

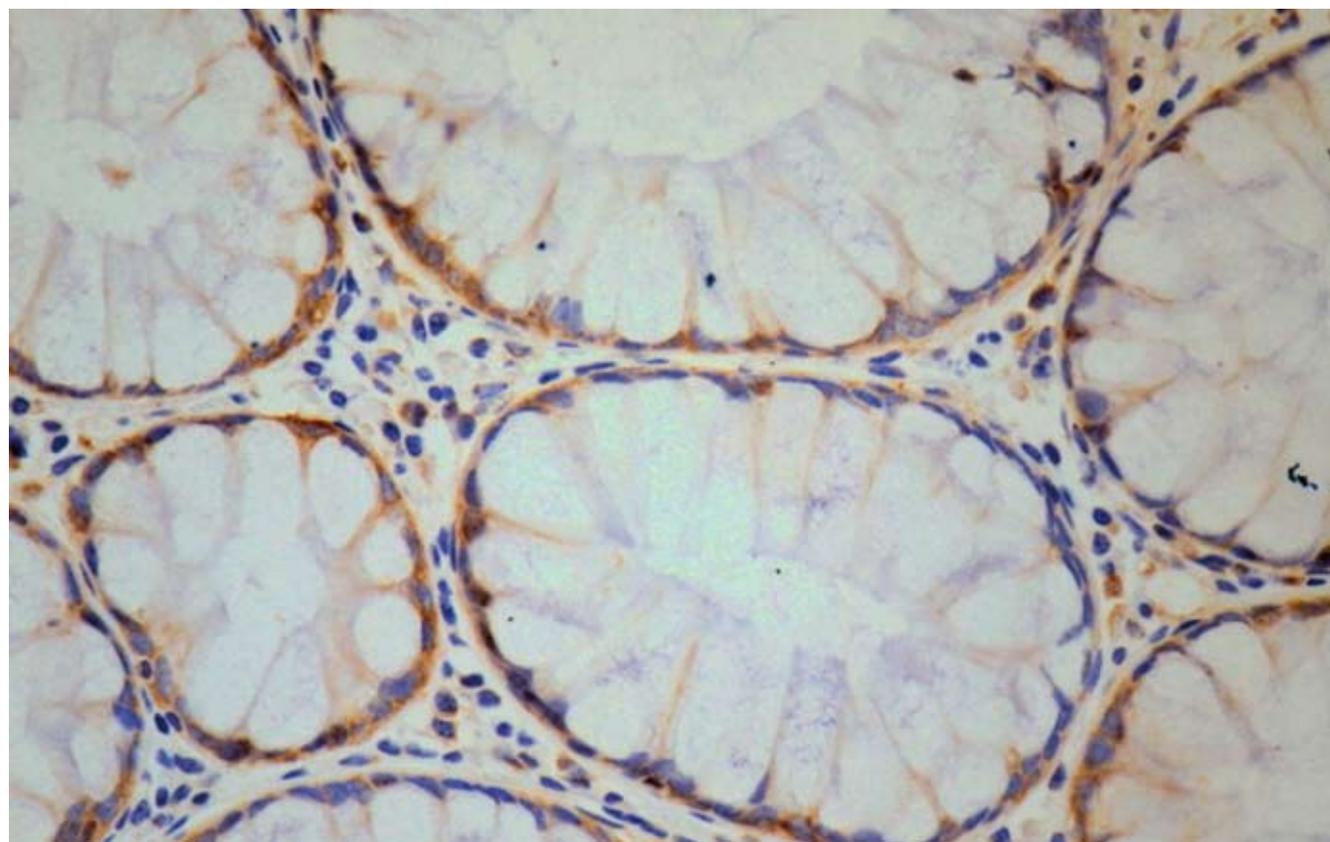
ISSN 1009-3079 (print)  
ISSN 2219-2859 (online)  
CN 14-1260/R

# 世界华人消化杂志®

## WORLD CHINESE JOURNAL OF DIGESTOLOGY

### Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

2012年3月18日 第20卷 第8期 (Volume 20 Number 8)



## 8/2012

ISSN 1009-3079



9 771009 307056

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

# 世界华人消化杂志®

## 编辑委员会

2012-01-01/2014-12-31

wcjd@wjgnet.com www.wjgnet.com

### 总顾问

陈可冀教授  
黄志强教授  
纪小龙教授  
王宝恩教授  
王苑本教授  
杨春波教授  
杨思凤教授  
姚希贤教授  
张万岱教授  
周学文教授

### 名誉主编

潘伯荣教授

### 主编

程英升教授  
党双锁教授  
江学良教授  
刘连新教授  
刘占举教授  
吕宾教授  
马大烈教授  
王小众教授  
张宗明教授  
姚登福教授

### 编委

#### 消化内科学

白爱平副教授  
陈国忠主任医师  
陈洪副教授  
陈其奎教授  
陈卫昌教授  
陈贻胜教授  
程斌教授  
迟宝荣教授  
崔立红教授  
丁士刚教授  
董蕾教授  
杜雅菊主任医师  
杜奕奇副教授  
樊晓明教授  
房静远教授  
冯志杰主任医师  
傅春彬主任医师  
戈之铮教授  
关玉盘教授  
关晓辉主任医师  
郭晓钟教授  
郝建宇教授  
何松教授

洪天配教授  
黄培林教授  
黄晓东主任医师  
黄颖秋教授  
黄缘教授  
季国忠教授  
江米足教授  
姜春萌教授  
姜慧卿教授  
姜相君主任医师  
金瑞教授  
蓝宇教授  
李淑德教授  
李瑜元教授  
李玉民教授

廖家智副主任医师

林志辉教授  
刘冰熔教授  
刘凤斌教授  
刘改芳主任医师  
刘海峰主任医师  
刘海林主任医师  
陆伦根教授  
马红主任医师  
马欣主任医师  
毛高平教授  
孟庆华教授  
倪润洲教授  
欧希龙副教授  
潘秀珍教授  
朴云峰教授  
秦成勇教授  
任粉玉教授  
任建林教授  
邵先玉教授  
沈琳主任医师  
沈薇教授  
施瑞华教授  
宋军副教授  
唐世刚教授  
田宇彬教授  
宛新建副教授  
王邦茂教授  
王炳元教授  
王承党教授  
王江滨教授  
王俊平教授  
王晓艳副教授  
夏冰教授  
夏时海副教授  
徐可树教授  
杨建民教授

姚树坤教授  
张国梁主任医师  
张军教授  
张小晋主任医师  
张筱茵副教授  
张志坚教授  
郑培永副教授  
郑鹏远教授  
郑素军副主任医师  
周国雄主任医师  
周宇教授  
邹晓平主任医师  
诸琦教授  
于珮主任医师

#### 消化外科学

白雪巍副主任医师  
蔡开琳副教授  
蔡三军主任医师  
曹杰主任医师  
陈光教授  
陈海龙教授  
陈积圣教授  
陈进宏副主任医师  
陈凜教授  
陈汝福教授  
陈亚军主任医师  
陈钟教授  
程爱国教授  
程树群副教授  
崔云甫教授  
戴朝六教授  
戴冬秋教授  
丁义涛教授  
杜顺达副教授  
房林教授  
傅红副教授  
傅华群教授  
傅志仁主任医师  
高毅主任医师  
葛海燕教授  
巩鹏副教授  
谷俊朝主任医师  
顾国利副主任医师  
顾岩教授  
韩天权教授  
郝纯毅主任医师  
郝立强副教授  
何超教授  
何晓顺教授  
何裕隆教授  
黄志勇教授

季加孚教授  
莫卫东教授  
姜波健教授  
金山主任医师  
黎乐群教授  
李革副教授  
李国威教授  
李华副教授  
李华山主任医师  
李胜研究员  
李涛副主任医师  
李文岗教授  
李旭副教授  
李永翔教授  
李志霞教授  
李宗芳教授  
梁力建教授  
刘宝林教授  
刘超教授  
刘建教授  
刘颖斌主任医师  
陆云飞教授  
禄韶英副教授  
吕云福教授  
齐清会教授  
秦春宏副主任医师  
秦华东教授  
秦环龙教授  
秦建民主任医师  
邱伟华主任医师  
仇毓东教授  
单云峰副主任医师  
沈柏用副教授  
施宝民教授  
施诚仁教授  
施晓雷副主任医师  
石毓君副研究员  
宋振顺教授  
孙诚谊教授  
孙学英教授  
邵升副教授  
谭晓冬教授  
汤朝晖副主任医师  
汤绍涛教授  
唐南洪教授  
田晓峰教授  
汪波主任医师  
汪根树副教授  
王德盛副主任医师  
王凤山教授  
王健生教授  
王蒙副教授

王石林主任医师  
王文跃主任医师  
王悦华副主任医师  
王振宁教授  
王正康教授  
王志刚副主任医师  
王忠裕教授  
吴泰璜教授  
伍晓汀教授  
谢敏主任医师  
徐迅迪教授  
徐泱副主任医师  
许戈良教授  
许剑民教授  
薛东波教授  
杨柏霖副主任医师  
杨桦教授  
杨家和主任医师  
杨银学教授  
殷正丰教授  
于聪慧教授  
于则利教授  
禹正杨副教授  
张必翔主任医师  
张宏伟教授  
张佳林教授  
张进祥副教授  
张俊副研究员  
张力为副教授  
赵刚副教授  
智绪亭教授  
周伟平教授  
邹小明教授

#### 消化感染病学

陈国凤主任医师  
陈红松研究员  
陈建杰教授  
陈志辉副主任医师  
丁惠国教授  
范建高教授  
范小玲主任医师  
范学工教授  
高润平教授  
高泽立副教授  
龚国忠教授  
管世鹤副教授  
胡国信主任医师  
靳雪源主任医师  
刘正稳教授  
钱林学主任医师

# 世界华人消化杂志®

## 编辑委员会

孙殿兴主任医师  
谭德明教授  
汤华研究员  
王凯教授  
王怡主任医师  
吴君主任医师  
宣世英教授  
杨江华副教授  
姚鹏副教授  
张明辉副主任医师  
张占卿主任医师  
赵桂鸣主任医师  
赵秀英副教授  
周霞秋教授  
朱传武教授  
庄林主任医师

### 消化中医学

陈治水主任医师  
杜群研究员  
黄恒青主任医师  
李军祥教授  
李康副教授  
李晓波教授  
李勇副教授  
李振华教授  
刘成海研究员

刘绍能主任医师  
南极星教授  
牛英才研究员  
王富春教授  
邢建峰副教授  
徐列明教授  
许玲教授  
徐庆教授  
袁红霞研究员  
张声生教授

### 消化肿瘤学

曹秀峰教授  
曹志成院士  
代智副研究员  
李瑗教授  
刘宝瑞教授  
刘平教授  
刘云鹏教授  
沈克平主任医师  
王阁教授  
向德兵副教授  
肖文华主任医师  
谢丹教授  
张凤春教授

### 消化影像学

白彬主任医师

官泳松教授  
胡红杰主任医师  
李健丁教授  
龙学颖副主任医师  
倪才方教授  
魏经国教授  
肖恩华教授  
徐辉雄教授  
严惟力副教授  
赵卫主任医师

### 消化内镜及介入治疗学

郝俊鸣副主任医师  
茅爱武教授  
孙明军教授  
万军教授  
袁友红副教授

### 消化中西医结合学

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

### 消化基础研究

曹洁副教授  
曹鹏副研究员

陈敬贤教授  
陈志龙教授  
崔莲花副教授  
樊红教授  
高国全教授  
高英堂研究员  
管冬元副教授  
何敏教授  
黄昆教授  
黄文林教授

黄园教授  
李刚教授  
李君文研究员  
李增山副教授  
刘克辛教授  
刘森副教授  
任超世研究员  
任浩副教授  
任晓峰副教授  
台桂香教授  
谭学瑞教授  
田文静副教授  
汪思应教授  
王钦红教授  
魏继福研究员  
吴道澄教授  
吴军研究员

吴俊华副教授  
徐宁志研究员  
许文燮教授  
阴赅宏研究员  
郁卫东副研究员  
喻荣彬教授  
周南进研究员  
周素芳教授  
周晓武副主任医师

### 消化病理学

杜祥教授  
季菊玲副教授  
李淳副教授  
李晟磊副主任医师  
刘丽江教授  
刘勇钢副主任医师  
门秀丽教授  
潘兴华副主任医师  
王鲁平主任医师  
王娅兰教授  
颜宏利副教授  
于颖彦教授  
余宏宇教授  
张锦生教授  
赵春玲副教授  
朱亮副教授

# 世界华人消化杂志

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

● 目 次 ● 2012年3月18日 第20卷 第8期 (总第376期)

基础研究	631 Nesfatin-1对肥胖大鼠胃排空及胃平滑肌条收缩性的影响 李娜, 田宇彬, 孙桂荣, 魏良洲, 徐璐, 王百惠, 孔心涓, 丁雪丽, 崔铭娟 638 慢病毒介导HBV X基因稳定表达HepG2细胞系的建立 余桂芳, 严跃红, 王瑞鑫, 李显波, 曾文铤, 朱科伦 644 Survivin对人胆管癌细胞凋亡相关信号通路的作用机制 卢昕, 肖新波
文献综述	649 化疗致胃肠道黏膜炎动物模型构建方法的研究进展 张敏, 陈锦秀, 谭景予, 刘贤亮 656 肠道屏障功能在非酒精性脂肪性肝病发病机制中的作用 戴鑫, 吕宗舜 662 炎症性肠病肝胆并发症的研究进展 牛国超, 刘蕾, 张晓岚
研究快报	670 内源性硫化氢对肝硬化大鼠肝细胞凋亡的影响 刘浩, 郑勇, 陈卫刚, 赵瑾, 李睿, 张宁, 刘芳, 阎继攀 675 帕瑞昔布对胰腺癌细胞株BxPC-3、AsPC-1的增殖凋亡及其机制 李鹏, 刘江伟, 许永华, 朱淑萍, 郭飞, 董翔 680 PRL-3基因对结直肠癌细胞增殖能力的影响 柳玉红, 温寿青, 陈蕾, 邱立, 汪春福, 曹亚平, 邹桂华
临床经验	685 原发性胆汁反流性胃炎与胃食管反流病的关系 刘芳, 姚萍 690 MTHFR基因多态性与胃癌的相关性 郭威, 陈萍, 郑立红, 李松 694 肿块型肝内胆管细胞癌: 多排CT的动脉期强化与临床病理的相关性 周建雄, 戴洪修, 杨静 699 结肠脂肪瘤6例 田新社, 张慧松 703 YB-1和P53蛋白在结直肠肿瘤中的表达及意义 刘露露, 房新志, 郭云泉, 王晓璐, 杨丽丽 708 老年急腹症外科治疗97例 王渭滨, 司海流, 张勇, 郭晓军, 郑政, 李旭虎
病例报告	712 胃癌前列腺转移1例 陈颖, 金波, 刘云鹏

<b>附 录</b>	714 《世界华人消化杂志》投稿须知 719 2012年国内国际会议预告
<b>志 谢</b>	720 志谢世界华人消化杂志编委
<b>消 息</b>	637 《世界华人消化杂志》外文字符标准 661 <i>WJG</i> 成功通过评审被PMC收录 669 《世界华人消化杂志》性质、刊登内容及目标 674 <i>WJG</i> 总被引频次排名位于第174名 679 《世界华人消化杂志》正文要求 684 2011年度《世界华人消化杂志》发文情况 689 《世界华人消化杂志》被评为中国精品科技期刊 693 《世界华人消化杂志》栏目设置 698 《世界华人消化杂志》参考文献要求 702 中国科技信息研究所发布《世界华人消化杂志》影响因子0.694 711 《世界华人消化杂志》2011年开始不再收取审稿费
<b>封面故事</b>	刘露露, 房新志, 郭云泉, 王晓璐, 杨丽丽. YB-1和P53蛋白在结直肠肿瘤中的表达及意义. 世界华人消化杂志 2012; 20(8): 703-707 <a href="http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/703.asp">http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/703.asp</a>
<b>本期责任人</b>	编务 周媛; 送审编辑 李军亮, 张姗姗; 组版编辑 鲁亚静; 英文编辑 王天奇; 责任编辑 张姗姗; 形式规范审核编辑部主任 李军亮; 最终清样审核总编辑 马连生

# 世界华人消化杂志

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 2012-03-18

原刊名 新消化病学杂志

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 太原消化病研究中心

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: [wjcd@wjgnet.com](mailto:wjcd@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: [wjcd@wjgnet.com](mailto:wjcd@wjgnet.com)

<http://www.wjgnet.com>

主编

程英升, 教授, 200072, 上海市, 同济大学附属第十人民医院影像临床医学中心

党双锁, 教授, 710004, 陕西省西安市, 西安交通大学医学院第二附属医院感染科

江学良, 教授, 250031, 山东省济南市, 中国人民解放军济南军区总医院消化科

刘连新, 教授, 150001, 黑龙江省哈尔滨市, 哈尔滨医科大学第一临床医学院普外科

刘占举, 教授, 200072, 上海市, 同济大学附属第十人民医院胃肠内科

吕兵, 教授, 310006, 浙江省杭州市, 浙江中医药大学附属医院(浙江省中医院)消化科

马大烈, 教授, 200433, 上海市, 中国人民解放军第二军医大学附属长海医院病理科

王小众, 教授, 350001, 福建省福州市, 福建医科大学附属医院协和医院消化内科

姚登福, 教授, 226001, 江苏省南通市, 南通大学附属医院临床医学研究中心

张宗明, 教授, 100016, 北京市, 清华大学第一附属医院消化医学中心

编辑部主任 李军亮

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

《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://www.baishideng.com/wjcd/ch/index.aspx>), 所有办公流程一律可以在线进行, 包括投稿、审稿、编辑、审读, 以及作者、读者、编者之间的信息反馈交流。

**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。

2012年版权归世界华人消化杂志所有

# World Chinese Journal of Digestology

## March 2012 Contents in Brief Volume 20 Number 8

<b>BASIC RESEARCH</b>	<p>631 Effect of Nesfatin-1 on gastric emptying and contraction of gastric smooth muscle strips in obese rats <i>Li N, Tian ZB, Sun GR, Wei LZ, Xu L, Wang BH, Kong XJ, Ding XL, Cui MJ</i></p> <p>638 Establishment of a HepG2 cell line stably transduced with a lentivirus expressing the HBV X gene <i>Yu GF, Yan YH, Wang RX, Li XB, Zeng WT, Zhu KL</i></p> <p>644 Investigation of mechanisms underlying inhibition of apoptosis-related signaling inhibited by survivin in human cholangiocarcinoma cells <i>Xin Lu, Xin-Bo Xiao</i></p>
<b>REVIEW</b>	<p>649 Progress towards the development of animal models of chemotherapy-induced gastrointestinal mucositis <i>Zhang M, Chen JX, Tan JY, Liu XL</i></p> <p>656 Role of gut barrier function in the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease <i>Dai X, Lv ZS</i></p> <p>662 Hepatobiliary complications of inflammatory bowel disease <i>Niu GC, Liu L, Zhang XL</i></p>
<b>RAPID COMMUNICATION</b>	<p>670 Effect of endogenous hydrogen sulfide on apoptosis of cirrhosis rat liver cells <i>Liu H, Zheng Y, Chen WG, Zhao J, Li R, Zhang N, Liu F, Yan JP</i></p> <p>675 Parecoxib inhibits cell proliferation and induces apoptosis in human pancreatic cancer cell lines BxPC-3 and AsPC-1 <i>Li P, Liu JW, Xu YH, Zhu SP, Guo F, Dong X</i></p> <p>680 Role of the PRL-3 gene in the proliferation of human colon cancer SW480 cells <i>Liu YH, Wen SQ, Chen L, Qiu L, Wang CF, Cao YP, Zou GH</i></p>
<b>CLINICAL PRACTICE</b>	<p>685 Relationship between primary bile gastritis and gastroesophageal reflux disease <i>Liu F, Yao P</i></p> <p>690 Association between methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphisms (C677T and G1793A) and risk of gastric cancer <i>Guo W, Chen P, Zheng LH, Li S</i></p> <p>694 Correlation between CT arterial enhancement patterns and clinicopathologic findings for intrahepatic mass-forming cholangiocarcinomas <i>Zhou JX, Dai HX, Yang J</i></p> <p>699 Colonic lipoma: an analysis of six cases <i>Tian XS, Zhang HS</i></p> <p>703 Clinical significance of expression of YB-1 and P53 in colorectal tumors <i>Liu LL, Fang XZ, Guo YQ, Wang XL, Yang LL</i></p> <p>708 Surgical treatment of acute abdomen in geriatric patients: an analysis of 97 cases <i>Wang WB, Si HL, Zhang Y, Guo XJ, Zheng Z, Li XH</i></p>
<b>CASE REPORT</b>	<p>712 Prostate metastasis derived from gastric tumor: a report of one case <i>Chen Y, Jin B, Liu YP</i></p>

<b>APPENDIX</b>	714 Instructions to authors of <i>World Chinese Journal of Digestology</i> 719 Meeting events calendar in 2012
<b>ACKNOWLEDGMENT</b>	720 Acknowledgments to reviewers of <i>World Chinese Journal of Digestology</i>
<b>COVER</b>	<i>Liu LL, Fang XZ, Guo YQ, Wang XL, Yang LL.</i> Clinical significance of expression of YB-1 and P53 in colorectal tumors. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2012; 20(8): 703-707 <a href="http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/703.asp">http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/703.asp</a>
<b>RESPONSIBLE EDITORS FOR THIS ISSUE</b>	Assistant Editor: <i>Yuan Zhou</i> Review Editor: <i>Jun-Liang Li, Shan-Shan Zhang</i> Electronic Page Editor: <i>Ya-Jing Lu</i> English Language Editor: <i>Tian-Qi Wang</i> Editor-in-Charge: <i>Shan-Shan Zhang</i> Proof Editor: <i>Jun-Liang Li</i> Layout Editor: <i>Lian-Sheng Ma</i>

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

### Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

**Founded** on January 15, 1993  
**Renamed** on January 25, 1998  
**Publication date** March 18, 2012

**NAME OF JOURNAL**  
*World Chinese Journal of Digestology*

**RESPONSIBLE INSTITUTION**  
Department of Science and Technology  
of Shanxi Province

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

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

**PRINTING**  
Beijing Kexin Printing House

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

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

### EDITOR-IN-CHIEF

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

**Shuang-Suo Dang, Professor**, Department of Infectious Diseases, the Second Affiliated Hospital of Medical School of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710004, Shaanxi Province, China

**Xue-Liang Jiang, Professor**, Department of Gastroenterology, General Hospital of Jinan Military Command of Chinese PLA, Jinan 250031, Shandong Province, China

**Lian-Xin Liu, Professor**, Department of General Surgery, the First Clinical Medical College of Harbin Medical University, Harbin 150001, Heilongjiang Province, China  
**Zhan-Ju Liu, Professor**, Department of Gastroenterology, Shanghai Tenth People's Hospital, Tongji University, Shanghai 200072, China

**Bin Lv, Professor**, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310006, Zhejiang Province, China

**Da-Lie Ma, Professor**, Department of Pathology, Changhai Hospital, the Second Military Medical University of Chinese PLA, Shanghai 200433, China

**Xiao-Zhong Wang, Professor**, Department of Gastroenterology, Union Hospital, Fujian Medical University, Fuzhou 350001, Fujian Province, China

**Deng-Fu Yao, Professor**, Clinical Research Center, Affiliated Hospital of Nantong University, Nantong 226001, Jiangsu Province, China

**Zong-Ming Zhang, Professor**, Department of General Surgery, Digestive Medical Center, the First Affiliated Hospital, School of Medicine, Tsinghua University, Beijing 100016, China

### SCIENCE EDITORS

Director: Jun-Liang Li

### SUBSCRIPTION

RMB 68 Yuan for each issue  
RMB 2448 Yuan for one year

### CSSN

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

### COPYRIGHT

© 2012 Published by *World Chinese Journal of Digestology (WCJD)*. All rights reserved; no part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise without the prior permission of *WCJD*. Authors are required to grant *WCJD* an exclusive licence to publish.

