenterol* 2009; 104: 1052
17 Schinke T, Schilling AF, Baranowsky A, Seitz S, Marshall RP, Linn T, Blaeker M, Huebner AK, Schulz A, Simon R, Gebauer M, Priemel M, Kornak U, Perkovic S, Barvencik F, Beil FT, Del Fattore A, Frattini A, Streichert T, Pueschel K, Villa A, Debatin KM, Rueger JM, Teti A, Zustin J, Sauter G, Amling M. Impaired gastric acidification negatively affects calcium homeostasis and bone mass. *Nat Med* 2009; 15: 674-681
18 Boyce BF. Stomaching calcium for bone health. *Nat Med* 2009; 15: 610-612
19 Insogna KL. The effect of proton pump-inhibiting drugs on mineral metabolism. *Am J Gastroenterol* 2009; 104 Suppl 2: S2-S4
20 Wright MJ, Proctor DD, Insogna KL, Kerstetter JE. Proton pump-inhibiting drugs, calcium homeostasis, and bone health. *Nutr Rev* 2008; 66: 103-108
21 Visentin L, Dodds RA, Valente M, Misiano P, Bradbeer JN, Oneta S, Liang X, Gowen M, Farina C. A selective inhibitor of the osteoclastic V-H(+)-ATPase prevents bone loss in both thyroparathyro idectomized and ovariectomized rats. *J Clin Invest* 2000; 106: 309-318
22 Farina C, Gagliardi S. Selective inhibition of osteoclast vacuolar H(+)-ATPase. *Curr Pharm Des* 2002; 8: 2033-2048

编辑 李军亮 电编 何基才

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2009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). (科学编辑: 李军亮 2009-10-08)

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2009年10月8日; 17(28): 2927-2930
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

研究快报 RAPID COMMUNICATION

siRNA沉默TPX2基因对食管癌细胞EC9706的增殖和TPX2基因表达的影响

刘红春, 刘玉含, 赵培荣, 李晟磊

刘红春, 刘玉含, 郑州大学第一附属医院检验科 郑州大学基础医学院 河南省郑州市 450052
赵培荣, 郑州大学肿瘤实验室 河南省郑州市 450052
李晟磊, 郑州大学第一附属医院病理科 河南省郑州市 450052
河南省教育厅自然科学基金资助项目, No. 2009A310011
作者贡献分布: 此课题由刘红春设计并参与实验; 研究过程主要由刘玉含与赵培荣操作完成; 数据分析由李晟磊完成; 本论文写作由刘红春与刘玉含完成.
通讯作者: 刘红春, 教授, 博士, 硕士生导师, 450052, 郑州大学第一附属医院, 郑州大学基础医学院. hcliu@zzu.edu.cn
收稿日期: 2009-07-31 修回日期: 2009-09-12
接受日期: 2009-09-21 在线出版日期: 2009-10-08

Small interfering RNA-mediated downregulation of targeting protein for Xklp2 suppresses the proliferation of human esophageal carcinoma EC9706 cells

Hong-Chun Liu, Yu-Han Liu, Pei-Rong Zhao, Sheng-Lei Li

Hong-Chun Liu, Yu-Han Liu, Department of Laboratory Medicine, the First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, Henan Province, China
Pei-Rong Zhao, Tumor Laboratory, Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, Henan Province, China
Sheng-Lei Li, Department of Pathology, the First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, Henan Province, China
Supported by: the Natural Science Foundation of Education Bureau of Henan Province, No. 2009A310011
Correspondence to: Professor Hong-Chun Liu, the First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Basic Medical College of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, Henan Province, China. hcliu@zzu.edu.cn
Received: 2009-07-31 Revised: 2009-09-12
Accepted: 2009-09-21 Published online: 2009-10-08

Abstract

AIM: To investigate the impact of targeting protein for Xklp2-speicific siRNA on TPX2 expression and cell proliferation in human esophageal carcinoma EC9706 cells.

METHODS: TPX2-specific siRNA was introduced into EC9706 cells by lipofectamine 2000-mediated transfection. After 24, 48, 72 and 96 hours of transfection, the expression levels of TPX2 mRNA and protein were determined by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) and Western blot, respectively, and cell proliferation was detected by methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) assay.

RESULTS: After siRNA transfection, RT-PCR and Western blot assays showed that there was a significant decrease in EC9706 mRNA and protein levels. The lowest expression levels of TPX2 mRNA and protein were detected 72 h after transfection (0.31 ± 0.08 and 0.39 ± 0.12 relative to blank control, respectively; both $P < 0.05$). MTT assay indicated that cell proliferation was restrained remarkably, and the growth inhibition rate was 35.4% relative to blank control ($P < 0.05$).

CONCLUSION: TPX2-specific siRNA can effectively downregulate TPX2 expression and inhibit cell proliferation in EC9706 cells.

Key Words: Targeting protein for Xklp2; Small interfering RNA; Esophageal carcinoma; EC9706 cell

Liu HC, Li YH, Zhao PR, Li SL. Small interfering RNA-mediated downregulation of targeting protein for Xklp2 suppresses the proliferation of human esophageal carcinoma EC9706 cells. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2009; 17(28): 2927-2930

摘要

目的: 研究TPX2基因特异性小干扰RNA(small RNA interference, siRNA)对食管鳞癌EC9706细胞基因表达的抑制作用及对食管癌细胞生长的影响.

方法: 以食管鳞癌EC9706细胞为研究对象, 利用Lipofectamine2000介导TPX2 siRNA分组转染EC9706细胞24, 48, 72, 96 h(实验组), 并设立阴性对照组和空白对照组. RT-PCR检测siRNA转染前后TPX2 mRNA的表达水平的变化; Western blot检测转染前后EC9706细胞中TPX2蛋白表达水平的变化; MTT法检测瞬时转染TPX2 siRNA对EC9706细胞增殖的影响.

■背景资料
TPX2蛋白在细胞有丝分裂纺锤体形成过程中发挥重要作用. TPX2在多种恶性肿瘤中存在过表达, 阻断其表达可抑制肿瘤细胞的生长, 有望成为肿瘤治疗的候选靶点. 选用高表达TPX2基因的食管癌EC9706细胞, 应用RNAi技术, 观察siRNA能否有效抑制TPX2的表达, 从而抑制细胞的生长增殖, 为基因治疗食管癌提供实验依据.

■同行评议者
许玲, 副教授, 中国人民解放军第二军医大学长征医院中医科

结果: 导入有效siRNA后, PT-PCR及Western blot结果显示, TPX2 siRNA可使EC9706细胞中TPX2 mRNA水平及蛋白表达水平下降, 至72 h时表达量最低, 与空白对照组相比分别为0.31±0.08和0.39±0.12, 差异有统计学意义(P<0.05); MTT实验显示细胞的生长增殖受到明显抑制, 与对照组相比抑制率可达35.4%(P<0.05).

结论: siRNA可以有效抑制EC9706细胞中TPX2的表达, 并降低EC9706细胞的增殖能力.

关键词: TPX2基因; 小干扰RNA; 食管癌; EC9706

刘红春, 刘玉含, 赵培荣, 李晟磊. siRNA沉默TPX2基因对食管癌细胞EC9706的增殖和TPX2基因表达的影响. 世界华人消化杂志 2009; 17(28): 2927-2930
http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/2927.asp

■**研发前沿**
有研究人员用RT-PCR和Western blot对肺癌细胞系中TPX2的表达水平进行了检测. 研究评价了TPX2异常表达在肺鳞癌发生、发展中的重要性. 还有研究表明胰腺癌中TPX2基因也明显扩增. 国外更多是研究TPX2的各种调控功能, 食管癌中的表达和干扰尚未见报道.

0 引言

TPX2(targeting protein for Xklp2)基因是近年来发现的一个候选的癌基因, 他的表达受到细胞周期的严格调控, 可能成为肿瘤细胞增殖的更确切的评估指标[1-3]. 肿瘤的发生和发展涉及到多个基因变化和相互作用, 是多阶段受多种因素调控的过程, RNAi相关技术可用于抑制其突变基因表达, 恢复正常基因的功能, 增加肿瘤细胞对现有治疗手段的敏感性, 还能研究各种作用因子的功能, 筛选有效的基因治疗的靶点[4]. 本实验利用siRNA技术, 通过体外设计合成针对靶基因TPX2的siRNA作用于食管癌EC9706细胞后观察其对细胞的作用效果及TPX2的表达.

1 材料和方法

1.1 材料 人食管癌EC9706细胞为中国医学科学院肿瘤医院肿瘤研究所分子肿瘤学国家重点实验室惠赠; RPMI 1640培养液、胎牛血清、胰蛋白酶购于美国Hyclone公司; siRNA模板由上海吉玛生物工程公司合成; Lipofectamine 2000购于Invitrogen公司; MTT购于Sigma公司; RT-PCR与DNA Marker 1000试剂购于美国TaKaRa公司; β-actin的兔多克隆抗体, 山羊抗兔辣根酶标记IgG(H+L)二抗均购自天根生化科技有限公司; 抗人TPX2的兔多克隆抗体为Gruss博士(European Molecular Biology Laboratory, Heidelberg, 德国)馈赠.

1.2 方法

1.2.1 细胞株及其培养: 本实验采用食管鳞癌EC9706细胞作为研究对象. EC9706细胞在100 mL/L胎牛血清的RPMI 1640培养基中, 置于37℃, 50 mL/L CO_2浓度, 饱和湿度下进行培养.

1.2.2 siRNA的设计与合成: TPX2的mRNA序列号为NM-012112, 针对靶基因TPX2设计siRNA, 靶序列为: 5'-CCA UUA ACC UGC CAG AGA ATT-3', 5'-UUC UCU GGC AGG UUA AUG GTG-3'.

1.2.3 siRNA特异性的转染: 按照Lipofectamine 2000说明书的要求进行转染, 转染前, 将处于对数生长期的EC9706(5×10^4个)铺于6孔板中, 使用无抗生素的培养基培养24 h. 待其细胞达到80%-90%融合度时, 将含有siRNA的转染试剂与细胞共孵育5 h后, 置换含100 mL/L胎牛血清的RPMI 1640培养基再孵育. 在培养24, 48, 72和96 h后分别收集转染细胞, 用于以下实验, 实验组重复4次. 每次实验设3组: 分别为siRNA组、阴性siRNA对照组和空白对照组(无siRNA). 每组设4 个平行孔, 实验重复2次.

1.2.4 RT-PCR检测EC9706细胞TPX2 mRNA的表达: 分别于转染后24, 48, 72和96 h收集各组细胞各2×10^6个, PBS洗涤2遍, 提取各组细胞总RNA, 再进行RT-PCR. 反应条件: 50℃ 30 min; 94℃ 2 min; 94℃ 30 s, 56℃ 30 s, 72℃ 1 min 35个循环, 4℃保存RT-PCR产物. 用12 g/L琼脂糖凝胶对RT-PCR产物进行电泳, GeneTools图像系统分析结果, 分别得出各组TPX2基因条带和内参条带β-actin的A比值, 以其表示TPX2 mRNA含量的相对强度. PCR引物为: TPX2: 上游5'-GCC CTT TGT TCC CAA GAA AGA-3', 下游5'-AGC AGT GGA ATC GAG TGG AGA-3'; β-actin: 上游5'-GGG ACC TGA CTG ACT ACC TCA-3', 下游5'-GAC TCG TCA TAC TCC TGC TTG-3'. 具体操作过程按RT-PCR试剂盒说明书进行. TPX2扩增片段为335 bp, β-actin扩增片段为500 bp.

1.2.5 Western blot检测TPX2蛋白: 分别于转染后24, 48, 72和96 h收集细胞, 加入细胞裂解液提取细胞的总蛋白, 用Bradford法测定蛋白浓度. 制备SDS-聚丙烯酰胺凝胶, 每孔上样量为60 μg, 进行常规电泳后, 凝胶转移至硝酸纤维素膜上. 取出转移膜, 用50 g/L的脱脂牛奶封闭. 兔抗人TPX2一抗(1∶1500), β-actin一抗(1∶300)孵育过夜. TBST洗涤3次, 加入(1∶10 000)稀释的山羊抗兔辣根酶标记IgG(H+L)二抗, 室温1 h. ECL发光液处理后, 暗室内曝光, 将胶片显影固定, 实验重复4次. 图像应用TotalLab 2.0软件进行灰度分析并作统计学处理.

■**创新盘点**
有关食管癌TPX2文献报道尚未见到, 本研究采用RNAi技术干扰食管癌细胞后, 采用RT-PCR、Western blot检测siRNA干扰前后TPX2 mRNA的表达水平和蛋白表达水平的变化, 以及MTT法检测瞬时转染TPX2 siRNA对EC9706细胞增殖的影响, 具有一定的创新性.

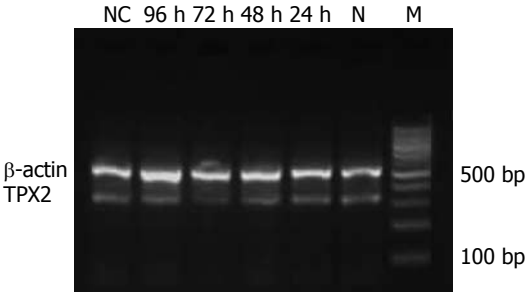


图 1 半定量RT-PCR检测TPX2 siRNA干扰结果. M: DNA Marker 1000; N: EC9706细胞空白对照组; NC: EC9706细胞阴性对照组.

1.2.6 干涉TPX2表达后细胞增殖抑制实验(MTT): 为了直观地验证抑制TPX2的表达是否会抑制细胞的增殖, 用MTT来直接检测[5]. 用96孔培养板分别于转染24、48、72和96 h时检测EC9706细胞增殖状态. 将转染siRNA后的细胞浓度调整为2×10^4/L, 96孔培养板内每孔加入培养液体积为200 μL. 分别在转染后的24、48、72和96 h, 在各组孔内加入20 μL MTT工作液(5 g/L), 继续37℃孵育4 h. 吸去上清液, 每孔加入二甲基亚砜(DMSO)200 μL, 置平板摇床震荡10 min. 至结晶完全溶解后, 酶标仪测定492 nm波长各孔的吸光度(A)值. 实验重复3次. 绘制细胞生长曲线, 计算生长抑制率. 生长抑制率 = (空白对照组A值-实验组A值)/对照组A值×100%.

统计学处理 使用SPSS13.0软件进行方差分析.

2 结果

2.1 转染TPX2 siRNA后TPX2 mRNA表达 RT-PCR产物电泳条带显示, 转染TPX2 siRNA后, EC9706细胞TPX2 mRNA表达量随时间的增加而减少, 在72 h达最低(图1), 之后又增高, 但不影响β-actin的表达, 而空白和阴性对照组的EC9706细胞TPX2 mRNA无明显改变. 用H检验进行分析, 转染TPX2 siRNA 72 h后EC9706细胞的mRNA表达量与空白对照组之间的差异有显著性意义(n = 4, P<0.05). 阴性对照组TPX2 mRNA的量为空白对照组的1.01±0.11, 瞬时转染24, 48, 72, 96 h后TPX2 mRNA的量仅为空白对照组的0.87±0.06, 0.62±0.09, 0.31±0.08和0.74±0.10.

2.2 siRNA TPX2转染后TPX2蛋白表达 在72 h时siRNA TPX2瞬时转染后的EC9706细胞中TPX2蛋白表达水平较转染阴性对照细胞组和空白对照细胞组的TPX2蛋白表达水平显著降低. TPX2 mRNA表达下调后, 在蛋白质层次上引起TPX2表达下调(图2). Bandscan图像系统分析结果所示, 以EC9706细胞空白对照组的TPX2蛋白带为标准(亮度定为100), 其他几组与之比较, 转染阴性对照siRNA TPX2的条带强度为0.98±0.11, 干扰后24, 48, 72和96 h的条带强度分别为0.91±0.06, 0.68±0.07, 0.39±0.12和0.77±0.09.

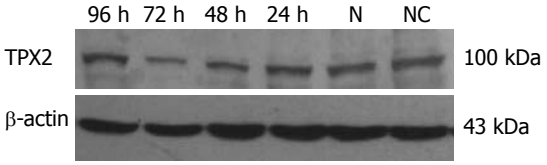


图 2 Western blot分析TPX2蛋白表达抑制情况. N: EC9706细胞空白对照组; NC: 阴性对照组.

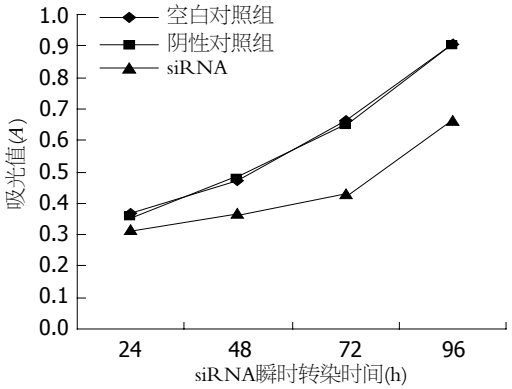


图 3 TPX2 siRNA干扰EC9706细胞生长曲线.

2.3 干扰TPX2表达后细胞增殖抑制实验(MTT) 通过比较细胞的3条生长曲线(图3), 可以看出阴性对照组和空白对照组细胞的生长曲线较为接近, 而转染TPX2 siRNA组细胞的生长曲线则位于前二者的下方. 这表明细胞在转染siRNA后48 h其增殖特性开始受到抑制, 至72 h抑制作用最为明显, 生长抑制率为0.35.

3 讨论

食管癌是世界上常见的消化系恶性肿瘤之一, 我国是世界上食管癌发病率和死亡率最高的国家, 鳞癌是最多见的组织学类型[6-7], 占90%以上. 基因治疗是近年来治疗恶性肿瘤的主要研究方向, 探寻食管鳞癌新的基因治疗方法具有重要意义. 与此同时, RNAi技术已经成为科学研究的前沿, 他为基因功能研究、疾病治疗及药物开发等提供了全新的构思和技术途径[8]. RNAi技术, 指内源性或外源性双链(dsRNA)在细胞内诱导同源序列的基因表达受抑的现象, 主要借助转录后的加工特异性抑制靶mRNA生成, 并导致特异性蛋白合成减少, 所以也称为转录后

■应用要点
siRNA可以有效抑制EC9706细胞中TPX2的表达, 并降低EC9706细胞的增殖能力.

■同行评价
本文选题新颖, 设计合理, 对食管癌基因治疗有一定的意义.

基因沉默(PTGS). 其基本原理是将dsRNA裂解为21-25个核苷酸组成的小的siRNA作为介导子, 引起同源序列特异性的mRNA降解[9].

TPX2是在爪蟾的微管相关蛋白中被首次发现的[10]. TPX2是一种微管相关蛋白, 对于有丝分裂纺锤体的稳定有重要作用[11]. TPX2的表达受细胞周期的严格调控, 只在G_1-S交界期开始可以被检测到, 在胞质分裂完成后消失. 在S和G_2期, 人TPX2弥漫分布在整个细胞核, 而在分裂期细胞, 他与有丝分裂的纺锤体密切结合, 是一种细胞周期蛋白[12]. 已有文献证明TPX2在肺鳞状细胞癌, 唾液腺癌, 卵巢癌中有高表达[11-13], 但关于TPX2在食管鳞癌细胞中表达情况的报道较为少见. 目前国内外应用RNAi技术干扰TPX2基因表达的报道甚少, Zhang *et al*[14]曾用RNAi技术成功地沉默了恶化的人支气管上皮细胞细胞TPX2基因, 实验结果显示: 化学合成的靶向siRNA在转染48 h时能够显著下调TPX2基因表达, 阻滞细胞周期于S期, 抑制细胞增殖. 在本研究中, 我们选用高表达TPX2基因的食管癌EC9706细胞, 应用RNAi技术观察化学合成的TPX2 siRNA对EC9706细胞的增殖抑制影响, 以及对TPX2的基因和蛋白表达的作用. 结果发现siRNA能有效抑制TPX2的表达, 从而抑制细胞的生长增殖.

本研究提示RNA干扰TPX2能有效抑制食管鳞癌EC9706细胞的生长增殖, 揭示了RNA干扰在食管癌基因治疗上的潜在应用价值, 为今后应用该技术治疗食管癌提供了一定的实验室依据.

致谢: 感谢Gruss博士(European Molecular Biology Laboratory, Heidelberg, 德国)馈赠TPX2抗体, 感谢河南省肿瘤重点实验室及病理科同仁对本实验研究的帮助.

4 参考文献

1 Wittmann T, Wilm M, Karsenti E, Vernos I. TPX2, A novel xenopus MAP involved in spindle pole organization. *J Cell Biol* 2000; 149: 1405-1418
2 Ma Y, Lin D, Sun W, Xiao T, Yuan J, Han N, Guo S, Feng X, Su K, Mao Y, Cheng S, Gao Y. Expression of targeting protein for xklp2 associated with both malignant transformation of respiratory epithelium and progression of squamous cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 2006; 12: 1121-1127
3 张云香, 李湘洲. TPX2在细胞有丝分裂中的作用及与肿瘤发生的关系. 肿瘤研究与临床 2007; 19: 861-864
4 叶景佳, 曹江. RNAi相关技术及其在肿瘤基因治疗中的应用. 国外医学・肿瘤学分册 2004; 31: 670-674
5 李静, 刘陕西. 反义寡核苷酸对K562细胞增殖的作用. 陕西医学杂志 2002; 31: 116-117
6 胡忠良, 文继舫. 食管癌组织TGIF表达的意义. 世界华人消化杂志 2004; 12: 1766-1768
7 Metzger R, Schneider PM, Warnecke-Eberz U, Brabender J, Hölscher AH. Molecular biology of esophageal cancer. *Onkologie* 2004; 27: 200-206
8 李珍珠. RNAi技术及其在疾病治疗中的应用. 医学新知杂志 2008; 18: 226-228
9 Semizarov D, Frost L, Sarthy A, Kroeger P, Halbert DN, Fesik SW. Specificity of short interfering RNA determined through gene expression signatures. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100: 6347-6352
10 Rajangam AS, Kumar M, Aspeborg H, Guerriero G, Arvestad L, Pansri P, Brown CJ, Hober S, Blomqvist K, Divne C, Ezcurra I, Mellerowicz E, Sundberg B, Bulone V, Teeri TT. MAP20, a microtubule-associated protein in the secondary cell walls of hybrid aspen, is a target of the cellulose synthesis inhibitor 2,6-dichlorobenzonitrile. *Plant Physiol* 2008; 148: 1283-1294
11 Lin DM, Ma Y, Xiao T, Guo SP, Han NJ, Su K, Yi SZ, Fang J, Cheng SJ, Gao YN. [TPX2 expression and its significance in squamous cell carcinoma of lung] *Zhonghua Binglixue Zazhi* 2006; 35: 540-544
12 Shigeishi H, Ohta K, Hiraoka M, Fujimoto S, Minami M, Higashikawa K, Kamata N. Expression of TPX2 in salivary gland carcinomas. *Oncol Rep* 2009; 21: 341-344
13 Scharer CD, Laycock N, Osunkoya AO, Logani S, McDonald JF, Benigno BB, Moreno CS. Aurora kinase inhibitors synergize with paclitaxel to induce apoptosis in ovarian cancer cells. *J Transl Med* 2008; 6: 79
14 Zhang L, Huang H, Deng L, Chu M, Xu L, Fu J, Zhu Y, Zhang X, Liu S, Zhou Z, Wang Y. TPX2 in malignantly transformed human bronchial epithelial cells by anti-benzo[a]pyrene-7,8-diol-9,10-epoxide. *Toxicology* 2008; 252: 49-55

编辑 李军亮 电编 何基才

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2009年10月8日; 17(28): 2931-2935
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

研究快报 RAPID COMMUNICATION

ERK通路对胃癌细胞顺铂敏感性的调节作用

荆 薇, 张 晔, 刘云鹏, 侯柯佐

荆薇, 张晔, 刘云鹏, 侯柯佐, 中国医科大学附属第一医院肿瘤内科 辽宁省沈阳市110001
荆薇, 中国医科大学附属盛京医院肿瘤科 辽宁省沈阳市110004
国家自然科学基金资助项目, No. 30770993
作者贡献分布: 此课题由刘云鹏、荆薇及张晔设计; 研究过程由荆薇完成; 研究所用试剂与分析工具由刘云鹏、侯柯佐及张晔提供; 数据分析由荆薇与张晔完成; 本论文写作由荆薇完成.
通讯作者: 刘云鹏, 教授, 110001, 辽宁省沈阳市和平区南京北街155号, 中国医科大学附属第一医院肿瘤内科.
cmuliuyunpeng@yahoo.cn
电话: 024-83282312 传真: 024-83282543
收稿日期: 2009-07-24 修回日期: 2009-09-09
接受日期: 2009-09-15 在线出版日期: 2009-10-08

Regulatory role of the extracellular signal-regulated kinase signaling pathway in sensitivity of gastric cancer cells to cis-platinum

Wei Jing, Ye Zhang, Yun-Peng Liu, Ke-Zuo Hou

Wei Jing, Ye Zhang, Yun-Peng Liu, Ke-Zuo Hou, Department of Medical Oncology, the First Hospital of China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China
Wei Jing, Department of Oncology, Shengjing Hospital of China Medical University, Shenyang 110004, Liaoning Province, China
Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30770993
Correspondence to: Professor Yun-Peng Liu, Department of Medical Oncology, the First Hospital of China Medical University, 155 Nanjing North Street, Heping Ward, Shenyang 110001, Liaoning Province, China. cmuliuyunpeng@yahoo.cn
Received: 2009-07-24 Revised: 2009-09-09
Accepted: 2009-09-15 Published online: 2009-10-08

Abstract

AIM: To investigate the regulatory role of the extracellular signal-regulated kinase (ERK) signaling pathway in sensitivity of gastric cancer cells to cis-platinum (CDDP).

METHODS: Gastric cancer cells (MGC-803 and BGC-823) were first treated with CDDP for 72 hours. Twenty-four hours after culture with PD98059, cells were treated with CDDP for 48 hours. Cell proliferation was then measured by methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) assay. The expression of glutathione S-transferases π (GST-π) and p-ERK was detected by Western blot.

RESULTS: The half maximal inhibitory concentration (IC_{50}) of CDDP for 72 hours in MGC-803 and BGC-823 cells were 0.71 and 1.21 mg/L, respectively. The proliferation rate of MGC-803 cells was significantly lower than that of BGC-823 cells ($P < 0.05$). MGC-803 cells did not express GST-π, while BGC-823 cells highly expressed GST-π. After PD98059 treatment for 24 h, the expression levels of p-ERK and GST-π significantly decreased in BGC-823 cells, and BGC-823 cells became more sensitive to CDDP.

CONCLUSION: Inhibition of the ERK signaling pathway may enhance the sensitivity of gastric cancer cells to CDDP, which is induced by downregulation of GST-π expression.

Key Words: Gastric cancer; Extracellular signal-regulated kinase; Drug sensitivity; Glutathione S-transferases π

Jing W, Zhang Y, Liu YP, Hou KZ. Regulatory role of the extracellular signal-regulated kinase signaling pathway in sensitivity of gastric cancer cells to cis-platinum. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2009; 17(28): 2931-2935

摘要

目的: 研究在人胃癌细胞中, 细胞外信号调节蛋白激酶(extracellular signal-regulated kinase, ERK)通路对人胃癌细胞顺铂敏感性的影响.

方法: 采用MTT法测定顺铂对两种胃癌细胞MGC-803、BGC-823的增殖抑制影响, 测定PD98059作用BGC-823细胞后顺铂对细胞的增殖抑制影响. Western blot方法检测MGC-803、BGC-823细胞中谷胱甘肽-S-转移酶π(glutathione S-transferases π, GST-π)蛋白的表达; 及PD98059作用BGC-823细胞24 h后BGC-823细胞中p-ERK、GST-π蛋白的表达.

结果: 顺铂作用两种胃癌细胞72 h后, MGC-803, BGC-823细胞的IC_{50}值分别为0.71和1.21 mg/L, 且MGC-803细胞的增殖率明显低于BGC-823细胞的增殖率($P<0.05$). MGC-803细胞顺铂的敏感性高于BGC-823

■背景资料
胃癌原发及继发性耐药是严重影响化疗疗效及患者预后的重要原因之一. 谷胱甘肽-S-转移酶π是一种多药耐药相关蛋白, 与肿瘤对铂类等化疗药物耐药相关. 下调谷胱甘肽-S-转移酶π的表达可以提高胃癌对铂类药物的敏感性.

■同行评议者
王振宁, 教授, 中国医科大学附属第一医院肿瘤外科; 刘冰熔, 教授, 黑龙江省哈尔滨医科大学附属第二临床医院消化内科

■研发前沿
肿瘤的多药耐药是目前肿瘤化疗领域的研究热点. 本研究通过阻断ERK通路活化, 下调人胃癌细胞中GST-π蛋白的表达, 增强胃癌细胞对顺铂的敏感性. 为解决胃癌患者铂类等化疗药物耐药提供理论依据.

■相关报道
Tsai *et al*研究发现大蒜有机硫化物通过活化ERK通路, 诱导Colon 9细胞中GST-π蛋白的表达. 抑制ERK活性后, 可下调细胞中GST-π蛋白表达. Kim *et al*提出在氧化应激条件下, 肿瘤细胞通过ERK通路的活化使Nrf2进入细胞核内与Maf形成杂二聚体与抗氧化剂反应元件结合促进GSTP1基因的转录.

细胞. MGC-803细胞不表达GST-π蛋白, BGC-823细胞强表达GST-π蛋白. 20 μmol/L PD98059作用BGC-823细胞24 h后, p-ERK蛋白表达明显下调, GST-π蛋白表达亦明显下调. 20 μmol/L PD98059作用BGC-823细胞24 h后, 加入顺铂培养48 h, BGC-823+PD98059组增殖率明显低于对照组, BGC-823细胞对顺铂的敏感性明显增强.

结论: 下调胃癌细胞GST-π蛋白的表达可增强其对顺铂的敏感性; 抑制胃癌细胞中ERK通路的活化, 可以降低其细胞内GST-π蛋白表达; ERK通路通过调节人胃癌细胞GST-π基因表达影响其对顺铂的敏感性.

关键词: 胃癌; 细胞外信号调节蛋白激酶; 耐药; 谷胱甘肽-S-转移酶π

荆薇, 张晔, 刘云鹏, 侯柯佐. ERK通路对胃癌细胞顺铂敏感性的调节作用. 世界华人消化杂志 2009; 17(28): 2931-2935
http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/2931.asp

0 引言

胃癌是我国常见的恶性肿瘤之一, 死亡率高达29.31/10万. 临床发现病例多以进展期为主[1]. 因此在其综合治疗中, 除根治性手术外, 化疗亦占有重要的地位. 目前胃癌化疗方案多以氟尿嘧啶、铂类、阿霉素类等药物联合为主, 但由于胃癌原发或继发的多药耐药的存在, 严重影响了化疗的疗效及患者预后. 谷胱甘肽-S-转移酶π(glutathione S-transferases π, GST-π)作为Ⅱ相代谢酶家族的主要成员, 在胃癌中呈现高表达. 以往的研究显示, GST-π一方面可以作为肿瘤标志物提示肿瘤负荷[2]. 另一方面GST-π还与胃癌的原发或继发的多药耐药相关[3]. 细胞外信号调节激酶(extracellular signal-regulated kinase, ERK)是丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)家族的一员, 与细胞增殖、分化、细胞形态维持、细胞凋亡和细胞的恶变等多种生物学反应有关[4]. 其可通过抑制凋亡促进细胞生长. 本研究旨在分子水平探讨影响人胃癌细胞顺铂敏感性的因素, 以期为临床胃癌患者个体化治疗提供基础支持.

1 材料和方法

1.1 材料 RPMI 1640购于Gibco公司, 胎牛血清购于中国医学科学院血液研究所; GST-π抗体(兔抗人, 武汉博士德), p-ERK抗体(Promega), 二抗(山羊抗兔, 中杉公司), 顺铂(齐鲁制药).

1.2 方法

1.2.1 细胞培养: 胃癌MGC-803、BGC-823细胞株生长于含有100 mL/L, 56℃, 30 min灭活胎牛血清, 12 kU/L庆大霉素的RPMI 1640培养液中. 于37℃, 50 mL/L CO_2饱和湿度的培养箱内传代培养.

1.2.2 MTT法测定铂类对细胞的增殖抑制作用: 取对数生长期细胞, 调整细胞浓度为4×10^7个/L, 接种于96孔培养板内, 每孔180 μL, 培养24 h后加药, 实验组加作用药物顺铂, 终浓度分别为0.1, 0.5, 1, 5, 10 mg/L. 对照组不加任何处理因素. 空白组为等体积RPMI 1640培养液. 每组设3个平行孔, 培养72 h. PD98059(20 μmol/L)作用BGC-823细胞24 h后, 方法同上培养接种于96孔板, 加入顺铂后, 培养48 h. 各孔加入20 μL MTT(5 g/L), 孵育4 h后弃上清, 加100 μL DMSO混匀震荡15 min后, 用酶联免疫测定仪于570 nm波长条件下测定各孔的吸光度值(*A*值). 算出3孔平均值, 并按公式计算细胞增殖率, 画出细胞生存曲线, 求出IC_{50}, 以上实验重复3次. 细胞生长的增殖率(%) = (实验组*A*均值-空白组*A*均值)/(对照组*A*均值-空白组*A*均值)×100%.

1.2.3 Western blot方法检测p-ERK、GST-π蛋白的表达: 收集4℃预冷PBS洗涤MGC-803, BGC-823, PD98059(20 μmol/L)作用24 h后的BGC-823细胞, 裂解于100 μL含有蛋白酶抑制剂的RIPA裂解液中, 超声粉碎后4℃裂解40 min, 4℃ 15 000 r/min, 离心30 min取上清. 以上步骤均于冰上操作. 采用Lowry法进行总蛋白定量. 以1∶2比例与3×样品缓冲液混匀, 煮沸5 min. 将样品在12% SDS-聚丙烯凝胶中进行电泳2 h. 后通过半干式转印(恒流60 mA, 20 min, 后120 mA, 15 min)转印到硝酸纤维素膜上, 50 g/L脱脂奶粉封闭2 h, 按预染Marker标记的分子量剪裁转印膜, 一抗(兔抗人GST-π 1∶500; p-ERK 1∶250), 4℃过夜, 二抗(山羊抗兔1∶800)室温孵育30 min, 显色, 图像采集及分析处理.

统计学处理 所有的实验均重复3次, 采用SPSS11.0软件进行统计学分析, 差异的显著性采用*t*检验, $P<0.05$有统计学意义.

2 结果

2.1 MTT法测定铂类药物对胃癌细胞的增殖抑制作用 0.1-10 mg/L的顺铂(cis-platinum, CDDP)处理2种胃癌细胞72 h, CDDP以剂量依赖方式抑制胃癌细胞增殖, 将所得结果绘制细胞增殖抑制曲线, 示MGC-803组增殖率明显低于BGC-823

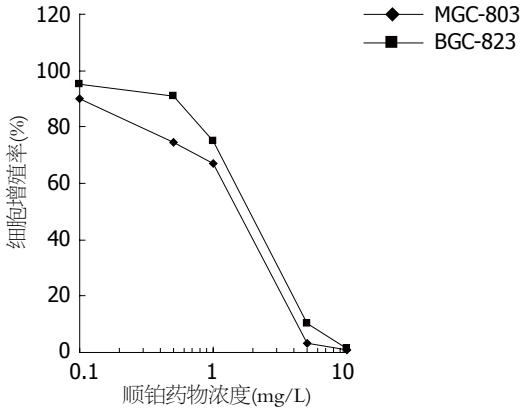


图 1 顺铂作用72 h后, MGC-803组及BGC-823组的增殖率变化.

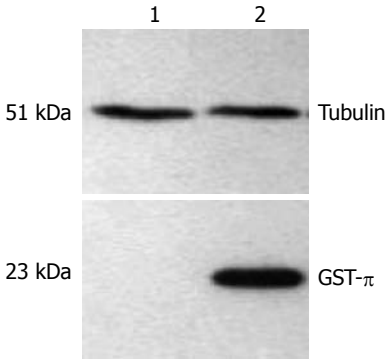


图 2 GST-π蛋白表达. 1: MGC-803; 2: BGC-823.

组(图1), 且2组间差异有统计学意义($P<0.05$). MGC-803, BGC-823细胞72 h抑制细胞增殖50%的药物浓度IC_{50}分别为0.71、1.21 mg/L.

2.2 GST-π蛋白表达 在2种胃癌细胞系中GST-π蛋白表达存在差异. MGC-803细胞无GST-π蛋白表达, BGC-823细胞GST-π呈强表达(图2).

2.3 PD98059作用BGC-823细胞后p-ERK、GST-π蛋白的表达 20 μmol/L PD98059处理BGC-823细胞24 h后, 明显下调了p-ERK的表达, 通过抑制ERK的磷酸化, 从而抑制ERK通路的传导. 同时出现GST-π蛋白表达的下调(图3).

2.4 MTT法测定顺铂对预处理后的胃癌细胞BGC-823的增殖抑制作用 PD98059(20 μmol/L)作用BGC-823细胞24 h后, 0.1-10 mg/L CDDP处理48 h, 实验组细胞增殖率明显低于对照组(图4), 对顺铂的敏感性明显增加.

3 讨论

胃癌是我国常见的消化系统恶性肿瘤之一, 目前主要以包含手术和化疗的综合治疗为主. 进展期胃癌患者化疗临床反应性差异导致肿瘤复发及总生存缩短. 研究表明肿瘤原发性及继发

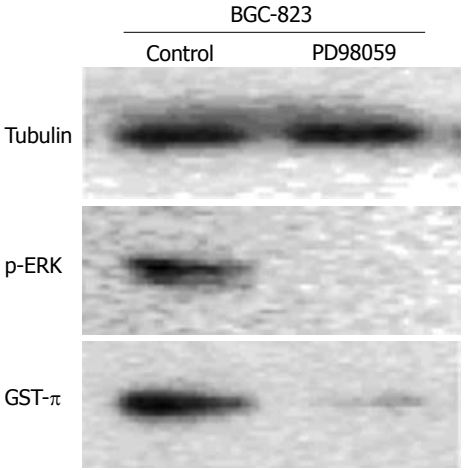


图 3 PD98059作用BGC-823细胞24 h后, p-ERK、GST-π蛋白的表达.

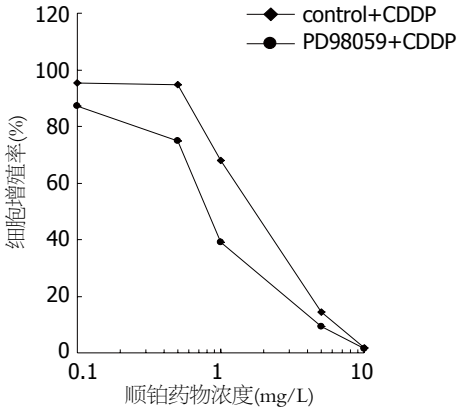


图 4 顺铂作用48 h后, BGC-823组及BGC-823+PD98059组的增殖率变化.

性耐药在其中发挥重要的作用. 尤其是肿瘤的多药耐药(multidrug resistance, MDR), 严重影响了化疗的疗效及患者预后[5].

铂类药物具有广泛的抗癌活性, 已成为癌症化疗中不可缺少的药物. 药理学特性为以DNA为靶点, 与DNA链上的G共价结合并可能形成链间交联从而阻断DNA的复制及转录. 顺铂为第一代铂类药物, 在肺癌、食管癌、卵巢癌、胃肠道肿瘤中成为推荐用药. 在临床上胃癌的治疗中多采用以铂类和氟尿嘧啶类药物联合方案, 但大部分患者存在原发耐药, 从而导致化疗失败, 疾病复发.

GST-π是一种酸性蛋白质, 包含2个亚基, 每个亚基由209个氨基酸构成, 在除大部分的前列腺癌外, 在如结肠癌、胃癌、膀胱癌、食管癌、肺癌等多种恶性肿瘤组织中高表达[6]. Doğru-Abbasoğlu *et al*的研究显示, GST-π在胃癌组织及血清中的表达明显高于正常患者[7]. 但目前的

■创新盘点

本研究探讨了除GSTP1基因启动子甲基化及编码启动子区基因异常等外其他影响GST-π蛋白表达的因素, 为解决胃癌耐药的靶向治疗提供新的靶点.

■应用要点
通过利用ERK上游激酶MEK1的抑制剂PD98059，抑制ERK信号通路活化，下调GST-π蛋白表达，增强胃癌细胞对顺铂的敏感性，为进一步解决肿瘤耐药提供了方法及途径，具有重要的临床实践意义.

研究表明其与肿瘤耐药亦具有重要的相关性. 作为谷胱甘肽转硫酶(glutathione S-transferases, GSTs)Ⅱ相代谢酶家族的重要成员之一, GST-π一方面能够催化谷胱甘肽与抗肿瘤药物结合促进这些药物的排出, 最新的研究证实其还能够通过蛋白-蛋白相互作用, 调节丝裂原活化的蛋白激酶信号通路(MAPK), 从而影响细胞生长及细胞凋亡[8-9]. Townsend *et al*研究结果显示GST-π的高表达导致肿瘤对如顺铂、阿霉素等多种化疗药物耐药, 并提示GST-π在肿瘤的原发及继发耐药中发挥重要的作用[10]. 针对GST-π的耐药作用机制, 临床出现了多种如GST-π抑制剂-谷胱甘肽类似物TER199、谷胱甘肽转硫酶抑制剂等靶向治疗方法. 部分已试验性应用于临床治疗, 提高了化疗药物的细胞毒性作用. 另外RNA干扰技术可通过基因沉默作用, 根本上抑制GSTP1基因蛋白水平的表达, 从而有望成为未来靶向治疗的发展方向[11]. 目前有关GST-π与化疗药物耐药报道多集中于卵巢癌、肺癌、前列腺癌和消化系等肿瘤. 然而国内在GST-π与胃癌耐药的关系研究上多局限于对患者的病理组织表达量的评价与其可能存在耐药的推测上. 本研究中以不同浓度的顺铂作用于两种胃癌细胞系72 h, CDDP组中发现MGC-803细胞IC_{50}值低于BGC-823细胞系, 分别为0.71、1.21 mg/L. MGC-803细胞对顺铂的敏感性高于BGC-823组. 进行两组增殖率配对*t*检验分析$P<0.05$, 具有统计学意义. 同时对多药耐药相关蛋白进行检测发现BGC-823细胞GST-π蛋白强表达, 这与免疫组化研究中所得的胃癌GST-π强表达的结果相一致[12]. 而人胃癌细胞MGC-803的GST-π蛋白表达缺失. 两种胃癌细胞对顺铂的敏感性与其GST-π蛋白水平的差异表现相关. 经本实验室利用RT-PCR方法检测两种细胞GST-π的mRNA的表达情况, 证实其与蛋白表达水平一致(数据未显示). 这与Wang *et al*[13], Chan *et al*[14]报道的GST-π蛋白的表达在转录水平受到调控的结果一致.

ERK是MAPK家族的一员, 控制着细胞增殖与分化、细胞形态维持、细胞凋亡和细胞的恶变等多种生物学反应[4]. 在人类的许多恶性肿瘤中都可发现ERK的过度激活. 其一方面接受生长因子、丝裂原、环境刺激等信号; 另一方面通过ERK信号级联反应激活后由胞质转位入胞核, 作用于核转录因子如转录因子AP-1(activator protein 1, AP-1)、核转录因子-κB(nuclear factor kappa B, NF-κB)等调控基因表达. 由此广大研究者将ERK通路视为肿瘤的治疗的新靶点[15-16]. Kim *et al*提出在氧化应激条件下, 肿瘤细胞启动细胞保护机制, 通过ERK通路的活化使转录因子NF-E2相关因子2(Nuclear factor-E2 related factor2, Nrf2)磷酸化, 导致其与胞质蛋白伴侣分子Keap1 (kelch-like ECH associating protein 1, Keap1)蛋白的解离, 进入细胞核内与Maf家族蛋白形成杂二聚体与抗氧化剂反应元件(antioxidant response element, ARE)结合从而促进GSTP1基因的转录[17]. 另外Tsai *et al*研究发现大蒜有机硫化物通过活化ERK通路, 增强AP-1与GSTP1基因的结合诱导Colon 9细胞中GST-π蛋白的表达. 抑制ERK活性后, 下调了Colon 9细胞中GST-π蛋白表达[18]. 本实验中采用MEK/ERK抑制剂PD98059作用BGC-823细胞24 h, 与对照组相比p-ERK的表达明显下调, ERK磷酸化明显降低, 同时伴随GST-π蛋白表达的下调. 提示胃癌细胞BGC-823中, PD98059作为ERK上游激酶MEK1(mitogen-activated protein kinase kinase-1)的抑制剂, 通过抑制ERK信号通路活化下调的GST-π蛋白的表达. 其可能是通过抑制ERK信号通路活化, 降低Nrf2磷酸化, 降低其与抗氧化剂反应元件(ARE)结合, 及降低AP-1与GSTP1基因的结合等途径来实现的.

本次研究发现, 人胃癌MGC-803细胞无GST-π蛋白表达, BGC-823细胞GST-π呈强表达, 同时伴有MGC-803细胞对顺铂敏感性强于BGC-823细胞. MEK/ERK抑制剂PD98059作用于BGC-823细胞24 h, ERK磷酸化水平明显降低, 同时伴随GST-π蛋白表达的下调. 我们发现阻断ERK通路活化, 可以实现对人胃癌细胞GST-π蛋白的表达的下调, 同时伴随对顺铂的敏感性增加. 本研究探讨了除GSTP1基因启动子甲基化及编码启动子区基因异常等其他影响GST-π蛋白表达的因素, 为解决胃癌患者顺铂、阿霉素、烷化剂类等化疗药物耐药问题提供进一步的理论依据, 并为解决胃癌耐药的靶向治疗提供新的靶点.

4 参考文献

1 Sun XD, Mu R, Zhou YS, Dai XD, Zhang SW, Huangfu XM, Sun J, Li LD, Lu FZ, Qiao YL. [Analysis of mortality rate of stomach cancer and its trend in twenty years in China] *Zhonghua Zhongliu Zazhi* 2004; 26: 4-9

2 Kim B, Bang S, Lee S, Kim S, Jung Y, Lee C, Choi K, Lee SG, Lee K, Lee Y, Kim SS, Yeom YI, Kim YS, Yoo HS, Song K, Lee I. Expression profiling

and subtype-specific expression of stomach cancer. *Cancer Res* 2003; 63: 8248-8255
3 Townsend DM, Findlay VL, Tew KD. Glutathione S-transferases as regulators of kinase pathways and anticancer drug targets. *Methods Enzymol* 2005; 401: 287-307
4 Ramos JW. The regulation of extracellular signal-regulated kinase (ERK) in mammalian cells. *Int J Biochem Cell Biol* 2008; 40: 2707-2719
5 Kwon HC, Roh MS, Oh SY, Kim SH, Kim MC, Kim JS, Kim HJ. Prognostic value of expression of ERCC1, thymidylate synthase, and glutathione S-transferase P1 for 5-fluorouracil/oxaliplatin chemotherapy in advanced gastric cancer. *Ann Oncol* 2007; 18: 504-509
6 McCarver DG, Hines RN. The ontogeny of human drug-metabolizing enzymes: phase II conjugation enzymes and regulatory mechanisms. *J Pharmacol Exp Ther* 2002; 300: 361-366
7 Doğru-Abbasoğlu S, Mutlu-Türkoğlu U, Türkoğlu S, Erbil Y, Barbaros U, Uysal M, Aykaç-Toker G. Glutathione S-transferase-pi in malignant tissues and plasma of human colorectal and gastric cancers. *J Cancer Res Clin Oncol* 2002; 128: 91-95
8 Ruscoe JE, Rosario LA, Wang T, Gaté L, Arifoglu P, Wolf CR, Henderson CJ, Ronai Z, Tew KD. Pharmacologic or genetic manipulation of glutathione S-transferase P1-1 (GSTpi) influences cell proliferation pathways. *J Pharmacol Exp Ther* 2001; 298: 339-345
9 Wang T, Arifoglu P, Ronai Z, Tew KD. Glutathione S-transferase P1-1 (GSTP1-1) inhibits c-Jun N-terminal kinase (JNK1) signaling through interaction with the C terminus. *J Biol Chem* 2001; 276: 20999-21003
10 Townsend DM, Tew KD. The role of glutathione-S-transferase in anti-cancer drug resistance. *Oncogene* 2003; 22: 7369-7375
11 Turella P, Cerella C, Filomeni G, Bullo A, De Maria F, Ghibelli L, Ciriolo MR, Cianfriglia M, Mattei M, Federici G, Ricci G, Caccuri AM. Proapoptotic activity of new glutathione S-transferase inhibitors. *Cancer Res* 2005; 65: 3751-3761
12 易永芬, 于冬青, 林晓, 王娅兰, 徐曼. 三种耐药蛋白在胃癌中的表达及意义. 实用肿瘤杂志 2003; 18: 185-187
13 Wang YY, Teicher BA, Shea TC, Holden SA, Rosbe KW, al-Achi A, Henner WD. Cross-resistance and glutathione-S-transferase-pi levels among four human melanoma cell lines selected for alkylating agent resistance. *Cancer Res* 1989; 49: 6185-6192
14 Chan QK, Khoo US, Chan KY, Ngan HY, Li SS, Chiu PM, Man LS, Ip PP, Xue WC, Cheung AN. Promoter methylation and differential expression of pi-class glutathione S-transferase in endometrial carcinoma. *J Mol Diagn* 2005; 7: 8-16
15 Roberts PJ, Der CJ. Targeting the Raf-MEK-ERK mitogen-activated protein kinase cascade for the treatment of cancer. *Oncogene* 2007; 26: 3291-3310
16 Wong KK. Recent developments in anti-cancer agents targeting the Ras/Raf/ MEK/ERK pathway. *Recent Pat Anticancer Drug Discov* 2009; 4: 28-35
17 Kim SG, Lee SJ. PI3K, RSK, and mTOR signal networks for the GST gene regulation. *Toxicol Sci* 2007; 96: 206-213
18 Tsai CW, Chen HW, Yang JJ, Sheen LY, Lii CK. Diallyl disulfide and diallyl trisulfide up-regulate the expression of the pi class of glutathione S-transferase via an AP-1-dependent pathway. *J Agric Food Chem* 2007; 55: 1019-1026

■同行评价
本实验试图研究ERK信号通路对人胃癌细胞顺铂敏感性的影响, 设计较为严谨, 研究方法得当, 研究结果具有一定的学术价值.

编辑 李军亮 电编 何基才

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2009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. (科学编辑: 李军亮 2009-10-08)

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2009年10月8日; 17(28): 2936-2939
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

研究快报 RAPID COMMUNICATION

旋覆代赭汤对胃窦平滑肌细胞收缩和钙离子浓度的影响

时昭红, 陶春晖, 石 拓, 林丽莉, 王湘宁, 韦秀明

■背景资料
胃动力障碍疾病是临床常见胃肠道疾病之一，其人群发病率高达20%-54%，约占消化门诊的52.85%，中医学对胃肠运动障碍疾病的治疗积累了丰富的经验. 旋覆代赭汤作为治疗胃动力障碍疾病的有效方剂，但缺少中药作用机制的系统研究.

时昭红，石拓，武汉市第一医院消化内科 湖北省武汉市 430022
陶春晖，林丽莉，王湘宁，韦秀明，湖北中医学院中医系 湖北省武汉市 430061
武汉市卫生局临床重点学科研究基金资助项目，武卫No. [2004]241
作者贡献分布：时昭红对此文做出主要贡献；此课题由时昭红、石拓及陶春晖设计；研究过程由陶春晖、林丽莉及王湘宁操作完成；研究所用新试剂及分析工具由陶春晖与林丽莉完成；数据分析由陶春晖、林丽莉及韦秀明完成；本论文写作由时昭红、陶春晖及林丽莉完成.
通讯作者：时昭红，教授，430022，湖北省武汉市中山大道215号，武汉市第一医院消化内科. ycfyx2000@126.com
电话：027-85855332
收稿日期：2009-06-24 修回日期：2009-08-29
接受日期：2009-09-07 在线出版日期：2009-10-08

Effects of Xuanfu Daizhe Decoction on cell contraction and intracellular calcium concentration in rat gastric antral smooth muscle cells

Zhao-Hong Shi, Chun-Hui Tao, Tuo Shi, Li-Li Lin, Xiang-Ning Wang, Xiu-Ming Wei

Zhao-Hong Shi, Tuo Shi, Department of Gastroenterology, Wuhan No.1 Hospital, Wuhan 430022, Hubei Province, China
Chun-Hui Tao, Li-Li Lin, Xiang-Ning Wang, Xiu-Ming Wei, Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan 430061, Hubei Province, China
Supported by: the Foundation of Wuhan Hygiene Bureau for Clinical Key Disciplines, Wu Wei No. [2004]241
Correspondence to: Professor Zhao-Hong Shi, Department of Gastroenterology, Wuhan No.1 Hospital, Wuhan 430022, Hubei Province, China. ycfyx2000@126.com
Received: 2009-06-24 Revised: 2009-08-29
Accepted: 2009-09-07 Published online: 2009-10-08

Abstract

AIM: To observe the effects of different concentrations of serum from rats medicated with Xuanfu Daizhe Decoction on cell contraction and intracellular calcium (Ca^{2+}) concentration in rat gastric antral smooth muscle cells (SMCs).

METHODS: After single SMCs were isolated and cultured, motilin or different concentrations (5%, 10% or 20%) of serum from rats medicated with XuanFu Daizhe Decoction were added, respectively. The contraction of SMCs was then determined, and intracellular Ca^{2+} concentration was measured using the o-cresolphthalein complexone (CPC) method.

RESULTS: Serum from rats medicated with XuanFu Daizhe Decoction could significantly stimulate the contraction of gastric antral SMCs in a concentration-dependent manner ($P < 0.05$). After cell contraction was induced, the total intracellular calcium concentration showed no significant difference among each serum treatment group and control group.

CONCLUSION: Serum from rats medicated with XuanFu Daizhe Decoction can induce obvious contraction of gastric antral SMCs in rats perhaps via a mechanism involving activation of inositol trisphosphate receptor to stimulate the release of Ca^{2+} from intracellular stores.