### SPECIAL STATEMENT

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

### INSTRUCTIONS TO AUTHORS

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

**Copyright © 2012 by Editorial Department of *World Chinese Journal of Digestology***

# Nesfatin-1对肥胖大鼠胃排空及胃平滑肌条收缩性的影响

李娜, 田字彬, 孙桂荣, 魏良洲, 徐璐, 王百惠, 孔心涓, 丁雪丽, 崔铭娟

李娜, 田字彬, 孙桂荣, 魏良洲, 王百惠, 孔心涓, 丁雪丽, 青岛大学医学院附属医院消化内科 山东省青岛市 266003  
徐璐, 青岛大学医学院病理生理学教研室 山东省青岛市 266021  
崔铭娟, 青岛西海岸医疗中心消化内科 山东省青岛市 266555  
李娜, 硕士, 主要从事消化系统胃动力方面的研究。  
国家自然科学基金资助项目, No. 81070305, No. 30470642, No. 30670780, No. 31071014, No. 81100260  
山东省自然科学基金资助项目, No. zr2010hm066  
山东省科技攻关基金资助项目, No. 2008GG10002006  
青岛市科技局基金资助项目, No. 11-2-3-3-(2)-nsh, No. 05-1-JC-93  
山东省卫生厅基金资助项目, No. 2007HZ026, No. 2007-37  
作者贡献分布: 李娜、田字彬、徐璐及王百惠对本文所作贡献均等; 此课题由李娜、田字彬、孙桂荣、魏良洲及徐璐设计; 研究过程、数据分析由李娜、王百惠、丁雪丽及崔铭娟完成; 论文写作由李娜、田字彬、孔心涓及徐璐完成。  
通讯作者: 田字彬, 教授, 主任医师, 266003, 山东省青岛市江苏路16号, 青岛大学医学院附属医院消化内科。  
tianzb@qdmh.qd.sd.cn  
电话: 0532-82911302  
收稿日期: 2011-12-07 修回日期: 2012-01-17  
接受日期: 2012-03-10 在线出版日期: 2012-03-18

## Effect of Nesfatin-1 on gastric emptying and contraction of gastric smooth muscle strips in obese rats

Na Li, Zi-Bin Tian, Gui-Rong Sun, Liang-Zhou Wei, Luo Xu, Bai-Hui Wang, Xin-Juan Kong, Xue-Li Ding, Ming-Juan Cui

Na Li, Zi-Bin Tian, Gui-Rong Sun, Liang-Zhou Wei, Bai-Hui Wang, Xin-Juan Kong, Xue-Li Ding, Department of Gastroenterology, Affiliated Hospital of Qingdao University Medical College, Qingdao 266003, Shandong Province, China  
Luo Xu, Department of Pathophysiology, Qingdao University Medical College, Qingdao 266021, Shandong Province, China  
Ming-Juan Cui, Department of Gastroenterology, Qingdao West Coast Medical Center, Qingdao 266003, Shandong Province, China  
Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 81070305, No. 30470642, No. 30670780, No. 31071014, No. 81100260; the Natural Science Foundation of Shandong Province, No. zr2010hm066; the Scientific and Technological Project of Shandong Province, No. 2008GG10002006; the Foundation of Qingdao Science and Technology Bureau, No. 11-2-3-3-(2)-nsh, No. 05-1-JC-93; the Foundation of Health Department of Shandong Province, No. 2007HZ026, No. 2007-37  
Correspondence to: Zi-Bin Tian, Professor, Department of Gastroenterology, Affiliated Hospital of Qingdao University Medical College, 16 Jiangsu Road, Qingdao 266003, Shandong Province, China. tianzb@qdmh.qd.sd.cn

Received: 2011-12-07 Revised: 2012-01-17  
Accepted: 2012-03-10 Published online: 2012-03-18

## Abstract

**AIM:** To observe the impact of treatment with Nesfatin-1 on gastric emptying and stomach smooth muscle contraction in obese rats.

**METHODS:** Obese rats were fed a high-nutrition diet for 6 weeks, while control rats were fed a normal diet. Different concentrations of Nesfatin-1 (0.5, 5, 50  $\mu\text{mol/L}$ ) were injected into the dorsal vagal complex (DVC). Gastric emptying was then determined, and the spontaneous contraction of isolated circular smooth muscle of gastric fundus and gastric body was recorded. In addition, the impact of different concentrations of Nesfatin-1 (0.026, 0.26, 2.6  $\mu\text{mol/L}$ ) on acetylcholine (ACh)-induced muscle contraction was observed.

**RESULTS:** Various concentrations of Nesfatin-1 significantly inhibited the contraction of gastric smooth muscle strips isolated from both normal and obese rats compared to rats treated with normal saline ( $q = 3.93-15.72$ , all  $P < 0.05$  or  $0.01$ ). Compared to normal rats, low-concentration Nesfatin-1 showed no significant relaxing effect on stomach fundus smooth muscle in obese rats ( $P > 0.05$ ); however, medium and high concentrations of Nesfatin-1 significantly inhibited the contraction of gastric fundus smooth muscle of obese rats ( $t = 2.14, 2.63$ ; both  $P < 0.05$ ). Compared to normal rats, low and medium concentrations of Nesfatin-1 showed no significant relaxing effect on stomach corpus smooth muscle in obese rats (both  $P > 0.05$ ); however, high-concentration Nesfatin-1 significantly inhibited the contraction of gastric corpus smooth muscle of obese rats ( $t = 2.53, P < 0.05$ ).

**CONCLUSION:** Nesfatin-1 inhibits gastric emptying in normal and obese rats and acetylcholine-induced gastric smooth muscle contraction in obese rats in a concentration-dependent manner. The inhibitory effect of Nesfatin-1 is stronger in normal rats than in obese ones.

## ■背景资料

Nesfatin-1是新发现的多肽,他可通过减少摄食、调节能量代谢平衡等减轻大鼠体质量,其对胃排空及平滑肌条收缩亦有影响。

## ■同行评议者

任建林, 教授, 厦门大学附属中山医院消化内科 厦门市消化疾病研究所

## ■ 研发前沿

Nesfatin-1对肥胖大鼠胃动力的影响报道较少, Nesfatin-1对胃排空及离体胃平滑肌条收缩的影响及机制有待进一步研究。

**Key Words:** Nesfatin-1; Obese; Smooth muscle; Gastric emptying; Contraction

Li N, Tian ZB, Sun GR, Wei LZ, Xu L, Wang BH, Kong XJ, Ding XL, Cui MJ. Effect of Nesfatin-1 on gastric emptying and contraction of gastric smooth muscle strips in obese rats. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2012; 20(8): 631-637

## 摘要

**目的:** 观察Nesfatin-1对正常及单纯性肥胖大鼠胃排空及离体胃平滑肌条收缩活性的影响。

**方法:** 高脂饲料喂养♂大鼠6 wk, 制作单纯性肥胖大鼠模型; 正常及肥胖大鼠实验组中枢注入不同浓度Nesfatin-1(0.5 μmol/L、5 μmol/L、50 μmol/L)后测胃排空率; 生理记录仪记录大鼠胃底、胃体平滑肌条自发收缩及不同浓度Nesfatin-1(0.026 μmol/L、0.26 μmol/L、2.6 μmol/L)作用下对乙酰胆碱(Ach)诱导的肌条收缩的影响。

**结果:** Nesfatin-1可抑制正常及肥胖大鼠胃平滑肌条收缩, 低、中、高浓度组与生理盐水对照组相比差异均有统计学意义( $q = 3.93-15.72, P < 0.05-0.01$ )。随Nesfatin-1浓度的增高, 其抑制作用呈明显剂量依赖关系( $q = 3.45-5.69, P < 0.05-0.01$ )。低浓度Nesfatin-1抑制正常大鼠、肥胖大鼠胃底平滑肌条收缩作用无显著性差异( $P > 0.05$ ), 中、高浓度对正常大鼠胃底平滑肌条抑制作用强于肥胖大鼠( $t = 2.14, P < 0.05; t = 2.63, P < 0.05$ )。低、中浓度Nesfatin-1抑制正常大鼠、肥胖大鼠离体胃体平滑肌条收缩作用无显著性差异( $P > 0.05$ ), 但高浓度抑制正常大鼠离体胃体平滑肌条收缩作用显著强于肥胖大鼠( $t = 2.53, P < 0.05$ )。

**结论:** Nesfatin-1可抑制正常及肥胖大鼠胃排空, 胃排空率随Nesfatin-1浓度增加而降低。Nesfatin-1可抑制乙酰胆碱诱导的单纯性肥胖大鼠离体胃平滑肌条的收缩活动, 其抑制作用随Nesfatin-1浓度增高而增强; 相同Nesfatin-1浓度抑制正常大鼠离体平滑肌条收缩作用强于肥胖大鼠。

**关键词:** Nesfatin-1; 肥胖; 平滑肌; 胃排空; 收缩

李娜, 田宇彬, 孙桂荣, 魏良洲, 徐璐, 王百惠, 孔心滢, 丁雪丽, 崔铭娟. Nesfatin-1对肥胖大鼠胃排空及胃平滑肌条收缩性的影响. *世界华人消化杂志* 2012; 20(8): 631-637

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/631.asp>

## 0 引言

肥胖症是高血压病、冠心病、糖尿病等常见疾

病的危险因子, 严重影响现代人的生活质量, 防治肥胖具有非常重要的意义<sup>[1-4]</sup>。大脑对机体能量的调节是通过一系列复杂多样的化学信号分子传递的, 在维持能量平衡中发挥重要作用<sup>[5-8]</sup>。Nesfatin-1是新发现的一种摄食调节肽, 可参与能量代谢, 其前体是NEFA基因编码的420个氨基酸组成的多肽(nucleobindin II, NUCB2), 脑室注射给予Nesfatin-1抑制摄食呈剂量依赖性, 而同时给予其特异性抗体可使摄食量增多<sup>[9]</sup>。研究表明Nesfatin-1有一定的抑制摄食作用, 但是否也具有调节大鼠胃排空的作用目前尚无报道, 本实验观察Nesfatin-1对离体胃平滑肌条收缩的作用及中枢注射Nesfatin-1对正常及肥胖大鼠胃排空的影响, 探讨肥胖状态下Nesfatin-1对胃排空及平滑肌条活性影响的作用机制。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 酚红、三氯乙酸购自国药集团化学试剂有限公司; 氯化乙酰胆碱购自上海三爱思试剂有限公司; Nesfatin-1购自Phoenix Pharmaceuticals, USA; 四道生理记录仪RM6240 BD型及四腔器官浴槽系统购自成都仪器厂。

### 1.2 方法

**1.2.1 动物准备:** 128只♂Wistar大鼠, 体质量在100-120 g(青岛药检所提供), 随机各分成8个正常饲料组及模型组。正常组喂以正常饲料, 模型组喂以高脂高营养性饲料, 配方为100 g基础饲料中加入全脂奶15 g、猪油5 g、鸡蛋黄50 g、黄豆15 g、鱼肝油10滴, 每周观察大鼠体质量、身长、Lee's指数[(体质量)/1/3 × 10<sup>3</sup>/体长cm], 6 wk后内眦取血检测甘油三酯和胃排空的变化<sup>[10]</sup>。正常饲料组及模型组大鼠均在22 ± 2 °C室温条件下饲养, 每天8:00-20:00光照, 自由饮水, 湿度保持在55% ± 10%。

**1.2.2 迷走复合体(DVC)区埋置套管:** 取♂Wistar正常及肥胖大鼠, 用400 mg/kg水合氯醛腹腔注射麻醉, 将大鼠俯卧位固定于脑立体定位仪上, 头部正中切口, 用3%的双氧水腐蚀软组织, 充分暴露颅骨, 使前后囟位于同一水平线, 根据大鼠脑部立体定位图谱(Paxinos&Watson, 第5版)确定DVC的位置(L+0.4, F-13.8, H+8.0), 用三棱针钻开颅骨, 清除硬脑膜及蛛网膜, 将长15 mm, 内径3 mm, 外径4 mm的自制不锈钢套管垂直置入左侧DVC区, 用502胶及牙托粉固定金属套管, 并插入不锈钢内芯防止阻塞。

**1.2.3 中枢注射Nesfatin-1测胃排空率:** DVC置管

表1 高脂饲料对大鼠体质量、身长、Lee's指数及甘油三酯的影响(mean ± SD)

分组	体质量(g)	身长(cm)	Lee's指数	甘油三酯(mmol/L)
对照组	329.96 ± 52.13	20.3 ± 0.95	339.61 ± 11.66	1.22 ± 0.22
高脂组	404.67 ± 53.34 <sup>b</sup>	21.02 ± 0.94 <sup>a</sup>	356.40 ± 13.75 <sup>b</sup>	1.50 ± 0.24 <sup>a</sup>

<sup>a</sup> $P < 0.05$ , <sup>b</sup> $P < 0.01$  vs 对照组.

手术后大鼠单笼饲养, 恢复7 d, 每天予腹腔注射2万单位青霉素预防感染. 将正常及肥胖大鼠禁食8 h不禁水. 分别予实验组大鼠DVC区微量注射Nesfatin-1: 0.5  $\mu\text{mol/L}$ 、5  $\mu\text{mol/L}$ 、50  $\mu\text{mol/L}$ 各0.5  $\mu\text{L}$ , 2 min内注完, 留针1 min. 生理盐水对照组大鼠同样方法注入等容积生理盐水(NS) 0.5  $\mu\text{L}$ . 2.5 h后每只大鼠给予50 mg/dL酚红2 mL灌胃, 15 min后将大鼠颈椎脱臼, 打开腹腔, 结扎贲门和幽门, 取出整个鼠胃, 沿胃大弯切开, 以蒸馏水冲洗胃内容物, 定容为20 mL. 再加入0.5 mol/L NaOH 20 mL搅拌混匀, 静置1 h后取5 mL上清液, 加入20%三氯乙酸0.5 mL去蛋白, 以3500 r/min(离心半径0.1 m)离心10 min, 取上清液用分光光度计在560 nm波长下测定吸光度值. 另取酚红溶液2 mL, 先后加入蒸馏水18 mL、0.5 mol/L NaOH 20 mL、20%三氯乙酸4 mL搅拌混匀, 测定吸光度值. 大鼠胃排空率 = (1-实测酚红吸光度/标准酚红吸光度) × 100%.

1.2.4 检验埋管位置准确性: 实验结束后, 正常及肥胖大鼠均经套管微量注射0.2  $\mu\text{L}$ 溴胺天蓝于DVC, 打开胸腔予心脏灌注生理盐水及4%多聚甲醛固定脑组织, 将脑组织切成50  $\mu\text{m}$ 冠状冰冻切片, 观察DVC置管定位. 定位不准确的实验结果不予统计.

1.2.5 平滑肌条制备及体外肌条舒缩实验: 实验前大鼠禁食24 h不禁水, 颈椎脱臼法处死, 剖腹取胃, 沿胃小弯剪开. 用Krebs液(mmol/L: 137.5  $\text{Na}^+$ , 5.9  $\text{K}^+$ , 2.5  $\text{Ca}^{2+}$ , 1.2  $\text{Mg}^{2+}$ , 134.2  $\text{Cl}^-$ , 15.5  $\text{HCO}_3^-$ , 1.2  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ , 11.5 glucose)洗净胃内容物后放入盛有Krebs液的硅胶盘中, 去掉黏膜及黏膜下层, 分别取胃体、胃底大小约2 mm × 10 mm<sup>[11]</sup>的环形肌条, 放入37 °C恒温浴槽中, 并通入含950 mL/L  $\text{O}_2$ 和50 mL/L  $\text{CO}_2$ 的混合气体. 将肌条一端固定于浴槽通气侧弯钩上, 另一端悬挂于张力换能器上, 并连接生理记录仪, 稳定1 h, 并记录肌条张力曲线, 待肌条的自发收缩活动稳定后加入乙酰胆碱, 待收缩曲线稳定后实验组加入Nesfatin-1, 对照组加入等容积的生理盐水, 观察不同浓度Nesfatin-1(0.026  $\mu\text{mol/L}$ 、0.26  $\mu\text{mol/L}$ 、2.6  $\mu\text{mol/L}$ )

对肌条张力的影响.

**统计学处理** 应用SPSS18.0统计学软件进行数据处理, 两组数据间比较采用 $t$ 检验, 多组间比较采用单因素方差分析法. 以乙酰胆碱( $5 \times 10^{-7}$  mol/L)诱导产生的收缩波之后平台期的张力为对照值(g), 以加入药物后平滑肌舒张至最低波谷为效应值(g). 结果以张力变化百分率表示(张力变化百分率 = 效应值/对照值 × 100%). 所有结果用mean ± SD表示,  $P < 0.05$ 差异有统计学意义.

## 2 结果

2.1 高脂饲料对大鼠体质量、体长及Lee's指数的影响 用2种不同饲料喂养的大鼠, 高脂饲料组体质量增长较快, 明显超过正常对照组, 两组差异有统计学意义( $t = 6.34$ ,  $P < 0.01$ ). 高脂饲料组大鼠身长、Lee's指数及甘油三酯含量均明显高于正常对照组( $t = 3.41$ ,  $P < 0.05$ ;  $t = 5.89$ ,  $P < 0.01$ ;  $t = 2.72$ ,  $P < 0.05$ , 表1).

2.2 Nesfatin-1对正常及肥胖大鼠胃排空率的影响 低浓度Nesfatin-1(0.5  $\mu\text{mol/L}$ )对正常大鼠胃排空有显著抑制作用( $q = 3.45$ ,  $P < 0.05$ ), 但对肥胖大鼠胃排空无显著影响( $q = 2.95$ ,  $P > 0.05$ ); 中浓度和高浓度Nesfatin-1(5.0  $\mu\text{mol/L}$ 、50  $\mu\text{mol/L}$ )均可显著抑制正常大鼠和肥胖大鼠胃排空作用( $P < 0.01$ ), 且呈显著量效依赖关系( $q = 3.03$ -5.20,  $P < 0.05$ -0.01, 表2).

2.3 Nesfatin-1对正常及肥胖大鼠胃平滑肌条收缩活动的影响

2.3.1 Nesfatin-1对大鼠胃底平滑肌条收缩活动的影响: 低、中或高浓度Nesfatin-1对由乙酰胆碱( $5 \times 10^{-7}$  mol/L)诱导的正常大鼠胃底离体平滑肌条的收缩活动均有抑制作用( $q = 6.43$ ,  $P < 0.01$ ;  $q = 10.03$ ,  $P < 0.01$ ;  $q = 15.72$ ,  $P < 0.01$ ), 随Nesfatin-1浓度的增高, 其抑制作用显著加强, 呈明显剂量依赖关系( $q = 3.60$ -5.69,  $P < 0.05$ -0.01, 图1, 表3).

低、中、高浓度的Nesfatin-1可明显抑制由乙酰胆碱( $5 \times 10^{-7}$  mol/L)诱导的肥胖大鼠胃底离体平滑肌条的收缩活动( $q = 4.18$ ,  $P < 0.01$ ;

## ■ 相关报道

Oh-I等研究表明Nesfatin-1对摄食有抑制作用, 中枢注射NUCB2重组蛋白可使大鼠体重降低, 摄食量也呈剂量依赖性的减少; Stengel等动物实验表明, Nesfatin-1能明显抑制瘦素受体突变小鼠的摄食, 考虑其作用可能与 $\alpha$ -促黑素细胞刺激素( $\alpha$ -MSH)有关.

### ■应用要点

Nesfatin-1对正常及肥胖大鼠胃排空及离体胃平滑肌条收缩活动均有抑制作用,且对正常大鼠抑制作用较强,可对临床上肥胖患者胃动力障碍方面的研究提供参考。

表 2 Nesfatin-1对大鼠胃排空率的影响(mean ± SD)

分组	剂量(μmol/L)	正常大鼠排空率(%)	肥胖大鼠排空率(%)
对照组	—	63.42 ± 6.9	57.17 ± 8.2
Nesfatin-1组	0.5	54.24 ± 8.9 <sup>a</sup>	49.89 ± 6.9
	5.0	44.65 ± 6.6 <sup>bc</sup>	41.94 ± 7.4 <sup>bc</sup>
	50	30.80 ± 7.5 <sup>bf</sup>	33.99 ± 7.1 <sup>be</sup>

<sup>a</sup>*P*<0.05, <sup>b</sup>*P*<0.01 vs 对照组; <sup>c</sup>*P*<0.05 vs 0.5 μmol/L; <sup>d</sup>*P*<0.05, <sup>e</sup>*P*<0.01 vs 5.0 μmol/L.

表 3 离体胃平滑肌条张力变化百分率(*n* = 10, mean ± SD, %)

部位	对照组	Nesfatin-1(μmol/L)		
		0.026	0.26	2.6
正常大鼠胃底	100.10 ± 6.70	84.78 ± 7.90 <sup>b</sup>	76.20 ± 8.50 <sup>bc</sup>	62.65 ± 6.90 <sup>bf</sup>
正常大鼠胃体	99.90 ± 7.00	84.87 ± 8.10 <sup>b</sup>	75.96 ± 7.70 <sup>bc</sup>	63.78 ± 7.90 <sup>bf</sup>
肥胖大鼠胃底	100.80 ± 7.20	90.28 ± 9.20 <sup>b</sup>	83.93 ± 7.60 <sup>bg</sup>	71.25 ± 7.70 <sup>bf</sup>
肥胖大鼠胃体	101.60 ± 6.60	91.53 ± 9.30 <sup>a</sup>	82.70 ± 8.70 <sup>bc</sup>	72.49 ± 7.50 <sup>beg</sup>

<sup>a</sup>*P*<0.05, <sup>b</sup>*P*<0.01 vs 对照组; <sup>c</sup>*P*<0.05 vs 0.026 μmol/L; <sup>d</sup>*P*<0.05, <sup>e</sup>*P*<0.01 vs 0.26 μmol/L; <sup>f</sup>*P*<0.05 vs 正常大鼠同部位同浓度。

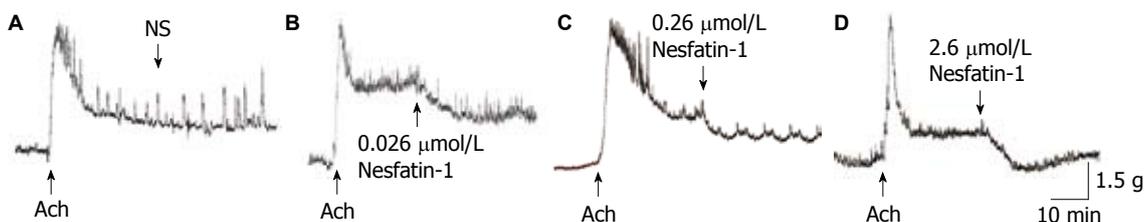


图 1 Nesfatin-1对正常大鼠胃底平滑肌条收缩影响。A: 生理盐水对照组; B: 0.026 μmol/L Nesfatin-1组; C: 0.26 μmol/L Nesfatin-1组; D: 2.6 μmol/L Nesfatin-1组。

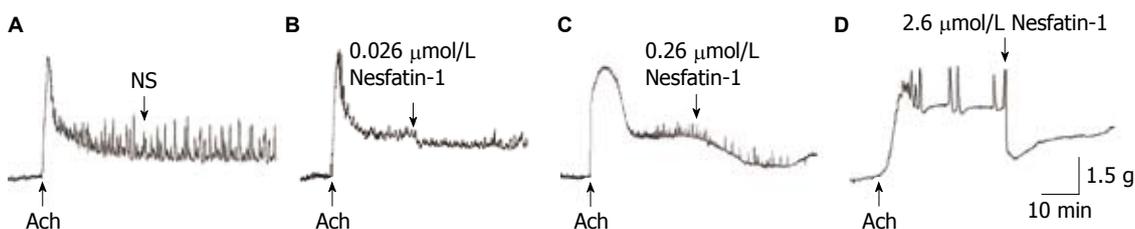


图 2 Nesfatin-1对肥胖大鼠胃底平滑肌条收缩影响。A: 生理盐水对照组; B: 0.026 μmol/L Nesfatin-1组; C: 0.26 μmol/L Nesfatin-1组; D: 2.6 μmol/L Nesfatin-1组。

$q = 6.70, P < 0.01; q = 11.74, P < 0.01$ ). 中浓度组(0.26 μmol/L)与低浓度组(0.026 μmol/L)相比较,差异无显著性( $P > 0.05$ ),高浓度组(2.6 μmol/L)与中浓度组(0.26 μmol/L)相比较差异有统计学意义( $q = 5.04, P < 0.01$ , 图2, 表3)。

低浓度Nesfatin-1(0.026 μmol/L)对正常大鼠、肥胖大鼠胃底平滑肌条收缩抑制作用无显著性差异( $P > 0.05$ ); 但中浓度Nesfatin-1

(0.26 μmol/L)和高浓度Nesfatin-1(2.6 μmol/L)对肥胖大鼠胃底平滑肌条的舒缩张力的抑制作用弱于正常大鼠( $t = 2.14, P < 0.05; t = 2.63, P < 0.05$ )。

2.3.2 Nesfatin-1对大鼠胃体平滑肌条收缩活动的影响: 低、中、高浓度Nesfatin-1对由乙酰胆碱( $5 \times 10^{-7}$  mol/L)诱导的正常大鼠胃体离体平滑肌条的收缩活动均有抑制作用( $q = 6.18, P < 0.01; q$

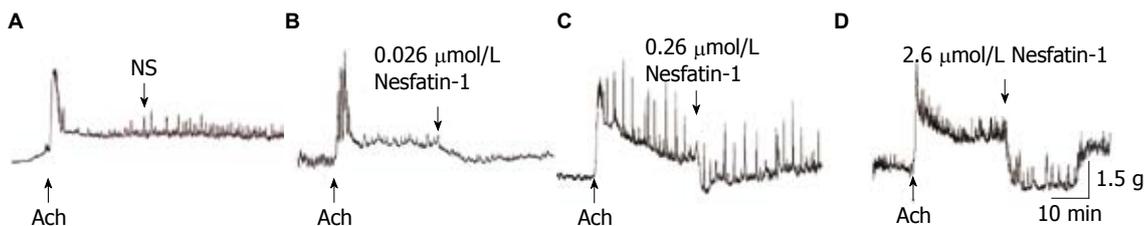


图3 Nesfatin-1对正常大鼠胃体平滑肌条收缩影响. A: 生理盐水对照组; B: 0.026  $\mu\text{mol/L}$  Nesfatin-1组; C: 0.26  $\mu\text{mol/L}$  Nesfatin-1组; D: 2.6  $\mu\text{mol/L}$  Nesfatin-1组.