Key Words: Xuanfu Daizhe Decoction; Medicated animal serum; Gastric antral smooth muscle cells; Ca^{2+}

Shi ZH, Tao CH, Shi T, Lin LL, Wang XN, Wei XM. Effects of Xuanfu Daizhe Decoction on cell contraction and intracellular calcium concentration in rat gastric antral smooth muscle cells. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2009; 17(28): 2936-2939

摘要

目的：观察不同浓度旋覆代赭汤含药血清对大鼠胃窦平滑肌细胞(SMC)Ca^{2+}浓度的影响，并探讨其对胃SMC收缩力作用机制.

方法：分离大鼠胃窦SMC，加入不同浓度(5%、10%、20%)含药血清和胃动素，观察含药血清对胃窦SMC收缩作用，CPC法检测细胞Ca^{2+}总浓度变化.

结果：5%、10%、20%旋覆代赭汤含药血清刺激胃窦SMC，随剂量的增加细胞收缩活动逐渐增强($P<0.05$). 细胞收缩后，各剂量组与无钙缓冲液组的细胞内钙离子总浓度相比较无明显差异.

结论：旋覆代赭汤可使胃窦SMC明显收缩，其

■同行评议者
管冬元，副教授，上海中医药大学基础医学院实验中医学教研室

机制可能是与IP_3R使细胞内质网释放Ca^{2+}引起胃窦SMC Ca^{2+}升高有关.

关键词: 旋覆代赭汤; 含药血清; 胃窦平滑肌细胞; 钙离子

时昭红, 陶春晖, 石拓, 林丽莉, 王湘宁, 韦秀明. 旋覆代赭汤对胃窦平滑肌细胞收缩和钙离子浓度的影响. 世界华人消化杂志 2009; 17(28): 2936-2939

http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/2936.asp

0 引言

胃肠道为中空的肌性器官, 其肌层由数层平滑肌构成, 胃肠动力性疾病的发生与平滑肌收缩的改变密切相关. Ca^{2+}在介导平滑肌细胞收缩反应中起核心作用, 是重要的“第二信使”. 外来刺激作用细胞膜, 引起细胞内游离Ca^{2+}的浓度升高, 启动平滑肌细胞(smooth muscle cell, SMC)的兴奋-收缩偶联过程. 旋覆代赭汤出自《伤寒论》, 是用以治疗伤寒解后胃虚气逆, 心下痞硬之痰气痞, 具有涤痰化饮, 镇肝降逆, 调补脾胃之功效. 研究表明[1-2], 旋覆代赭汤具有较强的促胃动力作用, 但是关于其含药血清对胃窦SMC Ca^{2+}的影响尚未见报道. 本实验通过镜下观察含药血清对胃窦SMC收缩作用, 并应用CPC法检测含药血清对大鼠胃窦SMC收缩后Ca^{2+}总浓度变化, 探讨旋覆代赭汤含药血清对大鼠胃窦SMC收缩的作用机制.

1 材料和方法

1.1 材料 SD大鼠♂, 体质量180-250 g, 10只, 购自华中科技大学同济医学院实验动物学部, 动物许可证号为scxk(鄂)2004-0007. 旋覆代赭汤方中中药由湖北省武汉市中西结合医院中药房提供. Ⅱ型胶原酶、大豆胰蛋白酶抑制剂、胃动素均购自Sigma公司. 高糖DMEM培养液购自Gibco公司. 胎牛血清购自三利公司. N2-羟乙基哌嗪-N-2, 2-乙烷磺酸(HEPES)购自Amerseco公司. BSA购自Roche公司. 台盼蓝购自北京有机化工厂. 钙试剂购自上海复星长征医学科学有限公司. Hepes-Ringer缓冲液按照文献[3]配制.

1.2 方法

1.2.1 旋覆代赭汤的制备: 旋覆代赭汤根据《伤寒论》161条原剂量折算, 由旋覆花9 g、代赭石30g、生晒参6 g、生姜15 g、炙甘草9 g、半夏9 g, 大枣4枚组成. 将上述中药饮片置于煎煮容器内, 加相当于药材量5倍的冷水浸泡60 min, 煮沸30 min; 再加3倍量水继续煎煮20 min; 煎煮液浓缩后, 制成含煎剂2.52 g/mL(根据人与动物体表面积换算, 相当于成人每日剂量的11倍)的浓缩液200 mL.

1.2.2 旋覆代赭汤含药血清的制备: 按文献[4]制备含药血清.

1.2.3 游离单个大鼠胃窦SMC的制备: 参考文献[2]方法, 成年SD♂大鼠经麻醉, 无菌剖腹取胃, 剪取胃窦(距幽门约0.5 cm), 剪碎成1-2 mm^2的小肌块, 用含0.1%胶原酶和0.01%大豆胰蛋白酶抑制剂的消化液消化2次, 制成胃窦SMC悬液. 台盼蓝检测细胞活性, 调整细胞数目为2.5×10^7/ L.

1.2.4 旋覆代赭汤含药血清对大鼠胃窦SMC收缩反应的影响: 在24孔培养板中分设5组, 每组3孔, 将250 μL的胃窦SMC悬液依次加入24孔培养板中, 不同组中分别5%、10%、20%的含药血清10 μL, 空白对照组中加入10%的未含药血清10 μL, 胃动素组中加入, 加入生理剂量胃动素10^{-10} mol/L(此剂量对平滑肌细胞的收缩效应最强)[3] 10 μL. 每孔终反应体积为1 mL. 作用60 s后, 再分别加入80 μL 2.5%戊二醛终止反应. 在倒置显微镜下测量, 用显微测微尺随机测量在视野中细胞长轴变化情况, 计算细胞长度和细胞收缩变化百分率. 细胞收缩变化百分数 = (给药组细胞平均长度值-对照组细胞平均长度值)/对照组细胞平均长度值×100%.

1.2.5 旋覆代赭汤对大鼠胃窦SMC收缩后细胞内钙离子总浓度的影响: 收集细胞悬液1500 r/min, 3 min离心, 去上清液, 调整细胞浓度约2.5×10^7细胞/L, 分6组, 分别为: 空白对照组(含10%的未含药血清)、胃动素组(10^{-10} mol/L胃动素), 无钙的HEPES缓冲液组(含20%含药血清)、5%含药血清剂量组、10%含药血清剂量组、20%含药血清剂量组. 各组作用60 s后, 用无钙的HEPES缓冲液冲洗2次, 收集细胞, 超声粉碎, 1500 r/min, 3 min离心, 取上清液. 按照钙试剂盒说明, 运用AU2700 Olympus检测仪器CPC法检测钙离子总浓度. 重复10次.

统计学处理 结果以mean±SD表示, 统计学分析用SPSS12.0软件进行方差分析, 样本均数之间两两比较采用*t*检验.

2 结果

2.1 旋覆代赭汤含药血清对大鼠胃窦SMC收缩效应的影响 旋覆代赭汤代对大鼠胃窦平滑肌均有明显的收缩作用. 其中, 20%含药血清组对于

■研发前沿
对胃肠动力学及其相关疾病的研究是近十几年来国际国内医学研究的热点, 运用中药治疗胃肠运动障碍疾病已逐渐得到人们重视, 本课题紧紧围绕临床急需解决的关键技术进行研究, 具有较高的研究价值和研究前景, 尤其是对中药现代化研究, 提高中医药竞争力意义重大.

■相关报道
周吕 *et al*就游离单个大鼠胃窦SMC的制备做出了详细的论述. 齐清会 *et al*钙离子在胃肠平滑肌动作电位产生中的重要地位进行深入阐明.

■**创新盘点**
本课题首次从细胞分子水平来探讨旋覆代赭汤促进胃动力的作用机制, 从信号转导通路的角度来探讨旋覆代赭汤治疗胃动力障碍疾病的可能机制.

大鼠胃窦SMC收缩作用最强, 20%含药血清组与胃动素组无明显差异(表1).

2.2 旋覆代赭汤含药血清对大鼠胃窦SMC总Ca^{2+}的影响 5%、10%、20%的含药血清、胃动素、无钙的缓冲液组引起细胞收缩后, 所测细胞内Ca^{2+}总浓度分别为: 0.119±0.0128 mmol/L、0.111±0.0269 mmol/L、0.116±0.0331 mmol/L、0.121±0.0131 mmol/L、0.124±0.0317 mmol/L. 5%、10%、20%的含药血清组、胃动素组、空白对照组(0.118±0.0379 mmol/L)与无钙缓冲液组比较无显著差异; 20%的含药血清组与胃动素比较也无明显差别.

3 讨论

胃动力障碍(gastric dysmotility)疾病是临床常见胃肠道疾病之一, 是以胃运动异常, 胃正常的生理性协调运动被扰乱为特征, 出现胃平滑肌收缩下降、张力低下, 正向节律性传导能力下降的一类疾病. 中医学虽然没有“胃动力障碍疾病”这一病名, 但根据胃动力障碍疾病的临床表现, 可将其归于痞证、嗳气、呕吐、呃逆、反胃等范畴. 旋覆代赭汤主要用于伤寒失治或误治, 导致脾胃虚弱, 而脾胃虚弱, 脾失运化, 痰湿内生, 气机阻滞, 胃气上逆之“痞证”.

代二庆 *et al*[2]研究发现旋覆代赭汤能明显增大食管肌条的收缩幅度及加快其收缩频率. 于强 *et al*[5-6]研究表明本方能提高大鼠血清中胃动素和胃泌素的水平, 促进胃的排空. 本实验通过检测不同浓度旋覆代赭汤含药血清对胃窦SMC作用后长度的改变, 结果表明旋覆代赭汤对胃窦SMC有明显的收缩作用.

“血清药理学”由日本学者首次提出, 就是指在动物经口服给药一段时间后采血分离血清, 用此含药血清进行体外药理实验的一种实验方法[7]. 这种研究方法不仅可以排除中药制剂的杂质成分、不同酸碱度、电解质等因素的影响, 克服中药粗制剂直接加入反应系统所带来的干扰, 而且含药血清能较接近地反映药物在体内的状态, 使体外试验能较好地重复在体试验的结果, 有利于从细胞分子水平阐明中药作用机制[8]. 一般认为含药血清浓度不宜过高, 超过某种限度, 将对细胞或组织活动产生不利影响, 以不超过20%为宜[9]. 我们实验也表明20%含药血清组对于大鼠胃窦SMC收缩作用最强.

由于胃肠道平滑细胞膜上的钙通道远比骨骼肌细胞膜上的钙通道多, 而钠通道又比骨骼肌少许多, 所以钙离子和钙通道在胃肠平滑肌动作电位产生中居主导地位[10]. 平滑肌细胞胞质游离Ca^{2+}在平滑肌细胞收缩过程中起重要的“第二信使”. 平滑肌收缩时的Ca^{2+}来源于细胞外液Ca^{2+}内流和细胞内钙库Ca^{2+}释放[11]. 肌质网是平滑肌细胞的细胞内钙贮存库, 已证实肌质网上存在着两种钙释放通道: IP_3受体(IP_3R)和ryanodine受体(Ry_3R)[12-15]. 这2种钙通道的开放有赖于胞外胃肠肽等激动剂与其G蛋白偶联受体结合后激活磷脂酶C(PLC), 产生第二信使IP_3[16]. IP_3受体接受IP_3和钙离子的双重调节. IP_3介导Ca^{2+}释放是量子化的, 具有“全或无”的特性. 在无Ca^{2+}条件IP_3几乎不能诱导其受体开放, 当细胞Ca^{2+}浓度升高时, IP_3R释放Ca^{2+}增加, 构成正反馈; 如果Ca^{2+}浓度升高超过300 nmol/L时, IP_3R对IP_3变得不敏感, Ca^{2+}释放被抑制, 此属负反馈, 如此反复, 形成了钙振荡(calcium oscillation)和钙波(calcium wave), 从而引起平滑肌节律性的收缩[17].

本实验采用CPC法检测收缩后细胞Ca^{2+}总浓度, 显示在含钙与无钙的缓冲液悬浮的胃窦SMC Ca^{2+}浓度比较无明显差异. 胃动素对胃收缩的调节不依赖胞外钙的存在, 而是作用于肌细胞膜, 通过受体活化性钙通道, 使细胞内肌浆网释放Ca^{2+}引起胞内钙浓度升高, 造成平滑肌细胞收缩[3]. 20%的含药血清组与胃动素收缩后Ca^{2+}总浓度也无明显差异. 由此推测引起的胃窦SMC收缩时, Ca^{2+}的升高可能来源于胞内钙库, 并且介导这一反应的第二信使是IP_3途径.

目前对于胃动力障碍疾病的治疗, 西医多以促胃动力药为主. 中医药治疗本病有着突出的优势, 但是对于其机制的研究比较局限. 旋覆代赭汤作为治疗胃动力障碍疾病的有效方剂, 目前的研究多以临床为主, 基础研究也多以在体动物为主, 缺乏相应的细胞分子机制研究, 进一步对旋覆代赭汤细胞分子作用机制的研究

表 1 旋覆代赭汤对胃窦SMC的收缩作用 (n = 10, mean ± SD)

分组	反应后(μm)	收缩百分数(%)
对照组	84.32 ± 8.21	–
胃动素组	60.20 ± 7.52	29.21 ± 2.46[ac]
5%含药血清组	69.76 ± 6.86	17.28 ± 2.04[a]
10%含药血清组	65.21 ± 7.15	22.66 ± 2.56[b]
20%含药血清组	60.58 ± 6.74	28.15 ± 2.64[bc]

[a]P<0.05, [b]P<0.01 *vs* 对照组比较; [c]P<0.05 *vs* 10%含药血清组.

■**应用要点**
旋覆代赭汤作为治疗胃动力障碍疾病的有效方剂, 对其在细胞分子学方面的作用机制的研究有助于进一步明确其作用范围, 推广其在临床上的应用.

有重要意义. 下一步, 我们将探讨旋覆代赭汤对大鼠胃窦SMC中IP_3R mRNA、CCKB/GASR mRNA、VIPR2 mRNA等表达的影响, 进一步揭示其促进胃平滑肌动力的信号转导机制.

4 参考文献

1 王长洪, 陈多, 吴春福, 陆宇平. 旋复代赭汤促胃肠动力作用的实验研究. 中国中西医结合脾胃杂志 1999; 7: 4-7
2 代二庆, 李海英, 赵占考, 袁红霞, 刘子泉, 王义和. 旋覆代赭汤及其拆方对大鼠离体食管肌条收缩活动的影响. 现代中西医结合杂志 2004; 13: 1268-1270
3 周吕, 王新. 胃动素对大鼠胃平滑肌细胞收缩活动的作用. 生理学报 1996; 48: 165-172
4 李仪奎, 吴健宇. 血清药理实验中采血时间的通法方案. 中国药理学通报 1999; 15: 569-570
5 于强, 袁红霞, 郭世铎. 旋覆代赭汤对酸性反流性食管炎模型大鼠胃窦黏膜胃泌素表达的影响. 天津中医药 2006; 23: 275-278
6 于强, 袁红霞, 崔乃强. 旋覆代赭汤对酸性反流性食管炎模型大鼠血浆胃动素水平的影响. 中医药学刊 2003; 21: 890-891
7 贺玉琢. 日本汉方药“血清药理学、血清药化学”的研究概况. 国外医学・中医中药分册 1998; 20: 3-7
8 赵万红, 曹永孝, 袁泽飞. 中药血清药理学的方法学探讨. 中药新药与临床药理 2002; 13: 122-124
9 潘卫松, 刘美凤, 石钺, 邢东明, 杜力军, 何希辉, 张宏印. 血清药理学、血清化学和中药药代动力学. 世界科学技术−中药现代化 2002; 4: 53-56
10 陈哲宇. 胃肠平滑肌运动的细胞信号转导机制. 国外医学・消化系疾病分册 2003; 23: 138-141
11 Sanders KM. Invited review: mechanisms of calcium handling in smooth muscles. *J Appl Physiol* 2001; 91: 1438-1449
12 White C, McGeown JG. Regulation of basal intracellular calcium concentration by the sarcoplasmic reticulum in myocytes from the rat gastric antrum. *J Physiol* 2000; 529 Pt 2: 395-404
13 Carl A, Lee HK, Sanders KM. Regulation of ion channels in smooth muscles by calcium. *Am J Physiol* 1996; 271: C9-C34
14 McCarron JG, Flynn ER, Bradley KN, Muir TC. Two Ca2+ entry pathways mediate InsP3-sensitive store refilling in guinea-pig colonic smooth muscle. *J Physiol* 2000; 525 Pt 1: 113-124
15 Takeuchi M, Watanabe J, Horiguchi S, Karibe A, Katoh H, Baba S, Shinozaki T, Miura M, Fukuchi M, Kagaya Y, Shirato K. Interaction between L-type Ca2+ channels and sarcoplasmic reticulum in the regulation of vascular tone in isolated rat small arteries. *J Cardiovasc Pharmacol* 2000; 36: 548-554
16 刘凯, 齐清会. 胃肠肽受体及受体后信号传导与胃肠动力. 世界华人消化杂志 2002; 10: 1445-1449
17 Cannell MB, Cheng H, Lederer WJ. The control of calcium release in heart muscle. *Science* 1995; 268: 1045-1049

■同行评价
本文应用中药血清学技术从旋覆代赭汤对胃窦平滑肌细胞收缩的影响及其作用机制方面进行了研究, 这对于全面揭示临床常用方剂旋覆代赭汤的作用机制, 具有一定的理论意义与临床指导价值.

编辑 李军亮 电编 何基才

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2009年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

《世界华人消化杂志》数字用法标准

本刊讯 遵照国家标准GB/T 15835-1995出版物上数字用法的规定, 本刊论文中数字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±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6 347意指6 000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mean±SD应考虑到个体的变差, 一般以SD的1/3来定位数, 例如3 614.5±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±0.4 kg, 过多的位数并无意义. 又如8.4±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→23.5→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≤分母≤1 000, 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1 486 800.475 65. 完整的阿拉伯数字不移行! (科学编辑: 李军亮 2009-10-08)

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2009年10月8日; 17(28): 2940-2943
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

临床经验 CLINICAL PRACTICE

口服4%碘海醇精粉糊状造影螺旋CT扫描诊断食管癌113例

胡兴荣, 崔显念, 邱妮妮

■背景资料
食管癌是食管最常见的恶性肿瘤之一, 严重危害我国人民身心健康. 食管部位检查常用的内镜及影像学检查, 各有优势, 但也有一定的盲区.

胡兴荣, 崔显念, 邱妮妮, 湖北省恩施自治州中心医院影像科 湖北省恩施市 445000
作者贡献分布: 胡兴荣为此课题的主要设计者及论文写作的主要完成者; 崔显念和邱妮妮参与论文写作及数据统计、分析.
通讯作者: 胡兴荣, 副主任医师, 445000, 湖北省恩施市舞阳大道158号, 湖北省恩施自治州中心医院影像科.
xingrong-hu.cct@126.com
电话: 0718-8295367
收稿日期: 2009-06-15 修回日期: 2009-09-07
接受日期: 2009-09-07 在线出版日期: 2009-10-08

Use of pasty iohexol as an oral contrast agent in spiral computed tomography for diagnosis of esophageal cancer: an analysis of 113 cases

Xing-Rong Hu, Xian-Nian Cui, Ni-Ni Qiu

Xing-Rong Hu, Xian-Nian Cui, Ni-Ni Qiu, Department of Medical Imaging, the Central Hospital of Enshi Autonomous Prefecture, Enshi 445000, Hubei Province, China
Correspondence to: Xing-Rong Hu, Department of Medical Imaging, the Central Hospital of Enshi Autonomous Prefecture, Enshi 445000, Hubei Province, China. xingrong-hu.cct@126.com
Received: 2009-06-15 Revised: 2009-09-07
Accepted: 2009-09-07 Published online: 2009-10-08

Abstract

AIM: To evaluate the clinical value of pasty iohexol (4%) used as an oral contrast agent in spiral computed tomography (CT) for diagnosis of esophageal cancer.

METHODS: Ten milliliters of 30% iohexol injection were diluted to 75 mL with water at a temperature above 95℃. Ten grams of konjac flour were then added and mixed fully to result in pasty iohexol (4%). A half dose of pasty iohexol was initially given to the patients. Subsequently, the patients were instructed to hold another half-dose in the mouth until the command to swallow was given. Spiral CT scan was then performed.

RESULTS: A total of 113 esophageal cancer patients underwent pasty iohexol-enhanced spiral CT scan, of which 71 were initially diagnosed as esophageal cancer. The diagnostic accuracy of pasty iohexol-enhanced spiral CT was significantly higher than that of conventional CT (90.1% *vs* 68%). Postoperatively, pasty iohexol-enhanced spiral CT scan was performed in 15 patients. It was found that two developed anastomotic stenosis and one developed local recurrence. After radiotherapy, 21 patients underwent pasty iohexol-enhanced spiral CT scan. It was found that 13 patients developed a rigid esophageal wall, of which 11 had mass lesions and thickened wall, and 6 underwent stent implantation. Of 64 esophageal cancer patients, 37 developed mediastinal lymph node metastasis, and 23 developed pulmonary metastasis. Pasty iohexol-enhanced spiral CT can clearly show luminal and extraluminal lesions, tumor shape and size, adjacent invasion, relationship between tumor mass and great vessels, and mediastinal lymph node and lung metastasis. However, it has some limitations in early esophageal cancer patients who do not develop thickened wall and significant mass lesions. Pasty iohexol-enhanced spiral CT is superior to endoscopy in patients who have difficulty in inserting the endoscope into the esophagus or have esophageal obstruction due to extrinsic lesions.

CONCLUSION: Pasty iohexol (4%) is useful as an oral contrast agent in spiral CT for diagnosis of esophageal cancer.

Key Words: Esophageal cancer; Computed tomography; X-ray computed tomography; Contrast agent; Endoscopy

Hu XR, Cui XN, Qiu NN. Use of pasty iohexol as an oral contrast agent in spiral computed tomography for diagnosis of esophageal cancer: an analysis of 113 cases. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2009; 17(28): 2940-2943

摘要

目的: 探讨口服4%碘海醇精粉糊状造影剂螺旋CT扫描结合内镜检查在诊断食管癌的临床应用价值.

方法: 取30%碘海醇注射液10 mL用95℃以上开水稀释成4%低浓度碘剂75 mL, 加入魔芋精

■同行评议者
王文跃, 主任医师, 中日友好医院普通外科; 许玲, 副教授, 中国人民解放军第二军医大学长征医院中医科

粉10 g充分搅拌, 即制成4%碘海醇精粉黏稠糊剂. 患者先口服1/2量糊状造影剂, 再将剩下造影剂嘱咐患者大口含于口中, 定位像准备好后, 嘱患者快速咽下后立即屏气扫描.

结果: 113例食管癌患者全部行4%碘海醇精粉糊状造影螺旋CT扫描. 其中初诊食管癌71例, 诊断准确64例, 准确率90.1%, 显著高于常规CT平扫68%; 术后复查15例, 出现吻合口狭窄2例, 局部复发1例; 放疗后复查21例, 13例可见管壁僵硬, 其中11例伴有肿块及管壁增厚, 支架植入术后6例; 发现纵隔淋巴结转移37例, 肺内转移23例. 螺旋CT造影对腔内外病变, 肿块形态、大小, 邻近侵犯及肿块与大血管的关系, 纵隔淋巴结和肺转移等均显示清楚. 但对管壁增厚不明显、肿块形成不明显的早期食管癌显示有限. 对内镜插管困难和食管外压性病变所示食管梗阻, 螺旋CT扫描明显优于内镜检查.

结论: 4%碘海醇精粉糊可用作螺旋CT扫描结合内镜检查诊断食管癌.

关键词: 食管肿瘤; 体层摄影术; X线计算机; 造影剂; 内镜

胡兴荣, 崔显念, 邱妮妮. 口服4%碘海醇精粉糊状造影螺旋CT扫描诊断食管癌113例. 世界华人消化杂志 2009; 17(28): 2940-2943

http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/2940.asp

0 引言

食管癌是食管最常见的恶性肿瘤之一, 据国际癌症研究所(IARC)报告, 全世界每年死于肿瘤的患者中, 消化系肿瘤占35%, 在我国食管癌占各部位癌症死亡的第2位, 仅次于胃癌, 因此食管癌是危害我国人民健康的主要恶性肿瘤. 鄂西南地区也是相对集中的高发地区, 可能与当地少数民族集居特殊饮食习惯, 爱好吃腌、熏制食品有关. 食管部位检查常用内镜及影像学检查, 常用食管钡餐、CT平扫及增强等方法, 这些检查方法各有优势, 但也有一定的盲区. 食管造影及电子内窥镜检查是诊断食管疾病的主要方法, 两者相互配合能使大多数疾病得到正确的诊断, 这方面的理论经验已经十分丰富, 而人们对CT诊断食管疾病还不够重视. 内镜和食管钡餐不能观察到食管腔外的情况, 食管CT平扫及增强不能了解食管腔的狭窄情况等, 食管CT扫描一般显示欠佳, 如何使其管腔充盈, 病灶显示清楚是病变诊断的关键, 国内、外许多学者[1-6]运用气体、液体及糊状造影剂行造影CT扫描诊断食管癌, 并取得了成功, 但多数学者没有详细介绍造影剂的配制方法, 得不到广泛应用. 我院应用口服4%碘海醇精粉糊状造影剂行螺旋CT食管扫描, 结合内镜检查进行诊断, 对上述问题迎刃而解.

1 材料和方法

1.1 *材料* 收集我院2007-01/2008-05经胃镜和手术病理证实的食管癌患者113例, 其中男81例, 女32例, 年龄39-76(平均64)岁. 113例患者中鳞癌97例, 腺癌16例, 其中伴食管癌食管气管瘘1例, 其中治疗前71例均因吞咽梗阻而入院检查, 病史1 wk-6 mo. 其中术后15例, 放化疗后21例, 支架置入6例.

1.2 *方法* 使用Toshiba Xvision/EX螺旋CT机. 范围从肺尖至贲门胃底, 准直10 mm, 床速10 mm/s, 螺距1, 重建层厚为3-5 mm. 取30%碘海醇注射液10 mL用95℃以上开水稀释成4%低浓度碘剂75 mL, 加入魔芋精粉10 g充分搅拌, 即制成4%碘海醇精粉黏稠糊剂. 患者扫描前口服1/2量糊状造影剂, 剩下1/2量造影剂嘱咐患者大口含于口中, 按常规胸部CT扫描定位片完成后, 嘱患者快速咽下, 迅速屏气行螺旋CT扫描. 具体扫描方法: 体位取仰卧位.

2 结果

113例食管癌患者全部行口服4%碘海醇精粉糊状造影螺旋CT扫描. 71例初诊行造影CT检查前常规胸部CT平扫25例, 17例考虑食管癌, 8例漏诊, 阳性率68%; 71例行口服4%碘海醇精粉糊状造影螺旋CT扫描后诊断食管癌64例, 阳性率90.1%. 造影检查较常规CT扫描明显提高阳性率. 42例食管癌治疗后复查患者全部行造影检查, 其中术后15例行口服4%碘海醇精粉糊状造影螺旋CT扫描吻合口显示清楚, 吻合口狭窄2例, 疑局部复发1例, 行内窥镜活检证实局部复发; 行局部放疗21例, 复查见13例管壁僵硬, 局部仍见肿块、管壁增厚11例; 支架置入术后6例见管壁增厚, 管腔尚通畅. 113例中CT扫描发现纵隔淋巴结肿大37例, 肺内小结节状转移23例, 单发5例, 多发18例, 其中5例行CT引导下穿刺活检证实为肺内转移灶.

3 讨论

我国魔芋产区主要分布在云、贵、川、陕西南

■研发前沿
研究诊断食管癌是一项非常有意义的工作, 尤其是应用魔芋精粉为一种天然食用植物来造影, 更是有开发资源利用的优势.

■相关报道
国内外许多学者运用气体、液体及糊状造影剂行造影CT扫描诊断食管癌, 并取得了成功, 但多数学者没有详细介绍造影剂的配制方法, 限制了广泛应用.

■应用要点
使用口服4%碘海醇精粉糊状造影螺旋CT扫描除能对常规CT扫描的病变进行诊断外，还具有一定的黏度，易附于管壁并充盈管腔而显示病变的部位、范围及程度，造影剂无伪影产生，更是一种健康食品，患者无特殊不适感觉，使用方便，价格低廉等优点.

部和湖北西部，以四川盆地周围山区的魔芋资源最为丰富. 魔芋精粉为一种天然食用植物，更是一种绿色食品、保健食品[7-8]，具有减肥、降压抗癌、补钙、洁胃、排毒通便等保健功能，其主要成分为葡甘露聚糖(KGM)，是以β-1，4糖苷键连接的杂多糖，并各有分支. KGM具有亲水性、增稠性、稳定性、悬浮性等多种特性，在弱碱环境中能保持长时间凝胶状态，物理性能极其稳定，其可分散在热水或冷水中形成高黏度的溶胶，属一种高相对分子质量、非离子型KGM[9-11]. 作为一种造影剂正好利用其良好的食用安全性和稳定的凝胶状态不易改变，经过多次反复比较、试验，运用4%浓度的碘海醇精粉糊既能保证良好的饮入，又能在卧位状态下稳定的充盈食管腔而达到造影效果.

食管壁没有浆膜层，癌组织一旦发展，早期即可发生周围组织侵犯. 正常食管壁周围都有一层疏松脂肪层包绕，所以CT能较清楚地显示出食管壁的外形. 一般认为CT片上所见正常食管壁的厚度约3 mm，如超过5 mm为异常. 食管常规螺旋CT平扫及增强能够了解肿块的位置及长度，气管及支气管的受侵情况，肿块与血管的关系，心包有无受侵，纵隔、胃周、腹腔淋巴结有无肿大，是否有胸膜及膈肌脚的浸润，有无胃壁受累，有无远处转移，特别是肝和肾上腺的转移. 螺旋CT扫描的优势在于其进行容积扫描，扫描速度快，不但克服了食管蠕动和呼吸造成的伪影、漏扫和重叠扫描，而且还可以根据要求对病变部位进行任意厚度的薄层扫描，为术前分期诊断提供更多、更全面的信息. 对于食管钡餐及胃镜检查起到了一定的补充及拓展作用. 食管CT平扫及增强给影像科医生提供了较广阔的信息量，但是他仍有一定的盲区，如：由于管腔内未有造影剂，医生不能了解食管腔具体狭窄到何种程度；是炎症性病变的均匀性狭窄，还是恶性病变的不规则狭窄，哪个壁的肿物，狭窄段以上食管扩张情况，是否有瘘管等，是食管钡剂造影和胃镜检查所不及的，CT扫描仍是食管癌术前评价主要影像检查[12]. 电子内窥镜检查能够直视食管内壁病变情况，并能对病变取组织活检而确诊，但对了解病变范围欠准确，限制了术前诊断，对病变浸润深度及食管周围病变无法显示. 食管由于解剖结构的特殊性，易受到纵隔内一些脏器运动的干扰，致图像模糊不清，而影响诊断的正确性，平时多处于松弛状态，而且造影剂通过快不易停留，给CT扫描带来困难，只有当食管充分扩张才能清楚显示腔内外的病变，有利于与邻近的纵隔结构区分. 可以在食管CT检查时用小剂量低扩张药物来诱使蠕动麻痹，使食管CT获得一时性满意的扩张. 因糊状造影剂在食管滞留时间较长，优于食管钡透，在吞咽过程中对食管内壁有支撑作用，便于了解食管内外病情的掌握，通过食管口服4%碘海醇精粉糊状造影后，在对CT检查食管病变，有了新的补充，对病变显示更加直观，对肿瘤特征，食管狭窄，黏膜皱襞增粗，管壁不均匀增厚，龛影形成都有较好的判别，同时对邻近器官浸润、粘连，淋巴结转移情况都会给予较清晰的了解，并可帮助临床制订治疗方案预后评估做出决策. 对上述食管钡餐、电子内窥镜及常规CT平扫甚至增强扫描的问题迎刃而解，对临床制定合理的治疗方案和判断预后有重要价值. 而更容易发现和确定原发病变的存在及制定原发病灶和纵隔脏器的关系. 较常规食管CT更能提供准确可靠的影像学信息. 口服糊状造影剂后CT平扫同时可以解决部分患者不能站立配合做食管钡透的问题，对于食管癌行放疗定位或治疗后复查的病例，能够提供更加准确全面的信息. 食管癌的首选治疗方法是外科治疗，虽然近年来外科技术有了明显提高，但进展期食管癌患者仍常因术后复发和转移而死亡，75%的肿瘤复发出现在术后2年内，其中大部分死于复发后的2年内[13-14]. 本组患者术后15例发现吻合口狭窄及复发3例(20%)，通过口服4%碘海醇精粉糊状造影螺旋CT扫描，吻合口显示清楚，且螺旋CT扫描图像能够三维显示肿瘤与周围器官的关系. 矢状位和曲面图像沿食管长轴方向显示肿瘤与周围器官的关系，观察食管肿瘤与气管膜部、左主支气管后壁、心包、椎前筋膜的关系优于横断面图像，食管癌患者由于进食困难多数消瘦，食管周围脂肪少，矢状位和曲面图像能够全面直观地显示肿瘤与主动脉之间的脂肪间隙情况，能够减少横断面的过高评估和可疑评估. 冠状面图像观察肿瘤与隆突、主动脉弓上下缘、纵隔胸膜的关系优于横断面图像，观察上段食管癌与颈总动脉和颈内静脉的关系也优于横断面图像，对肿瘤侵犯纵隔胸膜的判定明显优于横断面CT. 斜位成像观察肿瘤与下肺静脉和左主支气管后壁的关系优于横断面图像[15].

使用口服4%碘海醇精粉糊状造影螺旋CT扫描除能对常规CT扫描的病变进行诊断外，还具有以下优点：(1)具有一定的黏度，可附在管壁

并充盈管腔而显示病变的部位、范围及程度等; (2)造影剂无伪影产生, 不致影响诊断; (3)精粉为健康食品, 患者无特殊不适感觉; (4)使用方便, 价格低廉. 总之, 口服4%碘海醇精粉糊状造影食管螺旋CT扫描不失为对食管病变检查的良好手段, 有着重要的临床应用价值. 碘海醇的浓度不能太高, 出现伪影影响诊断, 精粉糊不能太黏稠, 影响患者吞咽; 口服糊状造影剂后, 尽量采用螺旋CT平扫, 避免病灶增强后与造影剂无法区分, 便于对病变部位行多方位重建. 另外对食管癌患者行口服碘海醇精粉糊状造影螺旋CT扫描后, 除给患者一张纵隔窗片的同时还应给一张肺窗片, 以便发现肺内转移瘤.

4 参考文献

1 段闽江, 胡晓林, 赵东, 向为民, 常青, 赵洪静, 张静. 食管充气加淀粉胶双重造影CT扫描的应用探讨(附65例分析). 实用放射学杂志 2005; 21: 837-839

2 崔国强. 介绍一种食管CT扫描口服造影剂方法. 实用放射学杂志 2000; 16: 723

3 宋俊萍, 钱云铉. 碘糊造影剂在食管CT检查中的应用. 江苏医药 2001; 27: 52

4 王宁, 陈涛. 注气法CT扫描在食管癌分期诊断中的价值. 影响诊断与介入放射学 2005; 14: 163-164

5 罗秀芬, 吴洪芬, 张强. 应用口服造影糊剂CT诊断食管癌的效果观察. 实用肿瘤学杂志 1998; 12: 272-273

6 刘大鹏. 水送服产气粉螺旋CT诊断食管癌. 实用放射学杂志 2002; 18: 681-682

7 黄琼, 刘波. 魔芋食品与中老年保健. 中外健康文摘·医药卫生版 2008; 5: 239-240

8 黄琼, 陈龙全. 魔芋的保健功能及其加工. 保健医学研究与实践 2008; 5: 55-56

9 马俊, 齐颖. 魔芋的功能及应用. 中国食物与营养 2006; 12: 48-49

10 黄琼, 陈龙全. 魔芋葡甘聚糖的药理作用. 湖北民族学院学报(医学版) 2008; 25: 85-86

11 王成军, 郭剑伟, 鱼梅, 吴俊珠, 姜毓丽. 魔芋的主要化学成分提取及应用研究概况. 中国药物应用与监测 2006; 3: 32-34

12 Noh HM, Fishman EK, Forastiere AA, Bliss DF, Calhoun PS. CT of the esophagus: spectrum of disease with emphasis on esophageal carcinoma. *Radiographics* 1995; 15: 1113-1134

13 Shimada H, Kitabayashi H, Nabeya Y, Okazumi S, Matsubara H, Funami Y, Miyazawa Y, Shiratori T, Uno T, Itoh H, Ochiai T. Treatment response and prognosis of patients after recurrence of esophageal cancer. *Surgery* 2003; 133: 24-31

14 Araki K, Ohno S, Egashira A, Saeki H, Kawaguchi H, Sugimachi K. Pathologic features of superficial esophageal squamous cell carcinoma with lymph node and distal metastasis. *Cancer* 2002; 94: 570-575

15 赵元桥, 龚凤. 螺旋CT扫描在食管癌分期诊断中的价值. 中国临床实用医学 2007; 1: 37-38

■同行评价

本文课题设计, 技术路线思路清晰, 方法合理, 有一定的创新性

编辑 李军亮 电编 何基才

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2009年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

《世界华人消化杂志》参考文献要求

本刊讯 本刊采用“顺序编码制”的著录方法, 即以文中出现顺序用阿拉伯数字编号排序. 提倡对国内同行近年已发表的相关研究论文给予充分的反映, 并在文内引用处右上角加方括号注明角码. 文中如列作者姓名, 则需在“Pang *et al*”的右上角注角码号; 若正文中仅引用某文献中的论述, 则在该论述的句末右上角注码号. 如马连生[1]报告……, 潘伯荣 *et al*[2-5]认为……; PCR方法敏感性高[6-7]. 文献序号作正文叙述时, 用与正文同号的数字并排, 如本实验方法见文献[8]. 所引参考文献必须以近2-3年SCIE, PubMed,《中国科技论文统计源期刊》和《中文核心期刊要目总览》收录的学术类期刊为准, 通常应只引用与其观点或数据密切相关的国内外期刊中的最新文献, 包括世界华人消化杂志(http://www.wjgnet.com/1009-3079/index.jsp)和*World Journal of Gastroenterology*(http://www.wjgnet.com/1007-9327/index.jsp). 期刊: 序号, 作者(列出全体作者). 文题, 刊名, 年, 卷, 起页-止页, PMID编号 ; 书籍: 序号, 作者(列出全部),书名, 卷次, 版次, 出版地, 出版社, 年, 起页-止页. (科学编辑: 李军亮 2009-10-08)

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2009年10月8日; 17(28): 2944-2947
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

临床经验 CLINICAL PRACTICE

非酒精性脂肪性肝病患者血清瘦素、脂联素的变化

李异玲, 田 忠, 杨 淼, 王炳元

■背景资料
非酒精性脂肪性肝病(NAFLD)的发病率近几年呈上升趋势，且表现出低龄化的特点，目前已经成为发达国家和富裕地区的第一大肝病，是成人肝功异常的最常见原因．“多次打击”学说是解释NAFLD发病机制最为成熟的学说，其中脂肪细胞因子尤其是瘦素和脂联素在这两次打击中起到了重要的作用．

李异玲，杨淼，王炳元，中国医科大学附属第一医院消化内科 辽宁省沈阳市 110001
田忠，中国医科大学盛京医院微创外科 辽宁省沈阳市 110001
作者贡献分布: 此课题由李异玲、田忠、杨淼及王炳元设计; 研究过程由李异玲、田忠及杨淼完成; 李异玲进行实验数据分析并完成写作.
通讯作者: 李异玲, 副教授, 副主任医师, 110001, 辽宁省沈阳市和平区南京北街155号, 中国医科大学附属第一医院消化内科. lyl-72@163.com
电话: 024-83282554
收稿日期: 2009-06-12 修回日期: 2009-07-27
接受日期: 2009-09-15 在线出版日期: 2009-10-08

Changes in serum leptin and adiponectin levels in patients with nonalcoholic fatty liver disease

Yi-Ling Li, Zhong Tian, Miao Yang, Bing-Yuan Wang

Yi-Ling Li, Miao Yang, Bing-Yuan Wang, Department of Gastroenterology, the First Hospital of China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China
Zhong Tian, Department of Minimally Invasive Surgery, Shengjing Hospital of China Medical University, Shenyang 110003, Liaoning Province, China
Correspondence to: Professor Yi-Ling Li, Department of Gastroenterology, the First Hospital of China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China. lyl-72@163.com
Received: 2009-06-12 Revised: 2009-07-27
Accepted: 2009-09-15 Published online: 2009-10-08

Abstract
AIM: To investigate changes in serum leptin and adiponectin levels in patients with nonalcoholic liver disease (NAFLD).

METHODS: Sixty NAFLD patients and equal number of healthy volunteers were included in the study. Serum leptin and adiponectin levels were measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Body mass index (BMI), waist-to-hip ratio (WHR), triglyceride (TG), total cholesterol (Tchol), high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C), aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), gamma-glutamyl transpeptidase (GGT), fasting blood glucose (FBG), and HOMA-IR (homeostasis model assessment insulin resistance) were evaluated.

RESULTS: Serum leptin level was significantly higher in NAFLD patients than in healthy controls (12.37 ± 1.99 μg/L *vs* 5.20 ± 1.03 μg/L, $P < 0.01$), while serum adiponectin level was significantly lower in NAFLD patients than in healthy controls (12.69 ± 2.83 mg/L *vs* 22.83 ± 4.61 mg/L, $P < 0.01$). Logistic regression analysis showed that serum leptin level was correlated positively with WHR (β = 8.175, $P < 0.01$), HOMA-IR (β = 0.974, $P < 0.01$), and FBG (β = 0.564, $P < 0.01$), while serum adiponectin level was independently associated with HOMA-IR (β = -0.495, $P < 0.01$), and MI (β = -0.314, $P < 0.01$).

CONCLUSION: NAFLD patients have increased serum leptin level and decreased serum adiponectin level, both of which are independently associated with HOMA-IR.

Key Words: Nonalcoholic fatty liver disease; Leptin; Adiponectin; Insulin resistance

Li YL, Tian Z, Yang M, Wang BY. Changes in serum leptin and adiponectin levels in patients with nonalcoholic fatty liver disease. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2009; 17(28): 2944-2947

摘要
目的: 探讨非酒精性脂肪性肝病(nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD)患者血清瘦素、脂联素的变化.

方法: 选取NAFLD患者60例，与健康组60例相对照．ELISA法测定血清瘦素、脂联素水平，并与体质量指数(BMI)、腰臀比(WHR)、甘油三脂(TG)、总胆固醇(Tchol)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)、血糖(FBG)、谷丙转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST)、谷氨酰转肽酶(GGT)、稳态模型评估的胰岛素抵抗指数(HOMA-IR)相结合，从而判定瘦素、脂联素在NAFLD中的作用.

结果: NAFLD组与正常对照组相比，血清瘦素水平升高(12.37±1.99 μg/L *vs* 5.20±1.03 μg/L, $P<0.01$)，脂联素水平降低(12.69±2.83 mg/L *vs* 22.83±4.61 mg/L, $P<0.01$). Logistic多因

■同行评议者
王怡，主任医师，天津市传染病医院 天津市肝病研究所

素回归分析显示瘦素与WHR、HOMA-IR、FBG呈独立正相关(β = 8.175, 0.974, 0.564, P<0.01). 脂联素与HOMA-IR、BMI呈独立负相关(β = -0.495, -0.314, P<0.01).

结论: NAFLD患者血清瘦素水平升高, 脂联素水平降低, 这两种细胞因子均与胰岛素抵抗相关.

关键词: 非酒精性脂肪性肝病; 瘦素 ; 脂联素; 胰岛素抵抗

李异玲, 田忠, 杨淼, 王炳元. 非酒精性脂肪性肝病患者血清瘦素、脂联素的变化. 世界华人消化杂志 2009; 17(28): 2944-2947
http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/2944.asp

0 引言

非酒精性脂肪性肝病(nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD)是以弥漫性肝细胞大泡性脂肪变和脂肪蓄积为病理特征, 但无过量饮酒史的临床综合征, 与胰岛素抵抗, 肥胖及代谢综合征密切相关[1-3]. 包括单纯性脂肪变(non-alcoholic fatty live, NAFL)以及由其演变的脂肪性肝炎(non-alcoholic steatohepatitis, NASH)和肝硬化, 是最常见的肝脏疾病之一[4], 在总人口中NAFLD和NASH的发病率分别为20%和3%, 但在肥胖人群中可能达到75%[5], NASH还可能发展成肝纤维化甚至肝细胞癌[6]. 因此, 研究NAFLD的发病机制, 寻找有效的治疗途径具有重要的意义. 近年来研究发现, 脂肪细胞因子中的瘦素和脂联素与NAFLD密切相关, 本文旨在探讨瘦素和脂联素在NAFLD发病过程中的变化.

1 材料和方法

1.1 材料 收集2007-10/2008-06中国医科大学附属第一医院门诊的NAFLD患者60例, 平均年龄41.9±5.49岁, 男女比例为1.46∶1, 均符合2006年中华医学会肝病学分会脂肪肝和酒精性肝病学组制定的NAFLD诊断标准[7]. 选取同期门诊健康体检者60例为对照组, 平均年龄42.26±4.95岁, 男女比例1.5∶1. 所有研究对象均签署知情同意书, 由专人负责测量身高、体质量、腰围、臀围, 计算BMI(BMI = 体质量(kg)/[身高(m)^2])、腰臀围之比.

1.2 方法

1.2.1 实验室指标检测: 静脉采血前低脂饮食3 d, 禁食8-10 h, 次日晨采集空腹时肘静脉血, 进行空腹血糖(fasting blood glucose, FBG)、空腹血胰岛素(fasting blood insulin, FINS)、甘油三脂(triglyceride, TG)、总胆固醇(total cholesterol, Tchol)、高密度脂蛋白(high-density lipoprotein cholesterol, HDL-C)、谷丙转氨酶(alanine aminotransferase, ALT)、谷草转氨酶(aspartate aminotransferase, AST)、γ-谷氨酰转肽酶(gamma-glutamyl transpeptidase, GGT)测定. 稳态模型评估的胰岛素抵抗指数(HOMA-IR) = FBG×FINS/22.5. 采用ELISA法检测血清脂联素和瘦素水平, 试剂盒为美国R&D公司, 按照试剂盒说明书进行操作.

1.2.2 影像学检查: 由专门的有经验的超声医生进行肝脏彩超检查, NAFLD组符合中华医学会肝病学分会脂肪肝和酒精性肝病学组制定的轻中度脂肪肝的B超诊断标准, 而健康对照组肝脏超声正常.

统计学处理 采用SPSS10.0软件包进行统计学分析, 数据以mean±SD表示, 计量资料间差异性用方差分析和t检验, 多因素相关性用Spearman分析和Logistic回归分析.

表 1 2组患者一般资料比较

分组	平均年龄(岁)	男∶女	腰臀围比	BMI
NAFLD组	41.90±5.49	1.46∶1	1.066[a]	25.71±1.68[a]
对照组	42.26±4.95	1.50∶1	0.743	20.46±1.40

[a]P<0.05 *vs* 对照组.

2 结果

2.1 一般资料比较 性别比例和年龄分布在两组之间差异无统计学意义(P>0.05). 腰臀围比和体质量指数在NAFLD组明显高于对照组, 两者之间有显著差异(P<0.05, 表1).

2.2 临床生化指标比较 NAFLD组瘦素、ALT、GGT、TG、FBG、HOMA水平明显高于对照组(P<0.05); HDL-C、脂联素水平明显低于对照组. AST、Tchol在NAFLD组和对照组无显著差异(P>0.05, 表2).

2.3 血清脂联素、瘦素与各临床指标间的相关性分析 血清瘦素、脂联素与性别、年龄、Tchol和AST无显著相关. 瘦素与ALT、GGT、TG、FBG、HOMA-IR、WHR、BMI呈显著正相关(P<0.01), 与HDL-C呈显著负相关. Logistic回归分析提示, 瘦素与WHR、FBG、HOMA-

■研发前沿
瘦素抵抗和低脂联素血症在NAFLD的发生发展中具有重要作用, 通过增加瘦素的敏感性和补充外源性脂联素均对NAFLD的治疗具有重要意义.

■创新盘点
本文应用ELISA法检测血清瘦素和脂联素水平, 并与血糖、血脂代谢以及肝脏功能有关的指标相结合, 通过直线分析和多元回归分析瘦素和脂联素在NAFLD中的变化以及相关因素.

■应用要点
在临床上给予瘦素增敏剂或者脂联素诱导剂来治疗NAFLD均有一定的应用前景.

表 2 2组患者临床资料比较 (mean ± SD)

分组	ALT (U/L)	AST (U/L)	GGT (U/L)	TG (mmol/L)	Tchol (mmol/L)	HDL (mmol/L)	FBG (mmol/L)	HOMA-IR	脂联素 (mg/L)	瘦素
NAFLD组	68.97 ± 18.71[a]	38.52 ± 9.08	49.85 ± 14.86[a]	2.63 ± 0.47[a]	5.09 ± 0.98	1.06 ± 0.13[a]	6.37 ± 0.70[a]	4.86 ± 0.63[a]	12.69 ± 2.83[a]	12.37 ± 1.99[a]
对照组	24.67 ± 6.61	29.97 ± 6.19	29.8 ± 9.81	1.26 ± 0.37	4.69 ± 0.51	1.46 ± 0.27	4.66 ± 0.55	1.91 ± 0.41	22.83 ± 4.61	5.20 ± 1.03

[a]P<0.05 *vs* 对照组.

表 3 脂联素、瘦素与相关因素Spearman分析

	ALT(U/L)	GGT(U/L)	TG(mmol/L)	HDL(mmol/L)	FBG(mmol/L)	WHR	BMI	HOMA-IR
瘦素								
γ值	0.76	0.57	0.767	−0.64	0.826	0.879	0.79	0.877
P值	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01
脂联素								
γ值	−0.643	−0.489	−0.671	0.567	−0.710	−0.732	−0.719	−0.752
P值	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01

表 4 脂联素、瘦素与相关因素Logistic回归分析

因变量	自变量	OR值	γ值	P值	95%CI
瘦素	HOMA-IR	2.56	0.914	<0.01	0.46-1.42
	WHR	3.55	8.175	<0.01	3.41-12.94
	FBG	1.76	0.564	<0.01	0.11-1.01
脂联素	HOMA-IR	0.14	−0.495	<0.01	1.19-2.79
	BMI	0.52	−0.314	<0.01	0.24-1.06

IR呈独立正相关; 脂联素与ALT、GGT、TG、FBG、HOMA-IR、WHR、BMI呈显著负相关(P<0.01), 与HDL-C呈显著正相关. Logistic回归分析发现, 脂联素与BMI、HOMA-IR呈独立负相关(表3-4).

3 讨论

本研究通过比较NAFLD组和健康对照组的脂肪细胞因子和临床生化指标, 结果显示: (1)NAFLD的肝功异常以ALT和GGT为主, AST在两组间无差异. 血脂异常表现为TG的升高和HDL-C的降低, 而Tchol水平对NAFLD的发生影响不大. (2)NAFLD患者的BMI、WHR均较对照组高, 说明NAFLD常发生于发生于肥胖, 尤其是腹型肥胖的患者中. (3)在NAFLD患者中有高瘦素血症和低脂联素血症, 并且这两种脂肪细胞因子的变化均与胰岛素抵抗有关.

“多次打击”是目前最为成熟的解释NAFLD发病机制的学说, 研究提示NAFLD可能是促炎和抑炎因子在胰岛素抵抗初次打击的基础上触发或抑制氧化应激和肝内脂质过氧化不平衡, 对肝细胞进行多次打击的结果[8-9]. 其中脂肪细胞因子活性的不平衡可能是患者体质量减轻, 体脂减少后NAFLD仍继续进展的原因. 脂肪细胞分泌的蛋白已达近百种, 其中与NAFLD关系密切的有瘦素、脂联素、肿瘤坏死因子、白介素等[10-12]. 国内外研究结果表明, 瘦素能够阻止FFA对非脂肪组织的侵入和积聚, 是一种抗脂肪变性激素[13]. 本研究结果显示NAFLD组瘦素水平显著高于对照组, 说明这部分患者体内可能存在瘦素抵抗. 由于多因素回归分析显示瘦素与WHR、FBG、HOMA-IR呈独立正相关, 而HOMA-IR是代表胰岛素抵抗较敏感的指标, 说明在肥胖患者中, 由于高瘦素血症和瘦素抵抗, 导致胰岛素水平升高, 促进了胰岛素抵抗, 从而增加糖原分解和糖异生, 增加肝脏脂质的沉积, 加速NAFLD的进展.

脂联素是脂肪组织基因表达最丰富的蛋白之一, 是抑制炎症反应的蛋白[12,14]. 本研究表明NAFLD患者的血清脂联素水平明显低于健康对照组, 这与Pagano *et al*的研究结果相一致[15]. 直线相关分析显示血清脂联素水平与TG、FBG、WHR、BMI、HOMA-IR呈显著负相关, 与HDL-C呈显著正相关, 说明脂联素受肥胖、血脂、血糖的影响. 本研究还提示, 血清脂

联素与ALT、GGT显著负相关, 说明低脂联素血症将导致肝细胞炎症反应. 多因素回归分析显示脂联素与BMI、HOMA-IR呈独立负相关, 说明脂联素在肥胖人群中分泌明显减少, 并且与胰岛素抵抗的程度密切相关. 已有的研究结果显示血清脂联素水平无昼夜变化, 因此不能被精细的调节, 反应的是长期的代谢变化[16-17], 这与胰岛素抵抗的发生是一个长期过程且受多种因素的控制相一致, 因此在NAFLD患者中可以用血清脂联素的变化来检测胰岛素抵抗的改善情况以及监测治疗的效果. 国内陶婷 *et al*对老年男性NAFLD患者的血清瘦素、脂联素水平进行研究[18], 结果显示脂联素的降低与WHR呈独立相关, 而本研究人群的平均年龄是41.9±5.49岁, 结果显示瘦素水平的升高与WHR呈独立相关, 由此我们可以推断在40岁左右的人群中腹型肥胖的NAFLD的发生主要以高瘦素血症为主, 而在60岁以上的人群中, 低脂联素血症对NAFLD的发生可能起着更重要的作用.

NAFLD中存在着瘦素抵抗和低脂联素血症, 临床上可以通过补充瘦素或脂联素来治疗NAFLD, 目前已在动物实验阶段得到了证实. 噻唑烷二酮类是过氧化物酶体增殖物激活受体的选择性激动剂, 可提高机体脂联素水平, 也为NAFLD的治疗带来新的曙光.