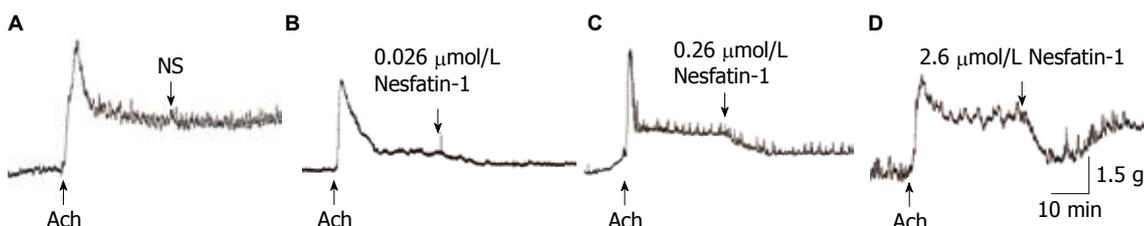


图4 Nesfatin-1对肥胖大鼠胃体平滑肌条收缩影响. A: 生理盐水对照组; B: 0.026  $\mu\text{mol/L}$  Nesfatin-1组; C: 0.26  $\mu\text{mol/L}$  Nesfatin-1组; D: 2.6  $\mu\text{mol/L}$  Nesfatin-1组.

#### 同行评价

本文的先进性、科学性均好, 结果结论可靠, 对临床上肥胖患者胃动力障碍方面的研究可提供参考.

= 9.85,  $P < 0.01$ ;  $q = 14.86$ ,  $P < 0.01$ ), 随Nesfatin-1浓度的增高, 其抑制作用呈剂量依赖关系( $q = 3.67$ -5.01,  $P < 0.05$ -0.01, 图3, 表3).

低、中、高浓度Nesfatin-1对由乙酰胆碱( $5 \times 10^{-7}$  mol/L)诱导的肥胖大鼠胃体离体平滑肌条的收缩活动均有抑制作用( $q = 3.93$ ,  $P < 0.05$ ;  $q = 7.39$ ,  $P < 0.01$ ;  $q = 11.37$ ,  $P < 0.01$ ), 随Nesfatin-1浓度的增高, 其抑制作用显著加强, 呈明显剂量依赖关系( $q = 3.45$ -3.99,  $P < 0.05$ , 图4, 表3).

低浓度(0.026  $\mu\text{mol/L}$ )及中浓度(0.26  $\mu\text{mol/L}$ )Nesfatin-1对正常大鼠、肥胖大鼠离体胃体平滑肌条作用无显著性差异( $P > 0.05$ ), 但高浓度Nesfatin-1(2.6  $\mu\text{mol/L}$ )对肥胖大鼠离体胃体平滑肌条收缩抑制作用低于正常大鼠( $t = 2.53$ ,  $P < 0.05$ ).

### 3 讨论

目前Nesfatin-1/NUCB2的功能及机制等方面仍有很多未知领域, 但是从大鼠、小鼠到人的Nesfatin-1序列具有高度保守性<sup>[12]</sup>. NUCB2在激肽原转化酶的作用下可裂解为Nesfatin-1、Nesfatin-2及Nesfatin-3 3个片段, 但只有Nesfatin-1对摄食有抑制作用<sup>[9]</sup>. 已有研究表明中枢注射NUCB2重组蛋白可使大鼠体质量降低, 摄食量也呈剂量依赖性的减少<sup>[9,13,14]</sup>. Nesfatin-1在中枢及外周均有表达, 在中枢Nesfatin-1主要表达于下丘脑, 包括下丘脑弓形核(arcuate nucleus, ARC)、室旁核(paraventricular nucleus, PVN)、视上核和下丘脑外侧区. 此外Nesfatin-1也存在于脑干, 如迷走

神经背核、孤束核等部位<sup>[15-18]</sup>. 迷走神经背核大部分神经元参与调节胃肠道反应, 所以迷走神经背核释放Nesfatin-1可能参与调控胃肠道收缩活动, 从而参与摄食调节<sup>[19,20]</sup>. 已有研究证明, 下丘脑和孤束核的葡萄糖感受神经元均参与摄食调控<sup>[21,22]</sup>. 最近Maejima等<sup>[28]</sup>报道, 第3脑室注射Nesfatin-1诱发c-Fos的表达主要位于室旁核和孤束核(nucleus tractus solitarius, NTS). 这种选择性c-Fos表达, 提示除室旁核之外, NTS是Nesfatin-1抑制摄食的重要靶点之一. 形态学的研究已证明, 室旁核催产素神经元发出下行纤维支配NTS<sup>[23]</sup>. 目前认为瘦素和促黑细胞皮质激素产生的 $\alpha$ -促黑细胞刺激素(alpha-melanocyte-stimulating hormone,  $\alpha$ -MSH)是摄食调节系统中的关键信号分子<sup>[24]</sup>. 动物实验表明<sup>[25-28]</sup>, Nesfatin-1能明显抑制瘦素受体突变小鼠的摄食, 考虑其作用可能与瘦素信号系统关系不大. 然而, 注射 $\alpha$ -MSH能增加下丘脑室旁核中NUCB2基因表达, 这表明黑皮质素对摄食行为的调节, 可能通过NUCB2-Nesfatin-1这一信号通路发挥作用, Nesfatin-1可能是与下丘脑中黑皮质素信号表达有关的一种饱食因子. 本实验研究显示中枢注射Nesfatin-1呈剂量依赖性抑制大鼠胃排空. 较低剂量Nesfatin-1组即可抑制正常大鼠胃排空, 但对肥胖大鼠胃排空无明显抑制作用, 推测正常与肥胖大鼠胃排空机制可能存在差异.

既往研究表明在外周胰腺、胃、十二指肠均可发现Nesfatin-1免疫阳性细胞高表达, 而且胃黏膜NUCB2 mRNA的表达比脑组织高十几

倍<sup>[29]</sup>. 本实验观察了Nesfatin-1对正常及肥胖大鼠离体胃平滑肌条收缩活性的影响, 结果显示Nesfatin-1可呈剂量依赖性地抑制正常及肥胖大鼠离体平滑肌条收缩. 低浓度Nesfatin-1对肥胖和正常大鼠胃底、胃体平滑肌条舒缩抑制作用无显著性差异; 中浓度Nesfatin-1对肥胖和正常大鼠离体胃体平滑肌条抑制作用无显著性差异, 对肥胖大鼠胃底平滑肌条舒缩张力抑制作用弱于正常大鼠. 高浓度Nesfatin-1对肥胖大鼠离体胃底及胃体平滑肌条抑制作用均弱于正常大鼠. 简言之, Nesfatin-1对正常大鼠平滑肌条抑制作用强于肥胖大鼠. 但因Nesfatin-1受体目前尚未发现, 关于Nesfatin-1抑制平滑肌条作用机制有待于进一步研究.

总之, Nesfatin-1能抑制正常及单纯性肥胖大鼠胃排空及离体胃底和胃体平滑肌条的收缩. 在相同药物浓度下, Nesfatin-1对肥胖大鼠胃平滑肌条的抑制作用比正常大鼠作用弱, 这可能与肥胖大鼠体内Nesfatin-1基础水平及对外源性注入Nesfatin-1后的敏感性不同有关, 具体原因未明. 通过上述实验, 对肥胖大鼠胃肠动力等方面进行实验研究, 为进一步减轻肥胖提供理论帮助.

#### 4 参考文献

- Qureshi K, Abrams GA. Metabolic liver disease of obesity and role of adipose tissue in the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 3540-3553
- Dai Z, Xu YC, Niu L. Obesity and colorectal cancer risk: a meta-analysis of cohort studies. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 4199-4206
- Piretta L, Alghisi F, Anzini F, Corazziari E. Prevalence of overweightedness in patients with gastroesophageal reflux. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 4602-4605
- Kenny PJ. Reward mechanisms in obesity: new insights and future directions. *Neuron* 2011; 69: 664-679
- Saper CB, Chou TC, Elmquist JK. The need to feed: homeostatic and hedonic control of eating. *Neuron* 2002; 36: 199-211
- Kenny PJ. Common cellular and molecular mechanisms in obesity and drug addiction. *Nat Rev Neurosci* 2011; 12: 638-651
- Liu Y, von Deneen KM, Kobeissy FH, Gold MS. Food addiction and obesity: evidence from bench to bedside. *J Psychoactive Drugs* 2010; 42: 133-145
- Wilson GT. Eating disorders, obesity and addiction. *Eur Eat Disord Rev* 2010; 18: 341-351
- Oh-I S, Shimizu H, Satoh T, Okada S, Adachi S, Inoue K, Eguchi H, Yamamoto M, Imaki T, Hashimoto K, Tsuchiya T, Monden T, Horiguchi K, Yamada M, Mori M. Identification of nesfatin-1 as a satiety molecule in the hypothalamus. *Nature* 2006; 443: 709-712
- 管玉玺, 王天云, 卫华, 赵长安. 高脂饲料诱发大鼠肥胖模型的实验研究. *现代预防医学* 2008; 35: 3131-3132
- Zhao P, Huang X, Wang ZY, Qiu ZX, Han YF, Lu HL, Kim YC, Xu WX. Dual effect of exogenous hydrogen sulfide on the spontaneous contraction of gastric smooth muscle in guinea-pig. *Eur J Pharmacol* 2009; 616: 223-228
- Shimizu H, Oh-I S, Okada S, Mori M. Nesfatin-1: an overview and future clinical application. *Endocr J* 2009; 56: 537-543
- García-Galiano D, Navarro VM, Gaytan F, Tena-Sempere M. Expanding roles of NUCB2/nesfatin-1 in neuroendocrine regulation. *J Mol Endocrinol* 2010; 45: 281-290
- Stengel A, Goebel M, Taché Y. Nesfatin-1: a novel inhibitory regulator of food intake and body weight. *Obes Rev* 2011; 12: 261-271
- Brailoiu GC, Dun SL, Brailoiu E, Inan S, Yang J, Chang JK, Dun NJ. Nesfatin-1: distribution and interaction with a G protein-coupled receptor in the rat brain. *Endocrinology* 2007; 148: 5088-5094
- Zhang AQ, Li XL, Jiang CY, Lin L, Shi RH, Chen JD, Oomura Y. Expression of nesfatin-1/NUCB2 in rodent digestive system. *World J Gastroenterol* 2010; 16: 1735-1741
- Foo KS, Brismar H, Broberger C. Distribution and neuropeptide coexistence of nucleobindin-2 mRNA/nesfatin-like immunoreactivity in the rat CNS. *Neuroscience* 2008; 156: 563-579
- Goebel-Stengel M, Wang L, Stengel A, Taché Y. Localization of nesfatin-1 neurons in the mouse brain and functional implication. *Brain Res* 2011; 1396: 20-34
- Goebel M, Stengel A, Wang L, Lambrecht NW, Taché Y. Nesfatin-1 immunoreactivity in rat brain and spinal cord autonomic nuclei. *Neurosci Lett* 2009; 452: 241-246
- 王文杰, 蒋正尧. Nesfatin-1对大鼠迷走复合体内葡萄糖感受神经元和胃扩张敏感神经元兴奋性的作用. *齐鲁医学杂志* 2010; 25: 225-227, 231
- Levin BE, Dunn-Meynell AA, Routh VH. Brain glucose sensing and body energy homeostasis: role in obesity and diabetes. *Am J Physiol* 1999; 276: R1223-R1231
- Routh VH. Glucose-sensing neurons: are they physiologically relevant? *Physiol Behav* 2002; 76: 403-413
- Blevins JE, Schwartz MW, Baskin DG. Evidence that paraventricular nucleus oxytocin neurons link hypothalamic leptin action to caudal brain stem nuclei controlling meal size. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2004; 287: R87-R96
- Kalra SP, Dube MG, Pu S, Xu B, Horvath TL, Kalra PS. Interacting appetite-regulating pathways in the hypothalamic regulation of body weight. *Endocr Rev* 1999; 20: 68-100
- Price TO, Samson WK, Niehoff ML, Banks WA. Permeability of the blood-brain barrier to a novel satiety molecule nesfatin-1. *Peptides* 2007; 28: 2372-2381
- Shimizu H, Ohsaki A, Oh-I S, Okada S, Mori M. A new anorexigenic protein, nesfatin-1. *Peptides* 2009; 30: 995-998
- Shimizu H, Oh-I S, Hashimoto K, Nakata M, Yamamoto S, Yoshida N, Eguchi H, Kato I, Inoue K, Satoh T, Okada S, Yamada M, Yada T, Mori M. Peripheral administration of nesfatin-1 reduces food intake in mice: the leptin-independent mechanism. *Endocrinology* 2009; 150: 662-671
- Maejima Y, Sedbazar U, Suyama S, Kohno D, Onaka T, Takano E, Yoshida N, Koike M, Uchiyama Y, Fujiwara K, Yashiro T, Horvath TL, Dietrich MO,

Tanaka S, Dezaki K, Oh-I S, Hashimoto K, Shimizu H, Nakata M, Mori M, Yada T. Nesfatin-1-regulated oxytocinergic signaling in the paraventricular nucleus causes anorexia through a leptin-independent melanocortin pathway. *Cell Metab* 2009; 10: 355-365

29 Stengel A, Goebel M, Yakubov I, Wang L, Witcher D, Coskun T, Taché Y, Sachs G, Lambrecht NW. Identification and characterization of nesfatin-1 immunoreactivity in endocrine cell types of the rat gastric oxyntic mucosa. *Endocrinology* 2009; 150: 232-238

编辑 张姗姗 电编 鲁亚静

ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) CN 14-1260/R 2012年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

## 《世界华人消化杂志》外文字符标准

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

# 慢病毒介导HBV X基因稳定表达HepG2细胞系的建立

余桂芳, 严跃红, 王瑞鑫, 李显波, 曾文铤, 朱科伦

## ■背景资料

乙型肝炎病毒X基因与原发肝癌的发生、发展以及侵袭转移等关系密切, 构建HBx稳定表达HepG2为日后研究HBx的蛋白功能及其肿瘤发生的机制奠定基础。

余桂芳, 严跃红, 王瑞鑫, 李显波, 广州医学院第五附属医院内一科 广东省广州市 510700

曾文铤, 朱科伦, 广州医学院第一附属医院肝病研究室 广东省广州市 510120

广东省科技计划基金资助项目, No. 2010B060900092

作者贡献分布: 此课题由余桂芳、严跃红、曾文铤及朱科伦设计; 研究过程由余桂芳、严跃红及李显波操作完成; 数据分析由王瑞鑫与李显波完成; 本论文写作由余桂芳完成。

通讯作者: 余桂芳, 主治医师, 510700, 广东省广州市黄埔区港湾路621号, 广州医学院第五附属医院内一科。

yuguifang2004@163.com

电话: 020-32213996

收稿日期: 2011-11-13 修回日期: 2012-01-19

接受日期: 2012-03-10 在线出版日期: 2012-03-18

## Establishment of a HepG2 cell line stably transduced with a lentivirus expressing the HBV X gene

Gui-Fang Yu, Yue-Hong Yan, Rui-Xin Wang, Xian-Bo Li, Wen-Ting Zeng, Ke-Lun Zhu

Gui-Fang Yu, Yue-Hong Yan, Rui-Xin Wang, Xian-Bo Li, Department of Internal Medicine (Division I), the Fifth Affiliated Hospital of Guangzhou Medical College, Guangzhou 510700, Guangdong Province, China

Wen-Ting Zeng, Ke-Lun Zhu, Institute of Hepatology, the First Affiliated Hospital of Guangzhou Medical College, Guangzhou 510120, Guangdong Province, China

Supported by: the Foundation of Science and Technology Agency of Guangdong Province, No. 2010B060900092

Correspondence to: Gui-Fang Yu, Attending Physician, Department of Internal Medicine (Division I), the Fifth Affiliated Hospital of Guangzhou Medical College, Guangzhou 510700, Guangdong Province, China. yuguifang2004@163.com

Received: 2011-11-13 Revised: 2012-01-19

Accepted: 2012-03-10 Published online: 2012-03-18

## Abstract

**AIM:** To establish a HepG2 cell line stably transduced with a lentivirus expressing the HBV X (HBx) gene for studying the biological function of HBx and its role in hepatocarcinogenesis.

**METHODS:** The HBV X gene was amplified from plasmid pIERES2-EGFP-HBV by PCR. The purified HBx gene fragment was inserted into a lentivirus vector (pZac2.1), and the insertion was identified by PCR, restriction endonuclease analysis and DNA sequencing. HepG2 cells were then transfected with the packaged recombinant

lentivirus, and resistant cell clones were selected with puromycin. The expression of HBx was examined using RT-PCR, immunohistochemistry, and Western blot.

**RESULTS:** Restriction enzyme digestion and DNA sequencing showed that the full-length HBx (489 bp) gene had been successfully subcloned into the lentiviral vector to result in the recombinant vector pZac2.1-HBx. The titre of purified recombinant lentivirus was  $1 \times 10^8$  TU/mL. Monoclonal cell line HepG2-HBx was produced 8-10 d after transfection with the recombinant lentivirus and selected with puromycin. HBx mRNA could be detected on days 3, 14, 30 and at 2 mo after cell colony formation. Meanwhile, stable expression of HBx protein was verified by immunohistochemistry and Western blot.

**CONCLUSION:** A HepG2 cell line stably transduced with a lentivirus expressing the HBx gene has been successfully generated.

**Key Words:** Hepatitis B virus; X gene; HepG2; Lentivirus; Stable cell line

Yu GF, Yan YH, Wang RX, Li XB, Zeng WT, Zhu KL. Establishment of a HepG2 cell line stably transduced with a lentivirus expressing the HBV X gene. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2012; 20(8): 638-643

## 摘要

**目的:** 构建乙型肝炎病毒X基因(HBV X)重组慢病毒表达载体, 建立稳定表达HBV X蛋白(HBx)的HepG2细胞系。

**方法:** 应用PCR法从质粒pIERES2-EGFP-HBV中扩增X基因片段, 克隆至慢病毒载体pZac2.1, 应用PCR、酶切和测序鉴定正确后, 经病毒包装, 感染HepG2细胞, 经嘌呤霉素筛选稳定表达细胞株, RT-PCR、免疫组织化学、Western blot鉴定HBx的表达。

**结果:** 酶切鉴定和基因序列测定证实长度为489 bp的HBx基因成功克隆至慢病毒表达载体pZac2.1-HBx; 重组慢病毒经包装、纯化后获得滴度为  $1 \times 10^8$  TU/mL, 通过感染HepG2

## ■同行评议者

周霞秋, 教授, 上海瑞金医院感染科

细胞株和嘌呤霉素筛选, 8-10 d形成生长形态良好的单克隆细胞株HepG2-HBx; RT-PCR鉴定显示细胞株HepG2-HBx在3 d, 14 d, 30 d和2 mo后均可见稳定表达的HBx mRNA; 利用免疫组织化学和蛋白免疫印迹法鉴定, 细胞株HepG2-HBx可稳定表达HBx蛋白。

**结论:** 成功构建了HBV X重组慢病毒载体, 获得稳定表达HBx的HepG2细胞系, 为进一步研究HBx的生物学功能及致病机制提供细胞模型。

**关键词:** 乙型肝炎病毒; X基因; HepG2; 慢病毒; 稳定细胞株

余桂芳, 严跃红, 王瑞鑫, 李显波, 曾文铤, 朱科伦. 慢病毒介导HBV X基因稳定表达HepG2细胞系的建立. 世界华人消化杂志 2012; 20(8): 638-643

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/638.asp>

## 0 引言

乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)感染是一个世界性的健康问题, 也是原发性肝癌(hepatocellular carcinoma, HCC)发生的主要原因之一。HBV基因组有4个开放读码框架(open reading frame, ORF)-C、P、S和X区, 其中X基因是最小的读码框架, 保守性高, 编码含有154个氨基酸的X蛋白(HBx)。近年发现, HBx是一种多功能病毒调节蛋白, 具有广泛的基因转录调控作用, 并能与宿主细胞的多种蛋白质相互作用, 不但影响病毒复制, 还调节宿主细胞的信号转导、细胞增殖与分化、细胞凋亡等<sup>[1]</sup>, 被认为与肝细胞癌的发生、发展关系非常密切<sup>[2,3]</sup>。为进一步探索HBx蛋白的理化和生物学特性及其与HCC发生和转归的关系, 有必要建立稳定表达HBx的HCC细胞模型。其中源于人类肝癌组织的细胞株HepG2应用最为普遍, 既往已有许多报道主要应用脂质体的转染方法<sup>[4,5]</sup>或电转导方法<sup>[6]</sup>对HepG2进行瞬时转染或稳定表达及其应用酵母表达系统进行HBx蛋白的功能研究<sup>[7]</sup>, 本研究尝试利用慢病毒载体的方法建立稳定表达HBx蛋白的HepG2细胞株, 为研究肝癌的分子发生机制和基因治疗打下良好基础。

## 1 材料和方法

1.1 材料 大肠杆菌DH5 $\alpha$ 、HEK293细胞、人肝母细胞瘤细胞系HepG2细胞均为本室保存。Taq DNA聚合酶、dNTP、限制性内切酶Hind

III、EcoR I、T4 DNA连接酶、DNA marker均购自TaKaRa公司; PCR产物纯化试剂盒、DNA片段纯化回收试剂盒及质粒抽提试剂盒购自QIAGEN公司; 慢病毒表达系统由东莞博捷生物科技有限公司提供; DMEM培养基、胎牛血清、胰蛋白酶购自Gibco公司; 嘌呤霉素购自Sigma公司; TRIzol、Alex568标记的山羊抗人IgG均购自Invitrogen公司; 逆转录试剂盒购自TOYOBO公司; 兔源抗HBx抗体购自武汉博士德生物科技有限公司; 二抗检测试剂盒购自上海基因公司。

### 1.2 方法

1.2.1 HBV X基因的获取: 从中山大学第三附属医院彭晓谋教授惠赠的pIERES2-EGFP-HBV质粒扩增X基因。扩增的上游引物为: 5'GATCACGCGTGCCACCATGGCTGCTAGGCTG3', 内含Nhe I酶切位点; 下游引物为: 5'GTCTGACTCTAGATTAGGCAGAGGTGAAAAAG3', 内含Not I酶切位点。

1.2.2 重组质粒的构建和鉴定: 上述PCR产物X基因和质粒pZac2.1分别以限制性内切酶Nhe I和Not I 37 °C双酶切过夜, T4连接酶16 °C连接4 h, 连接产物转化到感受态细胞大肠杆菌DH5 $\alpha$ , 用含有氨苄青霉素的LB平板筛选, 挑取阳性克隆, 扩大培养, 提抽质粒, PCR、酶切鉴定, 将上述2种方法鉴定正确的质粒送深圳华大基因公司测序。

1.2.3 慢病毒载体重组: 上述pZac2.1-HBx经Nhe I和Not I酶切后亚克隆至慢病毒载体pCDH1-MCS1-EF1-Puro形成pCDH1-HBx, 亚克隆过程同上。按常规接种HEK293细胞, 次日连接载体pCDH1-HBx与预先优化的辅助转染质粒混合物(ViraPower<sup>TM</sup>, Invitrogen, 美国; 包含pLP1、pLP2和pLP/VSVG), 以及Lipofectamine 2000共同转染HEK293, 并应用opti-MEM进行培养。48 h后, 应用0.45  $\mu$ m Millex-HV PVDF膜过滤, 最后离心提纯病毒颗粒。

1.2.4 病毒滴度测定: 取提纯后的重组慢病毒进行滴度测定。测定前对293T细胞进行传代, 并接种于96孔板, 每孔加入约 $1.0 \times 10^4$ 个细胞, 将病毒储存液按梯度稀释, 依次加到细胞孔中。培养4 d后置于倒置显微镜中观察荧光表达, 并在最大稀释倍数孔中计算荧光表达的细胞数, 病毒滴度(TU/mL) = (荧光细胞个数  $\times$  转染时细胞数 / 100  $\times$  每孔加入病毒稀释液体积)  $\times$  1 / 稀释浓度。

1.2.5 重组慢病毒转染HepG2: 按常规方法培养HepG2细胞, 用含100 mL/L胎牛血清的DMEM/F12完全培养基, 调整细胞密度为 $5 \times 10^5$ /mL, 于

### ■应用要点

本文主要以慢病毒表达系统在HepG2细胞系稳定表达HBV X基因, 这种表达系统方法有较多的优势, 可连接其他相关基因共表达, 该表达系统有可能为将来的基因治疗提供技术条件和研究基础。

### ■创新盘点

本文介绍慢病毒表达系统构建稳定表达HBx的HepG2细胞系的方法,其效率和蛋白表达的动态变化值得研究者的借鉴。

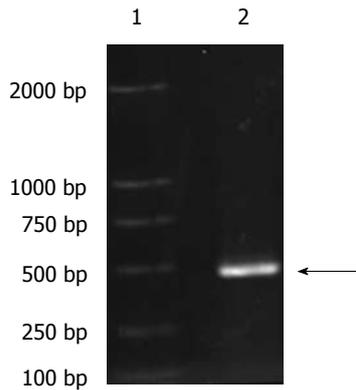


图1 通过PCR扩增获取HBV X基因. 1: DNA marker; 2: HBx gene.