4 参考文献

1 Sevastianos VA, Hadziyannis SJ. Nonalcoholic fatty liver disease: from clinical recognition to treatment. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol* 2008; 2: 59-79

2 Capeau J. Insulin resistance and steatosis in humans. *Diabetes Metab* 2008; 34: 649-657

3 Delgado JS. Evolving trends in nonalcoholic fatty liver disease. *Eur J Intern Med* 2008; 19: 75-82

4 Greenfield V, Cheung O, Sanyal AJ. Recent advances in nonalcholic fatty liver disease. *Curr Opin Gastroenterol* 2008; 24: 320-327

5 Miele L, Forgione A, Hernandez AP, Gabrieli ML, Vero V, Di Rocco P, Greco AV, Gasbarrini G, Gasbarrini A, Grieco A. The natural history and risk factors for progression of non-alcoholic fatty liver disease and steatohepatitis. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2005; 9: 273-277

6 Sorrentino P, D'Angelo S, Ferbo U, Micheli P, Bracigliano A, Vecchione R. Liver iron excess in patients with hepatocellular carcinoma developed on non-alcoholic steato-hepatitis. *J Hepatol* 2009; 50: 351-357

7 中华医学会肝病分会脂肪肝和酒精性肝病学组. 非酒精性脂肪性肝病诊疗指南. 中华肝脏病杂志 2006; 14: 68-69

8 Madan K, Bhardwaj P, Thareja S, Gupta SD, Saraya A. Oxidant stress and antioxidant status among patients with nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD). *J Clin Gastroenterol* 2006; 40: 930-935

9 Ma X, Li Z. Pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis (NASH). *Chin J Dig Dis* 2006; 7: 7-11

10 Wozniak SE, Gee LL, Wachtel MS, Frezza EE. Adipose tissue: the new endocrine organ? A review article. *Dig Dis Sci* 2009; 54: 1847-1856

11 Sun Y, Xun K, Wang C, Zhao H, Bi H, Chen X, Wang Y. Adiponectin, an unlocking adipocytokine. *Cardiovasc Ther* 2009; 27: 59-75

12 Wang J, Brymora J, George J. Roles of adipokines in liver injury and fibrosis. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol* 2008; 2: 47-57

13 Martin SS, Qasim A, Reilly MP. Leptin resistance: a possible interface of inflammation and metabolism in obesity-related cardiovascular disease. *J Am Coll Cardiol* 2008; 52: 1201-1210

14 Mendez-Sanchez N, Chavez-Tapia NC, Villa AR, Sanchez-Lara K, Zamora-Valdes D, Ramos MH, Uribe M. Adiponectin as a protective factor in hepatic steatosis. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 1737-1741

15 Pagano C, Soardo G, Esposito W, Fallo F, Basan L, Donnini D, Federspil G, Sechi LA, Vettor R. Plasma adiponectin is decreased in nonalcoholic fatty liver disease. *Eur J Endocrinol* 2005; 152: 113-118

16 Bugianesi E, Pagotto U, Manini R, Vanni E, Gastaldelli A, de Iasio R, Gentilcore E, Natale S, Cassader M, Rizzetto M, Pasquali R, Marchesini G. Plasma adiponectin in nonalcoholic fatty liver is related to hepatic insulin resistance and hepatic fat content, not to liver disease severity. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90: 3498-3504

17 Yoneda M, Iwasaki T, Fujita K, Kirikoshi H, Inamori M, Nozaki Y, Maeyama S, Wada K, Saito S, Terauchi Y, Nakajima A. Hypoadiponectinemia plays a crucial role in the development of nonalcoholic fatty liver disease in patients with type 2 diabetes mellitus independent of visceral adipose tissue. *Alcohol Clin Exp Res* 2007; 31: S15-S21

18 陶婷, 吴霖, 沈倍倍, 赵咏桔. 老年男性非酒精性脂肪肝患者腹部脂肪面积及血清脂联素、瘦素水平的变化. 中华肝脏病杂志 2009; 17: 120-123

■同行评价

本研究选材较好, 分析透彻, 具有一定的临床实际意义.

编辑 李军亮 电编 何基才

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2009年10月8日; 17(28): 2948-2950
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

临床经验 CLINICAL PRACTICE

胆内瘘临床分析32例

杨建军, 楼晓楼, 刘文勇, 顾 岩

■背景资料
胆内瘘病情复杂, 术前确诊率低, 探讨胆内瘘的诊断和治疗方式具有重要临床意义.

杨建军, 楼晓楼, 刘文勇, 顾岩, 上海交通大学医学院附属第九人民医院普外科 上海市 200011
作者贡献分布: 杨建军、楼晓楼、刘文勇及顾岩对此文所作贡献均等; 此课题由杨建军、楼晓楼、刘文勇及顾岩设计; 研究过程由杨建军、楼晓楼、刘文勇及顾岩完成; 研究所用新试剂及分析工具由杨建军提供; 数据分析由杨建军、楼晓楼、刘文勇及顾岩完成; 本论文写作由杨建军完成.
通讯作者: 杨建军, 主治医师, 200011, 上海市, 上海交通大学医学院附属第九人民医院普外科. ayang1230@126.com
电话: 021-23271699
收稿日期: 2009-07-25 修回日期: 2009-09-22
接受日期: 2009-09-28 在线出版日期: 2009-10-08

Internal biliary fistula: an analysis of 32 cases

Jian-Jun Yang, Xiao-Lou Lou, Wen-Yong Liu, Yan Gu

Jian-Jun Yang, Xiao-Lou Lou, Wen-Yong Liu, Yan Gu, Department of General Surgery, Shanghai Ninth People's Hospital Affiliated to Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200011, China
Correspondence to: Jian-Jun Yang, Department of General Surgery, Shanghai Ninth People's Hospital Affiliated to Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200011, China. ayang1230@126.com
Received: 2009-07-25 Revised: 2009-09-22
Accepted: 2009-09-28 Published online: 2009-10-08

Abstract
AIM: To analyze the diagnosis and treatment of internal biliary fistula.

METHODS: The clinical data of 32 internal biliary fistula patients treated at our hospital from December 1990 to December 2006 were retrospectively analyzed.

RESULTS: The preoperative diagnosis rate of internal biliary fistula was only 12.5% (4/32). Of all 32 patients with internal biliary fistula, 68.8% (22/32) had cholecystoduodenal fistula, 12.5% (4/32) had cholecystocholedochal fistula, 3.1% (1/32) had cholecysto-hepatic duct fistula, 6.3% (2/32) had cholecystocolonic fistula, 6.3% (2/32) had choledochogastric fistula, 3.1% (1/32) had choledochoduodenal fistula, and 6.3% (2/32) had gallstone ileus; 15 underwent selective operation, and 17 underwent emergency laparotomy. The mean hospital stay was 16.2 days. Postoperatively, three patients developed bile leakage, five developed wound infection, and two died.

CONCLUSION: The preoperative diagnosis rate of internal biliary fistula is low. Intraoperative cholangiography is a reliable method for accurate diagnosis of internal biliary fistula. Fistula can be repaired directly or using a part of the gallbladder wall.

Key Words: Internal biliary fistula; Diagnosis; Therapy

Yang JJ, Lou XL, Liu WY, Gu Y. Internal biliary fistula: an analysis of 32 cases. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2009; 17(28): 2948-2950

摘要
目的: 探讨胆内瘘患者的诊断和治疗, 为临床医师提供参考依据.

方法: 我院1990-12/2006-12共收治胆内瘘患者32例, 回顾性分析患者临床资料.

结果: 胆内瘘术前诊断率仅为12.5%. 患者中胆囊十二指肠瘘68.8%(22/32), 胆囊胆总管瘘12.5%(4/32), 胆囊肝总管瘘3.1%(1/32), 胆囊横结肠瘘6.3%(2/32), 胆囊胃瘘6.3%(2/32), 胆总管十二指肠瘘3.1%(1/32). 胆石性肠梗阻占胆内瘘的6.3%(2/32). 本组行择期手术15例, 急诊手术17例. 平均住院时间16.2 d, 术后3例发生胆瘘漏, 5例切口感染, 2例死亡.

结论: 胆内瘘术前诊断率低, 术中胆道造影有助于明确诊断. 发生胆囊炎后及时手术是预防胆内瘘发生的关键.

关键词: 胆内瘘; 诊断; 治疗

杨建军, 楼晓楼, 刘文勇, 顾岩. 胆内瘘临床分析32例. 世界华人消化杂志 2009; 17(28): 2948-2950
http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/2948.asp

0 引言
胆内瘘是胆囊、胆管树之间或与临近脏器之间形成的病理通道, 是胆道疾病发展过程中的一种少见并发症. 术前诊断率低, 术中处理有一定

■同行评议者
张国梁, 主任医师, 天津市第一中心医院消化内科

难度. 我院1990-12/2006-12共收治胆内瘘患者32例, 现将其诊断和治疗等报道如下.

1 材料和方法

1.1 材料 我院1990-12/2006-12共收治胆内瘘患者32例, 其中男13例, 女19例, 年龄22-68(平均42±5.3)岁, 病程10年以上26例, 10年以下6例. 既往有肝胆手术史者12例. 均有反复右上腹绞痛或隐痛史. 黄疸7例, 畏寒、发热9例, 慢性腹泻、体质量下降3例. 并发胆石性肠梗阻2例. 术前均经B超检查, 其中12例行CT检查, 21例胆囊壶腹部结石嵌顿, 18例提示胆囊萎缩, 9例有胆道积气征, 对其中8例行钡餐消化系造影, 4例发现胆肠瘘. 腹平片发现肠梗阻2例, 其中1例同时发现有胆道积气, 故术前怀疑胆内瘘、胆石性肠梗阻.

1.2 方法 患者均行手术治疗, 行择期手术15例, 急诊手术17例. 其中2例为腹腔镜中转开腹手术, 其余均为开腹手术. 术中发现: 胆囊十二指肠瘘22例(其中2例为胆囊癌侵犯十二指肠), 胆囊胆总管瘘4例, 胆囊肝总管瘘1例, 胆囊结肠瘘2例, 胆囊胃瘘2例, 胆总管十二指肠瘘1例. 术中有胆囊存在的21例中, 行胆囊切除者16例、部分胆囊切除者5例; 行相应的胃、十二指肠或结肠瘘口修补或切除术23例、胃大部切除毕Ⅰ式1例; 胆总管探查26例; 对于胆总管瘘口, 直接缝合1例; 用带蒂胆囊瓣膜修补2例; 胆管空肠Roux-Y吻合内引流术6例; 剖腹探查、末端回肠切开取石术2例, 观察取出之结石, 发现为混合性胆石, 探查胆道发现均为胆囊十二指肠内瘘, 其中1例同时修补了胆内瘘. 另1例因患者高龄, 耐受性差, 故仅行肠切开取石, 6 mo后行Ⅱ期胆内瘘手术.

2 结果

患者均随访4-60 mo, 治愈30例, 其中3例并发胆漏, 经充分引流治愈; 单纯胆囊造瘘或胆总管切开取石术的3例, 1例术后造影发现胆道残余结石, 3 mo后再次手术治愈. 切口感染5例, 肺部感染2例. 经积极治疗后痊愈. 死亡2例, 均为胆囊癌十二指肠瘘患者, 死于肿瘤转移.

3 讨论

胆内瘘通常为胆道疾病少见并发症, 国内外报道发病率较低0.2%-1.7%[1-4], 胆道结石长期梗阻压迫、炎症反复发作, 导致胆道发生坏死、穿透, 是引起胆内瘘的最常见原因, 其他少见的病因为胆道和十二指肠肿瘤、溃疡病以及胆道医源性创伤. 本组除2例为胆囊癌外, 其余均为胆道结石引起的胆内瘘, 均为胆肠内瘘或胆间瘘.

90%的胆内瘘合并慢性胆囊炎, 其往往表现为右上腹隐痛不适, 大部分病例曾合并有黄疸, 缺乏特异性临床表现, 医生主观上往往满足于胆囊炎的诊断, 故胆内瘘容易漏诊、误诊. 本组病程10年以上者占78.13%(25/32). 我们认为, 长期患胆道结石的患者, 既往胆绞痛发作并有发热、寒战、黄疸, 自行或经消炎处理后缓解; 长期呃逆、呕吐胆汁; 胆囊萎缩、慢性腹泻者, 应考虑到胆内瘘的可能. B超、CT能发现胆道积气及瘘口, 对诊断有一定帮助, 但应排除Oddi's扩约肌松弛、穿透性十二指肠溃疡、产气性胆囊炎及胆肠吻合因素. ERCP检查时, 如发现十二指肠内有异常开口, 并有胆汁或造影剂溢出, 即考虑该病. 有报道显示胃肠镜、ERCP对胆肠内瘘的诊断率高达88%[4]. 行CT扫描, 若见到胆囊内有口服造影剂, 则胆囊内瘘诊断成立. 而钡餐消化系造影可显示胆肠瘘的部位或瘘口大小, 最具有诊断价值. 胆石症急性发作缓解后出现肠梗阻, B超检查发现胆石消失, 尤其是胆石较大难以从胆囊管或胆总管排出者, 应考虑到胆石性肠梗阻的可能. 胆石性肠梗阻是胆道向肠道形成瘘管导致胆结石异位到肠道造成的结果[5]. 梗阻点最常见于末端回肠. 表现可因梗阻部位而异, 常见恶心、呕吐、疼痛和便秘症状[6]. 梗阻症状通常会延迟出现, 多在症状出现3-8 d后方能做出诊断[7]. Rigler三联征为胆石性肠梗阻的典型放射学表现: (1)部分或全部肠道梗阻; (2)胆道积气; (3)肠道内异位胆石影[4,8-9]. 较近期的研究报道, 胆石性肠梗阻的CT结果比腹部平片或超声更敏感. 据报道, CT诊断胆石性肠梗阻的敏感度高达93%[10]. CT检查的Rigler三联征检出率较高[9-11].

本组术前检查9例有胆道积气征, 对其中8例行钡餐消化系造影, 4例明确胆肠瘘. 而术中如发现胆囊与周围组织紧密粘连, 难以分离, 应想到内瘘的可能, 且不可盲目硬行分离, 应术中胆道造影, 本组22例通过术中胆道造影, 明确胆内瘘及确定瘘口位置. 其中胆囊十二指肠瘘22/32, 胆囊肝管瘘1/32. 文献报道胆内瘘中, 胆囊十二指肠瘘占到70%-90%, 胆囊结肠瘘占10%, 接下来依次为胆总管十二指肠瘘、胆总管胃瘘、胆囊胃瘘等[1]. 这与本研究基本相符, 68.8%(22/32)为胆囊十二指肠瘘, 12.5%(4/32)为胆囊胆总管瘘, 6.3%(2/32)为胆囊横结肠瘘, 6.3%(2/32)为胆囊胃瘘, 3.1%(1/32)为胆囊肝总

■研发前沿
胆内瘘是胆囊、胆管树之间或与临近脏器之间形成的病理通道, 是胆道疾病发展过程中的一种少见并发症. 术前诊断率低, 术中处理有一定难度.

■同行评价
本研究选题较好, 实用性强, 具有较好的临床指导意义.

管瘘, 3.1%(1/32)为胆总管十二指肠瘘.

胆内瘘容易胆道逆行感染反复发作, 继发肝功能损害, 难以自愈, 应积极行手术治疗. 对有症状的胆囊内瘘, 手术指征是明确的. 但对无明显症状者的治疗, 则意见不一. 我们认为对以下无症状者应行手术治疗: (1)多发胆囊结石; (2)胆囊结肠瘘; (3)怀疑恶性肿瘤者; (4)复杂性肠瘘; (5)胆囊管闭塞. 手术基本原则为: 去除病灶, 解除梗阻, 切除瘘管, 修复瘘口, 重建胆道生理性通道. 具体术式则因人而异. 首先要细致探查, 掌握胆道与周围组织器官的病变全貌, 切不可强行分离, 导致灾难性损伤. 粘连最紧密处往往是瘘口周围, 务必谨慎, 而术中胆道造影有助于明确诊断, 减少医源性损伤. 术中应明确胆总管是否通畅. 只有胆总管通畅, 才能保证术后安全、顺利. 对胆囊炎病史较长、术中发现胆囊壁厚、坚硬者应行冰冻检查, 以及时诊断, 早作处理.

对于胆肠瘘一般行胆囊切除, 并直接修补或采用带血管蒂的胃壁、空肠壁或圆韧带修复肠管瘘口即可. 手术的难点在于胆管瘘口的修补, 需探明胆管瘘口的大小及位置, 胆管下端是否狭窄瘘口直径<胆总管周径1/3者可直接缝合, 放置T管支撑, 但胆总管内的T管不宜经瘘口引出, 否则易发生晚期的胆管狭窄. 瘘口直径<胆总管周径2/3者, 若瘘口周围胆管壁尚正常而无明显的肝胆管扩张, 可以采取带蒂胆囊壁瓣修补, T管引流. 若瘘口直径>2/3胆总管周径, 瘘口处胆管炎症重, 上段胆管扩张明显或瘘口已破坏整个胆管壁, 胆总管下端狭窄时, 须采用胆管空肠Roux-en-Y吻合术. 一般而言, 腹腔镜胆囊切除术中发现胆内瘘需中转开腹手术, 但近年来国外有学者提出腹腔镜下也可行胆内瘘修补术, 并获成功[3,13]. 提示随着腹腔镜技术的发展, 胆内瘘并非腹腔镜手术禁忌.

此外, 并发胆石性肠梗阻时, 多数主张仅做肠切开取石解除肠梗阻, 胆内瘘Ⅱ期手术解决. 对于发病时间短、年龄轻、全身情况较好, 可考虑Ⅰ期切除胆囊胆内瘘管修补瘘口, 但对于老年人, 一般不主张Ⅰ期胆内瘘手术, 因为可能会增加并发症和死亡率[13-15]. 本组2例胆石性肠梗阻, 均为胆囊十二指肠瘘, 1例解除肠梗阻的同时修补了胆内瘘. 另1例因患者高龄, 耐受性差, 故仅行肠切开取石, 术后胆道感染反复发作, 6 mo后行Ⅱ期胆内瘘手术, 可恢复.

总之, 发现胆囊炎及早手术, 是避免胆内瘘发生的关键. 如遇胆道术中粘连致密、分离困难, 应警惕胆内瘘的存在, 避免发生医源性损伤.

4 参考文献

1 Duzgun AP, Ozmen MM, Ozer MV, Coskun F. Internal biliary fistula due to cholelithiasis: a single-centre experience. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 4606-4609

2 Rastogi R. Cholecystocolic fistula secondary to gallbladder carcinoma: a rare case. *Saudi J Gastroenterol* 2008; 14: 144-146

3 Angrisani L, Corcione F, Tartaglia A, Tricarico A, Rendano F, Vincenti R, Lorenzo M, Aiello A, Bardi U, Bruni D, Candela S, Caracciolo F, Crafa F, De Falco A, De Werra C, D'Errico R, Giardiello C, Petrillo O, Rispoli G. Cholecystoenteric fistula (CF) is not a contraindication for laparoscopic surgery. *Surg Endosc* 2001; 15: 1038-1041

4 王小红, 黄介飞. 内镜对胆肠内瘘的诊断价值. 中华消化内镜杂志 2005; 22: 244-247

5 Muthukumarasamy G, Venkata SP, Shaikh IA, Somani BK, Ravindran R. Gallstone ileus: surgical strategies and clinical outcome. *J Dig Dis* 2008; 9: 156-161

6 Chou JW, Hsu CH, Liao KF, Lai HC, Cheng KS, Peng CY, Yang MD, Chen YF. Gallstone ileus: report of two cases and review of the literature. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 1295-1298

7 Ayantunde AA, Agrawal A. Gallstone ileus: diagnosis and management. *World J Surg* 2007; 31: 1292-1297

8 Ripollés T, Miguel-Dasit A, Errando J, Morote V, Gómez-Abril SA, Richart J. Gallstone ileus: increased diagnostic sensitivity by combining plain film and ultrasound. *Abdom Imaging* 2001; 26: 401-405

9 Lassandro F, Gagliardi N, Scuderi M, Pinto A, Gatta G, Mazzeo R. Gallstone ileus analysis of radiological findings in 27 patients. *Eur J Radiol* 2004; 50: 23-29

10 Yu CY, Lin CC, Shyu RY, Hsieh CB, Wu HS, Tyan YS, Hwang JI, Liou CH, Chang WC, Chen CY. Value of CT in the diagnosis and management of gallstone ileus. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 2142-2147

11 Lassandro F, Romano S, Ragozzino A, Rossi G, Valente T, Ferrara I, Romano L, Grassi R. Role of helical CT in diagnosis of gallstone ileus and related conditions. *AJR Am J Roentgenol* 2005; 185: 1159-1165

12 Lee JH, Han HS, Min SK, Lee HK. Laparoscopic repair of various types of biliary-enteric fistula: three cases. *Surg Endosc* 2004; 18: 349

13 Pavlidis TE, Atmatzidis KS, Papaziogas BT, Papaziogas TB. Management of gallstone ileus. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 2003; 10: 299-302

14 Martínez Ramos D, Daroca José JM, Escrig Sos J, Paiva Coronel G, Alcalde Sánchez M, Salvador Sanchís JL. Gallstone ileus: management options and results on a series of 40 patients. *Rev Esp Enferm Dig* 2009; 101: 117-120, 121-124

15 Tan YM, Wong WK, Ooi LL. A comparison of two surgical strategies for the emergency treatment of gallstone ileus. *Singapore Med J* 2004; 45: 69-72

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2009年10月8日; 17(28): 2951-2954
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

临床经验 CLINICAL PRACTICE

I^{125}粒子植入在胰腺恶性肿瘤治疗中的疗效分析

吴汉青, 吴河水, 杨智勇, 王春友, 原伟伟

吴汉青, 吴河水, 杨智勇, 王春友, 原伟伟, 华中科技大学同济医学院附属协和医院胰腺外科中心 湖北省武汉市 430022
作者贡献分布: 吴汉青与吴河水对此文所作贡献均等; 此课题由吴汉青、吴河水、杨智勇、王春友及原伟伟设计; 研究过程由吴汉青、吴河水及王春友操作完成; 数据分析由吴汉青、吴河水及杨智勇完成; 本论文写作由吴汉青与原伟伟完成.
通讯作者: 吴河水, 教授, 博士生导师, 430022, 湖北省武汉市, 华中科技大学同济医学院附属协和医院胰腺外科中心.
whs1898@public.wh.hb.cn
电话: 027-62710555
收稿日期: 2009-07-16 修回日期: 2009-09-09
接受日期: 2009-09-15 在线出版日期: 2009-10-08

Efficacy of iodine-125 seed implantation in pancreatic carcinoma

Han-Qing Wu, He-Shui Wu, Zhi-Yong Yang, Chun-You Wang, Wei-Wei Yuan

Han-Qing Wu, He-Shui Wu, Zhi-Yong Yang, Chun-You Wang, Wei-Wei Yuan, Pancreatic Surgery Center, Wuhan Union Hospital, Tongji Medical College of Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, Hubei Province, China
Correspondence to: Professor He-Shui Wu, Pancreatic Surgery Center, Wuhan Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, Hubei Province, China. whs1898@public.wh.hb.cn
Received: 2009-07-16 Revised: 2009-09-09
Accepted: 2009-09-15 Published online: 2009-10-08

Abstract

AIM: To investigate the efficacy of palliative operation in combination with iodine-125 (I-125) seed implantation and postoperative chemotherapy in the treatment of unresectable pancreatic carcinoma.

METHODS: A total of 149 pancreatic carcinoma patients were retrospectively analyzed. These patients were divided into two groups according to therapeutic protocol: patients undergoing palliative operation in combination with postoperative chemotherapy and I-125 seed implantation (study group, n = 62) and those undergoing palliative operation only in combination with postoperative chemotherapy (control group, n = 87). Objective tumor response, clinical benefit response, median survival time and complication rate were compared between the two groups.

RESULTS: Significant differences were noted in clinical benefit response and median survival time between the two groups (χ^2 = 7.361 and 10.090, respectively, both P < 0.05). No significant differences were observed in objective tumor response and complication rate between the two groups (both P > 0.05).

CONCLUSION: Palliative operation in combination with I-125 seed implantation and postoperative chemotherapy is safe and effective in the treatment of unresectable pancreatic carcinoma.

Key Words: Pancreatic carcinoma; Palliative operation; Iodine-125 seed implantation; Postoperative chemotherapy

Wu HQ, Wu HS, Yang ZY, Wang CY, Yuan WW. Efficacy of iodine-125 seed implantation in pancreatic carcinoma. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2009; 17(28): 2951-2954

摘要

目的: 分析姑息性手术联合I^{125}粒子植入和化疗对晚期胰腺癌患者的疗效.

方法: 回顾性分析我科2004-2008年收治的晚期胰腺癌患者149例, 按治疗方法分为2组, 姑息手术+I^{125}粒子植入+化疗62例(A组), 姑息手术+化疗87例(B组). 比较2组患者客观有效率(OTR)、临床受益率(CBR)、中位生存期以及并发症发生率.

结果: 与B组相比, A组患者临床受益率, 中位生存期差异有统计学差异(χ^2 = 7.361, 10.090, P<0.05), 而客观有效率与并发症发生率差异无统计学差异(P>0.05).

结论: 姑息性手术联合I^{125}粒子植入和术后化疗治疗晚期胰腺癌患者, 是一种安全有效的治疗方法.

关键词: 胰腺肿瘤; 姑息手术; I^{125}粒子植入; 术后化疗

吴汉青, 吴河水, 杨智勇, 王春友, 原伟伟. I^{125}粒子植入在胰腺恶性肿瘤治疗中的疗效分析. 世界华人消化杂志 2009; 17(28):

■背景资料
胰腺癌是一种常见而又恶性程度很高的消化系肿瘤, 5年生存率仍低于5%, 且其发病率在近数十年有明显升高. 如何提高胰腺癌患者生存质量和生存期为当今治疗的难点和重点. 文献报道多种恶性肿瘤术中联合放射性粒子为近年发展起来的一种针对晚期不能切除恶性实体肿瘤新的治疗手段. 将放射性粒子应用到不能根治切除胰腺癌, 并评价其效果, 为临床胰腺癌治疗提供依据.

■同行评议者
谷俊朝, 主任医师, 首都医科大学附属北京友谊医院普外科

■研发前沿
不能根治切除的胰腺癌单纯应用化疗药物由于可能产生耐药性从而导致治疗效果不佳. 由于放射性粒子的应用取得了很大的进展, 故联合化疗和放疗将成为不能根治切除胰腺癌的一个重要治疗方法.

2951-2954
http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/2951.asp

0 引言

胰腺癌因其隐匿性及生物学特性, 患者早期多无明显临床症状, 就诊时大多失去根治性切除机会. 对于不能行根治切除的中晚期胰腺癌, 治疗方法较多, 但效果不尽人意[1]. 华中科技大学同济医学院附属协和医院胰腺外科中心自2004年采用姑息性手术联合I^{125}粒子植入和术后化疗治疗患者, 取得了较好的疗效, 现报道如下.