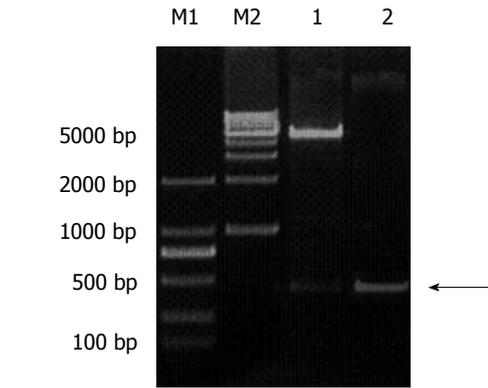


图2 重组慢病毒质粒载体的构建. M1, M2: DNA marker; 1: 酶切鉴定; 2: PCR鉴定.

转染前1 d胰蛋白酶消化HepG2,重新接种于培养瓶中;待细胞生长汇合度达70%-80%时弃原培养液,加入含200  $\mu$ L的重组慢病毒颗粒(MOI = 10).感染4 h后更换培养液继续培养,以不含目的基因的空载体为对照.

1.2.6 筛选稳定表达株:感染48 h后加入终浓度为2 g/L的嘌呤霉素进行稳定表达株筛选.挑取抗性细胞克隆于96孔培养板、24孔培养板、6孔培养板逐级扩大培养.经过大约14 d建立稳定表达的HepG2细胞系.

1.2.7 RT-PCR法鉴定稳定表达HBx的HepG2-HBx细胞株:TRIzol法提取经筛选稳定表达的细胞总RNA,反转录试剂盒合成、扩增cDNA,琼脂糖电泳检测,同时以转染空质粒为对照.

1.2.8 免疫组织化学鉴定HBx表达:培养的HepG2-HBx细胞株(第10代)用多聚甲醛固定,按照常规方法进行间接法免疫组织化学反应.兔源抗HBx抗体(1:500)4  $^{\circ}$ C孵育过夜,PBS漂洗;按二抗反应试剂盒说明书进行二抗结合、底色反应.

1.2.9 Western blot鉴定HBx表达:培养的HepG2-HBx细胞株至第10代,使用细胞全蛋白抽提试剂盒抽提细胞总蛋白,经过常规的定量,变性聚丙烯酰胺凝胶电泳,转印至PVDF膜,底物化学发光法显影曝光.

**统计学处理** 反转录PCR凝胶电泳采用美国Biorad公司Quantity one 4.0图像分析软件进行扫描分析,获得灰度值数据,经过内参照 $\beta$ -actin条带灰度进行校正.校正灰度值以mean  $\pm$  SD表示,多组比较采用单因素ANOVA检验,两两比较应用Bonferroni检验,以 $P < 0.05$ 作为具有显著性差异.

## 2 结果

2.1 HBV基因组中X基因的获取 根据惠赠的

pIRES2-EGFP-HBV质粒的HBV全长基因组扩增X基因,设计PCR产物的长度为489 bp.扩增产物经琼脂糖凝胶电泳图可见清晰的特异性扩增条带,近似于500 bp marker条带,与理论值预期值相符(图1).

2.2 重组慢病毒的构建与鉴定 PCR扩增的X基因经纯化,连接至慢病毒质粒载体pZac2.1,连接产物转化感受态细胞后经抗生素筛选的单克隆扩大培养,通过质粒抽提纯化进行PCR和双酶切鉴定.在理论预期值489 bp处可见一特异性条带.阳性克隆通过测序,Genbank数据库比对,与目标序列完全一致,无突变及缺失,证实pZac2.1-HBx载体构建成功.大量包装后最终得到的病毒滴度为 $1 \times 10^8$  TU/mL(图2).

2.3 基因转染与筛选 将重组慢病毒载体pZac2.1-HBx和阴性参照pZac2.1分别感染HepG2细胞.病毒感染后24 h内可见部分细胞死亡(图3A, B),经过细胞的传代、嘌呤霉素筛选,8-10 d逐渐形成长形态良好的单克隆细胞株(图3C, D).

2.4 HBx mRNA的表达 对单克隆细胞株进行扩大培养,在不同感染后的时间点进行RT-PCR分析鉴定.产物经琼脂糖凝胶电泳分析(图4),重组慢病毒载体pZac2.1-HBx感染的细胞在感染后24 h可见较弱的目的基因表达,3 d后呈现稳定的HBx mRNA高表达( $P < 0.01$  vs 24 h,  $n = 5$ );内参照(pZac2.1)则未见HBx mRNA表达.在14 d、30 d和2 mo后均可见稳定的表达,组内HBx mRNA表达量无显著差异( $P > 0.05$ ).

2.5 间接免疫组织化学法和Western blot检测HBx蛋白的表达 经过免疫组织化学分析,体外扩大培养稳定表达株HepG2-HBx几乎所有细胞均呈现HBx的阳性信号,主要位于胞浆,未见局部的高浓度聚集;野生型HepG2以及阴性对照均未见阳性信号(图5).应用Western blot技术,同样证实

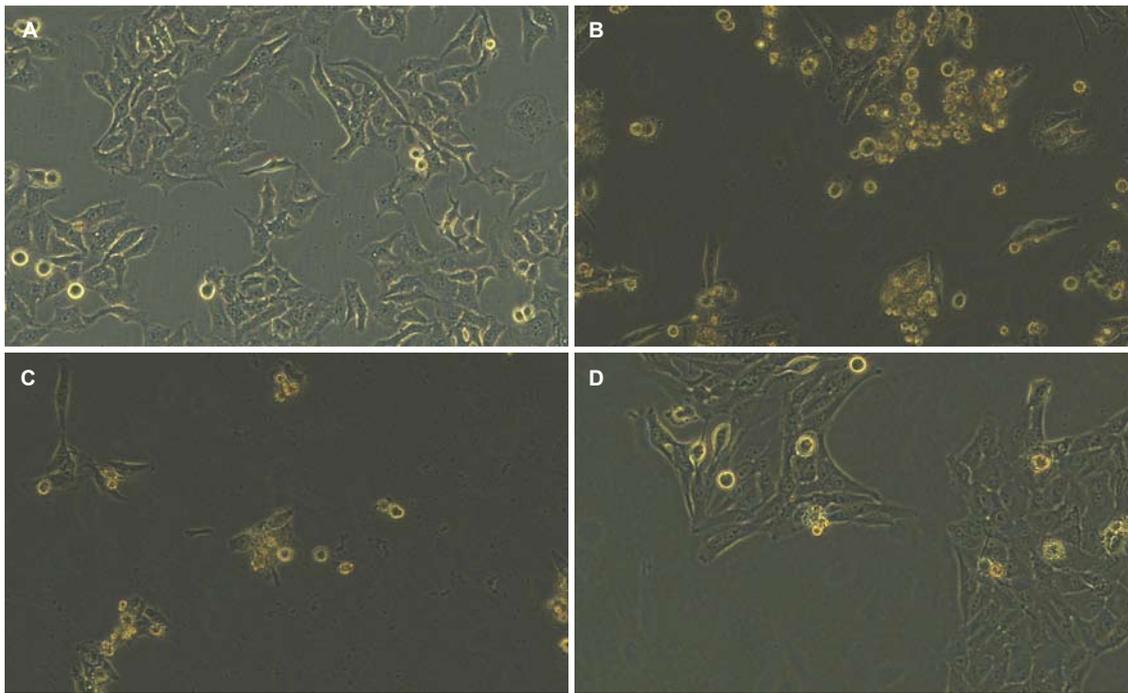


图3 重组慢病毒感染HepG2. A: 感染前; B: 感染后24 h; C: 感染后5 d; D: 感染后8 d.

#### 同行评价

本研究内容新颖, 方法先进, 设计科学, 研究过程合理, 结论可靠, 对今后的基础研究和临床应用有一定的指导意义.

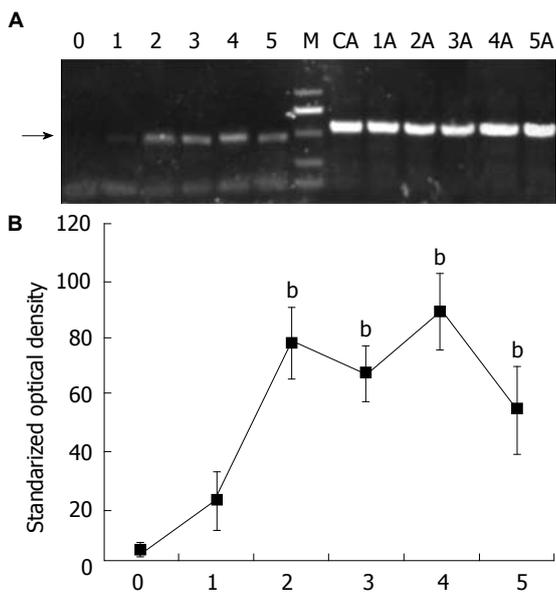


图4 RT-PCR法分析重组慢病毒感染后的HBx mRNA表达水平. A: RT-PCR电泳图, DNA marker左侧为HBx条带, 右侧为 $\beta$ -actin作为内参照; 0: 空质粒载体阴性对照; 1、2、3、4、5分别为感染后24 h、3 d、14 d、30 d、2 mo; CA、1A、2A、3A、4A、5A分别对应上述组的 $\beta$ -actin; B: 电泳的灰度密度分析, 0: Control组; 1、2、3、4、5分别为感染后24 h、3 d、14 d、30 d、2 mo.  $^b P < 0.01$  vs 24 h或Control组.

的HBV DNA不是完整的, 通常发生于DNA链末端的直接重复序列(DR1和DR2)<sup>[10,11]</sup>. 由于HBV X基因紧邻DR序列, HBV的X基因片段在病毒DNA序列整合中最为常见<sup>[12]</sup>. HBV感染肝细胞后即形成共价闭合环状DNA, 作为转录模板在宿主RNA聚合酶II的作用下产生不同转录子, 其中包括X基因转录本. X基因的ORF位于调控元件增强子I(Enh I)的下游, 与其他功能区有高度的重叠, 并可独立转录<sup>[13]</sup>. 这种功能重叠性和独立性提示了HBx功能的多样性和重要性. 现已揭示HBx不但与传染期病毒复制有关, 还可在宿主细胞发挥重要影响, 可诱导肝细胞染色体改变和微粒体形成, 影响基因组的稳定性, 促进细胞癌变; 参与肝细胞转化、细胞凋亡调控、DNA修复等<sup>[2,14]</sup>; 还可促进肿瘤血管增生, 加速肿瘤的侵袭与转移<sup>[13,15,16]</sup>. 在肝癌细胞中, HBx蛋白表达可导致 $\beta$ -链蛋白活性增加, 可激活Ras/Raf/MEK/ERK和PI3K/Akt通路, 从而影响细胞增殖、周期和凋亡, 间接参与了肝细胞的恶性转化与癌变<sup>[1,17,18]</sup>. 进一步的研究提示HBx对上述信号转导激酶的活化并不是通过与这些蛋白直接作用来完成的, 而是通过活化其编码基因的上游序列<sup>[2]</sup>. HBx不能直接结合双链DNA, 而是通过蛋白相互作用与转录因子和转录元件结合, 介导转录起始复合物的形成, 直接或间接作用于基因启动子或增强子<sup>[19,20]</sup>, 因此被定义为反式激活因子<sup>[21]</sup>. HBx的转录调节作用在不同细胞

了稳定表达株HepG2-HBx的蛋白表达(图6).

### 3 讨论

HBV感染是肝细胞癌发生的一个主要危险因素<sup>[8]</sup>. 大部分HBV感染相关HCC可以检测到HBV DNA整合到肝细胞基因组中<sup>[9]</sup>, 整合于染色体上

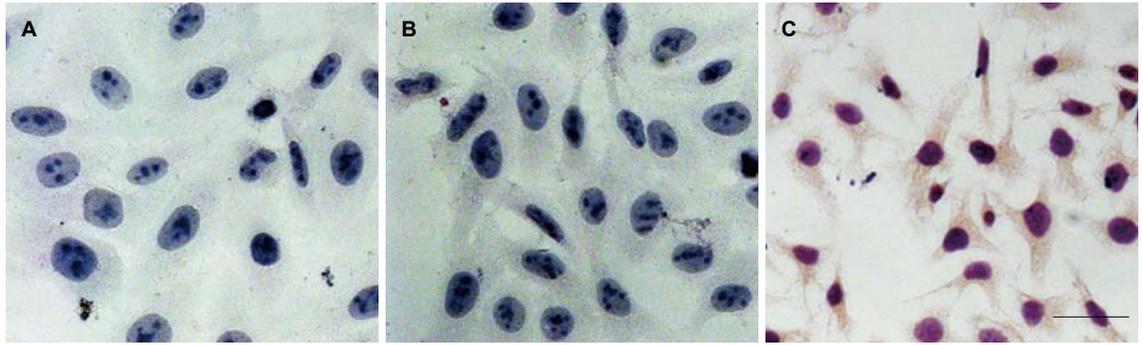


图5 免疫组织化学法鉴定稳定表达株HepG2-HBx的HBx蛋白表达。A: 野生型HepG2; B: 空质粒载体的阴性对照; C: 稳定表达株HepG2-HBx。

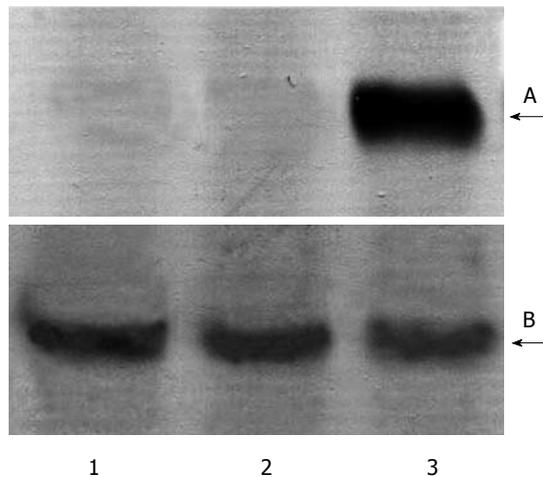


图6 Western blot鉴定稳定表达株HepG2-HBx的HBx蛋白表达。1: HepG2; 2: HepG2+pZac2.1; 3: HepG2+pZac2.1-HBx; A: HBx; B:  $\beta$ -actin。

系表现不一致, 与其相互作用的转录因子等也非常复杂。HBx在HCC形成、发展、转归的过程中所发挥的作用尚不清楚, HBx的具体功能及致病机制还需要进一步的揭示。

随着分子生物学的发展, 应用基因转导的技术在肝癌细胞特异表达HBx是研究HBx生物学功能与病理机制的重要手段。X基因序列具有较高的保守性, 不含有内含子, 经PCR克隆所得目的基因可以直接用于该蛋白的原核和真核表达。由于HBx对肝癌细胞的影响往往是长期积累的效果, 因此, 建立一种稳定表达HBx的肝癌细胞株非常必要。在既往研究报道中, 已有许多成功建立长期稳定表达HBx的肝癌细胞株, 最常见的是HepG2和Huh7细胞系<sup>[22-25]</sup>。这些研究大都利用脂质体转染的方法进行稳定表达株的细胞筛选。这种方法操作简单, 含有HBV X基因的重组载体可直接转染HepG2或Huh7细胞系进行瞬时表达, 再通过携带的抗性基因进行筛选稳定表达的细胞株。这些载体(如pcDNA3)在目的基因上

游使用强启动子, 抗性基因使用弱启动子, 以期筛选高表达的细胞株<sup>[26]</sup>。然而, 这种筛选方法阳性率低, 难以获得长期稳定表达的细胞株。在本研究中探索利用慢病毒载体的方法筛选稳定表达HBx的HepG2细胞。与传统的脂质体转染方法不同, 慢病毒载体的操作相对复杂, 既要和辅助病毒共转染, 还要经过有效的病毒包装, 产生具有感染能力的病毒颗粒才能用于感染宿主细胞, 并将目的基因整合到宿主基因组中。相比脂质体转染, 病毒感染可使宿主细胞中发生整合的频率相对较高, 有助于获得长期稳定表达的细胞株<sup>[27,28]</sup>。在筛选过程中, 我们发现大部分克隆(>80%)RT-PCR鉴定成阳性(数据未显示), 在8-14 d便可筛选获得稳定表达株, 效率远高于脂质体筛选的方法。筛选出的稳定表达株在3 d-2 mo均有较高的表达水平, 而在24 h仅有低水平表达。与其他载体相比, 慢病毒载体的目的基因表达较为滞后。有报道利用腺病毒表达系统筛选稳定表达HBx的HepG2细胞株<sup>[29,30]</sup>, 腺病毒是双链DNA, 基因组游离于宿主基因组外, 也较难获得稳定表达的细胞株。

由此可见, 慢病毒载体在HepG2-HBx稳定表达株的筛选具有一定优势。本研究构建HBx重组慢病毒表达载体, 实现HBx分子在肝癌细胞HepG2中的稳定性表达, 为后续研究HBx在细胞增殖、细胞周期、蛋白降解、基因稳定性、肿瘤细胞凋亡提供一个细胞模型。此外, 构建的HBx慢病毒载体还可应用于其他非分裂细胞系的基因转导, 研究HBx在不同细胞中的作用。慢病毒表达系统是日前基因治疗的主要手段<sup>[31]</sup>, 本研究利用慢病毒载体在HepG2中稳定表达HBx的方法, 或许可成为日后研究肝癌基因治疗的提示和借鉴。

志谢: 感谢中山大学第三附属医院感染科彭晓

谋教授在实验过程中给予的指导!

#### 4 参考文献

- Arbuthnot P, Capovilla A, Kew M. Putative role of hepatitis B virus X protein in hepatocarcinogenesis: effects on apoptosis, DNA repair, mitogen-activated protein kinase and JAK/STAT pathways. *J Gastroenterol Hepatol* 2000; 15: 357-368
- Benhenda S, Cougot D, Buendia MA, Neuveut C. Hepatitis B virus X protein molecular functions and its role in virus life cycle and pathogenesis. *Adv Cancer Res* 2009; 103: 75-109
- 侯全玲, 唐红, 黄飞骏. 乙型肝炎病毒X蛋白与原发肝癌. *世界华人消化杂志* 2008; 16: 50-55
- Li WH, Miao XH, Qi ZT, Ni W, Zhu SY, Fang F. Proteomic analysis of differently expressed proteins in human hepatocellular carcinoma cell lines HepG2 with transfecting hepatitis B virus X gene. *Chin Med J (Engl)* 2009; 122: 15-23
- 曹鹏飞, 柳永和. 稳定转染HBx基因的HepG2细胞对raf-1表达的影响. *肿瘤研究与临床* 2007; 19: 724-726
- 黄婷婷, 程丽英, 李毅, 蔡雪飞, 刘湘, 黄爱龙, 汤华. 利用基因敲入技术在肝癌细胞系中稳定表达HBV的X抗原. *医学分子生物学杂志* 2008; 5: 299-302
- 陆荫英, 李克, 成军, 王琳, 刘妍, 段惠娟, 张玲霞. 乙型肝炎病毒X基因酵母表达载体构建及表达. *世界华人消化杂志* 2002; 10: 15-18
- Ganem D. Virology. The X files--one step closer to closure. *Science* 2001; 294: 2299-2300
- Lee AT, Lee CG. Oncogenesis and transforming viruses: the hepatitis B virus and hepatocellular carcinoma--the etiopathogenic link. *Front Biosci* 2007; 12: 234-245
- Nguyen DH, Ludgate L, Hu J. Hepatitis B virus-cell interactions and pathogenesis. *J Cell Physiol* 2008; 216: 289-294
- Park EH, Koh SS, Srisuttee R, Cho IR, Min HJ, Jhun BH, Lee YS, Jang KL, Kim CH, Johnston RN, Chung YH. Expression of HBx, an oncoprotein of hepatitis B virus, blocks reoviral oncolysis of hepatocellular carcinoma cells. *Cancer Gene Ther* 2009; 16: 453-461
- Zhang X, Zhang H, Ye L. Effects of hepatitis B virus X protein on the development of liver cancer. *J Lab Clin Med* 2006; 147: 58-66
- Tang H, Oishi N, Kaneko S, Murakami S. Molecular functions and biological roles of hepatitis B virus x protein. *Cancer Sci* 2006; 97: 977-983
- Ye L, Qi J, Li G, Tao D, Song S. The effect of HBx gene on the apoptosis of hepatic cells. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci* 2007; 27: 167-169
- Wang XW, Hussain SP, Huo TI, Wu CG, Forgues M, Hofseth LJ, Brechot C, Harris CC. Molecular pathogenesis of human hepatocellular carcinoma. *Toxicology* 2002; 181-182: 43-47
- Ou DP, Tao YM, Chang ZG, Tang FQ, Yang LY. Hepatocellular carcinoma cells containing hepatitis B virus X protein have enhanced invasive potential conditionally. *Dig Liver Dis* 2006; 38: 262-267
- Kekulé AS, Lauer U, Weiss L, Luber B, Hofschneider PH. Hepatitis B virus transactivator HBx uses a tumour promoter signalling pathway. *Nature* 1993; 361: 742-745
- Kim YC, Song KS, Yoon G, Nam MJ, Ryu WS. Activated ras oncogene collaborates with HBx gene of hepatitis B virus to transform cells by suppressing HBx-mediated apoptosis. *Oncogene* 2001; 20: 16-23
- Cougot D, Wu Y, Cairo S, Caramel J, Renard CA, Lévy L, Buendia MA, Neuveut C. The hepatitis B virus X protein functionally interacts with CREB-binding protein/p300 in the regulation of CREB-mediated transcription. *J Biol Chem* 2007; 282: 4277-4287
- Park SG, Chung C, Kang H, Kim JY, Jung G. Up-regulation of cyclin D1 by HBx is mediated by NF-kappaB2/BCL3 complex through kappaB site of cyclin D1 promoter. *J Biol Chem* 2006; 281: 31770-31777
- Wei Y, Neuveut C, Tiollais P, Buendia MA. Molecular biology of the hepatitis B virus and role of the X gene. *Pathol Biol (Paris)* 2010; 58: 267-272
- 杨林, 范红梅, 陈幼明, 谢奇峰, 吴盟, 陈雪娟, 李刚, 高志良. GFP/ HBV X融合蛋白重组载体的构建及稳定表达细胞系的建立. *热带医学杂志* 2007; 7: 112-115, 125
- 郭国斌, 连芳, 梁安民. 乙型肝炎病毒HBx基因荧光真核表达质粒的构建与鉴定. *广西医科大学学报* 2010; 27: 357-360
- He Y, Yang F, Wang F, Song SX, Li DA, Guo YJ, Sun SH. The upregulation of expressed proteins in HepG2 cells transfected by the recombinant plasmid-containing HBx gene. *Scand J Immunol* 2007; 65: 249-256
- Kanda T, Yokosuka O, Nagao K, Saisho H. State of hepatitis C viral replication enhances activation of NF-kB- and AP-1-signaling induced by hepatitis B virus X. *Cancer Lett* 2006; 234: 143-148
- Yang JQ, Pan GD, Chu GP, Liu Z, Liu Q, Xiao Y, Yuan L. Interferon-alpha restrains growth and invasive potential of hepatocellular carcinoma induced by hepatitis B virus X protein. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 5564-5569; discussion 5568
- Logan AC, Lutzko C, Kohn DB. Advances in lentiviral vector design for gene-modification of hematopoietic stem cells. *Curr Opin Biotechnol* 2002; 13: 429-436
- Young LS, Searle PF, Onion D, Mautner V. Viral gene therapy strategies: from basic science to clinical application. *J Pathol* 2006; 208: 299-318
- 马臻, 沈钦海, 陈国民, He T. 乙型肝炎病毒X基因重组腺病毒的构建及在HepG2细胞中的表达. *生物医学工程学杂志* 2007; 24: 1338-1342
- Chen YB, Shi XJ, Lu G, Nie HF, Shen XQ, Yu CH, Gong JP. Recombinant adenovirus with human indoleamine-2,3-dioxygenase and hepatitis B virus preS was constructed and expressed in HepG2 cells. *Chin Med J (Engl)* 2011; 124: 3159-3163
- Lever AM, Kaye JF, McCann E, Chadwick D, Dorman N, Thomas J, Zhao J. Lentivirus vectors for gene therapy. *Biochem Soc Trans* 1999; 27: 841-847

编辑 曹丽鸥 电编 鲁亚静

# Survivin对人胆管癌细胞凋亡相关信号通路的作用机制

卢昕, 肖新波

## ■背景资料

Survivin基因是新近发现的凋亡抑制蛋白基因家族成员,其通过抑制细胞凋亡促进肿瘤发生发展。既往有学者研究发现Survivin基因在胆管癌细胞中也呈现高表达状态,且其表达状态与患者预后相关。但是Survivin基因在胆管癌发生机制中的作用还不明确。

卢昕, 肖新波, 武汉市第一医院胃肠外科 湖北省武汉市 430022

卢昕, 副主任医师, 主要从事外科分子生物学的研究。

武汉市卫生局基金资助项目, No. 0270819

作者贡献分布: 卢昕与肖新波对此文所作贡献均等; 此课题由卢昕与肖新波设计; 研究过程由卢昕操作完成; 研究所用新试剂及分析工具由肖新波提供; 数据分析由卢昕完成; 本论文写作由卢昕完成。

通讯作者: 卢昕, 副主任医师, 430022, 湖北省武汉市硚口区中山大道215号, 武汉市第一医院胃肠外科。

luxin2002wh2002@yahoo.com.cn

电话: 027-85332695

收稿日期: 2011-11-13 修回日期: 2011-12-19

接受日期: 2012-03-10 在线出版日期: 2012-03-18

## Investigation of mechanisms underlying inhibition of apoptosis-related signaling inhibited by survivin in human cholangiocarcinoma cells

Xin Lu, Xin-Bo Xiao

Xin Lu, Xin-Bo Xiao, Department of Gastrointestinal Surgery, the First Hospital of Wuhan, Wuhan 450022, Hubei Province, China

Supported by: the Science Foundation of Public Health Bureau of Wuhan, No. 0270819

Correspondence to: Xin Lu, Associate Chief Physician, Department of Gastrointestinal Surgery, the First Hospital of Wuhan, Wuhan 450022, Hubei Province, China. luxin2002wh2002@yahoo.com.cn

Received: 2011-11-13 Revised: 2011-12-19

Accepted: 2012-03-10 Published online: 2012-03-18

## Abstract

**AIM:** To explore the mechanisms by which survivin regulates apoptosis-related signaling in human cholangiocarcinoma cells.

**METHODS:** SiRNA targeting the survivin gene and control siRNA were constructed and transfected into human cholangiocarcinoma cell line QBC939. The knockdown of survivin expression in QBC939 cells was confirmed by Western blot. Apoptosis rate was evaluated by flow cytometry. Caspase-3 activity was determined using a commercial kit, and expression of caspase-3, caspase-9 and procaspase-9 in QBC939 cells was detected by Western blot.

**RESULTS:** Transfection of siRNA targeting the

survivin gene significantly inhibited survivin expression in QBC939 cells ( $P < 0.05$ ). Inhibition of survivin significantly increased apoptosis rate ( $18.9\% \pm 2.3\%$ ,  $P < 0.05$ ) and caspase-3 activity ( $0.83 \pm 0.15$ ,  $P < 0.01$ ), up-regulated the expression of caspase-3 and caspase-9 (both  $P < 0.05$ ), and down-regulated the expression of procaspase-9 ( $P < 0.05$ ) in QBC939 cells. No significant differences were observed in the above parameters between non-transfected QBC939 cells and cells transfected with control siRNA (all  $P > 0.05$ ).

**CONCLUSION:** Survivin inhibits apoptosis of cholangiocarcinoma cells possibly by inhibiting caspase-3 and caspase-9 activities through activating procaspase-9.

**Key Words:** Survivin gene; Apoptosis; Cholangiocarcinoma cells

Lu X, Xiao XB. Investigation of mechanisms underlying inhibition of apoptosis-related signaling by survivin in human cholangiocarcinoma cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2012; 20(8): 644-648

## 摘要

**目的:** 探讨Survivin基因对人胆管癌细胞凋亡信号通路的调节机制。

**方法:** 构建针对Survivin基因的siRNA和对照siRNA, 分别转染QBC939人胆管癌细胞, Western blot检测siRNA对细胞Survivin的干扰效果。继而分别用流式细胞仪, 激酶活性测定和Western blot检测不同Survivin表达状态下, QBC939细胞的凋亡状态, caspase-3的活性和caspase-3, caspase-9及procaspase-9凋亡信号分子的表达。

**结果:** siRNA-Survivin显著抑制Survivin在QBC939细胞的表达( $P < 0.05$ )。Survivin表达抑制后, QBC939细胞凋亡明显增加( $18.9\% \pm 2.3\%$ ,  $P < 0.05$ ), caspase-3活性显著升高( $0.83 \pm 0.15$ ,  $P < 0.01$ ), caspase-3和caspase-9表达明显上调( $P < 0.05$ ), 而procaspase-9表达降低( $P < 0.05$ )。未转染和转染对照siRNA的QBC939细胞上述变化无显著性差异( $P > 0.05$ )。

## ■同行评议者

秦建民, 主任医师, 上海中医药大学附属普陀医院普外科

**结论:** Survivin基因通过促进procaspase-9的活化以阻止caspase-3和caspase-9的激活从而抑制胆管癌细胞的凋亡。

**关键词:** Survivin基因; 凋亡; 胆管癌细胞

卢昕, 肖新波. Survivin对人胆管癌细胞凋亡相关信号通路的作用机制. 世界华人消化杂志. 2012; 20(8): 644-648

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/644.asp>

## 0 引言

胆管癌是一种对标准化治疗(包括手术疗法、化学疗法和放射疗法)反应较差的恶性肿瘤, 其发生发展的机制还不十分确切<sup>[1,2]</sup>. Survivin基因是新近发现的凋亡抑制蛋白基因家族成员, 其通过抑制细胞凋亡促进肿瘤发生发展<sup>[3]</sup>. 既往有学者研究发现Survivin基因在胆管癌细胞中也呈现高表达状态, 且其表达状态与患者预后相关<sup>[4]</sup>. 但是Survivin基因在胆管癌发生机制中的作用还不明确. 目前研究认为Survivin通过直接抑制凋亡终末效应器caspase-3和caspase-9的活性阻断细胞凋亡过程<sup>[5,6]</sup>. 本研究通过siRNA干扰Survivin基因在胆管癌细胞中的表达, 拟阐明其对胆管癌细胞凋亡的调节机制.

## 1 材料和方法

**1.1 材料** QBC939胆管癌细胞系由西南医院王曙光教授惠赠. Survivin, caspase-3, caspase-9和procaspase-9兔抗人单克隆一抗均购自Santa Cruz Biotechnology公司(USA);  $\beta$ -actin兔抗人单克隆一抗及相应辣根过氧化物酶标记二抗购自武汉博士德公司; 蛋白裂解液和ECL发光试剂盒购自Pierce公司; caspase-3活性测定试剂盒购自Clontech公司(USA); Annexin V-FITC凋亡检测试剂盒购自南京凯基生物公司; siRNA转染试剂盒购自北京全式金生物技术公司.

### 1.2 方法

**1.2.1 siRNA设计构建及细胞转染:** Survivin基因cDNA序列为: 5'-GGACCACCGCATCTC-TACATTCAAGAGATGTAGAGATGCGGTG-GTCC-3'. 其siRNA靶序列为: 5'-AAGGAC-CACCGCATCTCTACA-3'. 阴性对照siRNA序列为随机序列: 5'-AAGCTTCATAAGGCG-CATAGC-3', siRNA设计参考课题前期研究结论<sup>[7]</sup>. 设计的siRNA由上海吉玛制药技术有限公司合成纯化. 接种QBC939胆管癌细胞于24孔板内, 待生长至30%-50%融合时, siRNA转染依照

北京全式金生物技术公司siRNA转染试剂盒说明书进行.

**1.2.2 细胞凋亡检测:** QBC939细胞、QBC939/siRNA(-)细胞和QBC939/siRNA(+)细胞接种于100 mL培养瓶中, 待细胞生长至融合度约为80%( $1 \times 10^6$ )时, 轻微消化细胞, 并及时加入含血清的完全培养基终止反应. 轻微吹打使细胞脱壁, 500 r/min离心5 min收集细胞, 吸弃上清, 用PBS洗涤细胞2次. 后续步骤按照Annexin V FITC凋亡检测试剂盒说明书进行操作, 用流式细胞仪定量分析细胞凋亡水平.

**1.2.3 细胞caspase-3活性测定:** QBC939细胞、QBC939/siRNA(-)细胞和QBC939/siRNA(+)细胞接种于100 mL培养瓶中, 待细胞生长至融合度约为80%( $1 \times 10^6$ )时, 消化收集细胞. 细胞重悬于50  $\mu$ L预冰的细胞裂解缓冲液, 冰上孵育10 min, 再以13 000 r/min 4  $^{\circ}$ C离心10 min, 收集上清液置于冰上Ep管中, 后续步骤按caspase-3活性测定试剂盒说明书进行, 最后用酶标仪测定405 nm处底物裂解产生的荧光强度.

**1.2.4 Western blot检测:** 以冰PBS分别洗QBC939细胞、QBC939/siRNA(-)细胞和QBC939/siRNA(+)细胞2次, 刮取收集细胞并加入蛋白裂解液反复抽提, 冰浴5 min后, 13 000 r/min 4  $^{\circ}$ C离心10 min, 收集上清. 蛋白定量后, 30  $\mu$ g/孔上样, 经10%SDS-PAGE电泳后电转移至NC膜上, 5%脱脂奶粉封闭1 h, 分别加入1:1 000 Survivin, caspase-3, caspase-9和procaspase-9兔抗人单克隆一抗4  $^{\circ}$ C孵育过夜, 相应二抗室温孵育1 h后, ECL发光显影.

**统计学处理** 采用SPSS12.0软件做统计学分析, 结果以mean $\pm$ SD表示, 组间数据比较采用方差分析.  $P < 0.05$ 被认为具有统计学意义.

## 2 结果

**2.1 siRNA抑制胆管癌细胞Survivin基因表达** 本研究构建的针对Survivin基因的siRNA成功转染QBC939胆管癌细胞后, 经Western-blot证实Survivin蛋白的相对表达量在实验组、阴性对照组、空白对照组分别为 $0.225 \pm 0.028$ ,  $0.590 \pm 0.043$ ,  $0.581 \pm 0.023$ . 转染siRNA-Survivin的QBC939胆管癌细胞Survivin蛋白表达与阴性对照组、空白对照组相比明显减少( $P < 0.05$ , 图1).

**2.2 Survivin基因抑制胆管癌细胞凋亡** 采用流式细胞仪定量分析经Annexin V-FITC和PI染色的QBC939细胞、QBC939/siRNA(-)细胞

### ■ 相关报道

有研究已发现Survivin基因在胆管癌细胞中呈现高表达状态, 且其表达状态与患者预后相关.

### ■ 创新盘点

本研究运用siRNA研究凋亡抑制基因Survivin对胆管癌的抑制作用并初步探讨其机制。目前国内外尚未见相关文献。

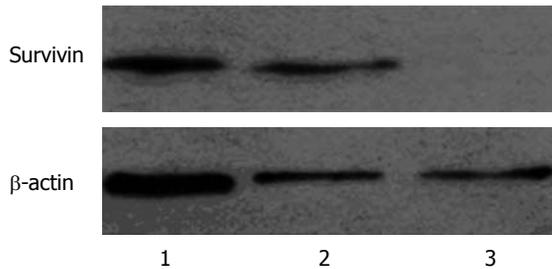


图1 siRNA对Survivin蛋白表达的抑制。1: QBC939细胞; 2: QBC939/silence(-)细胞; 3: QBC939/silence(+)细胞。

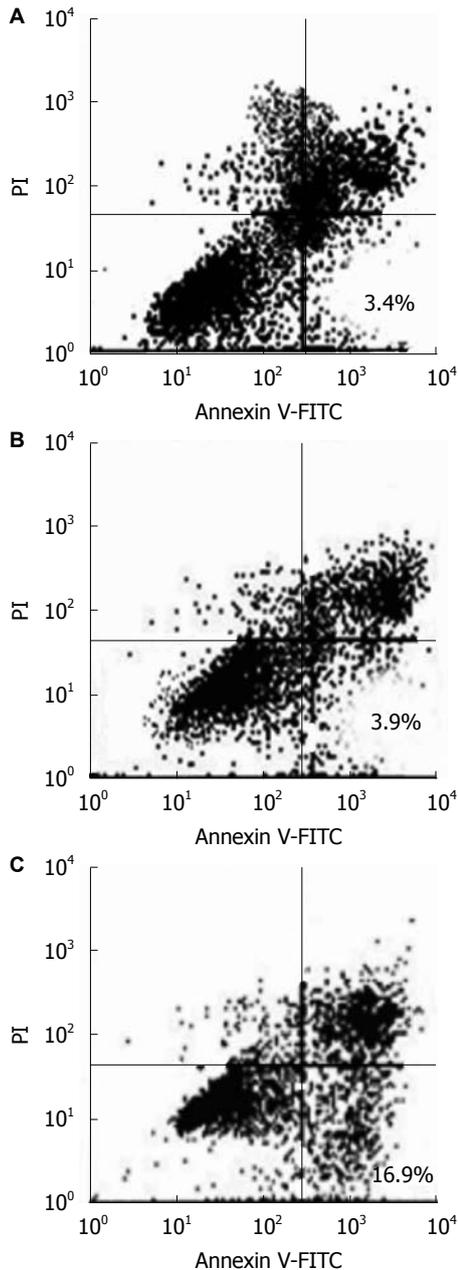


图2 细胞凋亡率检测流式细胞。A: QBC939细胞; B: QBC939/silence(-)细胞; C: QBC939/silence(+)细胞。

和QBC939/siRNA(+)的凋亡水平, 结果显示: QBC939/silence(+)凋亡细胞明显增多(18.9%±

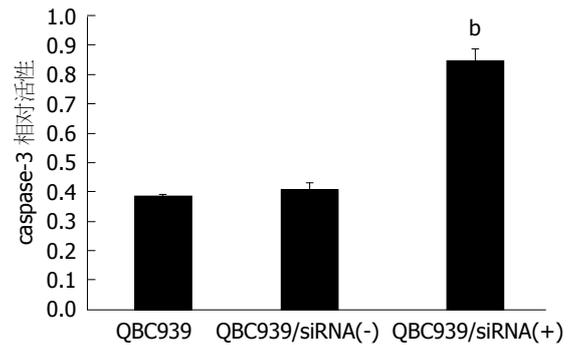


图3 caspase-3在各实验组活性变化直方图。<sup>b</sup> $P < 0.01$  vs 其他组。

2.3%), 与QBC939细胞(3.4%±0.9%) 和QBC939/silence(-)细胞(3.9%±1.0%)相比, 差异具有显著性( $P < 0.01$ , 图2)。

2.3 Survivin基因抑制细胞caspase-3活性 细胞caspase-3活性测定显示QBC939和QBC939/silence(-)细胞吸光度(A)值较低( $0.39 \pm 0.11$  vs  $0.41 \pm 0.13$ ), 两者之间无显著性差异( $P > 0.05$ ); 而转染siRNA-Survivin的QBC939细胞的A值较高( $0.83 \pm 0.15$ ), 与对照组相比有显著差异( $P < 0.01$ , 图3)。

2.4 抑制Survivin基因活化细胞凋亡相关信号分子 Western blot检测信号分子caspase-3、procaspase-9和caspase-9蛋白的表达显示: caspase-3、caspase-9、procaspase-9 A值在QBC939细胞、QBC939/siRNA(-)、QBC939/siRNA(+)分别为:  $0.201 \pm 0.014$ ,  $0.297 \pm 0.015$ ,  $0.782 \pm 0.021$ ;  $0.215 \pm 0.013$ ,  $0.289 \pm 0.009$ ,  $0.791 \pm 0.081$ ;  $1.386 \pm 0.112$ ,  $0.892 \pm 0.043$ ,  $0.281 \pm 0.011$ 。QBC939/siRNA(+)细胞中caspase-3、caspase-9表达较对照组明显增加( $P < 0.01$ ), 而procaspase-9表达明显降低( $P < 0.05$ , 图4)。

### 3 讨论

肿瘤的发生是一种多因素、多阶段、长期相互作用的过程<sup>[8,9]</sup>。近年来, 细胞凋亡在肿瘤发展过程中的作用引起了广泛关注<sup>[10-12]</sup>。目前研究表明肿瘤细胞中凋亡抑制基因的高表达能明显抑制细胞的凋亡, 逃避机体免疫系统对肿瘤细胞的识别和清除<sup>[13,14]</sup>, 导致细胞增殖、分化、凋亡三者间的平衡失调进而参与肿瘤的发生发展<sup>[15,16]</sup>。

Survivin是1997年发现的凋亡抑制蛋白(inhibitor of apoptosis protein, IAPs)家族的一个新成员<sup>[17]</sup>。他的主要作用是抑制肿瘤细胞凋亡, 促进肿瘤细胞增殖<sup>[18]</sup>。目前研究发现胆管癌中Survivin表达明显高于正常组织, 并且参与了胆管癌的发生发展过程<sup>[19]</sup>, 然而Survivin在胆管癌

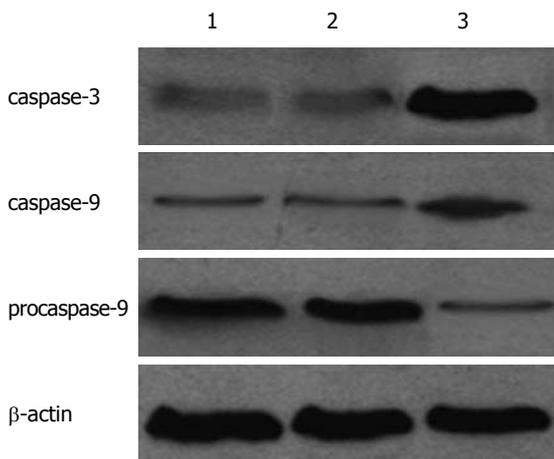


图4 caspase-3、caspase-9、procaspase-9蛋白表达变化。1: QBC939细胞; 2: QBC939/silence(-)细胞; 3: QBC939/silence(+)细胞。

发生发展中的确切机制仍不明确<sup>[20]</sup>。

Caspases是一个特异性的半胱氨酸蛋白酶家族,其活性是细胞内执行凋亡过程中最关键的环节之一<sup>[21]</sup>。其中caspase-3广泛分布于各种类型的细胞中,是多种刺激诱导的凋亡中最主要的效应分子,其降解凋亡底物的活性最强<sup>[22]</sup>。Caspase-3活化后以相同方式作用于另一些成员,从而构成蛋白酶级联放大系统,介导细胞核片段化,并参与凋亡小体的形成<sup>[23]</sup>。因此对caspase蛋白级联反应的抑制将导致细胞对凋亡的抵抗<sup>[24]</sup>,实际上,许多抗凋亡蛋白都具有抗caspases活性的作用,如Survivin<sup>[25]</sup>。在本实验中我们发现, QBC939细胞高表达Survivin,而caspase-3的活性水平极低,这有利于胆管癌细胞逃避凋亡,维持较高的增殖活性,促进肿瘤发生发展。而在siRNA-Survivin转染后, caspase-3活性水平显著升高,这与以前的研究发现Survivin具有抑制caspase-3活性的功能是一致的。这一结果说明在QBC939细胞中表达的caspase-3主要以无活性的形式存在,单独caspase-3的表达不足以诱导凋亡,以siRNA沉默Survivin基因的表达可以导致caspase-3的激活,活化的caspase-3再发挥其介导细胞凋亡的作用。这一结果也提示在QBC939胆管癌细胞中caspase-3的低活性状态是由于Survivin的表达所致,在转染siRNA-Survivin诱导QBC939细胞发生的凋亡过程中, caspase-3的活化是一个关键性的步骤。

然而Survivin抑制肿瘤细胞凋亡的信号传导通路至今仍存在争议,有研究表明Survivin可能是通过以下2条途径来抑制细胞凋亡<sup>[26,27]</sup>: 其一是通过直接抑制凋亡终末效应器caspase-3和caspase-7的活性阻断各种刺激诱导的细胞凋亡

过程<sup>[28]</sup>; 其二是Survivin与周期蛋白激酶cdk4、p34cdc2相互作用阻断凋亡信号传导通路<sup>[29]</sup>。Survivin依赖细胞增殖信号进入核内与cdk4结合,导致Cdk2/CyclinE激活和Rb磷酸化以启动细胞进入生长周期,加快G1→S期的转换,同时使p21从cdk4中释放出来并易位到线粒体与procaspase-3形成复合物,抑制caspase-3的活性,阻断线粒体释放细胞色素c从而抑制细胞凋亡<sup>[30]</sup>。Wall等<sup>[31]</sup>研究发现Survivin是周期蛋白激酶p34cdc-Cyclin B1的有丝分裂期底物, Survivin磷酸化后与caspase-9结合并抑制其活性,阻断caspase-9依赖性的细胞凋亡信号传导。由此可见, Survivin抑制肿瘤细胞凋亡的机制还不清楚。本研究发现在QBC939细胞中caspase-9和caspase-3的表达和活性水平均较低,这有利于胆管癌细胞逃逸凋亡,维持较高的增殖活性,促进肿瘤的发生和发展。而在应用siRNA抑制Survivin表达后,一些信号分子的表达发生变化,主要表现在procaspase-9表达减少,而caspase-9和caspase-3表达增加。由此推测,抑制Survivin的表达导致procaspase-9表达减少,而caspase-9表达增加,进而激活procaspase-3产生caspase-3,随后激活caspase级联,导致细胞的凋亡。研究认为Survivin抑制肿瘤细胞凋亡的信号传导通路之一是通过促进procaspase-9的活化而阻止caspase-3和caspase-9的激活,抑制肿瘤细胞的凋亡。

本研究初步阐明了Survivin抑制胆管癌细胞凋亡的相关信号分子变化,探讨了Survivin凋亡抑制的可能作用机制,然而本研究所涉及的信号分子有限, Survivin抑制凋亡信号传导的下游通路是我们下一步深入研究的重点。

#### 4 参考文献

- 1 Friman S. Cholangiocarcinoma--current treatment options. *Scand J Surg* 2011; 100: 30-34
- 2 Charbel H, Al-Kawas FH. Cholangiocarcinoma: epidemiology, risk factors, pathogenesis, and diagnosis. *Curr Gastroenterol Rep* 2011; 13: 182-187
- 3 Varfolomeev E, Vucic D. Inhibitor of apoptosis proteins: fascinating biology leads to attractive tumor therapeutic targets. *Future Oncol* 2011; 7: 633-648
- 4 左克强, 艾开兴, 郭兴军, 宋自芳, 陈立波, 郑启昌. Survivin蛋白和mRNA在胆管癌中的表达和意义. *华中科技大学学报(医学版)* 2007; 36: 199-201
- 5 Olie RA, Simões-Wüst AP, Baumann B, Leech SH, Fabbro D, Stahel RA, Zangemeister-Wittke U. A novel antisense oligonucleotide targeting survivin expression induces apoptosis and sensitizes lung cancer cells to chemotherapy. *Cancer Res* 2000; 60: 2805-2809
- 6 Baratchi S, Kanwar RK, Kanwar JR. Novel survivin mutant protects differentiated SK-N-SH human

#### ■同行评价

本研究采用siRNA干扰技术观察Survivin基因对胆管癌细胞生长调控作用及其机制,研究方法得当,结果可靠,初步揭示了Survivin基因参与胆管癌细胞生物学行为,为研究胆管癌的发生与治疗提供重要的理论基础。

- neuroblastoma cells from activated T-cell neurotoxicity. *J Neuroimmunol* 2011; 233: 18-28
- 7 卢昕, 胡安斌, 张勇, 陈立波, 郑启昌. 靶向Survivin的siRNA对肝癌细胞生物学行为的影响. *世界华人消化杂志* 2004; 12: 1534-1538
  - 8 Kimmelman AC. The dynamic nature of autophagy in cancer. *Genes Dev* 2011; 25: 1999-2010
  - 9 Li G, Xiao Z, Liu J, Li C, Li F, Chen Z. Cancer: a proteomic disease. *Sci China Life Sci* 2011; 54: 403-408
  - 10 Kelly GL, Strasser A. The essential role of evasion from cell death in cancer. *Adv Cancer Res* 2011; 111: 39-96
  - 11 Plati J, Bucur O, Khosravi-Far R. Apoptotic cell signaling in cancer progression and therapy. *Integr Biol (Camb)* 2011; 3: 279-296
  - 12 Llambi F, Green DR. Apoptosis and oncogenesis: give and take in the BCL-2 family. *Curr Opin Genet Dev* 2011; 21: 12-20
  - 13 Lheureux S, Le Moulec S. [Molecules involved in apoptosis regulation as therapeutic targets in oncology]. *Bull Cancer* 2011; 98: 1029-1036
  - 14 LaCasse EC, Baird S, Korneluk RG, MacKenzie AE. The inhibitors of apoptosis (IAPs) and their emerging role in cancer. *Oncogene* 1998; 17: 3247-3259
  - 15 Erenpreisa J, Cragg MS. Cancer: a matter of life cycle? *Cell Biol Int* 2007; 31: 1507-1510
  - 16 Green DR, Evan GI. A matter of life and death. *Cancer Cell* 2002; 1: 19-30
  - 17 Sela B. [Survivin: anti-apoptosis protein and a prognostic marker for tumor progression and recurrence]. *Harefuah* 2002; 141: 103-107, 123
  - 18 Chiou SK, Jones MK, Tarnawski AS. Survivin - an anti-apoptosis protein: its biological roles and implications for cancer and beyond. *Med Sci Monit* 2003; 9: PI25-PI29
  - 19 Qin XL, Xue HZ, Wang ZR, Liu HS, Zhou HB, Ma W. [Expression of Survivin protein in extrahepatic cholangiocarcinoma and its relationship with the prognosis]. *Zhonghua Waike Zazhi* 2009; 47: 1852-1856
  - 20 Altieri DC. Survivin and IAP proteins in cell-death mechanisms. *Biochem J* 2010; 430: 199-205
  - 21 Strasser A, Cory S, Adams JM. Deciphering the rules of programmed cell death to improve therapy of cancer and other diseases. *EMBO J* 2011; 30: 3667-3683
  - 22 Raff M. Cell suicide for beginners. *Nature* 1998; 396: 119-122
  - 23 Takeda K, Naguro I, Nishitoh H, Matsuzawa A, Ichijo H. Apoptosis signaling kinases: from stress response to health outcomes. *Antioxid Redox Signal* 2011; 15: 719-761
  - 24 Enari M, Talanian RV, Wong WW, Nagata S. Sequential activation of ICE-like and CPP32-like proteases during Fas-mediated apoptosis. *Nature* 1996; 380: 723-726
  - 25 Suzuki A, Ito T, Kawano H, Hayashida M, Hayasaki Y, Tsutomi Y, Akahane K, Nakano T, Miura M, Shiraki K. Survivin initiates procaspase 3/p21 complex formation as a result of interaction with Cdk4 to resist Fas-mediated cell death. *Oncogene* 2000; 19: 1346-1353
  - 26 Keibell MR, Giles DC. Some experimental influences of lawyers' complicated questions on eyewitness confidence and accuracy. *J Psychol* 2000; 134: 129-139
  - 27 Mesri M, Wall NR, Li J, Kim RW, Altieri DC. Cancer gene therapy using a survivin mutant adenovirus. *J Clin Invest* 2001; 108: 981-990
  - 28 Cladis FP, Litman RS. Transient cardiovascular toxicity with unintentional intravascular injection of 3% 2-chloroprocaine in a 2-month-old infant. *Anesthesiology* 2004; 100: 181-183
  - 29 Wittmann S, Bali P, Donapaty S, Nimmanapalli R, Guo F, Yamaguchi H, Huang M, Jove R, Wang HG, Bhalla K. Flavopiridol down-regulates antiapoptotic proteins and sensitizes human breast cancer cells to epothilone B-induced apoptosis. *Cancer Res* 2003; 63: 93-99
  - 30 O'Connor DS, Grossman D, Plescia J, Li F, Zhang H, Villa A, Tognin S, Marchisio PC, Altieri DC. Regulation of apoptosis at cell division by p34cdc2 phosphorylation of survivin. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 13103-13107
  - 31 Wall NR, O'Connor DS, Plescia J, Pommier Y, Altieri DC. Suppression of survivin phosphorylation on Thr34 by flavopiridol enhances tumor cell apoptosis. *Cancer Res* 2003; 63: 230-235

编辑 李军亮 电编 鲁亚静

# 化疗致胃肠道黏膜炎动物模型构建方法的研究进展

张敏, 陈锦秀, 谭景予, 刘贤亮

张敏, 陈锦秀, 谭景予, 刘贤亮, 福建中医药大学 福建省福州市 350108

张敏, 硕士, 主要从事肿瘤康复相关临床及实验研究.