1 材料和方法

1.1 材料 收集2004-01/2008-06华中科技大学同济医学院附属协和医院胰腺外科收治的中晚期胰腺癌患者149例, 患者术前均经彩超和CT, 或者经术中病理确诊肿瘤已广泛侵犯肠系膜血管和(或)门静脉血管, 无法施行根治性手术. 其中男91例, 女58例, 年龄31-72(平均52)岁; 既往未接受化疗和放疗, 无严重的心脏病及其他脏器病史等.

1.2 方法

1.2.1 分组: 根据患者所受的治疗方法分为2组, A组62例, 行姑息性手术(如胆管空肠吻合和/或胃空肠吻合等), 术中同时在肿瘤中植入I^{125}粒子, 术后行化疗(吉西他滨); B组87例, 行姑息性手术(同A组), 术后行化疗(同A组). 2组病例性别、年龄和病程方面无差异, 具有可比性.

1.2.2 治疗: 手术前彩超和CT检查结果评价瘤体, 根据胰腺肿瘤病灶大小、位置以及与周围正常组织的关系从而确定手术方案及I^{125}粒子植入的数目及进针的深度. I^{125}粒子植入是在术中直视下采用粒子植入枪植入, 常用的粒子数目估算公式为: 粒子植入总数 = [(肿瘤长+宽+高)/3×5]/每个粒子的活度, 常用的每个粒子的活度为(1.1-1.8)×10^7 Bq, 一般粒子数目为20-40粒. 姑息性手术常常为胆管空肠吻合和/或胃空肠吻合术, 其目的常常为解除黄疸及肠道梗阻. 吉西他滨的化疗常常在患者术后2 wk内施行, 用量根据患者体表面积大小决定常常为1000 mg/m^2经外周静脉滴入30 min, 每周1次, 连续3 wk, 随后休息1 wk, 每4 wk重复1次. 依据患者的毒性反应相应减少剂量.

1.2.3 临床疗效标准和临床受益反应: 临床疗效标准按照世界卫生组织(WHO)疗效评价标准, 将患者治疗疗效评价为完全缓解(CR)、部分缓解(PR)、疾病稳定(SD)和疾病进展(PD). 临床受益反应根据1997年Burris *et al*制定的临床受益反应标准对患者的疼痛强度对患者的疼痛强度(VAS评分, 10分制)、镇痛药物消耗量、卡氏评分和体质量变化综合评估. 凡符合下列一项指标(持续4 wk以上), 并无任何一项恶化者, 定义为临床受益者: (1)疼痛强度减轻≥50%; (2)镇痛药物用量减少≥50%; (3)体力状况按卡氏评分标准改善≥20分; (4)如疼痛程度及体力状况均稳定, 则非体液滞留的体质量增加≥7%.

统计学处理 在SPSS13.0软件上进行统计学分析, 2组间样本客观有效率, 临床受益率以及并发症发生率等采用χ^2检验. 对生存率比较采用Log-rank检验法. P<0.05差异有统计学意义.

2 结果

2.1 患者治疗后客观有效率、临床受益率和并发症发生率 客观有效率(PR+CR)A组为32.3%(20/62), B组为28.7%(25/87), 2组差异无统计学差异(χ^2 = 0.213, P = 0.640). 临床受益率A组为58.1%(36/62), B组为35.6%(31/87), 2组差异有统计学差异(χ^2 = 7.361, P = 0.007<0.05). 术后1 mo中患者发生的并发症A组为6.5%(4/62), B组为5.7%(5/87), 2组间差异无统计学差异(χ^2 = 0.032, P = 0.859), 并发症主要为腹腔感染, 恶心呕吐为主, A组有1例患者出现粒子游走至肝脏(表1).

2.2 患者生存时间 A组中位生存期为12.0 mo, B组中位生存期为8.0 mo, 平均生存时间A组为11.3 mo, B组为8.9 mo. Log-rank检验发现2组差异有统计学意义(χ^2 = 10.09, P<0.05, 表2, 图1).

3 讨论

胰腺癌是恶性程度较高的消化系肿瘤, 其发病率在近数十年明显升高. 胰腺癌患者的1年生存率低于25%, 可手术切除者的5年生存率也不超过5%[1-2], 局部进展期和伴转移的胰腺癌患者中位生存时间分别为6-10 mo和3-6 mo[3]. 因此, 如何有效提高胰腺癌患者的生活质量和生存期成为临床医学的重要课题.

对大多数手术不能根治切除的胰腺癌, 目前主要的治疗方法有以下几种: 姑息性外科手术治疗, 体内外放疗[4-5], 以吉西他滨为主的化疗[6]等. 姑息性外科手术治疗主要目的在于缓解临床症状, 改善生活症状, 包括以下手术: (1)解除黄疸: 胰腺癌中大多数为胰头癌, 易引起梗阻

表 1 患者临床指标的比较

分组	PR+CR	SD+PD	客观有效率(%)	临床受益n(%)	并发症n(%)
A组	20	42	32.3	36(58.10)	4(6.5)
B组	25	62	28.7	31(35.60)	5(5.7)
总计	45	104	30.5	67(46.85)	9(5.6)

表 2 患者生存时间

分组	平均生存时间(mo)		中位生存时间(mo)	
	mean ± SD	95%CI	mean ± SD	95%CI
A组	11.316 ± 0.866	9.618–13.014	12.000 ± 1.631	8.804–15.196
B组	8.908 ± 0.584	7.763–10.053	8.000 ± 0.666	6.694–9.306
总计	10.102 ± 0.541	9.042–11.162	9.000 ± 0.495	8.029–9.971

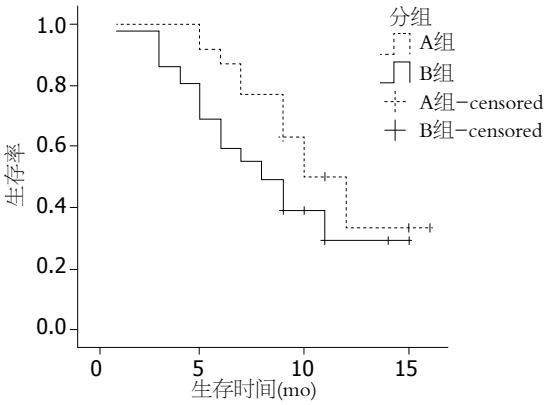


图 1 2组患者的生存率的Log-rank检验结果.

性黄疸. 手术方式有胆囊空肠吻合、胆管空肠吻合和胆道外引流等. 本次收集的患者中, 有黄疸者82例, 占所有患者比例为55%. (2)解除或预防十二指肠梗阻: 手术方式通常为胃空肠吻合, 对尚未发生梗阻行预防性胃空肠吻合尚存在争议. 本次患者中有十二指肠梗阻者9例, 占所有患者比例为6%, 对其他患者未行预防性胃空肠吻合. (3)缓解疼痛: 引流减压胆胰管; 内脏神经切断或神经节切除等. 放射性粒子近距离治疗肿瘤是指将微型放射源(I^{125}放射性粒子)植入肿瘤内或受肿瘤浸润侵犯的组织中, 包括肿瘤淋巴扩散途径的组织, 通过微型放射源发出的持续低能量射线, 使肿瘤组织遭受最大程度的毁灭性损伤, 而正常组织不损伤或仅有微小损伤. 肿瘤的内部放射治疗既能达到一定治疗效果, 同时也无严重并发症. 据文献报道, I^{125}内放射粒子植入可有力控制胰腺癌局部病变的发展, 降低肿瘤生长速度. 与此同时, 内放射粒子副损伤小, 可有力保留周围功能性组织(如血管和神经等)[7]. 从上述实验结果可以看出, 通过放射性粒子植入治疗中晚期手术不能切除的胰腺癌病例, 可以明显改善生活质量减少患者尤其是疼痛对患者的影响, 同时不引起明显并发症. 结果说明粒子植入有比较确切的止痛效果, 可以明显改善患者的生活质量. 本实验A组患者行粒子植入后, 对比B组未行粒子植入患者, 生活质量明显改善, 这可能与减轻患者疼痛有关. 吉西他滨对胰腺癌的治疗作用最早在1999年Storniolo *et al*[8]一项临床试验, 证实了吉西他滨对晚期胰腺癌的治疗益处. 此后吉西他滨成为晚期胰腺癌的标准一线药物, 并逐渐用于术后治疗. 近年的研究多针对吉西他滨为基础的化疗方案. 而吉西他滨作为新合成的脱氧胞苷类似物, 具有完全不同的抗肿瘤活性, 美国FDA以批准吉西他滨作为抗胰腺癌的一线用药[9], 在无法行根治切除术的进展期胰腺癌患者, 吉西他滨可以获得较高的反应率和更长的生存期. 在2007年ASCO年会上, Yoshitomi *et al*[10]报道了胰腺癌术后辅助化疗的Ⅱ期随机临床试验结论是吉西他滨为基础的联合化疗方案对术后患者是安全有效的.

本研究结果显示对肿块不能切除、伴有消化系梗阻的晚期胰腺癌患者, 在应用姑息手术以解除日渐加重的胆道和胃肠道梗阻的基础上, 结合术后吉西他滨化疗加行术中I^{125}粒子植入可明显提高晚期胰腺癌患者的客观有效率和临床受益率. 同时结果显示I^{125}粒子植入组临床受益率明显高于未加用粒子组, 说明I^{125}粒子植入可持久的改善患者生活质量, 减轻痛苦, 这可能与I^{125}粒子既可以使肿瘤局部变性坏死, 减轻局部张力, 也可以破坏胰腺周围的腹腔神经丛有关.

■相关报道

放射性粒子植入被广泛应用到晚期不能切除的恶性实体肿瘤. 有学者认为, 应用I^{125}粒子植入对于晚期不能根治切除的胰腺癌不能提高其远期生存率. 还有学者认为, 应该应用更优越性的Pd^{103}治疗胰腺癌, 但还需要样本支持.

■同行评价
本研究设计合理，具有一定的临床应用价值.

在并发症的发生率上，I^{125}粒子植入组并发症发生并没有高于未植入粒子组，这说明在粒子植入对于患者是比较安全的. 在生存率的比较上，I^{125}粒子植入组与未植入组有明显的统计学差异，所以粒子的植入能够提高患者的远期生存率，这可能与I^{125}粒子的放射性能够局部杀灭肿瘤细胞，抑制肿瘤的生长，从而提高患者中位生存期. 但I^{125}粒子种植治疗也有其不利的因素，如粒子游走等. A组患者有1例患者出现粒子游走至肝脏，但因患者无不良反应，肝功能正常未作处理. 由于I^{125}的半衰期特点以及穿透力的局限性，目前许多学者正进行更具优越性的Pd^{103}粒子治疗胰腺癌的探讨，如Bernard *et al*[11]应用Pd^{103}粒子治疗一组晚期胰腺癌患者，但确切疗效尚需要大样本资料对照研究来证实.

总之，姑息性手术联合I^{125}粒子植入和吉西他滨化疗对局部进展期胰腺癌，能控制局部肿瘤的生长，提高患者生存率，是一种安全有效的晚期胰腺肿瘤治疗手段.

4 参考文献

1 Cooperman AM, Kini S, Snady H, Bruckner H, Chamberlain RS. Current surgical therapy for carcinoma of the pancreas. *J Clin Gastroenterol* 2000; 31: 107-113

2 Parkin DM, Bray FI, Devesa SS. Cancer burden in the year 2000. The global picture. *Eur J Cancer* 2001; 37 Suppl 8: S4-S66

3 Haller DG. New perspectives in the management of pancreas cancer. *Semin Oncol* 2003; 30: 3-10

4 Willett CG, Safran H, Abrams RA, Regine WF, Rich TA. Clinical research in pancreatic cancer: the Radiation Therapy Oncology Group trials. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2003; 56: 31-37

5 Moore MJ. Pancreatic cancer: what the oncologist can offer for palliation. *Can J Gastroenterol* 2002; 16: 121-124

6 Böttger TC, Junginger T. Factors influencing morbidity and mortality after pancreaticoduodenectomy: critical analysis of 221 resections. *World J Surg* 1999; 23: 164-171; discussion 171-172

7 Cooperman AM. Pancreatic cancer: the bigger picture. *Surg Clin North Am* 2001; 81: 557-574

8 Storniolo AM, Enas NH, Brown CA, Voi M, Rothenberg ML, Schilsky R. An investigational new drug treatment program for patients with gemcitabine: results for over 3000 patients with pancreatic carcinoma. *Cancer* 1999; 85: 1261-1268

9 Oya N. Chemoradiotherapy for pancreatic cancer: current status and perspectives. *Int J Clin Oncol* 2004; 9: 451-457

10 Yoshitomi H, Togawa A, Kimura F, Shimizu H, Yoshidome H, Miyazaki M. A randomized phase II trial of adjuvant chemotherapy with uracil/tegafur (UFT) and gemcitabine (GEM) vs gemcitabine alone in patients with resected pancreatic cancer. ASCO Annual Meeting, 2007: Abstract 454

11 Bernard S, Vynckier S. Dosimetric study of a new polymer encapsulated palladium-103 seed. *Phys Med Biol* 2005; 50: 1493-1504

编辑 李军亮 电编 何基才

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2009年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

《世界华人消化杂志》英文摘要要求

本刊讯 本刊英文摘要包括目的、方法、结果、结论，书写要求与中文摘要一致. 具体格式要求如下: (1)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; (2)作者 署名一般不超过8人. 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”; (3)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; (4)基金资助项目 格式如: Supported by National Natural Science Foundation of China, No.30224801; (5)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; (6)收稿及修回日期 格式如: Received: Revised: . (科学编辑: 李军亮 2009-10-08)

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2009年10月8日; 17(28): 2955-2957
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

临床经验 CLINICAL PRACTICE

ERCP在梗阻性黄疸病因鉴别诊断中的应用

任粉玉, 朴熙绪, 崔顺子

任粉玉, 朴熙绪, 崔顺子, 延边大学附属医院消化内科 吉林省延吉市 133000
通讯作者: 任粉玉, 教授, 133000, 吉林省延吉市局子街1327号, 延边大学附属医院消化内科. fenyu65@yahoo.com.cn
电话: 0433-2670332 传真: 0433-2513610
收稿日期: 2009-03-25 修回日期: 2009-09-01
接受日期: 2009-09-07 在线出版日期: 2009-10-08

Diagnostic value of endoscopic retrograde cholangiopancreatography in obstructive jaundice

Fen-Yu Ren, Xi-Xu Piao, Shun-Zi Cui

Fen-Yu Ren, Xi-Xu Piao, Shun-Zi Cui, Department of Hepatology and Gastroenterology, Yanbian University Hospital, Yanji 133000, Jilin Province, China
Correspondence to: Professor Fen-Yu Ren, Department of Hepatology and Gastroenterology, Yanbian University Hospital, Yanji 133000, Jilin Province, China. fenyu65@yahoo.com.cn
Received: 2009-03-25 Revised: 2009-09-01
Accepted: 2009-09-07 Published online: 2009-10-08

Abstract
AIM: To evaluate the application of endoscopic retrograde cholangiopancreatography (ERCP) in the diagnosis of obstructive jaundice (OJ).

METHODS: A total of 49 patients with surgically and pathologically confirmed OJ were retrospectively analyzed. Of all patients included, 40 underwent routine ERCP, B-mode ultrasonic examination and computed tomography (CT) examination simultaneously. The diagnostic accuracy of these examinations was compared.

RESULTS: The diagnostic accuracy of ERCP in the detection of choledocholithiasis-induced OJ was 96.6%. The diagnostic accuracy of ERCP, B-mode ultrasonic examination and CT examination for OJ was 77.7%, 35.72% and 64.77%, respectively. The diagnostic accuracy of ERCP in investigating the etiology of OJ was significantly higher than that of B-mode ultrasonic examination and CT examination (both $P < 0.05$).

CONCLUSION: ERCP is superior to B-mode ultrasonic examination and CT examination in the investigation of the etiology of OJ.

Key Words: Endoscopic retrograde cholangiopancreatography; Obstructive jaundice; Diagnosis

Ren FY, Piao XX, Cui SZ. Diagnostic value of endoscopic retrograde cholangiopancreatography in obstructive jaundice. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2009; 17(28): 2955-2957

摘要
目的: 探讨逆行胰胆管造影术(endoscopic retrograde cholangiopancreatogahpy, ERCP)在梗阻性黄疸的病因鉴别诊断中的应用价值.

方法: 行ERCP检查并经术后或病理检查确诊的梗阻性黄疸患者49例, 其中40例行ERCP、B超、CT检查, 比较分析三者的诊断符合率.

结果: 40例患者同时行ERCP、B超、CT检查, 三种影像学诊断符合率分别为77.7%、35.72%、64.77%, 其中ERCP对梗阻性黄疸病因的诊断率明显高于B超及CT检查(P<0.05).

结论: ERCP在梗阻性黄疸的病因鉴别诊断中具有较高的诊断价值, 且优于B超和CT检查.

关键词: 逆行胰胆管造影术; 梗阻性黄疸; 诊断

任粉玉, 朴熙绪, 崔顺子. ERCP在梗阻性黄疸病因鉴别诊断中的应用. 世界华人消化杂志 2009; 17(28): 2955-2957
http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/2955.asp

0 引言
在梗阻性黄疸的病因鉴别诊断中, 影像学检查具有重要的作用. 自1968年Mccune *et al*首次报道内镜下逆行胰胆管造影(endoscopic retrograde cholangiopancreatogahpy, ERCP)在胆胰疾病中的临床应用以来, ERCP作为诊断胆胰疾病的金标准已在临床应用多年, 其诊断价值得到公认. 随着ERCP术的广泛应用, 现已成为胆胰疾病诊治的主要手段之一. 本文总结我院行ERCP检查, 并经手术治疗后证实的梗阻性黄疸患者49例,

■背景资料
在梗阻性黄疸的病因鉴别诊断中, 影像学检查具有重要的作用. ERCP作为诊断胆胰疾病的金标准已在临床应用多年, 其诊断价值得到公认. 随着ERCP术的广泛应用, 现已成为胆胰疾病诊治的主要手段之一.

■同行评议者
黄恒青, 主任医师, 福建省第二人民医院消化内科

■相关报道
任旭 *et al*对32例梗阻性黄疸患者ERCP诊断与B超和CT进行对比, 其定位诊断率分别为93.7%、87.5%和81.3%, 定性诊断率分别为0.6%、62.5%和56.3%, ERCP对梗阻性黄疸的病因诊断率明显优于B超和CT.

现报道如下.

1 材料和方法

1.1 材料 2003-01/2008-12因梗阻性黄疸在我院行ERCP并接受手术治疗的患者49例, 其中男28例, 女21例, 年龄34-86(平均60.5)岁. 同时有3种影像学(B超、CT、ERCP)资料患者40例. 行内镜下乳头括约肌切开(endoscpicduo-denal papilosphincterotomy, EST)取石术8例, 经内镜行内镜鼻胆管引流术1例. 其余均经手术或病理证实黄疸的病因. Olympus JF-240型电子十二指肠镜、取石网篮、碎石器和PSD-20高频电发生器, Boston切开刀、导丝、取石气囊和鼻胆引流管, Philips数字胃肠机, 造影剂用30%泛影葡胺.

1.2 方法 在十二指肠镜下行十二指肠乳头插管成功后, 注入30%泛影葡胺10-20 mL, 透视下明确肝内外胆管病变后, 行EST或留置鼻胆引流管. EST选用电切30 W、电凝25 W的混合电流, 于乳头11-12点位置之间切开, 切开长度约10-15 mm, 用取石网篮+气囊取尽结石, 完成ERCP操作术后于24 h检查血淀粉酶. 胰管拍片取俯卧与仰卧位, 胆管取俯卧位、仰卧位、立位及左右斜位等, ERCP术后行手术治疗.

统计学处理 40例同时有ERCP、B超、CT检查, 3种影像学诊断符合率比较采用χ^2检验, $P<0.05$表示差异有统计学意义.

2 结果

良性胆道梗阻31例(包括包括胆总管结石、胆总管炎性狭窄、乳头炎), 其中胆总管结石29例, 胆总管炎性狭窄1例, 乳头炎1例. 8例胆总管结石行EST(endoscopicduo-denal papilosphincterotomy, EST)取石术, 其中5例用取石网篮一次取尽结石, 2例经碎石器碎石后取尽, 1例泥沙样结石用取石网篮+内镜下乳头气囊扩张术(endoscopic papillary balloon dilatation, EPBD). 结石取尽率为100%. 恶性胆道梗阻18例(包括胰腺癌, 胆管癌, 壶腹周围癌), 占36.7%(18/49), ERCP诊断符合率见表1. 40例3种影像学诊断符合率分别为占77.7%、35.7%、64.8%, 采用χ^2检验, $P<0.05$(表2).

ERCP术后出现一过性高淀粉酶血症的6例, 其中2例血淀粉酶值高于正常值3倍以上, 但无腹痛、腹胀和发热, 经药物治疗, 48 h内降至正常: 3例出现急性胰腺炎(经CT检查结合血尿淀粉酶检测后确诊), 发生率为6.12%(3/49), 未见其他严重并发症.

表 1 梗阻性黄疸患者ERCP诊断符合率比较 (n = 49)

	ERCP确诊	术后确诊	符合率(%)
胆总管结石	28	29	96.6
胆总管炎性狭窄	1	1	100.0
乳头炎	1	1	100.0
胰腺癌	5	7	71.4
胆囊癌	2	3	66.7
胆管癌	4	5	80.0
壶腹周围癌	2	3	66.7

表 2 ERCP、B超、CT检查对梗阻性黄疸患者病因诊断 (n = 40)

	n	ERCP		B超		CT	
		确诊	误诊	确诊	误诊	确诊	误诊
胆总管结石	20	19	1	17	3	18	2
胆总管炎性狭窄	2	2	0	0	2	1	1
乳头炎	2	2	0	0	2	1	1
胰腺癌	7	4	3	4	3	5	2
胆囊癌	2	1	1	1	1	1	1
胆管癌	4	3	1	1	3	3	1
壶腹周围癌	3	2	1	1	2	2	1

3 讨论

ERCP是诊断梗阻性黄疸病因的一种既准确又安全的方法. 其价值在于确定梗阻的性质、部位和范围[1-4]. 梗阻性黄疸常见的病因有胆总管结石、胰腺癌、胆管癌. 临床研究均表明ERCP对胆胰疾病的诊断优于B超、CT等[5-7], ERCP是确诊胆管结石的最佳方法, 对胆总管结石的确诊率为92.1%-94.6%, 肝内胆管显影率为86.6%, 诊断符合率96.6%. B超、CT虽为无创检查, 但不能全面清晰显示胆胰管. B超对胆总管结石的诊断, 由于胆总管下端位于十二指肠背侧, 受腹腔气体和肥胖影响易漏诊, 其诊断准确率约60%, 而ERCP达90%以上[8]. 我们的研究显示B超对胆总管结石的诊断准确率为85%, 而ERCP达96.9%. CT对胆红素结石无法显示, 且受设备分辨率高低、分层厚度等的影响大. 本组40例梗阻性黄疸的病因诊断率ERCP高于B超和CT, 3者对比差异有显著意义. 任旭 *et al*[9]对32例梗阻性黄疸患者ERCP诊断与B超和CT进行对比, 其定位诊断率分别为93.7%、87.5%和81.3%, 定性诊断率分别为0.6%、62.5%和56.3%, ERCP对梗阻性黄疸的病因诊断率明显优于B超和CT.

ERCP不仅可直观胆石的大小、数目、部位, 而且可及时对胆总管结石进行EST后取石, 达到诊断和治疗同时进行, 这是其他影像学检查所不能比拟.

胆管癌ERCP在早期诊断胆管癌方面明显优于B超及CT检查, 其诊断符合率可达90.3%[10], 高于B超(80.7%)和CT(85.0%), 并能清晰地显示胆道系统的全貌, 对治疗及手术方案选择有重要价值. 胆管癌ERCP的主要表现是狭窄、充盈缺损或梗阻. 常伴有管壁僵硬, 病变以上胆管普遍扩张. 本组手术证实胆管癌5例, 符合率80%, 误诊1例手术证实为胆管下端炎性狭窄.

ERCP是诊断胰腺癌的主要方法之一. 本组ERCP、B超、CT的诊断符合率为71.4%(5/7)、57.1%(4/7)、71.4%(5/7). 由于胰腺癌多起源于胰管上皮细胞, 故早期就可引起胰管狭窄或梗阻、扩张和移位, 因此ERCP对发现早期胰腺癌有重要意义, 胰头癌时可引起胆总管、主胰管梗阻, 出现“双管征”影像, 这对胰腺癌的诊断有特异性的诊断价值. 通过ERCP收集胰液作脱落细胞学检查, 对胰腺癌诊断阳性率可达75%. 国内学者[11]通过对ERCP下收集的胰液进行K-ras基因点突变检测, 胰腺癌阳性率为80%, 明显高于胰腺良性疾病33%, 为胰腺癌的早期诊断开辟了一条新途径.

尽管ERCP技术已成熟, 但仍存在一定的并发症. ERCP的并发症主要是胰腺炎、出血、感染和穿孔. 主要由EST、反复多次的胰管插管和高压注射造影剂等引起, 表现为ERCP术后出现腹痛、腹胀, 伴有发热, 血淀粉酶常常高于正常值3倍以上. ERCP术后并发胰腺炎的原因除了与操作者的操作技术有关外, 与患者本身因素也存在着高危因素, 即使操作技术娴熟也难避免其发生[12-16]. 因此, 除了严格掌握ERCP术的适应证以及重视ERCP术中、术后的处理之外, 规范操作者的操作技术和加强操作技巧的培训, 可减少ERCP并发症的发生. 预防措施包括: (1)乳头插管时避免盲目插管; (2)在透视下注射造影剂, 要用缓力, 胰管显影时立即停止注射; (3)因插管困难使用导丝来引导时, 注意导丝的行走方向, 避免反复进入胰管等. 本组有3例发生急性轻型胰腺炎, 经保守治疗后痊愈. ERCP术后出现一过性高淀粉酶血症的6例, 其中3例血淀粉酶值高于正常值3倍以上, 但无腹痛、腹胀和发热, 经药物治疗, 48 h内降至正常. 并发症处理的关键是术前预防用药、术后加强抗感染和使用抑酶制剂(如加贝酯、生长抑素)等, 内镜下胆道引流也是不可忽视的处理手段之一.

ERCP对梗阻性黄胆的诊病因断符合率高, 优于B超和CT. 特别是随着内镜技术的发展, 治疗性ERCP的广泛应用, 更显示出其不可替代的作用.

■**同行评价**
本研究目的明确, 方法和技术可行, 结论具有临床参考价值.