福建省教育厅资助省属高校科研专项基金资助项目, No. JK2011024

作者贡献分布: 本文由张敏构思、设计并撰写综述; 谭景予与刘贤亮进行文献检索和筛选; 陈锦秀教授进行修改和审核.

通讯作者: 陈锦秀, 教授, 硕士生导师, 350108, 福建省福州市闽侯上街华佗路1号, 福建中医药大学护理学院. jinxuoc@163.com  
电话: 0591-22861027

收稿日期: 2011-11-15 修回日期: 2012-01-10

接受日期: 2012-03-10 在线出版日期: 2012-03-18

## Progress towards the development of animal models of chemotherapy-induced gastrointestinal mucositis

Min Zhang, Jin-Xiu Chen, Jing-Yu Tan, Xian-Liang Liu

Min Zhang, Jin-Xiu Chen, Jing-Yu Tan, Xian-Liang Liu, Department of Nursing, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350108, Fujian Province, China  
Supported by: the Higher Education Research Fund of Educational Commission of Fujian Province, No. JK2011024

Correspondence to: Jin-Xiu Chen, Professor, Department of Nursing, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350108, Fujian Province, China. jinxuoc@163.com

Received: 2011-11-15 Revised: 2012-01-10

Accepted: 2012-03-10 Published online: 2012-03-18

### Abstract

The pathogenesis of chemotherapy-induced gastrointestinal mucositis is not fully elucidated, which makes it extremely difficult to develop effective interventions. Recently, the use of animal models of chemotherapy-induced gastrointestinal mucositis has led to advances in the understanding of cellular mechanisms and clinical pharmacology of various types of chemotherapy drugs. Tumor-bearing models, non-tumor-bearing models, transgenic models and gene knockout models have been developed to assess the effect of chemotherapy on chemotherapy-induced gastrointestinal mucositis. In this paper, we comprehensively analyze the advantages and disadvantages of various methods for developing chemotherapy-induced gastrointestinal mucositis to provide a reference for the choice of animal models for future research of chemother-

apy-associated mucosal toxicity and the underlying mechanisms.

**Key Words:** Gastrointestinal mucositis; Intestinal mucosal barrier injury; Chemically induced; Animal model

Zhang M, Chen JX, Tan JY, Liu XL. Progress towards the development of animal models of chemotherapy-induced gastrointestinal mucositis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2012; 20(8): 649-655

### ■背景资料

化疗后胃肠道黏膜炎已成为近年来肿瘤支持治疗的研究热点, 由于其根本的发病机制尚未完全阐明, 研究者无法直接在人体上开展实验, 因此动物模型的应用在该领域的研究中起到极为关键的作用.

### 摘要

化疗后胃肠道黏膜炎的主要问题之一是其根本的发病机制尚未完全阐明, 研究者无法直接在人体上开展实验, 难以制定有效干预措施. 动物模型的应用在该领域的研究中起到极为关键的作用. 近年来, 研究者通过复制接近人体状态的动物模型, 在各类化疗药物的细胞机制和临床药理学研究方面取得了显著进展. 本文通过MeSH主题词结合自由词, 电子检索PubMed(1950-2011)、Science Direct(1823-2011)数据库, 对荷瘤大鼠化疗胃黏膜炎模型、胃肠黏膜炎非荷瘤模型、基因敲除和转基因动物模型进行综述, 全面分析各种化疗后胃肠道黏膜炎模型的造模方法及优缺点, 为今后研究化疗的胃肠黏膜毒性反应及其机制, 提供造模方面的选择和参考依据.

**关键词:** 胃肠黏膜炎; 肠黏膜损伤; 药物疗法; 动物模型

张敏, 陈锦秀, 谭景予, 刘贤亮. 化疗致胃肠道黏膜炎动物模型构建方法的研究进展. *世界华人消化杂志* 2012; 20(8): 649-655  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/649.asp>

### 0 引言

“黏膜屏障损伤”也称为“黏膜炎”, 是肿瘤患者化疗过程中主要的剂量限制性不良反应<sup>[1]</sup>, ESMO(european society for medical oncology)将其定义为由肿瘤治疗引起的口腔和/或胃肠道的炎性病变和/或溃疡性病变<sup>[2]</sup>. 流行病学资料显示, 由肿瘤治疗所导致的口腔和胃肠道黏膜炎

### ■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

## ■ 研发前沿

近年来,基因敲除GIM模型和转基因GIM动物模型应用日益广泛,值得关注。但鉴于各类模型只侧重于表现化疗胃肠道黏膜炎的某些主要症状及病理生理变化,目前在建立化疗GIM模型方面尚无统一标准,对模型的探索仍是今后的科研焦点。

总发生率高达100%<sup>[3]</sup>。根据化疗方案不同,胃肠道黏膜炎(gastrointestinal mucositis, GIM)的发生率可达40%-76%,成为近年来肿瘤支持治疗的研究热点<sup>[4,5]</sup>。GIM可引起恶心、呕吐、腹泻、食欲减退等一系列胃肠道症状;严重时出现厌食、水电解质及酸碱平衡失调、贫血等反应,甚至导致化疗相关性死亡<sup>[6-8]</sup>。上述反应致使临床试验中的绝大多数患者不得不停止或减量化疗。肿瘤学家意识到,要加强药物预防性干预效果、改善预后,则必须克服化疗相关毒性反应。然而目前胃肠黏膜炎发病机制尚未完全阐明<sup>[9]</sup>,研究者无法直接在人体上开展实验,难以制定有效干预措施。因此,开发和复制接近人体状态的动物模型显得尤为必要。本文旨在对各种化疗致GIM的造模方法进行综述,以期对化疗引起的各类胃肠道不良反应的预防、治疗、营养及预后提供安全、稳定和可靠的造模参考。

## 1 纳入文献研究方法

电子检索PubMed(1950/2011)、Science Direct(1823/2011)数据库收录的化疗后胃肠道黏膜炎模型的相关研究和论文报告。采用MeSH主题词结合自由词检索,英文主题词为“Mucositis/chemically induced; Models Animal”,自由词为“Gastrointestinal Mucositis; Intestinal mucosal barrier injury; Chemotherapy-Induced Mucositis; Alimentary tract mucositis”,不限定文章语言种类。同时进行参考文献的追溯,并注意“灰色”文献,如未发表的学位论文、会议论文等。

纳入标准:(1)文献主体内容与GIM模型紧密联系的文章;(2)研究设计和研究方法可靠的实验研究类文章;(3)观点明确,分析全面的理论研究类文章。排除标准:(1)内容陈旧或重复文献;(2)体外实验文章;(3)非化疗药物(如放疗等)造成的胃肠道损伤;(4)研究设计为非随机对照研究。

经逐一仔细阅读全文,严格按照纳入和排除标准筛选文献。文献的筛选由2人独立完成,将2人的筛查结果进行比对,不一致处由2人讨论解决或第3方仲裁决定。电子检索获取文献390篇,其中PubMed 201篇、Science Direct 189篇,阅读标题和摘要进行初筛,共113篇文献符合标准,进一步阅读全文,二次筛选后,共纳入70篇进行综述。

## 2 纳入文献综合分析

### 2.1 荷瘤大鼠化疗胃肠黏膜炎模型 Gibson等<sup>[10,11]</sup>

在荷瘤模型基础上,以♀DA(dark agouti)大鼠为受试对象,构建化疗致GIM的荷瘤大鼠模型。首先采用肿瘤细胞悬液接种法,于化疗开始前9 d皮下植入乳腺腺癌细胞,制备腺癌模型;随后选用200 mg/kg伊立替康(Irinotecan, CPT-11)一次性腹腔注射,制备GIM腺癌模型。72 h内造模成功率为66%。结果评价采用盲法,可见模型大鼠出现腹泻、喜卷缩、少动、消瘦等症状。其中,以腹泻症状最为严重,72 h内达到腹泻高峰,82%大鼠出现中重度腹泻,96 h死亡率达50%。Kim等<sup>[12]</sup>将CT26结肠癌细胞株接种到小鼠体内后,多次腹腔注射5-氟尿嘧啶[5-Fu 30 mg/(kg·d),共4 d],制备CT26小鼠GIM模型。观察可见,CT26小鼠化疗后第3天出现腹泻和体质量下降(25.3%),上皮细胞增殖减少。另有早期研究<sup>[12,13]</sup>用1.5 mg/kg甲氨喋呤(Methotrexate, MTX)腹腔注射2 d造模,结果显示化疗结束6 h后肠隐窝细胞凋亡增加28倍,2-4 d可见绒毛萎缩增加。同时可见化疗第1天后大鼠肿瘤扩散减少,第2天肿瘤质量减低、肿瘤细胞凋亡增加。

上述荷瘤模型已被国外学者<sup>[14-16]</sup>反复多次应用于抗黏膜毒性药物(如微生物制剂、KGF等),以及各种化疗药物(如MTX、CPT-11、5-FU等)胃肠黏膜损伤机制的研究。被证实能够有效模拟人体黏膜炎的发展过程,值得借鉴。其优点在于受试动物在肿瘤生长和化疗黏膜毒性反应上具有高度的同质性,可以保证受试动物个体间病理变化相对一致;此外,研究者可以同时观察肿瘤细胞和黏膜损害对大鼠的影响作用。缺点是造模时间长、花费大,致使研究受限。

### 2.2 基因敲除小鼠化疗胃肠黏膜炎模型

目前,基因敲除小鼠化疗胃肠黏膜炎模型应用日趋广泛,其最常见造模药物为MTX和5-Fu<sup>[17,18]</sup>。相对大鼠而言,小鼠对MTX介导的胃肠黏膜损伤耐受性更强。Kato等<sup>[19]</sup>为研制mrp1基因敲除小鼠化疗GIM模型,采用♂FVB野生型小鼠(mrp1<sup>+/+</sup>)和FVB基因敲除小鼠(mrp1<sup>-/-</sup>)连续4 d腹腔注射MTX 50 mg/(kg·d),各组均未见造模后死亡。实验第5天体质量减轻大于5%,mrp1<sup>+/+</sup>组第7天体质量开始恢复,而mrp1<sup>-/-</sup>组体质量继续下降;摄食和饮水与体质量下降水平相一致,化疗后第4天摄入量mrp1<sup>-/-</sup>组显著低于mrp1<sup>+/+</sup>组;化疗第7天,mrp1<sup>-/-</sup>组全部出现嗜睡、拱背和皮毛枯槁,并出现严重腹泻等GIM典型症状。另有研究<sup>[20]</sup>通过皮下注射300 mg/kg MTX诱导TGF- $\alpha$ 基因敲除小鼠GIM模型,成活率为100%。观察发现模

型小鼠近端小肠有丝分裂减少, 隐窝损失或失真, 绒毛萎缩、缩短以及炎症细胞浸润等病理改变, 提示模型复制成功. Tran等<sup>[21-23]</sup>以C57BL/6金属硫蛋白基因敲除小鼠MT<sup>-/-</sup>和C57BL/6野生型小鼠MT<sup>+/+</sup>为对象, 分别给予一次性皮下注射MTX 500 mg/kg, 制备MT基因敲除小鼠GIM模型和MTX诱导的野生型小鼠GIM模型. 通过比较发现, 前者肠道组织的损害和中性粒细胞的浸润更严重, 对MTX引起的肠黏膜损伤较后者更为敏感, 说明MT基因可能在MTX引起肠道损伤中发挥保护作用. 除此之外, Tucker等<sup>[24-27]</sup>采用5-FU一次性大剂量(450 mg/kg)或分次腹腔注射(40 mg/kg 5-Fu, 共5 d)造模, 分别对caspase-11、血小板活化因子(platelet-activating factor, PAF)、叶酸(folic acid)、肠三叶因子(intestinal trefoil factor, ITF)等基因敲除小鼠进行研究, 从而为化疗致GIM的预防和修复提供科学依据.

以上模型具有靶向性特点, 对于研究动物遗传与GIM相关基因的功能十分有用, 但仍有其局限性. 首先, 基因敲除小鼠的培育成功较为复杂和困难, 特别是基因重组时, 同源基因位点和重组率相当低, 是获得成功的主要障碍. 其次, 若所敲除的基因是具有致命功能的基因, 小鼠将在胚胎早期死亡(如早期出血致死); 若敲除的基因可被多功能的其他基因功能代偿, 这样就会使表型改变模糊, 致使结果难以分析.

**2.3 转基因小鼠化疗胃肠黏膜炎模型** 转基因小鼠又称为“智能检测试管”, 可用来研究人类疾病的生物学基础和各种治疗方案, 检测潜在的治疗药物, 也可根据意愿在特定类型细胞中打开或关闭转基因的表达. Huang等<sup>[28]</sup>利用肠道表皮细胞生长因子(epidermal growth factor, EGF)广泛表达的转基因小鼠模型, 评估EGF对化疗引起的肠道损伤的影响. 经RT-PCR确认EGF在转基因小鼠回肠中广泛表达后, 持续4 d给予5-FU 50 mg/(kg·d)腹腔注射造模. 转基因小鼠化疗GIM模型存活率为100%. 症状观察发现, 造模后第4天小鼠体质量开始下降, 第6天下降达到10%, 直至实验结束仅恢复至基线水平的50%. 病理显示绒毛高度显著缩短, 隐窝深度增加. 转基因小鼠模型的优点之一是能够最大限度地减少因给药所致的混杂因素, 如口服、皮下或腹腔给药所致差异; 其次是具有器官特异性, 基因在特异组织(如肠道)中表达, 避免肠内或肠外给予外源性生长因子对机体带来的系列影响. 但小鼠与人类具有很大差别, 因此医学

上转基因模型提供的信息与人体并不总是相关; 实际应用中, 制作和维持转基因动物相对耗时、耗钱, 使转基因小鼠的应用受到一定限制.

**2.4 化疗致胃肠黏膜炎非荷瘤模型** 为了排除混杂因素, 单独研究化疗药物对胃肠黏膜的毒性作用, 国外学者根据自身研究目的和观测指标, 开发了各种胃肠黏膜炎非荷瘤模型. 根据所用化疗药物的种类、剂量、间隔时间和给药方式不同, 所造模型的侧重点也各不相同. 因模型动物黏膜损伤的严重程度和主要症状与给药方案关系密切, 现根据不同给药方案, 分为以下3类.

**2.4.1 一次性注射给药:** (1)5-Fu. 化疗药物对肠黏膜屏障损伤的众多试验中, 针对5-Fu的研究较多. 40多年来, 5-Fu作为一种抗嘧啶类抗代谢药, 已被广泛应用于治疗多种人类肿瘤. Pedro等<sup>[29]</sup>采用 $\delta$  Wistar大鼠, 给予5-Fu 150 mg/kg一次性腹腔注射, 动物成活率为100%. 大鼠体质指数于化疗后3 d、5 d、15 d明显下降, 其中以化疗后第3天减低最为显著. 化疗后第3天, 病理可见胃黏膜固有层存在散在的嗜酸性粒细胞; 肠绒毛变短变粗, 互相融合, 并且存在绒毛断裂现象, 肠腔内出现大小不等的绒毛碎片; 上皮细胞大小不一, 排列紊乱; 回肠、结肠黏膜层及固有层厚度变薄, 并见大量炎症细胞, 小肠腺体成萎缩样变. 以上病变至第15天开始恢复, 可观察到绒毛和隐窝尚存, 十二指肠肌层仍有少许中性粒细胞浸润. 学者们<sup>[30-38]</sup>通过评价各代谢指标(体质量、摄食量、饮水量和尿量)和病理变化, 分别在BALB/L小鼠、DBA/2小鼠、SD大鼠、DA大鼠等不同实验动物中验证了该类造模方法的可行性. 但该方法未见或少见腹泻症状<sup>[39]</sup>, 研究者若以腹泻为主要研究内容, 不适合选此模型. (2)CPT-11. 与5-Fu相比, CPT-11可使患者3-4度GIM的发生率增加15%<sup>[40]</sup>. Stringer等<sup>[41-44]</sup>采用200 mg/kg伊立替康对DA大鼠行一次性腹腔注射, 观察可见化疗2 h后23%动物出现腹泻, 24 h腹泻发生率高达44%, 72 h后33%大鼠轻度腹泻, 144 h后腹泻停止<sup>[45,46]</sup>, 符合急性肠黏膜损伤过程. 组织形态学发现, CPT-11早期引起腺体严重萎缩和退化, 胃腺窝、空结肠隐窝细胞凋亡增加, 化疗后6 h达到凋亡高峰<sup>[47,48]</sup>. 黏膜中大量炎性细胞浸润, 黏液分泌增加<sup>[41,48]</sup>. 由于CPT-11剂量限制性不良反应以腹泻为主<sup>[49]</sup>, 且模型大鼠腹泻症状与肠隐窝细胞增殖、凋亡等改变相一致<sup>[50]</sup>. 因此, 该方法较侧重于化疗黏膜毒性所致腹泻的研究. 其局限性在于造模存活率低, 有报道注射高剂量

#### ■ 相关报道

Hirata等运用不同化疗药物成功建立起非荷瘤模型, 在一定程度上符合人类GIM形成的病理过程, 方法简便, 可操作性强, 但缺乏靶向性特点, 难以对GIM遗传学和发病机制方面进行深入和透彻研究.

### ■创新盘点

本文对各种化疗后胃肠道黏膜炎模型的造模方法进行全面分析,为学者研究化疗的胃肠黏膜毒性反应及其机制提供造模选择和参考依据。

CPT-11 96 h后动物全部死亡<sup>[24]</sup>,但目前对此说法不一<sup>[41,45]</sup>。

MTX: 能够诱发大鼠典型黏膜炎的病理改变,致使黏膜炎发生率达40%。若短时间内大剂量MTX进入体内,发生率可增至76%。Gulgun等<sup>[51]</sup>给予大鼠单剂量MTX 20 mg/kg腹腔注射,模型存活率为57%。大鼠体重显著下降,并伴有腹泻;病理显示化疗后24 h即出现明显的肠道损伤,第3天损伤最重,表现为小肠绒毛变短变粗,上皮细胞脱落,黏膜固有层炎性细胞浸润,出现溃疡。Fijlstra等<sup>[52]</sup>通过剂量筛选,给予Wistar大鼠MTX 60 mg/kg一次性尾静脉注射。观察发现大鼠化疗后3-4 d摄食、饮水、体质量下降最为严重,并于第3天出现水样便。处死后发现大鼠呈现轻至重度GIM病理变化,小肠黏膜绒毛萎缩,降至正常55.6%。肠隐窝长度增加至1.3倍,杯状细胞分布不均,黏膜层炎细胞浸润,肠黏膜蛋白质、mRNA含量显著下降。MTX单剂量注射诱发模型具有迅速恢复、过程短暂的特征,缩短了造模时间<sup>[53]</sup>。

2.4.2 持续性注射给药: (1)腹腔注射给药: 5-Fu对肠黏膜的不良反应的剧烈程度与给药方案有一定关系,在大剂量给药条件下,剂量分次连续给予较一次性给予对肠屏障的损伤更大,损伤恢复较慢。各研究中对于5-Fu分次连续给药造模的剂量和持续时间各有不同,其动物黏膜损伤的严重程度和主要症状也不尽相同<sup>[54-56]</sup>。Hirata等<sup>[57]</sup>采用Wistar大鼠,连续4 d的给药剂量为5-Fu 30 mg/kg,与空白组相比,模型组小肠的干重和湿重均有明显降低,小肠MPO活性显著降低,肠通透性增加。但该研究对模型的评价不够全面,无法完全反应出模型的损伤程度。(2)皮下注射给药: 多项研究结果发现<sup>[58-60]</sup>, MTX诱导的GIM大鼠体质量变化呈现剂量依赖性。Leblond等<sup>[28]</sup>通过不同剂量比较,选用2.5 mg/kg MTX皮下注射,持续3 d。实验第2-3天,大鼠体质量和摄食量开始下降,第5-6天降到最低,至实验第7天开始恢复,但仍无法恢复到正常水平<sup>[58-61]</sup>。第4天开始出现严重的胃肠黏膜损伤,形态学方面,表现为肠上皮细胞增生减慢导致绒毛萎缩、隐窝细胞增殖降低、杯状细胞排空增加<sup>[62,63]</sup>;功能方面,肠黏膜屏障受损,通透性增加,伴随有细菌移位<sup>[58,59]</sup>。肠系膜淋巴结细菌培养阳性;生化方面,肠黏膜蛋白质、DNA及RNA含量显著下降<sup>[58,60]</sup>。以上损伤于第7天开始恢复。(3)中心静脉给药: Tsuji等<sup>[55]</sup>以9周龄♂ Wistar大鼠为对象,通过中心静脉进行100 mg/(kg·d) 5-Fu

滴注,持续4 d(0-3 d)。实验共7 d(0-6 d)。72 h内无明显症状发生,第4天73.9%模型组大鼠出现急性腹泻,大便呈水样。86.2%出现呕吐(异食癖反应),符合GIM症状表现,肉眼可见空肠长度较空白组短。实验第6天,模型组所有大鼠均出现毛发竖立和眼底渗血等败血症症状;检查发现急性炎性细胞因子升高,内毒素含量增加,出现肠道细菌易位。病理显示胃肠黏膜的萎缩和广泛糜烂,空肠肠壁变薄,出现点状溃疡;黏膜下层基本消失,仅残余少许腺体及黏膜下层水肿组织。该模型后期累积毒性反应较重,可用于5-FU对胃肠黏膜迟发效应及胃肠微生物屏障损伤的研究。

2.4.3 经口给药法: 大鼠经口给药的半数致死量为230 mg/kg。Shiota等<sup>[64]</sup>选用7周龄♂ SD大鼠,实验第5天给予5-FU 300 mg/kg灌胃后大鼠进食量和体质量急剧下降,腹泻率为75%。第8天处死后组织检查发现小肠绒毛呈不同程度萎缩、倒伏,隐窝深度增加,空肠黏膜IL-6和TNF- $\alpha$  mRNA表达降低。Saegusa等<sup>[65,66]</sup>给予Wistar大鼠连续5 d 50 mg/kg 5-FU灌胃,测量发现胃黏膜粘蛋白含量下降57.6%,空肠粘蛋白含量自化疗第1天开始显著下降,最低降至43.9%,第13天恢复正常。胃和小肠PCNA含量第1天开始降低,第7天增加至空白组的2倍。Kotani等<sup>[67]</sup>为研究5-FU化疗后胃的形态和功能变化,给予SD大鼠同等剂量5-Fu(50 mg/kg,连续5 d)灌胃,与Saegusa结果不同的是,肉眼和镜下均未见胃黏膜的明显改变,改为100 mg/kg 5-Fu连续5 d灌胃后,大鼠出现胃功能紊乱,黏膜对酸等不良刺激的抵抗力降低。病理可见胃黏膜高度减低,上皮细胞基层层脱离。上述变化说明胃黏膜对化疗的敏感性相对较低于肠黏膜。Manzano等<sup>[68]</sup>以小型猪为实验对象,每周给予5 d 12 mg/kg 5-FU口服,持续4 wk,成活率为100%。模型组于化疗第1周后体质量呈显著下降趋势,第2周表现出典型的化疗胃肠道反应(如呕吐和腹泻)。检测发现空肠和回肠重量明显降低,空回肠所含蛋白质和DNA数量降低。由于猪胃肠道的病理生理与人类非常相似,因此该模型非常接近癌症患者化疗致GIM,为评估新颖的抗黏膜毒性方法提供了一个有效途径。

以上非荷瘤模型价格低廉,相比其他模型制作方法更为简便快速,在一定程度上符合人类GIM形成的病理过程。在成功的建立起化疗致GIM模型的前提下,保证了科研资源的合理利用。从实验的可操作性和研究目的来说,不失为

化疗胃肠黏膜炎研究的有效方法, 值得借鉴。

### 3 结论

由于不同化疗药物引发的胃肠黏膜炎病理基础不同, 导致的病理学变化、损伤程度和恢复过程也不相同. 目前在建立化疗GIM模型方面尚无统一标准. 因此, 研究者在开展实验前必须明确实验设计上想要了解或研究的内容, 选择合适的造模方法. 在选用模型时, 除考虑药物种类外, 还应考虑药物剂量和干预时间. 原则上以能够引起胃肠道黏膜损伤, 而又远低于致死剂量为准<sup>[33]</sup>. 虽然动物模型只是一种间接反映人类疾病的手段和方法, 尚不能完全代表人类疾病. 但转基因、基因敲除等技术的发展以及与人类胃肠道病理生理相似的实验动物的广泛应用, 均为研究化疗致GIM的提供了新思路与新方法, 在化疗致GIM的机制研究、药物筛选和治疗方案确立过程中起到关键性作用。

### 4 参考文献

- Rustum YM. Fluoropyrimidines in Cancer Therapy. Totowa: Humana Press, 2003: 249-259
- Peterson DE, Bensadoun RJ, Roila F. Management of oral and gastrointestinal mucositis: ESMO Clinical Practice Guidelines. *Ann Oncol* 2011; 22 Suppl 6: vi78-vi84
- Wells M, Donnan PT, Sharp L, Ackland C, Fletcher J, Dewar JA. A study to evaluate nurse-led on-treatment review for patients undergoing radiotherapy for head and neck cancer. *J Clin Nurs* 2008; 17: 1428-1439
- Prisciandaro LD, Geier MS, Butler RN, Cummins AG, Howarth GS. Evidence supporting the use of probiotics for the prevention and treatment of chemotherapy-induced intestinal mucositis. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2011; 51: 239-247
- Leblond J, Le Pessot F, Hubert-Buron A, Duclos C, Vuichoud J, Faure M, Breuillé D, Déchelotte P, Coëffier M. Chemotherapy-induced mucositis is associated with changes in proteolytic pathways. *Exp Biol Med (Maywood)* 2008; 233: 219-228
- Gibson RJ. Gut microbiome and intestinal mucositis: A new challenge for researchers. *Cancer Biol Ther* 2009; 8. [Epub ahead of print]
- Sonis ST. Regimen-related gastrointestinal toxicities in cancer patients. *Curr Opin Support Palliat Care* 2010; 4: 26-30
- Chipponi J, Huguier M, Pezet D, Basso N, Hay JM, Quandalle P, Jaeck D, Fagniez PL, Gainant A. Randomized trial of adjuvant chemotherapy after curative resection for gastric cancer. *Am J Surg* 2004; 187: 440-445
- Gibson RJ, Keefe DM. Cancer chemotherapy-induced diarrhoea and constipation: mechanisms of damage and prevention strategies. *Support Care Cancer* 2006; 14: 890-900
- Gibson RJ, Keefe DM, Clarke JM, Regester GO, Thompson FM, Goland GJ, Edwards BG, Cummins AG. The effect of keratinocyte growth factor on tumour growth and small intestinal mucositis after chemotherapy in the rat with breast cancer. *Cancer Chemother Pharmacol* 2002; 50: 53-58
- Gibson RJ, Bowen JM, Keefe DM. Palifermin reduces diarrhea and increases survival following irinotecan treatment in tumor-bearing DA rats. *Int J Cancer* 2005; 116: 464-470
- Kim KA, Kakitani M, Zhao J, Oshima T, Tang T, Binnerts M, Liu Y, Boyle B, Park E, Emtage P, Funk WD, Tomizuka K. Mitogenic influence of human R-spondin1 on the intestinal epithelium. *Science* 2005; 309: 1256-1259
- Gibson RJ, Stringer AM, Bowen JM, Logan RM, Yeoh AS, Burns J, Alvarez E, Keefe DM. Velafermin improves gastrointestinal mucositis following irinotecan treatment in tumor-bearing DA rats. *Cancer Biol Ther* 2007; 6: 541-547
- Letari O, Booth C, Bonazzi A, Garofalo P, Makovec F, Rovati LC, Caselli G. Efficacy of CR3294, a new benzamidine derivative, in the prevention of 5-fluorouracil-induced gastrointestinal mucositis and diarrhea in mice. *Cancer Chemother Pharmacol* 2010; 66: 819-827
- Gibson RJ, Bowen JM, Alvarez E, Finnie J, Keefe DM. Establishment of a single-dose irinotecan model of gastrointestinal mucositis. *Chemotherapy* 2007; 53: 360-369
- Gibson RJ, Keefe DM, Thompson FM, Clarke JM, Goland GJ, Cummins AG. Effect of interleukin-11 on ameliorating intestinal damage after methotrexate treatment of breast cancer in rats. *Dig Dis Sci* 2002; 47: 2751-2757
- Leitão RF, Brito GA, Oriá RB, Braga-Neto MB, Bellaguarda EA, Silva JV, Gomes AS, Lima-Júnior RC, Siqueira FJ, Freire RS, Vale ML, Ribeiro RA. Role of inducible nitric oxide synthase pathway on methotrexate-induced intestinal mucositis in rodents. *BMC Gastroenterol* 2011; 11: 90
- Kim JK, Takeuchi M, Yokota Y. Impairment of intestinal intraepithelial lymphocytes in Id2 deficient mice. *Gut* 2004; 53: 480-486
- Kato S, Ito K, Kato Y, Wakayama T, Kubo Y, Iseki S, Tsuji A. Involvement of multidrug resistance-associated protein 1 in intestinal toxicity of methotrexate. *Pharm Res* 2009; 26: 1467-1476
- Xian CJ, Cool JC, Howarth GS, Read LC. Effects of TGF- $\alpha$  gene knockout on epithelial cell kinetics and repair of methotrexate-induced damage in mouse small intestine. *J Cell Physiol* 2002; 191: 105-115
- Tran CD, Sundar S, Howarth GS. Dietary zinc supplementation and methotrexate-induced small intestinal mucositis in metallothionein-knockout and wild-type mice. *Cancer Biol Ther* 2009; 8: 1662-1667
- Tran CD, Howarth GS, Coyle P, Philcox JC, Rofe AM, Butler RN. Dietary supplementation with zinc and a growth factor extract derived from bovine cheese whey improves methotrexate-damaged rat intestine. *Am J Clin Nutr* 2003; 77: 1296-1303
- Howarth GS, Francis GL, Cool JC, Xu X, Byard RW, Read LC. Milk growth factors enriched from cheese whey ameliorate intestinal damage by methotrexate when administered orally to rats. *J Nutr* 1996; 126: 2519-2530
- Tucker JM, Davis C, Kitchens ME, Bunni MA, Priest DG, Spencer HT, Berger FG. Response to 5-fluorouracil chemotherapy is modified by dietary folic acid deficiency in Apc(Min/+) mice. *Cancer Lett*

### ■同行评价

该篇综述检索系统全面, 论文撰写条理清晰, 内容对临床相关研究有一定指导意义。

- 2002; 187: 153-162
- 25 Soares PM, Lima-Junior RC, Mota JM, Justino PF, Brito GA, Ribeiro RA, Cunha FQ, Souza MH. Role of platelet-activating factor in the pathogenesis of 5-fluorouracil-induced intestinal mucositis in mice. *Cancer Chemother Pharmacol* 2011; 68: 713-720
- 26 Kang SJ, Popat R, Bragdon C, Odonnell K, Phelan S, Yuan J, Sonis ST. Caspase-11 is not necessary for chemotherapy-induced intestinal mucositis. *DNA Cell Biol* 2004; 23: 490-495
- 27 Beck PL, Wong JF, Li Y, Swaminathan S, Xavier RJ, Devaney KL, Podolsky DK. Chemotherapy- and radiotherapy-induced intestinal damage is regulated by intestinal trefoil factor. *Gastroenterology* 2004; 126: 796-808
- 28 Huang FS, Kemp CJ, Williams JL, Erwin CR, Warner BW. Role of epidermal growth factor and its receptor in chemotherapy-induced intestinal injury. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2002; 282: G432-G442
- 29 Soares PM, Mota JM, Gomes AS, Oliveira RB, Assreuy AM, Brito GA, Santos AA, Ribeiro RA, Souza MH. Gastrointestinal dysmotility in 5-fluorouracil-induced intestinal mucositis outlasts inflammatory process resolution. *Cancer Chemother Pharmacol* 2008; 63: 91-98
- 30 Stringer AM, Gibson RJ, Logan RM, Bowen JM, Yeoh AS, Hamilton J, Keefe DM. Gastrointestinal microflora and mucins may play a critical role in the development of 5-Fluorouracil-induced gastrointestinal mucositis. *Exp Biol Med (Maywood)* 2009; 234: 430-441
- 31 Torres DM, Tooley KL, Butler RN, Smith CL, Geier MS, Howarth GS. Lyprinol only partially improves indicators of small intestinal integrity in a rat model of 5-fluorouracil-induced mucositis. *Cancer Biol Ther* 2008; 7: 295-302
- 32 Cool JC, Dyer JL, Xian CJ, Butler RN, Geier MS, Howarth GS. Pre-treatment with insulin-like growth factor-I partially ameliorates 5-fluorouracil-induced intestinal mucositis in rats. *Growth Horm IGF Res* 2005; 15: 72-82
- 33 Wright TH, Yazbeck R, Lymn KA, Whitford EJ, Cheah KY, Butler RN, Feinle-Bisset C, Pilichiewicz AN, Mashtoub S, Howarth GS. The herbal extract, Iberogast, improves jejunal integrity in rats with 5-Fluorouracil (5-FU)-induced mucositis. *Cancer Biol Ther* 2009; 8: 923-929
- 34 Carneiro-Filho BA, Oriá RB, Wood Rea K, Brito GA, Fujii J, Obrig T, Lima AA, Guerrant RL. Alanylglutamine hastens morphologic recovery from 5-fluorouracil-induced mucositis in mice. *Nutrition* 2004; 20: 934-941
- 35 Pritchard DM, Bower L, Potten CS, Jackman AL, Hickman JA. The importance of p53-independent apoptosis in the intestinal toxicity induced by raltitrexed (ZD1694, Tomudex): genetic differences between BALB/c and DBA/2 mice. *Clin Cancer Res* 2000; 6: 4389-4395
- 36 Wu Z, Han X, Qin S, Zheng Q, Wang Z, Xiang D, Zhang J, Lu H, Wu M, Zhu S, Yu Y, Wang Y, Han W. Interleukin 1 receptor antagonist reduces lethality and intestinal toxicity of 5-fluorouracil in a mouse mucositis model. *Biomed Pharmacother* 2010; 64: 589-593
- 37 Smith CL, Geier MS, Yazbeck R, Torres DM, Butler RN, Howarth GS. Lactobacillus fermentum BR11 and fructo-oligosaccharide partially reduce jejunal inflammation in a model of intestinal mucositis in rats. *Nutr Cancer* 2008; 60: 757-767
- 38 Bonneville F, Bloch F, Kurys E, du Montcel ST, Welter ML, Bonnet AM, Agid Y, Dormont D, Houeto JL. Campylobacter and Parkinson's disease: MR imaging. *Eur Radiol* 2008; 18: 1710-1719
- 39 Han X, Wu Z, Di J, Pan Y, Zhang H, Du Y, Cheng Z, Jin Z, Wang Z, Zheng Q, Zhang P, Wang Y. CXCL9 attenuated chemotherapy-induced intestinal mucositis by inhibiting proliferation and reducing apoptosis. *Biomed Pharmacother* 2011; 65: 547-554
- 40 Jhun HJ, Cho SI, Park JT. Changes in job stress, musculoskeletal symptoms, and complaints of unfavorable working conditions among nurses after the adoption of a computerized order communication system. *Int Arch Occup Environ Health* 2004; 77: 363-367
- 41 Stringer AM, Gibson RJ, Logan RM, Bowen JM, Yeoh AS, Laurence J, Keefe DM. Irinotecan-induced mucositis is associated with changes in intestinal mucins. *Cancer Chemother Pharmacol* 2009; 64: 123-132
- 42 Logan RM, Gibson RJ, Bowen JM, Stringer AM, Sonis ST, Keefe DM. Characterisation of mucosal changes in the alimentary tract following administration of irinotecan: implications for the pathobiology of mucositis. *Cancer Chemother Pharmacol* 2008; 62: 33-41
- 43 Stringer AM, Gibson RJ, Logan RM, Bowen JM, Yeoh AS, Burns J, Keefe DM. Chemotherapy-induced diarrhea is associated with changes in the luminal environment in the DA rat. *Exp Biol Med (Maywood)* 2007; 232: 96-106
- 44 Bowen JM, Gibson RJ, Tsykin A, Stringer AM, Logan RM, Keefe DM. Gene expression analysis of multiple gastrointestinal regions reveals activation of common cell regulatory pathways following cytotoxic chemotherapy. *Int J Cancer* 2007; 121: 1847-1856
- 45 Al-Dasooqi N, Gibson RJ, Bowen JM, Logan RM, Stringer AM, Keefe DM. Matrix metalloproteinases are possible mediators for the development of alimentary tract mucositis in the dark agouti rat. *Exp Biol Med (Maywood)* 2010; 235: 1244-1256
- 46 Al-Dasooqi N, Bowen JM, Gibson RJ, Logan RM, Stringer AM, Keefe DM. Selection of housekeeping genes for gene expression studies in a rat model of irinotecan-induced mucositis. *Chemotherapy* 2011; 57: 43-53
- 47 Bowen JM, Gibson RJ, Stringer AM, Chan TW, Prabowo AS, Cummins AG, Keefe DM. Role of p53 in irinotecan-induced intestinal cell death and mucosal damage. *Anticancer Drugs* 2007; 18: 197-210
- 48 Bowen JM, Tsykin A, Stringer AM, Logan RM, Gibson RJ, Keefe DM. Kinetics and regional specificity of irinotecan-induced gene expression in the gastrointestinal tract. *Toxicology* 2010; 269: 1-12
- 49 Ramesh M, Ahlawat P, Srinivas NR. Irinotecan and its active metabolite, SN-38: review of bioanalytical methods and recent update from clinical pharmacology perspectives. *Biomed Chromatogr* 2010; 24: 104-123
- 50 Bowen JM, Stringer AM, Gibson RJ, Yeoh AS, Hannam S, Keefe DM. VSL#3 probiotic treatment reduces chemotherapy-induced diarrhea and weight loss. *Cancer Biol Ther* 2007; 6: 1449-1454
- 51 Gulgun M, Erdem O, Oztas E, Kesik V, Balamtekin N, Vurucu S, Kul M, Kismet E, Koseoglu V. Proan-

- thocyanidin prevents methotrexate-induced intestinal damage and oxidative stress. *Exp Toxicol Pathol* 2010; 62: 109-115
- 52 Fijlstra M, Rings EH, Verkade HJ, van Dijk TH, Kamps WA, Tissing WJ. Lactose maldigestion during methotrexate-induced gastrointestinal mucositis in a rat model. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2011; 300: G283-G291
- 53 de Koning BA, van Dieren JM, Lindenbergh-Kortleve DJ, van der Sluis M, Matsumoto T, Yamaguchi K, Einerhand AW, Samsom JN, Pieters R, Nieuwenhuis EE. Contributions of mucosal immune cells to methotrexate-induced mucositis. *Int Immunol* 2006; 18: 941-949
- 54 Tsuji E, Hiki N, Nomura S, Fukushima R, Kojima J, Ogawa T, Mafune K, Mimura Y, Kaminishi M. Simultaneous onset of acute inflammatory response, sepsis-like symptoms and intestinal mucosal injury after cancer chemotherapy. *Int J Cancer* 2003; 107: 303-308
- 55 Murakami M, Sato N, Tashiro K, Nakamura T, Masunaga H. Effects of caloric intake on intestinal mucosal morphology and immune cells in rats treated with 5-Fluorouracil. *J Clin Biochem Nutr* 2009; 45: 74-81
- 56 Silecchia G, Guarino E, Sinibaldi-Vallebona P, Pierimarchi P, Restuccia A, Spaziani E, Bernard P, Tuthill C, Garaci E, Rasi G. Efficacy of repeated cycles of chemo-immunotherapy with thymosin alpha1 and interleukin-2 after intraperitoneal 5-fluorouracil delivery. *Cancer Immunol Immunother* 1999; 48: 172-178
- 57 Hirata K, Horie T. A prostaglandin E1 analog, OP-1206, alleviates 5-fluorouracil-induced injury of rat small intestine. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol* 1999; 104: 243-251
- 58 Leblond J, Le Pessot F, Hubert-Buron A, Duclos C, Vuichoud J, Faure M, Breuille D, Déchelotte P, Coëffier M. Chemotherapy-induced mucositis is associated with changes in proteolytic pathways. *Exp Biol Med (Maywood)* 2008; 233: 219-228
- 59 Alamir I, Boukhattala N, Aziz M, Breuille D, Déchelotte P, Coëffier M. Beneficial effects of cathepsin inhibition to prevent chemotherapy-induced intestinal mucositis. *Clin Exp Immunol* 2010; 162: 298-305
- 60 Boukhattala N, Ibrahim A, Claeysens S, Faure M, Le Pessot F, Vuichoud J, Lavoine A, Breuille D, Déchelotte P, Coëffier M. A diet containing whey protein, glutamine, and TGFbeta modulates gut protein metabolism during chemotherapy-induced mucositis in rats. *Dig Dis Sci* 2010; 55: 2172-2181
- 61 Soares PM, Lopes LO, Mota JM, Belarmino-Filho JN, Ribeiro RA, Souza MH. Methotrexate-induced intestinal mucositis delays gastric emptying and gastrointestinal transit of liquids in awake rats. *Arq Gastroenterol* 2011; 48: 80-85
- 62 Harsha WT, Kalandarova E, McNutt P, Irwin R, Noel J. Nutritional supplementation with transforming growth factor-beta, glutamine, and short chain fatty acids minimizes methotrexate-induced injury. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2006; 42: 53-58
- 63 Sukhotnik I, Mogilner JG, Shteinberg D, Karry R, Lurie M, Ure BM, Shaoul R, Coran AG. Leptin accelerates enterocyte turnover during methotrexate-induced intestinal mucositis in a rat. *Cancer Biol Ther* 2009; 8: 899-906
- 64 Shiota A, Hada T, Baba T, Sato M, Yamanaka-Okumura H, Yamamoto H, Taketani Y, Takeda E. Protective effects of glycolipids extracted from spinach on 5-fluorouracil induced intestinal mucosal injury. *J Med Invest* 2010; 57: 314-320
- 65 Saegusa Y, Ichikawa T, Iwai T, Goso Y, Okayasu I, Ikezawa T, Shikama N, Saigenji K, Ishihara K. Changes in the mucus barrier of the rat during 5-fluorouracil-induced gastrointestinal mucositis. *Scand J Gastroenterol* 2008; 43: 59-65
- 66 Saegusa Y, Ichikawa T, Iwai T, Goso Y, Ikezawa T, Nakano M, Shikama N, Saigenji K, Ishihara K. Effects of acid antisecretory drugs on mucus barrier of the rat against 5-fluorouracil-induced gastrointestinal mucositis. *Scand J Gastroenterol* 2008; 43: 531-537
- 67 Kotani T, Nakagiri A, Murashima Y, Takeuchi K. Prophylactic effect of lafutidine against the adverse reaction induced in rat stomach by repeated administration of 5-fluorouracil. *Inflammopharmacology* 2007; 15: 203-208
- 68 Manzano M, Bueno P, Rueda R, Ramirez-Tortosa CL, Prieto PA, Lopez-Pedrosa JM. Intestinal toxicity induced by 5-fluorouracil in pigs: a new preclinical model. *Chemotherapy* 2007; 53: 344-355

编辑 曹丽鸥 电编 鲁亚静

# 肠道屏障功能在非酒精性脂肪性肝病发病机制中的作用

戴鑫, 吕宗舜

## ■背景资料

自马歇尔(Marshall)于1998年正式提出了“肠-肝轴”的概念,将肠道和肝脏这两个以往认为无密切相关的器官联系在一起,肠道屏障功能在NAFLD的发病机制中的作用逐渐成为关注的热点,国内外不少学者都在进行“肝-肠对话”的研究,目前在此方面已取得较新进展。

戴鑫, 吕宗舜, 天津医科大学总医院 天津市 300052  
作者贡献分布: 本文综述由戴鑫完成, 由吕宗舜审核。  
通讯作者: 吕宗舜, 教授, 主任医师, 300052, 天津市和平区鞍山道154号, 天津医科大学总医院消化内科. lzs\_zyy@163.com  
收稿日期: 2011-10-20 修回日期: 2012-01-10  
接受日期: 2012-03-10 在线出版日期: 2012-03-18

## Role of gut barrier function in the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease

Xin Dai, Zong-Shun Lv

Xin Dai, Zong-Shun Lv, Department of Gastroenterology, General Hospital of Tianjin Medical University, Tianjin 300052, China

Correspondence to: Zong-Shun Lv, Professor, Department of Gastroenterology, General Hospital of Tianjin Medical University, Tianjin 300052, China. lzs\_zyy@163.com  
Received: 2011-10-20 Revised: 2012-01-10  
Accepted: 2012-03-10 Published online: 2012-03-18

## Abstract

Nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) is one of the most common forms of chronic liver disease, and its incidence is increasing year by year. Many efforts have been made to investigate the pathogenesis of this disease. Since 1998 when Marshall proposed the conception of "gut-liver axis", more and more researchers have paid close attention to the role of gut barrier function in the pathogenesis of NAFLD. The four aspects of gut barrier function, including physical, chemical, biological and immunological barriers are interrelated closely and related to NAFLD. In this paper, we present a summary of research findings on the relationship between gut barrier dysfunction and the occurrence and development of NAFLD, aiming at illustrating the role of gut barrier function in the pathogenesis of this disease.

Key Words: Nonalcoholic fatty liver disease; Gut-barrier function; Gut-liver axis

Dai X, Lv ZS. Role of gut barrier function in the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2012; 20(8): 656-661

## ■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

## 摘要

非酒精性脂肪性肝病(nonalcoholic fatty liver

disease, NAFLD)是一种常见的慢性肝脏疾病,且发病率有逐年上升的趋势.关于其发病的具体机制的研究从未停止.自马歇尔(Marshall)于1998年正式提出了“肠-肝轴”的概念,肠道屏障功能在NAFLD发病机制中的作用逐渐成为关注的重点.肠道屏障功能的4大方面机械屏障、化学屏障、生物屏障、免疫屏障相互密切联系,并且与NAFLD之间的关系也密不可分.本文对近年来关于肠道屏障功能与NAFLD的发生和发展的相关性研究结果进行综述,旨在探讨在NAFLD的发病机制中肠道屏障功能所起到的作用.

关键词: 非酒精性脂肪性肝病; 肠道屏障功能; 肝肠轴

戴鑫, 吕宗舜. 肠道屏障功能在非酒精性脂肪性肝病发病机制中的作用. *世界华人消化杂志* 2012; 20(8): 656-661

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/656.asp>

## 0 引言

非酒精性脂肪性肝病(nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD)是一种与胰岛素抵抗(insulin resistance, IR)和遗传易感密切相关的代谢应激性肝脏损伤,其病理学改变与酒精性肝病相似,但患者无过量饮酒史.疾病谱包括非酒精性单纯性脂肪肝(nonalcoholic simple fatty liver, NAFL)、非酒精性脂肪性肝炎(nonalcoholic hepatitis, NASH)及其相关肝硬化和肝细胞癌<sup>[1]</sup>. NAFLD是21世纪全球重要的公共健康问题之一,亦是我国愈来愈重视的慢性肝病问题.其发病的具体机制目前尚不完全清楚.近来,关于NAFLD发病的多重打击学说受到研究者的广泛关注.在多重打击学说中,包括脂源性因素、肠道屏障功能、内质网应激、基因等作为平行相关因素都参与了NAFLD的发生和发展过程<sup>[2]</sup>.以往的研究着重于脂源性因素,强调一些因素可破坏脂肪细胞与肝细胞之间脂肪代谢的动力循环平衡,引起NAFLD.但此类研究结果目前还未能圆满解释NAFLD的发病过程.自马歇尔(Marshall)于1998年正式提出了“肠-肝轴”的概念,将肠

道和肝脏这两个以往认为无密切相关的器官联系在一起, 肠道屏障功能在NAFLD的发病机制的作用逐渐成为学者研究的重要方面. 目前在此方面已取得较多新进展.