4 参考文献

1 Ross AS. Endoscopic retrograde cholangiopancreatography in the surgically modified gastrointestinal tract. *Gastrointest Endosc Clin N Am* 2009; 19: 497-507
2 胡冰, 周岱云, 龚彪. ERCP临床诊疗图解. 第1版. 上海: 上海科学技术出版社, 2004: 4
3 Johnson GK, Geenen JE, Johanson JF, Sherman S, Hogan WJ, Cass O. Evaluation of post-ERCP pancreatitis: potential causes noted during controlled study of differing contrast media. Midwest Pancreaticobiliary Study Group. *Gastrointest Endosc* 1997; 46: 217-222
4 Raraty MG, Finch M, Neoptolemos JP. Acute cholangitis and pancreatitis secondary to common duct stones: management update. *World J Surg* 1998; 22: 1155-1161
5 刘运祥, 黄留业. 实用消化内镜治疗学. 第1版. 北京: 人民卫生出版社, 2002: 126
6 林国伟, 李剑英. ERCP对胰胆疾病的诊断价值. 中国内镜杂志 1999; 5: 27
7 杨玉秀, 李修岭, 樊晓明, 张延瑞, 齐玉芬, 李怀斌. ERCP对胰胆疾病的诊断价值-附732例分析. 中国内镜杂志 1998; 4: 63-64
8 李兆申, 许国铭. ERCP基本技术与临床应用. 第1版. 济南: 山东科学技术出版社, 2001: 36
9 任旭, 王义录, 李洪松, 唐季芬, 李秀梅, 李艳华, 原龙. 逆行胰胆管造影对梗阻性黄疸的诊断价值. 中华消化内镜杂志 1996; 13: 17-19
10 李兆申. 中国ERCP研究现状. 世界华人消化杂志 2000; 8: 446-448
11 龚晓明, 陈元方, 陈元嫁. 胰腺癌患者胰液中K-ras基因突变的检测及其意义. 中华内科杂志 1999; 38: 673-676
12 张东海, 李兆申. ERCP并发症的危险因素及药物预防进展. 中华消化内镜杂志 2002; 19: 378-378
13 许晓倩. ERCP术后胰腺炎. 胰腺病学 2003; 3: 243-247
14 杨克钦, 郭学仁. 胆道梗阻性病变的PTC, ERCP诊断: 附100例分析. 实用放射学杂志 1998; 14: 35-37
15 许国铭, 李兆申. 上消化道内镜学. 上海: 上海科学技术出版社, 2003: 485-509
16 龚彪, 王坚. ERCP中采用气囊导管造影确诊肝内胆管结石的应用价值. 中华消化内镜杂志 1999; 16: 78-79

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2009年10月8日; 17(28): 2958-2963
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

临床经验 CLINICAL PRACTICE

无症状平均风险人群大肠癌的筛查

刘国伟, 蔡全才

■背景资料
无症状平均风险人群是指无大肠癌相关症状或预警症状、无大肠癌和大肠腺瘤性息肉病史及家族史, 无遗传性大肠癌和炎症性肠病病史的人群. 国外研究认为, 70%-75%大肠癌患者来自于50岁以上的平均风险人群. 如果每1位50岁以上的无症状平均风险人群都能按照筛查指南定期进行筛查, 大肠癌的发病率可以减少76%-90%, 死亡率可以减少60%

刘国伟, 蔡全才, 中国人民解放军第二军医大学长海医院消化内科 上海市 200433
作者贡献分布: 刘国伟与蔡全才对此文所作贡献均等; 此课题由蔡全才与刘国伟设计; 研究过程由刘国伟操作完成; 数据分析由蔡全才完成; 本论文写作由刘国伟完成.
通讯作者: 蔡全才, 副教授, 200433, 上海市, 中国人民解放军第二军医大学长海医院消化内科. caiquancai1219@163.com
收稿日期: 2009-07-25 修回日期: 2009-09-09
接受日期: 2009-09-15 在线出版日期: 2009-10-08

Screening for colorectal cancer in an asymptomatic average-risk population

Guo-Wei Liu, Quan-Cai Cai

Guo-Wei Liu, Quan-Cai Cai, Department of Gastroenterology, Changhai Hospital of Shanghai, the Second Military Medical University of Chinese PLA, Shanghai 200433, China
Correspondence to: Professor Quan-Cai Cai, Department of Gastroenterology, Changhai Hospital of Shanghai, the Second Military Medical University of Chinese PLA, Shanghai 200433, China. caiquancai1219@163.com
Received: 2009-07-25 Revised: 2009-09-09
Accepted: 2009-09-15 Published online: 2009-10-08

Abstract
AIM: To establish a risk prediction model and a risk scoring system for adenomatous polyps.

METHODS: A cross-sectional study was performed in consecutive asymptomatic average-risk patients. The potential risk factors were selected from the following aspects: general data, past medical history, personal history, dietary history, frequency of defecation, and menstrual history. The chi-square test and *t*-test were used for univariate analysis. Univariates with a *P* value equal to or lower than 0.25 were selected to perform multivariate analysis. Potential predictive factors were gradually selected using stepwise regression analysis to build a predictive model to estimate the risk of colorectal cancer. Scores were assigned to each predictive factor according to the β value to establish a scoring system to evaluate the precision and predictive ability of the model.

RESULTS: The prevalences of polyps, adenoma, progressive adenocarcinoma and infiltrating cancer were 21.5%, 7.9%, 1.2% and 2.0%, respectively. The potential predictive factors identified for adenomatous polys included gender, education level, history of smoking and drinking, occupation, intake of fruit, milk, pickled and fried food as well as red meat, menstrual history, body mass index (BMI), and alcohol and tea consumption. These factors were used to build a risk predictive model for adenomatous polys. History of smoking, fruit intake, and red meat intake were three independent predictive factors for adenomatous polys. A risk scoring system for adenomatous polyps was also established: patients with a score more than 1 were considered to have adenomatous polyps.

CONCLUSION: The risk prediction model and risk scoring system built in this study have relatively high diagnostic and predictive efficiency in an asymptomatic average-risk population. They are expected to be used to predict the risk of colorectal cancer among asymptomatic average-risk persons.

Key Words: Colorectal cancer; Screen; Predictive model; Logistic regression; Risk stratification

Liu GW, Cai QC. Screening for colorectal cancer in an asymptomatic average-risk population. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2009; 17(28): 2958-2963

摘要
目的: 建立具有实用价值的大肠息肉发病风险预测模型和方便易用的大肠息肉发病风险预测评分系统.

方法: 采用横断面研究设计. 调查内容包括一般情况、既往史、个人史(手术史、服药史、吸烟史、饮酒史、毒物接触史等)、饮食史、排便频率、月经史(女性检查者)等. 采用χ^2检验、*t*检验等方法进行单因素分析. 选择单因素中*P*值小于或等于0.25的因素进行多因素分析, 逐步Logistic回归后退法逐步筛选潜在预测因子, 建立大肠癌癌前病变-息肉发病风险的预测模型. 将模型中的连续变量转变成分类

■同行评议者
王志刚, 副主任医师, 上海市第六人民医院普外科

变量后对模型中的所有变量进行多元Logistic回归分析, 根据模型中的β值而赋予分值, 建立评分系统.

结果: 息肉发生率为21.5%, 腺瘤发生率为7.9%, 进展期腺瘤发生率为1.2%, 浸润癌发生率为2.0%. 性别、文化程度、吸烟史、饮酒史、工作性质、水果、奶类、腌制食品、油炸食品、红肉摄入、月经史、体质量指数、饮酒量、饮茶量14项是息肉的潜在预测因子(P≤0.25). 多因素分析-Logistic回归发病风险预测模型的建立. 吸烟史、水果摄入、红肉摄入是息肉的独立预测因子. 息肉发病风险预测评分系统分值>1分被判断为息肉患者.

结论: 本研究所建立的大肠癌无症状平均风险人群息肉发病风险预测模型和评分系统具有较高的诊断预测效能, 可望用于无症状平均风险人群大肠癌癌前病变-息肉发病风险预测.

关键词: **大肠癌; 筛查; 预测模型; Logistic回归; 危险分层**

刘国伟, 蔡全才. 无症状平均风险人群大肠癌的筛查. 世界华人消化杂志 2009; 17(28): 2958-2963
http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/2958.asp

0 引言

大肠癌在全球范围均是发病率较高的恶性肿瘤之一. 根据2008年最新统计数据, 在美国, 大肠癌占常见肿瘤的第3位, 死亡率占第2位[1]. 亚洲大肠癌呈急速攀升趋势, 却仍然缺乏行之有效的筛查指南[2]. 无症状平均风险人群(average-risk population)是指无大肠癌相关症状或预警症状、无大肠癌和大肠腺瘤性息肉病史及家族史, 无遗传性大肠癌和炎症性肠病病史的人群[3-4]. 国外研究认为, 70%-75%大肠癌患者来自于50岁以上的平均风险人群[3]. 如果每1位50岁以上的无症状平均风险人群都能按照筛查指南定期进行筛查, 大肠癌的发病率可以减少76%-90%, 死亡率可以减少60%[3]. 所以, 通过对无症状平均风险人群进行大肠癌筛查, 可以检出早期癌和癌前病变并进行及时治疗, 从而有效降低大肠癌的发病率、死亡率和病死率.

1 材料和方法

1.1 材料 研究对象来自长海医院研究开始起连续的无症状平均风险人群. 采用横断面研究设计.

1.2 方法

1.2.1 纳入标准: 拟行结肠镜检查; 年龄≥40岁; 汉族; 满足下列条件之一者: (1)无症状体检人群; (2)非特异性症状(轻微腹痛, 间歇腹泻和便秘).

1.2.2 排除标准: (1)无家族史: 1-2级亲属中无结、直肠肿瘤史, 60岁以下的一级亲属中无腺瘤性息肉病史和家族遗传性综合征史, 主要包括家族性腺瘤性息肉病、遗传性非息肉性结直肠癌、Turcot综合征、Oldfield综合征及青少年性息肉病等. (2)无以下疾病史: 包括大肠癌、息肉病、炎症性肠病、其他器官肿瘤(乳腺、卵巢、子宫及泌尿系统等). (3)无以下情况(6 mo内未曾行血常规和FOBT检查者须先进行这2项检查): 6 mo内缺铁性贫血; 6 mo内FOBT阳性; 12 mo内直肠出血或便血; 体质量减轻(非减肥原因6 mo内体质量减轻≥4.5 kg); 黑便; 里急后重; 近5年结肠镜检查史; 结、直肠手术史.

1.2.3 调查内容: 调查内容由两部分组成. 第1部分包括: 一般情况、既往史、个人史(手术史、服药史、吸烟史、饮酒史、毒物接触史等)、饮食史、排便频率、月经史(女性检查者). 第2部分包括: 是否完成全结肠检查、有无并发症、肠镜检查诊断及病理结果. 调查方法以面对面问卷调查为主. 第1部分为患者口述信息采集, 均由专人负责填写; 第2部分为专业医师填写信息, 肠镜及病理结果为最终诊断标准.

统计学处理 以SPSS15.0统计软件建立数据库并进行统计分析. 根据数据性质, 连续变量选用t检验, 二分类变量选用χ^2检验进行单因素分析. 多因素分析-建立预测模型并评价: 第1步选择单因素分析中P值小于或等于0.25的危险因素进行多因素Logistic回归分析建立预测模型. 第2步对预测模型的区分能力(ROC曲线下面积)和准确度进行评价. 模型拟合优度采用Hosmer-Lemeshow方法检验. 建立评分系统并评价: 根据危险因素变量中最小β值的绝对值为基数, 各危险因素变量的β值与之相除得到各变量所转化为其得分, 四舍区五入取整数以便使用. 总得分等于各变量得分之和. 根据总得分最佳诊断界值判定, 总得分≤n分, 赋值0(无病); 总得分>n分, 赋值1(有病). 进一步对评分系统的区分能力(ROC曲线下面积)和准确度进行评价. 所有统计学分析均采用双侧检验, 单因素分析中P<0.05被认为具有统计学差异, 多因素分析中P≤0.25被认为具有统计学差异.

■相关报道
陈安海 *et al*认为老年人大肠息肉的检出率、癌变率均显著高于中青年组, 随年龄增长检出率有逐渐增加的趋势.

■应用要点
本研究对于无症状平均风险人群大肠癌癌前病变-息肉发病风险预测具有较好的准确性, 其预测模型及评分系统对于息肉的发病风险有较好的诊断价值, 可望用于无症状平均风险人群大肠癌发病风险预测.

表 1 多因素Logistic回归模型中的独立预测因子

独立预测因子	*OR*值	95%CI
吸烟史	3.249	1.786–5.909
水果摄入	0.613	0.340–1.104
红肉摄入	2.453	1.372–4.386

2 结果

2.1 一般情况 共纳入病例344例. 其中331例完成结肠镜检查, 完成率96.2%, 13例未完成结肠镜检查, 未完成原因: 梗阻性肿瘤6例, 不能耐受者5例, 其他原因2例. 无一例出现并发症. 年龄最大者81岁, 年龄最小者40岁, 平均年龄54.83±9.52岁. 男154例(46.5%), 女177例(53.5%), 结肠镜结果中发现息肉71例(21.5%), 腺瘤26例(7.9%), 其中进展期腺瘤4例(1.2%), 7例确诊结肠癌(2.0%).

2.2 病变流行和解剖部位分布 息肉、腺瘤、进展期腺瘤和浸润癌的发生率分别为21.5%、7.9%、1.2%、2.0%, 各病变中解剖学部位近端、远端均无显著性差别.

2.3 单因素分析 由于进展期腺瘤及结肠癌病例数较少, 共11例, 各变量P>0.05, 无统计学差异. 息肉单因素分析后得到: 性别、文化程度、吸烟史、饮酒史、工作性质、水果、奶类、腌制食品、油炸食品、红肉摄入、月经史、体质量指数、饮酒量、饮茶量14项P值均小于0.25, 是息肉的潜在预测因子.

2.4 多因素分析结果 Logistic回归建立预测模型中提示吸烟史、水果摄入、红肉摄入是息肉的独立预测因子. 吸烟及红肉摄入是危险因子, 水果摄入为保护因子. 多因素Logistic回归模型中的独立预测因子见表1. 其ROC曲线下面积0.705(0.634, 0.776), P<0.001; 敏感度为69%, 特异度为65.4%, 准确度为66.2%, 阳性预测值35.3%, 阴性预测值88.5%, 阳性似然比1.994, 阴性似然比0.474. 通过模型拟合优度Hosmer-lemeshow检验χ^2 = 0.850, P = 0.932, 说明预测值与观察值无显著差别. 模型拟合优度良好.

2.5 建立评分系统并评价 吸烟、水果、红肉的β值分别为: 1.178、-0.490、0.897, 以水果摄入的β值-0.490取绝对值0.490为基数, 分别得到吸烟、水果摄入及红肉摄入的得分分别为: 2.4、1、1.83四舍区五入取整数为最终得分系统分值: 2、-1、2. 其中负值表示为保护因素. 根据各变量的β值建立评分系统: 吸烟史, 吸2分, 否0分; 水果摄入, 是-1分, 否0分; 红肉摄入, 是2分, 否0分. 总得分 = 2×吸烟史+(-1)×水果摄入+2×红肉摄入. 危险因素存在是取1, 不存在示取0. 验证其有效性的ROC曲线下面积0.704(0.633, 0.775), P<0.001, 说明此评分系统的预测能力较佳. 总得分(二分类赋值): 得分≤1分, 赋值0(无息肉); 得分>1分, 赋值1(有息肉). 以评分系统二分类判定分析试验结果中敏感度为57.7%, 特异度为80.4%, 准确度为75.5%, 阳性预测值44.6%, 阴性预测值87.4%, 阳性似然比2.94, 阴性似然比0.53. 说明该评分系统有效可行.

3 讨论

本课题试图通过危险因素调查建立其评分系统对大肠癌早期发现进行初步探讨. 本课题研究共纳入病例344例, 结肠镜结果中发现息肉71例(21.5%), 腺瘤26例(7.9%), 其中进展期腺瘤4例(1.2%), 7例确诊结肠癌(2.0%), 阳性率教高. 结直肠息肉是下消化系中的常见病, 本组结直肠息肉检出率为21.5%. 结直肠息肉分为肿瘤性息肉和非肿瘤性息肉, 肿瘤性息肉即腺瘤, 虽然腺瘤是腺上皮发生的良性肿瘤, 但Morson的腺瘤一癌因果关系学说证实结肠腺瘤是癌前病变, 目前得到国内外学者的一致公认[5].

本研究结果显示, 71例息肉患者中男性49例(68.5%)显著高于女性22例(31.5%), 性别是息肉发生的影响因素, 与朱元民 *et al*[6]和McCashland *et al*[7]研究的结果相一致. 全世界大肠癌的流行病学研究显示, 男性大肠癌的发病率普遍高于女性, 这可能与吸烟、喝酒、在工作中的压力状况等因素有关.

本研究结果显示提示50岁以上息肉的检出率较高, 与国内外学者研究结果基本一致. 陈安海 *et al*[8]认为老年人大肠息肉的检出率、癌变率均显著高于中青年组, 随年龄增长检出率有逐渐增加的趋势. 究其原因可能与随年龄增大, 免疫功能下降有关以及从结肠正常肠黏膜-腺瘤-癌一般历时5-15年, 息肉早期患者可无任何症状有关. 待出现症状而就医时, 息肉已生长5-15年, 初次检出年龄也就推迟到中老年.

Ashktorab *et al*[9]在对南美人种结肠息肉危险因素的分析中并未发现烟酒的摄入是危险因素之一. 陈坤 *et al*[10]对国内14个研究的Meta分析后发现其OR值超过1, 且P<0.05, 故仍认为吸烟是一危险因素因素. Shin *et al*[11]认为肉类尤其

是红肉类的大量摄入与结肠息肉发生有关. Wolf *et al*[12]认为绝经后妇女补充雌激素可以降低结肠腺瘤的危险. Dubé *et al*[13]认为阿司匹林的使用能预防结肠癌. Willett *et al*[14]认为钙和维生素D的摄入能预防结肠腺瘤. Cole *et al*[15]则认为叶酸可以起到预防患腺瘤性息肉. 食物方面, Agurs-Collins *et al*[16]认为豆类摄入能减低结肠腺瘤的风险. 此外, Vinikoor *et al*[17]认为胆囊切除术会增加腺瘤性息肉的再发几率. Bingham *et al*[18]通过对比欧洲10个国家519 978人的饮食习惯和大肠癌的发病后发现, 膳食纤维的摄入和大肠癌的发病呈负相关, 且对左半结肠保护作用最大, 对直肠保护作用最小, 和膳食纤维的来源无关. 一项在美国波士顿进行的包括88 757名34-59岁女护士的研究[19], 平均随访期16年, 未发现膳食纤维的摄入和大肠癌及腺瘤有关. 相反, 却发现摄入较多植物纤维者结肠癌的发病危险增加. 陈坤 *et al*[10]Meta分析表明: 肠道相关症状或疾病、饮食因素中的油腻性食物等、精神刺激和家族肿瘤史与大肠癌的发生有关, 而轻体力活动、膳食纤维为保护性因素. 饮酒因素未达到统计学上显著性, 而吸烟是否可以致大肠癌各方观点不一, 经过综合分析后发现其*OR*值超过1, 且$P<0.05$, 故仍认为是一危险因素因素. 周伦 *et al*[20]研究发现轻度体力活动是大肠癌的保护因素. 综合国内外对大肠癌的危险因素研究分析中, 可能的危险因素: 遗传性因素; 环境因素(高脂膳食、高糖膳食、吸烟、饮酒等)、肥胖、糖尿病、Crohn's病、溃疡性结肠炎等. 可能的保护因素: 水果、叶酸/VitB6、VitC、β-胡萝卜素、膳食镁、铁、硒、高纤维质膳食、 高体力活动、阿司匹林/NSAIDs等. 本研究中单因素分析中得出性别、文化程度、吸烟史、饮酒史、工作性质、水果、奶类、腌制食品、油炸食品、红肉摄入、月经史、体质量指数、饮酒量、饮茶量为14项危险因素.

国内外针对无症状人群大肠癌筛查研究中, 发病风险预测或危险分层的研究中有代表性的是Imperiale *et al*[21]、Betés *et al*[22-23]、Lin *et al*[24]和陈坤 *et al*[25]课题组. 但他们的模型各有其缺点. Imperiale TF课题组以无症状体检人群为研究对象, 建立了基于年龄、性别和远端结肠病变的近端结肠进展期腺瘤发病风险评分系统, 但该研究所建立的危险分层方法阳性预测值很低. Betés M课题组以无症状平均风险人群为研究对象, 建立了基于年龄、性别和体质量指数(BMI)的进展期腺瘤发病风险评分系统, ROC曲线下面积仅为0.65, 说明该方法区分病例与非病例的能力差, 筛查效能很差. Lin *et al*[24]以无症状人群为研究对象, 建立了基于年龄、性别和家族史的进展期腺瘤发病风险评分系统. ROC曲线下面积为0.596, 说明该方法区分病例与非病例的能力很差. 国内陈坤 *et al*[25]1988年报道了基于模糊数学的用隶属度判别危险性的用于人群大肠癌筛查的数量化方法, 后来又进一步完善该方法, 在代谢酶遗传多态性、环境暴露与大肠癌关系的病例对照研究的基础上, 建立包含环境和遗传因素的结肠癌、直肠癌危险度数学模型. 在此基础上, 提出了以个体危险度指标AD值结合FOBT为普通人群初筛手段, 结直肠镜检为精筛的大肠癌普通人群序贯筛查方案[26-28]研究结果结肠癌、直肠癌的AD阈值分别设定为0.13和0.19时, 结肠癌的灵敏度和特异度分别为82.2%和73.3%, 直肠癌的灵敏度和特异度分别为73.1%和78.0%, ROC曲线下面积分别为0.851和0.845. 其研究虽然按结肠癌、直肠癌建立的危险度评估模型诊断价值都较高, 但该模型较复杂, 难以临床推广及应用于无症状平均风险人群. 本课题针对单因素分析中14项显著危险因素中剔除月经史(女性)、饮酒量(35例)、饮茶量(36例)进行Logistic逐步回归建立预测大肠息肉发病模型, 分析结果提示吸烟及红肉摄入是危险因子, 水果摄入为保护因子. 与国外Shin *et al*[11], Gatof *et al*[29]研究结果一致. 验证预测模型ROC曲线下面积0.705, 说明模型区分度良好. 根据此3项建立评分系统ROC曲线下面积0.704, 说明此评分系统评判效果较高, 且简洁方便, 更符合大肠癌初筛要求.

本研究对于无症状平均风险人群大肠癌癌前病变-息肉发病风险预测具有较好的准确性, 其预测模型及评分系统对于息肉的发病风险有较好的诊断价值, 可望用于无症状平均风险人群大肠癌发病风险预测, 从而对于进一步探讨符合我国国情的大肠癌初筛策略[30-33]具有重要的实际意义.

■同行评价
国内外虽然有很多同类研究, 但本研究的方法和角度有一定新颖性, 所得结论有一定临床意义.

4 参考文献

1 Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Murray T, Thun MJ. Cancer statistics, 2008. *CA Cancer J Clin* 2008; 58: 71-96

2 Sung JJ, Lau JY, Young GP, Sano Y, Chiu HM, Byeon JS, Yeoh KG, Goh KL, Sollano J, Rerknimitr

R, Matsuda T, Wu KC, Ng S, Leung SY, Makharia G, Chong VH, Ho KY, Brooks D, Lieberman DA, Chan FK. Asia Pacific consensus recommendations for colorectal cancer screening. *Gut* 2008; 57: 1166-1176
3 Davila RE, Rajan E, Baron TH, Adler DG, Egan JV, Faigel DO, Gan SI, Hirota WK, Leighton JA, Lichtenstein D, Qureshi WA, Shen B, Zuckerman MJ, VanGuilder T, Fanelli RD; Standards of Practice Committee, American Society for Gastrointestinal Endoscopy. ASGE guideline: colorectal cancer screening and surveillance. *Gastrointest Endosc* 2006; 63: 546-557
4 Schoenfeld P, Cash B, Flood A, Dobhan R, Eastone J, Coyle W, Kikendall JW, Kim HM, Weiss DG, Emory T, Schatzkin A, Lieberman D. Colonoscopic screening of average-risk women for colorectal neoplasia. *N Engl J Med* 2005; 352: 2061-2068
5 Morson BC, Bussey HJ. Magnitude of risk for cancer in patients with colorectal adenomas. *Br J Surg* 1985; 72 Suppl: S23-S25
6 朱元民, 刘玉兰, 李世荣, 屈汉廷. 北京城区2万查体人群大肠息肉发病情况调查. 中国内镜杂志 2003; 9: 8-10
7 McCashland TM, Brand R, Lyden E, de Garmo P. Gender differences in colorectal polyps and tumors. *Am J Gastroenterol* 2001; 96: 882-886
8 陈安海, 赵逵, 文学铨, 石国庆. 老年人大肠息肉的临床分析. 中华老年医学杂志 2002; 21: 96-96
9 Ashktorab H, Begum R, Akhgar A, Smoot DT, Elbedawi M, Daremipouran M, Zhao A, Momen B, Giardiello FM. Folate status and risk of colorectal polyps in African Americans. *Dig Dis Sci* 2007; 52: 1462-1470
10 陈坤, 裘炯良, 张扬. 大肠癌危险因素的Meta分析. 浙江大学学报(医学版) 2002; 31: 254-258
11 Shin A, Shrubsole MJ, Ness RM, Wu H, Sinha R, Smalley WE, Shyr Y, Zheng W. Meat and meat-mutagen intake, doneness preference and the risk of colorectal polyps: the Tennessee Colorectal Polyp Study. *Int J Cancer* 2007; 121: 136-142
12 Wolf LA, Terry PD, Potter JD, Bostick RM. Do factors related to endogenous and exogenous estrogens modify the relationship between obesity and risk of colorectal adenomas in women? *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2007; 16: 676-683
13 Dubé C, Rostom A, Lewin G, Tsertsvadze A, Barrowman N, Code C, Sampson M, Moher D. The use of aspirin for primary prevention of colorectal cancer: a systematic review prepared for the U.S. Preventive Services Task Force. *Ann Intern Med* 2007; 146: 365-375
14 Oh K, Willett WC, Wu K, Fuchs CS, Giovannucci EL. Calcium and vitamin D intakes in relation to risk of distal colorectal adenoma in women. *Am J Epidemiol* 2007; 165: 1178-1186
15 Cole BF, Baron JA, Sandler RS, Haile RW, Ahnen DJ, Bresalier RS, McKeown-Eyssen G, Summers RW, Rothstein RI, Burke CA, Snover DC, Church TR, Allen JI, Robertson DJ, Beck GJ, Bond JH, Byers T, Mandel JS, Mott LA, Pearson LH, Barry EL, Rees JR, Marcon N, Saibil F, Ueland PM, Greenberg ER. Folic acid for the prevention of colorectal adenomas: a randomized clinical trial. *JAMA* 2007; 297: 2351-2359
16 Agurs-Collins T, Smoot D, Afful J, Makambi K, Adams-Campbell LL. Legume intake and reduced colorectal adenoma risk in African-Americans. *J Natl Black Nurses Assoc* 2006; 17: 6-12
17 Vinikoor LC, Robertson DJ, Baron JA, Silverman WB, Sandler RS. Cholecystectomy and the risk of recurrent colorectal adenomas. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2007; 16: 1523-1525
18 Bingham SA, Day NE, Luben R, Ferrari P, Slimani N, Norat T, Clavel-Chapelon F, Kesse E, Nieters A, Boeing H, Tjønneland A, Overvad K, Martinez C, Dorronsoro M, Gonzalez CA, Key TJ, Trichopoulou A, Naska A, Vineis P, Tumino R, Krogh V, Bueno-de-Mesquita HB, Peeters PH, Berglund G, Hallmans G, Lund E, Skeie G, Kaaks R, Riboli E; European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition. Dietary fibre in food and protection against colorectal cancer in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC): an observational study. *Lancet* 2003; 361: 1496-1501
19 Fuchs CS, Giovannucci EL, Colditz GA, Hunter DJ, Stampfer MJ, Rosner B, Speizer FE, Willett WC. Dietary fiber and the risk of colorectal cancer and adenoma in women. *N Engl J Med* 1999; 340: 169-176
20 周伦, 余海, 郑树. 杭州市大肠癌危险因素分析. 浙江医科大学学报 1996; 25: 204-206
21 Imperiale TF, Wagner DR, Lin CY, Larkin GN, Rogge JD, Ransohoff DF. Using risk for advanced proximal colonic neoplasia to tailor endoscopic screening for colorectal cancer. *Ann Intern Med* 2003; 139: 959-965
22 Betés M, Muñoz-Navas MA, Duque JM, Angós R, Macías E, Súbtil JC, Herraiz M, De La Riva S, Delgado-Rodríguez M, Martínez-González MA. Use of colonoscopy as a primary screening test for colorectal cancer in average risk people. *Am J Gastroenterol* 2003; 98: 2648-2654
23 Betés Ibáñez M, Muñoz-Navas MA, Duque JM, Angós R, Macías E, Súbtil JC, Herraiz M, de la Riva S, Delgado-Rodríguez M, Martínez-Gonzélez MA. Diagnostic value of distal colonic polyps for prediction of advanced proximal neoplasia in an average-risk population undergoing screening colonoscopy. *Gastrointest Endosc* 2004; 59: 634-641
24 Lin OS, Kozarek RA, Schembre DB, Ayub K, Gluck M, Cantone N, Soon MS, Dominitz JA. Risk stratification for colon neoplasia: screening strategies using colonoscopy and computerized tomographic colonography. *Gastroenterology* 2006; 131: 1011-1019
25 陈坤, 俞维萍, 马新源, 姚开颜, 李其龙. 结直肠癌个体危险度及人群筛查数量化评价的研究. 肿瘤 2005; 25: 66-70
26 刘希永, 郑树, 陈坤, 马新源, 周伦, 余海, 姚开颜, 陈康, 蔡善荣, 张苏展. 大肠癌序贯筛检方案在人群中应用的前瞻性评估. 中华流行病杂志 2000; 21: 430-433
27 李世荣, 田素丽, 武子涛, 韩英, 盛剑秋, 高革, 夏长虹, 曹建彪, 晨智敏, 王志红, 李雅君. 序贯粪隐血试验在自然人群连续性大肠癌普查中的应用. 世界华人消化杂志 2004; 12: 137-139
28 李世荣, 王化虹, 胡继春, 李楠, 刘玉兰, 武子涛, 郑悦, 王洪华, 吴凯, 叶辉. 三种粪隐血试验在结直肠癌筛检中的效率与费用分析. 中华医学杂志 2005; 85: 697-700
29 Gatof D, Ahnen D. Primary prevention of colorectal

cancer: diet and drugs. *Gastroenterol Clin North Am* 2002; 31: 587-623, xi
30 董志伟. 中国癌症研究进展–中国主要癌症的筛查及早诊早治. 北京: 北京大学出版社, 2004: 91-124
31 曲利园, 关丽征, 吴优, 尹娜, 王亚东, 王贵齐, 王芮, 彭德银, 何晓丽, 张凤珍, 张建东, 郑春燕. 国内外大肠癌筛查现状分析及对我国大肠癌筛查的建议. 中国全科医学 2007; 10: 1584-1586
32 李世荣. 现阶段我国大肠癌筛查策略的思考. 胃肠病学和肝脏病学 2008; 17: 261-262
33 中华人民共和国卫生部. 大肠癌早诊早治项目技术方案. 中华人民共和国卫生部官方网站, 2007-01, 引用日期: 2009-07. 见网址: http://www.moh.gov.cn/open/web_edit_file/20070201151751.doc

编辑 李军亮 电编 何基才

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2009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学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员提供转换平台, 更新知识, 为患者康复服务. (科学编辑: 李军亮 2009-10-08)

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2009年10月8日; 17(28): 2964-2967
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

临床经验 CLINICAL PRACTICE

芳香基硫酸酯酶法对结直肠癌和乳腺癌筛查的价值

张 晶, 张青云, 董大海

■背景资料
肿瘤是危害人类健康最严重的疾病之一, 随着肿瘤患者的发病率升高, 早诊断早治疗已成为现在抗癌的主要手段. 研究和寻找可以实现肿瘤早期诊断的检测方法尤其重要. 尤其是利用血液、尿液等体液标本检测方式, 更是简单、方便, 易于为患者所接受, 达到早查早治的目的.

张晶, 张青云, 董大海, 北京大学临床肿瘤学院 北京市肿瘤防治研究所暨北京肿瘤医院检验科 恶性肿瘤发病机制及转化研究教育部重点实验室 北京市 100142
作者贡献分布: 张晶主要负责标本收集、实验和数据的基本整理; 张青云负责实验设计、组织实施和文稿修订; 董大海负责标本收集和实验.
通讯作者: 张青云, 教授, 100142, 北京市, 北京大学临床肿瘤学院, 北京市肿瘤防治研究所暨北京肿瘤医院检验科.
zhqy_208@163.com
电话: 010-88196336
收稿日期: 2009-06-16 修回日期: 2009-08-16
接受日期: 2009-08-17 在线出版日期: 2009-10-08

Significance of arylsulphatase activity in the screening of colorectal and breast cancer

Jing Zhang, Qing-Yun Zhang, Da-Hai Dong

Jing Zhang, Qing-Yun Zhang, Da-Hai Dong, Department of Clinical Laboratory Sciences, Peking University School of Oncology, Beijing Institute for Cancer Research, Beijing 100142, China
Correspondence to: Professor Qing-Yun Zhang, Department of Clinical Laboratory Sciences, Peking University School of Oncology, Beijing Institute for Cancer Research, Beijing 100142, China. zhqy_208@163.com
Received: 2009-06-16 Revised: 2009-08-16
Accepted: 2009-08-17 Published online: 2009-10-08

Abstract
AIM: To evaluate the significance of arylsulphatase (ARS) activity in the screening of colorectal and breast cancer.

METHODS: Fifty-nine healthy volunteers, 22 colorectal cancer patients and 110 breast cancer patients were included in the study. Urine samples were collected from these subjects to measure the activity of arylsulphatase to catalyze 4-methyl umbelliferone sulfate to produce 4-methyl umbelliferone. Serum tumor markers including CEA, CA199, CA72.4, CA242 and CA153 were also measured. Statistical analysis was performed using the SPSS 11.5 software.

RESULTS: The positive rates of arylsulphatase in urine samples from colorectal cancer patients, breast cancer patients and healthy controls were 68.2%, 55.5% and 8.4%, respectively. The mean arylsulphatase activity in colorectal and breast cancer patients was significantly higher than that in healthy controls (0.373 U/L and 0.342 U/L *vs* 0.156 U/L, respectively; t = 10.266 and 5.735, respectively; df = 109, 21; both $P < 0.05$). The positive rates of tumor markers CEA, CA199, CA72.4 and CA242 in colorectal cancer patients were 18.2%, 22.7%, 4.54% and 13.6%, respectively, whereas the positive rates of tumor markers CA153 and CEA in breast cancer patients were 3.03% and 5.05%, respectively. No significant correlation was noted between arylsulphatase activity and serum tumor markers for colorectal and breast cancers ($P > 0.05$).

CONCLUSION: Arylsulphatase activity in the urine is valuable for screening colorectal and breast cancer though it is not correlated with routinely used serum tumor markers for colorectal and breast cancer.

Key Words: Arylsulphatase; Colorectal cancer; Breast cancer; Tumor marker

Zhang J, Zhang QY, Dong DH. Significance of arylsulphatase activity in the screening of colorectal and breast cancer. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2009; 17(28): 2964-2967

摘要
目的: 探讨芳香基硫酸酯酶(ARS)法对结直肠癌和乳腺癌筛查价值及适用性.

方法: 利用酶催化底物的方法检测正常人59例、结直肠癌22例、乳腺癌110例患者组共191例临床尿液标本中ARS及其同工酶的活性, 同时测定相关肿瘤标志物, 如CEA, CA199, CA72.4, CA242, CA153.

结果: 芳香基硫酸酯酶的检测结果显示, 结直肠癌该酶活力的平均数为0.373 U/L, 阳性率为68.2%; 乳腺癌该酶活力的平均数为0.342 U/L, 阳性率为55.5%, 正常人该酶活力平均数为0.156 U/L, 阳性率为8.4%. 与正常人组比较, 乳腺癌和结直肠癌患者尿液中芳香基硫酸酯酶阳性百分比及酶活力增高, 差异有统计学意义(t = 10.266, 5.735, df = 109, 21, 均P<0.05).

■同行评议者
王正康, 教授, 北京中日友好医院普外科

直肠癌和乳腺癌相关肿瘤标志物与芳香基硫酸酯酶活力无相关性(P>0.05). 结直肠癌的肿瘤标志物检测CEA阳性率为18.2%, CA199阳性率为22.7%, CA72.4阳性率为4.54%, CA242阳性率为13.6%, 乳腺癌的肿瘤标志物检测CA153阳性率为27.3%, CEA阳性率为3.03%. 直肠癌和乳腺癌相关肿瘤标志物与芳香基硫酸酯酶活力无相关性(P>0.05).

结论: 芳香基硫酸酯酶活性对结直肠癌和乳腺癌筛查具有一定的价值, 但与常规肿瘤标志检测结果不直接相关.

关键词: 芳香基硫酸酯酶; 结直肠癌; 乳腺癌; 肿瘤标志物

张晶, 张青云, 董大海. 芳香基硫酸酯酶法对结直肠癌和乳腺癌筛查的价值. 世界华人消化杂志 2009; 17(28): 2964-2967
http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/2964.asp

0 引言

癌症是当前危害人类健康最严重的疾病之一, 就人群的死亡病因而言, 肿瘤是西方国家仅次于冠心病, 中国仅次于脑血管疾病的第2病因[1]. 伴随着肿瘤患者的发病率升高, 早诊断早治疗已成为现在抗癌的主要手段. 芳香基硫酸酯酶(arylsulphatase, ARS)及其同工酶能水解芳香族的硫酸酯类, 与机体解毒功能有关. 研究表明尿中ARS活性升高多与恶性肿瘤有关[2-5]. 本实验利用尿液样本中的ARS及其同工酶可催化4-甲基伞形酮硫酸盐(4-MUS), 生成4-甲基伞形酮(4-MU)的生化反应, 通过荧光酶标仪检测4-MU的荧光强度, 并根据已知浓度的标准溶液绘制标准曲线, 从而定量检测尿液样本中的ARS及其同工酶的活性, 比较正常人与结直肠癌以及乳腺癌的区别, 来判断良恶性, 已达到筛查肿瘤的目的.

1 材料和方法

1.1 材料 正常对照组59例为北京大学临床肿瘤学院经体检及辅助检查排除各种恶性疾病的健康人员(男14例, 女45例), 年龄30-73(平均年龄43)岁. 肿瘤组132例: 结直结肠22例(男12例, 女10例), 年龄44-80(平均年龄63)岁; 乳腺肠癌110例, 年龄28-78(平均年龄51)岁, 均为北京大学临床肿瘤学院门诊和住院患者, 肿瘤手术后标本均经病理证实. ARS检测试剂盒北京雅康博生物科技有限公司提供, 通过荧光酶标仪检测. CEA, CA199, CA72.4, CA153试剂盒购自德国罗氏公司. CA242试剂盒购自瑞典康乃格公司. 550酶标仪购自BIO-RAD公司.

表 1 191例尿液标本芳香基硫酸酯酶的检测

分组	n	阳性n(%)	酶活力平均值(IU/L)
正常人	59	5(8.4)	0.15630
结直肠癌	22	15(68.2)	0.37355
乳腺癌	110	61(55.5)	0.34150

1.2 方法

1.2.1 标本要求及检测: 尿液样本, 必须采用晨尿, 若有杂质, 可室温3000 r/min离心10 min, 去除杂质. 先将试剂盒、质控品、尿液样本及所有试剂必须摇匀但不能起泡. 用微量取液器吸取40 μL尿液、质控品、零控制液R4至EP管中, 再加入40 μL沉淀剂R5, 混匀, 4℃放置5 min(注意在不同的样本间更换吸头). 室温下, 3000 r/min离心5 min. 用微量取液器尽量吸尽上清后, 向管中加入40 μL底物制剂R2, 混匀, 不要残留结块(可用手指轻弹管底), 37℃温育30-40 min, 反应时间记为T. 迅速将反应管置于冰上, 加入200 μL终止液R3, 混匀. 将反应管于室温下, 6000-8000 r/min离心1 min. 分别吸取200 μL反应后的尿液样本上清、质控品上清、零控制液R4上清, 逐一加入荧光酶标仪的酶标板(酶标板在加入待测样本前应洁净无杂质, 无积液). 用荧光酶标仪进行荧光测定: 365 nm激发, 3 s内记录445 nm发射光数值. 其中待测尿液样本、质控品的读数记为Ai, 零控制液R4的读数记为A0. 绘制标准曲线: 用荧光酶标仪分别对4个标准溶液(B1-B4)进行荧光测定, 365 nm激发, 3 s内记录450 nm发射光数值, 分别记为B1, B2, B3, B4. 质控品的酶活力值在允许数值范围内, 本次试验有效. 参考值: 酶活力≤0.300 U/L, 样本为阴性; 酶活力>0.300 U/L, 样本为阳性.

1.2.2 肿瘤标志物CEA, CA153, CA199, CA72.4检测: 空腹取血2 mL经4000 r/min离心10 min, 取上清血清用双抗体夹心法在罗氏E170全自动免疫分析仪采用电化学发光方法按标准程序检测. 肿瘤标志检测结果判断, CEA>5 μg/L, CA153>25 kU/L, CA199>37.0 kU/L, CA72.4>6.7 kU/L为阳性.

1.2.3 肿瘤标志物CA242检测: 空腹取血2 mL经4000 r/min离心10 min, 取上清血清, 分别加入标准品和患者血清, 孵育后洗涤然后加入抗体后再

■相关报道
近年来, 结肠癌的发病率不断上升, 已由恶性肿瘤的第4位上升到第3位, 发达国家如美国估计大肠癌死亡人数56 290人, 占全年癌症死亡总数的9.9%, 仅次于肺及气管癌而位居第2位.

■应用要点
芳香基硫酸酯酶活性对结直肠癌和乳腺癌筛查具有一定的价值, 但与常规肿瘤标志检测结果不直接相关.

表 2 患者肿瘤标志物的检测及与芳香基硫酸酯酶活力的关系

	结直肠癌				乳腺癌	
	CEA	CA199	CA72.4	CA242	CEA	CA153
*r*值	−0.213	−0.386	−0.052	−0.414	−0.045	0.063
*P*值	0.177	0.042	0.412	0.031	0.319	0.225

洗涤, 最后加入底物450 nm比色, 采用酶联免疫法方法(ELISA), 通过标准曲线, 获得样品数值. CA242试剂盒购自瑞典康乃格公司, 采用ELISA标准程序检测, 通过BIO-RAD公司550酶标仪检测*A*值, 进行比计较分析. CA242>20 kU/L为阳性.

统计学处理 计量资料采用SPSS11.5统计软件对临床数据进行统计学分析, 采用独立样本*t*检验.

2 结果

2.1 芳香基硫酸酯酶的检测 与正常人组比较, 乳腺癌和结直肠癌患者尿液中芳香基硫酸酯酶阳性百分比及酶活力增高, 差异有统计学意义(t = 10.266, 5.735, df = 109, 21, 均P<0.05, 表1).

2.2 患者肿瘤标志物的检测及与芳香基硫酸酯酶活力的关系 结直肠癌肿瘤标志的检测结果CEA阳性率为18.2%, CA199阳性率为22.7%, CA72.4阳性率为4.54%, CA242阳性率为13.6%, 结果表明直肠癌相关肿瘤标志物与芳香基硫酸酯酶活力无相关性(P>0.05). 乳腺癌的肿瘤标志物检测结果CEA阳性率为3.03%, CA153阳性率为5.05%, 结果表明乳腺癌相关肿瘤标志物与芳香基硫酸酯酶活力无相关性(P>0.05, 表2).

3 讨论

近年来, 结肠癌的发病率不断上升, 已由恶性肿瘤的第4位上升到第3位, 发达国家如美国估计大肠癌死亡人数56 290人, 占全年癌症死亡总数的9.9%, 仅次于肺及气管癌而位居第2位[6-14]. 另外, 乳腺癌是严重威胁女性健康的恶性肿瘤. 在美国, 每8位女性中会有1位患乳腺癌[15-20]. 随着人民生活水平的不断提高, 我国乳腺癌发病率也呈逐年上升趋势, 年增长率达到2%, 在城市, 乳腺癌已成为女性最常见的恶性肿瘤. 因此, 乳腺癌的早期诊断对改善患者预后和提高治愈率意义重大[21]. 所以早诊断, 早治疗对改善患者的预后就意义重大. 随着社会的进步和人民生活水平的提高, 人们对健康的需求与渴望越来越高, 医疗消费者的需求心理也随之发生变化, 人们对健康有了新的追求和目标, 不再是因病就医. “有病没病先查查, 有病早治, 没病早防”, 已经成为越来越多人的健康理念, “健康体检”已经成为一种健康消费形式[22]. 虽然目前对恶性肿瘤的检测手段多种多样, 但都存在着局限性[1], 如结肠镜检查, 乳腺影像学检查确等等虽然直观准, 但是操作复杂, 存在技术难度, 不利于大规模普查, 还有一些肿瘤标志物的检测, 如AFP、CEA、VCA-IgA、CA199、CA153, CA72.4, CA242等, 虽然检测的灵敏度好, 但检测范围不够广, 不适于肿瘤筛查[1].

以往对于乳腺癌和结直肠癌的检测研究中尝试了许多检测的方法[23-26], 同时多年来也对出尿液的检测开始了探讨[27-30]. 由于检测患者尿液方便、简单, 无需特殊仪器, 无创伤, 易被患者接受, 有利于大规模地进行普查筛选[30]. 本文中ARS试剂盒的检测原理是ARS及其同工酶能水解芳香族的硫酸酯类, 与机体解毒功能有关. 研究表明尿中ARS活性升高多与恶性肿瘤有关[2-5]. 因此ARS检测试剂盒通过一个生化反应, 利用样本中ARS及其同工酶催化试剂盒中4-MUS, 生成4-MU, 再利用荧光酶标仪检测4-MU的荧光强度, 并根据已知浓度的标准溶液绘制标准曲线, 从而定量检测尿液样本中的ARS及其同工酶的活性. 本文对119例标本的检测结果显示: 结直肠癌的酶活力的平均数为0.373 U/L, 阳性率为68.2%; 乳腺癌的酶活力的平均数为0.342 U/L, 阳性率为55.5%; 正常人的酶活力的平均数为0.156 U/L, 阳性率为8.4%, 与正常人组比较, 乳腺癌和结直肠癌患者尿液中芳香基硫酸酯酶阳性百分比及酶活力增高, 差异有统计学意义(t = 10.266, 5.735, df = 109, 21, 均P<0.05). 结直肠癌肿瘤标志的检测结果CEA阳性率为18.2%, CA199阳性率为22.7%, CA72.4阳性率为4.54%, CA242阳性率为13.6%, 结果表明直肠癌相关肿瘤标志物与芳香基硫酸酯酶活力无相关性(P>0.05). 乳腺癌的肿瘤标志物检测结果CEA阳性率为3.03%, CA153阳性率为5.05%, 结果表明乳腺癌相关肿瘤标志物与芳香基硫酸酯酶活

力无相关性(P>0.05). 结合本试验可以认为结直肠癌患者、乳腺癌患者尿液中平均ARS活力高于正常人. 可见ARS检测试剂盒对结直肠恶性肿瘤、乳腺恶性肿瘤的筛查具有一定的价值. 同时也可弥补肿瘤标志检测的一些不足, 其操作简便, 患者标本留取方便, 适合于结直肠恶性肿瘤、乳腺恶性肿瘤体检筛查和辅助诊断. 但是本试验中的可能出现某些假阳性或假阴性可疑病例, 对待这些病例, 要进步检查, 应严密随访、定期复查, 减少漏诊或误诊.

总之, ARS检测试剂盒对结直肠恶性肿瘤、乳腺恶性肿瘤的筛查具有一定的价值. 有望通过进一步的研究用于癌症患者的初步筛查.

4 参考文献

1 王凤丽, 陈健, 张朵, 陈再连. 施瑞癌症快速尿检测定及其临床应用价值. 四川肿瘤防治 1999; 12: 26
2 王坤, 施前. 实用诊断酶学. 第2版. 上海: 上海医科大学出版社, 2000; 376
3 候振江, 陈立新. 芳香基硫酸酯酶及其同工酶与临床. 医学检验进修杂志 2001; 8: 32
4 陈铁河, 曾坤荣, 王兰金, 朱炳钗, 郑家富. 晨尿芳香基硫酸酯酶B活性检测的临床应用. 临床检验杂志 1996; 14: 24
5 陈铁河, 曾坤荣, 王兰金, 朱炳钗. 沉淀法分离尿中芳香基硫酸酯酶及其活性测定. 临床检验杂志 1995; 13: 17
6 Steinert R, Buschmann T, van der Linden M, Fels LM, Lippert H, Reymond MA. The role of proteomics in the diagnosis and outcome prediction in colorectal cancer. *Technol Cancer Res Treat* 2002; 1: 297-304
7 Price AS. Primary and secondary prevention of colorectal cancer. *Gastroenterol Nurs* 2003; 26: 73-81
8 Hendon SE, DiPalma JA. U.S. practices for colon cancer screening. *Keio J Med* 2005; 54: 179-183
9 Parkin DM. Global cancer statistics in the year 2000. *Lancet Oncol* 2001; 2: 533-543
10 Jemal A, Murray T, Ward E, Samuels A, Tiwari RC, Ghafoor A, Feuer EJ, Thun MJ. Cancer statistics, 2005. *CA Cancer J Clin* 2005; 55: 10-30
11 吴晖, 董叶. 结肠癌早期诊断的研究. 实用临床医学 2006; 7: 153-154
12 许哲, 黎介寿. 结直肠癌的筛查. 中国癌症杂志 2006; 16: 75-77
13 张渊智, 李世荣. 大肠癌早期诊断新技术. 世界华人消化杂志 2004; 12: 1202-1206
14 黄慧峰, 杜芳腾. 早期结肠癌诊断的进展. 实用临床医学 2008; 9: 134-135, 138
15 Otto SJ, Fracheboud J, Looman CW, Broeders MJ, Boer R, Hendriks JH, Verbeek AL, de Koning HJ; National Evaluation Team for Breast Cancer Screening. Initiation of population-based mammography screening in Dutch municipalities and effect on breast-cancer mortality: a systematic review. *Lancet* 2003; 361: 1411-1417
16 Swami S, Raghavachari N, Muller UR, Bao YP, Feldman D. Vitamin D growth inhibition of breast cancer cells: gene expression patterns assessed by cDNA microarray. *Breast Cancer Res Treat* 2003; 80: 49-62
17 Baum M. The changing face of breast cancer--past, present and future perspectives. *Breast Cancer Res Treat* 2002; 75 Suppl 1: S1-S5; discussion S33-S35
18 侯振江, 张宗英. 乳腺肿瘤标志物研究进展. 医学综述 2008; 14: 224-226
19 张铁, 付斌, 尹子毅, 王丕琳. 早期乳腺癌临床诊断分析. 武警医学 2008; 19: 51-52
20 杨新红, 王文敬. 乳腺癌肿瘤标志物−乳腺球蛋白的研究进展. 现代医学仪器与应用 2008; 20: 21-23
21 吕大鹏, 徐光炜. 乳腺癌普查的国内外进展. 中国实用外科杂志 2006; 26: 68-70
22 陶红. 建立肿瘤专科健康体检中心的设想之我见. 现代医院管理 2006; 3: 32
23 王继恒, 李世荣. 我国结直肠癌筛查和早期诊断十年回顾: 1994-2005. 胃肠病学 2006; 11: 245-250
24 占强, 严洁, 蒋志阳, 司进, 陈涛, 郭继中, 陶国清. 粪便P53基因突变检测在结直肠癌诊断中的应用. 中华内科杂志 2004; 43: 502-505
25 钱海英. 肿瘤标志物CA153、CA125、CEA联合检测在乳腺癌中的临床应用. 医学检验与临床 2008; 19: 32-33
26 刘亚萍, 马南花, 陆雪秋. 乳腺癌患者血清肿瘤标志物检测的临床价值. 吉林医学 2008; 29: 1235-1237
27 陈昌南, 黄活勋, 潘岐作, 苏铭俊, 林云笑, 黄小兵, 杨劲松. URC测试对消化道恶性肿瘤根治术后复发监测的临意义. 现代肿瘤医学 2006; 14: 1581-1582
28 吴怡春, 徐笑红, 张剑英, 王胜. 癌症尿液筛查监测试剂临床应用分析. 实验与检验医学 2008; 26: 332
29 申哲洙, 顾晋, 赵伟, 张志谦. 妇女尿中MMP-9及MMP9-NGAL复合物的表达对筛查早期乳腺癌病人的临床意义. 内分泌外科杂志 2008; 2: 13-16, 22
30 申哲洙, 顾晋, 赵威, 张志谦. 尿液中MMP-2、MMP-9及MMP-9/NGAL复合物的表达在乳腺癌筛查中的意义. 首都医科大学学报 2008; 29: 395-398

■同行评价

本文内容较新, 设计与推理都较合理, 提供了有价值的信息, 但尚属初步研究, 其准确率与灵敏度等尚需进一步探讨.

编辑 李军亮 电编 何基才

• 致谢 •

致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

陈积圣 教授
中山大学孙逸仙纪念医院肝胆外科

陈立波 副教授
华中科技大学同济医学院附属协和医院肝胆外科中心

陈亚军 主任医师
首都医科大学附属北京儿童医院普外科

程爱国 教授
华北煤炭医学院临床医学系

程英升 教授
同济大学附属第十人民医院影像临床医学中心

杜祥 教授
复旦大学附属肿瘤医院病理科

葛海燕 教授
同济大学附属第十人民医院普通外科

巩鹏 教授
大连医科大学附属第一医院普外二科

谷俊朝 主任医师
首都医科大学附属北京友谊医院普外科

黄恒青 主任医师
福建省第二人民医院消化内科

李军祥 教授
北京中医药大学附属东方医院消化内科

潘兴华 副主任医师
中国人民解放军成都军区昆明总医院病理实验科

钱林学 教授
首都医科大学附属北京友谊医院内科

邱伟华 副主任医师
上海交通大学医学院附属瑞金医院普外科

施瑞华 教授
南京医科大学第一附属医院消化科

孙学英 教授
哈尔滨医科大学第一附属医院黑龙江省肝脾外科中心

邰升 副教授
哈尔滨医科大学附属二院肝胆外科

谭德明 教授
中南大学湘雅医院感染病科

唐文富 副主任医师
四川大学华西医院中西医结合科

汪波 副主任医师
北京大学第一医院急诊科

王炳元 教授
中国医科大学附属第一医院消化内科

王文跃 主任医师
中日友好医院普通外科

王怡 主任医师
天津市传染病医院 天津市肝病研究所

王振宁 教授
中国医科大学附属第一医院肿瘤外科

王正康 教授
北京中日友好医院普外科

魏经国 教授
中国人民解放军第四军医大学唐都医院放射科

宣世英 教授
山东省青岛市市立医院肝病内科

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

张国梁 主任医师
天津市第一中心医院消化内科