### 1 肠道黏膜屏障

肠道黏膜屏障是指肠道能防止肠腔内的有害物质如细菌和毒素等穿过肠黏膜进入体内其他组织器官和血液循环的结构和功能的总和<sup>[3]</sup>. 肠道屏障功能通常可以归纳为机械屏障、化学屏障、免疫屏障、生物屏障4大方面. 具体来说, 机械屏障包括粘液层、肠道上皮细胞及上皮间紧密连接; 化学屏障主要包括胃酸、各种消化酶、胆汁等; 免疫屏障主要由淋巴细胞及肠道黏膜分泌的免疫球蛋白A(immunoglobulin, IgA)组成; 生物屏障由正常菌群的平衡构成, 是能量吸收, 储存的重要环境因素<sup>[4]</sup>. 肠道屏障功能损伤有多种表现形式, 包括肠道菌群失调、小肠细菌过多生长(small intestinal bacterial overgrowth, SIBO)、肠细胞紧密连接的改变、肠道黏膜通透性增高、血液循环中脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)升高等.

### 2 肠道黏膜机械屏障与NAFLD

多项动物实验及人体实验的研究显示肠道黏膜机械屏障的损伤与NAFLD的发生发展有明显相关性. 肠道通透性是指肠黏膜上皮容易被某些分子物质以简单扩散方式通过的特性, 通透性的增高是肠道黏膜机械屏障损伤的主要表现之一. 在NAFLD的患者与健康对照组中, NAFLD患者的肠道黏膜通透性较对照组明显提高, 而作为维持肠道机械屏障的重要因素的紧密连接, 其完整性也较对照组有明显缺失<sup>[5]</sup>. Rahimi等<sup>[6]</sup>的研究显示, 在伊朗, 紧密连接完整性损伤的典型疾病乳糜泻在NAFLD人群中的发病率显著高于无NAFLD人群的发病率. 这更提示了肠道黏膜机械屏障与NAFLD的紧密关系.

正常情况下, 完整的肠上皮细胞间紧密连接可阻止肠道细菌及毒素等大分子物质通过, 从而防止其发生易位. 而当肠道上皮细胞之间的紧密连接完整性损伤时, 肠道黏膜的通透性增高, 肠道内的革兰氏阴性菌细胞壁的成分脂多糖可大量涌入门脉系统, 如果肝脏内Kupffer细胞(kupffer cell, KC)吞噬功能低下, 内毒素的量超过了肝脏的清除能力, 内毒素“泛滥”进入体循环, 形成内毒素血症. 目前认为内毒素除了

对肝细胞具有直接毒性作用, 还可以激发KC等释放<sup>[7]</sup>. Lefkowitz等<sup>[8]</sup>所做的免疫组织化学检测发现, 在NASH发病过程中, 枯否细胞形态、数量较正常均发生变化. 在对酒精性脂肪肝和非酒精性脂肪肝研究中观察到枯否细胞在中央静脉区域相对集中, 体积增大, 细胞内散落有大的脂肪空泡, 呈活化状态. 而在NAFLD的发病过程中, 枯否细胞分泌的促炎因子参与了肝脏疾病的发生发展. 其中, TNF- $\alpha$ 具有关键性作用<sup>[9]</sup>.

### 3 肠道化学屏障和NAFLD

肝脏分泌的胆汁酸不仅在脂肪类食物的乳化、脂溶性维生素的吸收中起关键作用<sup>[10]</sup>, 也能抑制小肠细菌过度生长, 细菌易位的发生从而保持黏膜屏障功能及肠内环境的稳定<sup>[11]</sup>. 在建立高果糖诱导的NAFLD小鼠模型时, 实验组同时饲喂胆汁酸, 可以发现同对照组相比, 实验组的小鼠肝脏脂肪变情况明显减轻, 门静脉血中内毒素下降, 十二指肠闭锁小带完整性趋于正常. 而胆汁酸的受体法尼酯受体(farnesoid X receptor, FXR)及FXR介导的小异二聚体伴侣(short heterodimer partner, SHP)两组并无明显区别. 这提示了胆汁酸治疗可以减轻高果糖饮食诱导的NAFLD, 其机制除了胆汁酸通过FXR-固醇调控元件结合蛋白-1c(sterol response element-binding protein1c, SREBP-1c)瀑布样信号转导系统调节肝脏甘油三酯代谢继而减轻NAFLD之外<sup>[12]</sup>, 肠道菌群和内毒素的改变也在其中发挥了不容忽视的作用<sup>[13,14]</sup>. 也有研究显示, 一些微生物则能通过合成胆盐水解酶影响胆汁酸的代谢, 干扰能量和脂类代谢的信号通路, 进而引起脂质过氧化及脂肪酸在肝脏的沉积. Martin等<sup>[15]</sup>将人类婴儿菌群灌注在无菌小鼠肠道中并定植, 发现其回肠末端牛磺酸结合胆汁酸的含量增高, 血浆脂蛋白水平下降, 而肝脏甘油三酯含量则增加. 推测肠道菌种的改变可以促进胆汁的肝肠循环, 抑制肝细胞VLDL及LDL合成和分泌进而导致肝脏甘油三酯沉积<sup>[16,17]</sup>.

### 4 肠道免疫屏障和NAFLD

肠道上皮还可表达Toll样受体(toll like receptors, TLRs). TLRs作为原发免疫的重要分子, 其信号传导与NAFLD的发生发展相关. 在高脂, 高果糖及低胆碱或低胆碱低氨基酸饮食诱导的NAFLD动物模型中, 循环血中LPS水平明显升高, 而敲除TLR4的小鼠, 予以同样的饮食, 虽然

■**研发前沿**  
越来越多的医师倾向于将益生菌、益生元、谷氨酰胺等调整肠道屏障的药物用于防治NAFLD的临床实践, 但由于伦理条件所限, 目前此类研究尚少, 且缺少组织学变化结果支持.

### ■创新盘点

本文从肠道屏障功能的4大方面-机械屏障、化学屏障、生物屏障、免疫屏障入手,介绍导致NAFLD机制的研究进展,又将其之间是如何相互关联进行分析,具有较好的创新性和科研学术价值。

其血中LPS升高水平相同,但NAFLD的发生大大减少<sup>[18]</sup>。一些观点认为,宿主细胞破坏的产物即损伤相关分子模式(damage associated molecular Patterns, DAMPs)是TLRs的主要配体<sup>[19]</sup>,主要是一些内源性的物质,比如游离脂肪酸(free fatty acids, FFAs)。FFAs可能直接刺激依赖TLR2或TLR4的信号通路。这意味着FFAs是连接饮食中脂肪摄入与TLR信号介导的疾病的中心环节<sup>[20]</sup>。

但是,Erridge等<sup>[21]</sup>否认了这个观点,他们做了各种细胞(巨噬细胞、脂肪细胞、平滑肌细胞、内皮细胞等)试验,都发现FFAs没有诱导能明显上调TLR刺激造成的基因产物如白介素1(interleukin-1, IL-1),肿瘤坏死因子 $\alpha$ (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )的表达。而肠道细菌菌体结构或代谢产物可能参与了TLRs的信号转导通路。此后又有较多研究继承了他们的观点,支持了人体肠道内微生物来源的病原相关的分子模式(pathogen-associated molecular patterns, PAMPs)在NAFLD发展中的中心地位。细菌的脂肽、脂多糖和鞭毛蛋白分别被TLR2、TLR4和TLR5识别,而TLR3、TLR7、TLR8和TLR9负责识别细菌的核酸,TLR1和TLR6虽然不能单独作用,但与TLR2形成多聚体后则可识别二酰基及三酰基的细菌脂肽。当PAMPs与相应的TLR结合后大多数可以通过激活核因子- $\kappa$ B(nuclear factor-kappa B, NF- $\kappa$ B)和促分裂素原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinases, MAPK)信号转导通路,快速上调促炎基因如粘附分子、细胞因子和趋化因子的表达<sup>[22]</sup>。依据当今观点,这些全身的、低水平的炎症反应在NAFLD的发生发展中起到了关键作用<sup>[23,24]</sup>。

除了TLRs外,肠道分泌的IgA也是肠道黏膜免疫屏障的重要组分。IgA可以遏制病原体在黏膜表面的黏附及减少病原体的着生,并在肠腔内参与行使效应功能<sup>[25]</sup>。实验证实,IgA对肠道革兰氏阴性杆菌具有特殊的亲和力,人和啮齿动物肠道中60%-80%革兰氏阴性杆菌被IgA包裹。当肠道黏膜受损后,产生分泌性免疫球蛋白A的功能明显受到抑制,主要表现为sIgA的浆细胞数量减少及被sIgA包被的革兰氏阴性菌减少等,肠道抗定植力下降,促进肠内细菌易位<sup>[26]</sup>。从而与NAFLD的发生发展相关。

已知谷氨酰胺是肠道黏膜上皮损伤修复的主要原料,补充谷氨酰胺可以预防肠道免疫屏障的损伤。目前已有大鼠实验显示,在通过连续高脂饮食建立大鼠NASH模型后,经谷氨酰胺治

疗4 wk的治疗组大鼠其血中转氨酶水平及肝脏炎症计数较对照组明显下降,

### 5 肠道生物屏障与NAFLD

来源于小鼠实验的数据支持了肠道菌群的失衡与NAFLD的发病相关。小鼠肠道菌群改变造成NAFLD的原因考虑为以下几个方面:(1)肠腔内乙醇的产生增多。Nair等<sup>[28]</sup>使用呼气试验发现肥胖 $\delta$  C57BL/6小鼠内源性乙醇显著高于对照组,经新霉素治疗后乙醇量下降50%以上,提示尽管没有酒精的摄入,但肠道微生物产生内源性乙醇在NAFLD发病中起一定作用。乙醇或其体内代谢物乙醛,会增加活性氧自由基、高价氮氧合酶的产生,并进一步改变肠道菌群的种类或比例(如革兰氏阴性杆菌繁殖增加),这些因素单独或联合作用于肠道黏膜,使其完整性受到破坏,黏膜屏障受损,肠道通透性增加,导致细菌移位,最终使门静脉内毒素水平升高;(2)代谢宿主饮食中的胆碱。胆碱对甘油三酯有高亲和力,可以促进脂肪以磷脂的形式由肝脏通过血液循环输出,以防止脂肪在肝脏中的异常积聚,从而防止NAFLD的发生。小鼠实验表明,肠道菌群有将饮食中的胆碱转化为甲胺、二甲胺、三甲胺及其氧化物的能力,从而降低机体对于胆碱的生物利用率<sup>[29]</sup>;(3)释放LPS,从而激活肠道上皮细胞的炎症相关的细胞因子或肝脏巨噬细胞<sup>[30]</sup>。不仅是动物,人类肠道菌群的改变与NAFLD的发生相关也得到了证实。Miele等<sup>[5]</sup>通过葡萄糖呼气试验显示患有NAFLD的患者发生SIBO的情况远超过健康对照组,并且SIBO的程度与肝脏脂肪变的情况成正相关。

近来的相关基础研究显示肠道菌群能调节能量代谢<sup>[31,32]</sup>。当肠道内菌群平衡被打破时,人体能量代谢也相应发生改变。肠道微生物调节能量可能与以下机制有关<sup>[33]</sup>:(1)发酵人的消化器官未消化的食物,增加能量代谢效率,从而给宿主提供更多能量<sup>[34]</sup>;(2)抑制肠黏膜上皮中禁食诱导脂肪因子(fasting-induced adipose factor, Fiaf)的生成(又被称为类血管生成素4,一种可以抑制脂蛋白脂酶活性的蛋白质),从而使脂蛋白脂酶持续表达,结果增加了脂肪酸的摄入和肝脏甘油三酯的堆积<sup>[35]</sup>;(3)影响外周脂肪组织和肝脏细胞中磷酸腺苷激活蛋白激酶(AMP-activated protein kinase, AMPK)活性进而抑制了脂肪酸氧化的关键酶(如乙酰辅酶A羧化酶、肉毒碱棕榈酰转移酶)。AMPK是一种在细胞内行

使能量代谢调节的蛋白激酶, 其主要的特征是能与AMP结合, 通过AMP感知细胞的能量水平和代谢平衡来调节相关酶的活性, 在肥胖、糖尿病的发病机制中起重要作用<sup>[36,37]</sup>。目前考虑由于以上原因造成了脂肪细胞与肝细胞之间脂代谢的动力循环平衡被破坏, 从而促使了NAFLD的发病。

饮食因素在肠道生物屏障中发挥了怎样的作用, 近来也有相关研究。在健康人群中, 小肠内固有的细菌所产生的可溶性PAMPs浓度非常低, 以LPS为例, 约为0.3 μg/L<sup>[38]</sup>, 这似乎意味着与NAFLD密切相关的小肠中的PAMPs更可能来源于饮食摄入。对西方人的饮食检测结果显示, 未经加工的食物中PAMPs水平低至难以检测到, 而在加工过的食品中却远远超出小肠中的一般水平<sup>[39]</sup>。

Spencer等<sup>[31]</sup>的人体实验显示, 在短时间内予完全低胆碱饮食诱导肝脏脂肪变的情况下, 不同个体的肠道菌群构成仍然各不相同, 但丹毒丝菌纲和γ-变形菌纲的变化情况同脂肪变的情况有相关性。这可能为寻找与NAFLD致病有关的肠道标志性的菌群开拓了思路, 但目前研究尚少, 还需要进一步完善。

当然, NAFLD同时也反过来促进肠道的菌群失调。在NAFLD的发展过程中, 伴随着多种炎症介质的产生。IL-1、干扰素(interferon, IFN)可抑制摄食中枢, 使食欲下降, 反射性使胃肠运动减弱; 前列腺素2(prostaglandin, PGE2)、血小板激活因子(platelet activating factor, PAF)能引起肠道运动功能异常, 胃肠功能紊乱, 移行性运动复合(migrating motor complex, MMC)减弱或者消失, 其最重要的后果是使小肠部内容物淤滞, 从而导致菌群失调<sup>[9]</sup>。在多个动物实验中, 研究者予实验动物益生元和益生菌类制剂, 可以改善NAFLD动物的肝脏组织学表现, 降低转氨酶水平, 同时也减轻胰岛素抵抗的情况。这也有力的证明了维护肠道生物屏障在阻止NAFLD发生发展中的有着重要意义<sup>[40-43]</sup>。

## 6 结论

肠道屏障功能的4大方面机械屏障、化学屏障、生物屏障、免疫屏障相互密切联系。而它们与NAFLD之间的关系也是密不可分的。比如肠道上皮细胞是机械屏障的重要组分, 其通透性增强可以造成LPS大量的涌入肝脏系统, 诱导NAFLD的发生发展。同时肠道上皮细胞还可表

达原发免疫的重要分子TLRs, TLRs信号传导与NAFLD的发生发展相关。TLRs的配体为微生物来源的PAMPs。肠道菌种的改变, 通过抑制肝细胞VLDL及LDL合成和分泌进而导致肝脏甘油三酯沉积, 造成NAFLD。免疫屏障的重要组分IgA对肠道黏膜的保护作用是通过革兰氏阴性杆菌的包裹而效应的。肠道菌群失调所导致的乙醇量增多, 会使肠道黏膜的完整性遭到破坏, 进而破坏机械屏障等。不论肠道屏障功能的哪一方面发生了损伤, 必然导致其他方面的变化, 综合作用造成NAFLD的发生发展。当然, 如前所述, 肠道屏障的损伤可以导致NAFLD, 而NAFLD在发展到一定阶段也会反过来影响肠道屏障功能, 造成相互影响, 恶性循环。如果说肠道屏障(机械、生物、免疫和化学屏障)“构筑”了人体同外源性物质接触的第一道“防线”, 那么肝脏则提供了第二道“防线”。这是因为肝脏与肠道之间天然具有很多内在联系: (1)胚胎发育时, 肝肠共同起源; (2)他们有着共同的功能单元, 如营养代谢、细菌过滤、药物活化、毒性稀释等; (3)由于门静脉收纳肠系膜的血液, 因此使二者拥有了共同的血液联系; (4)肝脏能为肠道炎症和感染提供保护, 肝脏的炎症必有肠道的免疫反应发生<sup>[44,45]</sup>。当肠道屏障发生改变时, 肝脏也会发生相应的变化, 这种改变也包括NAFLD。至于在肠道屏障改变的众多方面中, 是哪一种因素起到了核心介导作用, 可能还需要进一步的研究以明确。

依据已有的研究结果, 肠道黏膜屏障损伤的形式与程度同NAFLD的演进过程(即NAFL, NASH, 相关的肝硬化及肝细胞癌)之间的确切关系, 尚不清楚, 有待进一步研究。比如Miele等<sup>[5]</sup>的实验显示在NAFLD患者中, 肠道通透性和SIBO的发生明显与肝脏脂肪变的严重情况成正相关, 但未发现与NASH中肝脏的炎症程度有明显正相关。而Gäbele等<sup>[46]</sup>用新的实验证据质疑了这种观点, 他们以高脂饮食与葡聚糖硫酸酯钠(dextran sulfate sodium, DSS)同时给小鼠饲服, 诱导建立NASH伴肠道屏障损伤的动物模型, 发现肝脏炎症较仅予高脂饮食造成的NASH组更为明显, 且肝脏纤维化的指标也明显升高。故考虑Luca的实验结果的发生是否是由于样本量不足所造成尚不能肯定, 可能需要更大样本的人类实验来验证。由于肠道黏膜屏障在NAFLD的发病机制中的重要作用得到广泛认同, 越来越多的医师倾向于将益生菌、益生元、谷氨酰胺

**同行评价**  
肠道屏障功能在NAFLD的发病机制中的作用逐渐成为关注的热点, 国内外不少学者都在进行“肝-肠对话”的研究, 本综述有一定的临床意义。

等调整肠道屏障的药物用于防治NAFLD的临床实践,但由于伦理条件所限,关于益生菌和益生元治疗NAFLD的效果到目前仅有2项临床实验结果发表<sup>[47,48]</sup>。维护肠道屏障功能入手防治NAFLD,重新建立起健康平衡的肝肠对话关系,其效果究竟有多大,尚待更多方面的研究加以证实<sup>[49]</sup>。

## 7 参考文献

- 中华医学会肝病学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(2010年修订版). 胃肠病学和肝病学杂志 2010; 19: 483-487
- Tilg H, Moschen AR. Evolution of inflammation in nonalcoholic fatty liver disease: the multiple parallel hits hypothesis. *Hepatology* 2010; 52: 1836-1846
- 蒋朱明, 蔡威. 临床肠外与肠内营养. 第1版. 北京: 科学技术文献出版社, 2000: 364-365
- 张燕, 罗予. 肠道黏膜受损及保护机制的研究进展. 中国微生物学杂志 2010; 22: 85-87, 91
- Miele L, Valenza V, La Torre G, Montalto M, Cammarota G, Ricci R, Mascianà R, Forgione A, Gabrieli ML, Perotti G, Vecchio FM, Rapaccini G, Gasbarrini G, Day CP, Grieco A. Increased intestinal permeability and tight junction alterations in nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2009; 49: 1877-1887
- Rahimi AR, Daryani NE, Ghofrani H, Taher M, Pashaei MR, Abdollahzade S, Kalani M, Ajdarkosh H. The prevalence of celiac disease among patients with non-alcoholic fatty liver disease in Iran. *Turk J Gastroenterol* 2011; 22: 300-304
- Cani PD, Amar J, Iglesias MA, Poggi M, Knauf C, Bastelica D, Neyrinck AM, Fava F, Tuohy KM, Chabo C, Waget A, Delmée E, Cousin B, Sulpice T, Chamontin B, Ferrières J, Tanti JF, Gibson GR, Casteilla L, Delzenne NM, Alessi MC, Burcelin R. Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. *Diabetes* 2007; 56: 1761-1772
- Lefkowitz JH, Haythe JH, Regent N. Kupffer cell aggregation and perivenular distribution in steatohepatitis. *Mod Pathol* 2002; 15: 699-704
- Wigg AJ, Roberts-Thomson IC, Dymock RB, McCarthy PJ, Grose RH, Cummins AG. The role of small intestinal bacterial overgrowth, intestinal permeability, endotoxaemia, and tumour necrosis factor alpha in the pathogenesis of non-alcoholic steatohepatitis. *Gut* 2001; 48: 206-211
- Hofmann AF. Bile Acids: The Good, the Bad, and the Ugly. *News Physiol Sci* 1999; 14: 24-29
- Begley M, Gahan CG, Hill C. The interaction between bacteria and bile. *FEMS Microbiol Rev* 2005; 29: 625-651
- 魏珏, 叶丽静, 邱德凯, 马雄. 胆汁酸核受体FXR在非酒精性脂肪性肝病中的作用. 胃肠病学 2010; 15: 21-24
- Volynets V, Spruss A, Kanuri G, Wagnerberger S, Bischoff SC, Bergheim I. Protective effect of bile acids on the onset of fructose-induced hepatic steatosis in mice. *J Lipid Res* 2010; 51: 3414-3424
- 魏珏, 叶丽静, 邱德凯, 马雄. 胆汁酸改善胰岛素抵抗和非酒精性脂肪性肝病的研究进展. 中华消化杂志 2007; 27: 791-792
- Martin IV, Schmitt J, Minkenberg A, Mertens JC, Stieger B, Mullhaupt B, Geier A. Bile acid retention and activation of endogenous hepatic farnesoid-X-receptor in the pathogenesis of fatty liver disease in ob/ob-mice. *Biol Chem* 2010; 391: 1441-1449
- 李灏, 姜颖, 贺福初. 胆汁酸功能及其与肠道细菌相互关系. 中国生物化学与分子生物学报 2007; 23: 817-822
- Pumbwe L, Skilbeck CA, Nakano V, Avila-Campos MJ, Piazza RM, Wexler HM. Bile salts enhance bacterial co-aggregation, bacterial-intestinal epithelial cell adhesion, biofilm formation and antimicrobial resistance of *Bacteroides fragilis*. *Microb Pathog* 2007; 43: 78-87
- Miura K, Seki E, Ohnishi H, Brenner DA. Role of toll-like receptors and their downstream molecules in the development of nonalcoholic Fatty liver disease. *Gastroenterol Res Pract* 2010; 2010: 362847. Epub 2011 Jan 17
- Tsan MF, Gao B. Endogenous ligands of Toll-like receptors. *J Leukoc Biol* 2004; 76: 514-519
- Shi H, Kokoeva MV, Inouye K, Tzameli I, Yin H, Flier JS. TLR4 links innate immunity and fatty acid-induced insulin resistance. *J Clin Invest* 2006; 116: 3015-3025
- Erridge C, Samani NJ. Saturated fatty acids do not directly stimulate Toll-like receptor signaling. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2009; 29: 1944-1949
- Kawai T, Akira S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol* 2010; 11: 373-384
- Ferrante AW. Obesity-induced inflammation: a metabolic dialogue in the language of inflammation. *J Intern Med* 2007; 262: 408-414
- Erridge C. Diet, commensals and the intestine as sources of pathogen-associated molecular patterns in atherosclerosis, type 2 diabetes and non-alcoholic fatty liver disease. *Atherosclerosis* 2011; 216: 1-6
- 包士三. 细胞因子在肠道黏膜免疫中的重要作用. 上海免疫学杂志 2001; 21: 133-135
- 于勇. IgA在肠道免疫屏障中的作用及其创伤后的改变. 国外医学 1994; 15: 15-18
- 李生, 吴万春, 何池义, 韩真, 金道友. 谷氨酰胺对非酒精性脂肪性肝炎大鼠肠黏膜屏障的保护作用. 临床消化病杂志 2008; 20: 241-244
- Nair S, Cope K, Risby TH, Diehl AM. Obesity and female gender increase breath ethanol concentration: potential implications for the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis. *Am J Gastroenterol* 2001; 96: 1200-1204
- 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 USA* 2006; 103: 12511-12516
- Ruiz AG, Casafont F, Crespo J, Cayón A, Mayorga M, Estebanez A, Fernandez-Escalante JC, Pons-Romero F. Lipopolysaccharide-binding protein plasma levels and liver TNF-alpha gene expression in obese patients: evidence for the potential role of endotoxin in the pathogenesis of non-alcoholic steatohepatitis. *Obes Surg* 2007; 17: 1374-1380
- Spencer MD, Hamp TJ, Reid RW, Fischer LM, Zeisel SH, Fodor AA. Association between composition of the human gastrointestinal microbiome and development of fatty liver with choline deficiency. *Gastroenterology* 2011; 140: 976-986
- Frazier TH, DiBaise JK, McClain CJ. Gut microbiota, intestinal permeability, obesity-induced inflammation, and liver injury. *JPEN J Parenter Enteral Nutr*

- 2011; 35: 14S-20S
- 33 Musso G, Gambino R, Cassader M. Obesity, diabetes, and gut microbiota: the hygiene hypothesis expanded? *Diabetes Care* 2010; 33: 2277-2284
- 34 Turnbaugh PJ, Ley RE, Mahowald MA, Magrini V, Mardis ER, Gordon JI. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature* 2006; 444: 1027-1031
- 35 Bäckhed F, Ding H, Wang T, Hooper LV, Koh GY, Nagy A, Semenkovich CF, Gordon JI. The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101: 15718-15723
- 36 Delzenne NM, Cani PD. [Gut microflora is a key player in host energy homeostasis]. *Med Sci (Paris)* 2008; 24: 505-510
- 37 Yoon MJ, Lee GY, Chung JJ, Ahn YH, Hong SH, Kim JB. Adiponectin increases fatty acid oxidation in skeletal muscle cells by sequential activation of AMP-activated protein kinase, p38 mitogen-activated protein kinase, and peroxisome proliferator-activated receptor alpha. *Diabetes* 2006; 55: 2562-2570
- 38 Lappin DF, Sherrabeh S, Erridge C. Stimulants of Toll-like receptors 2 and 4 are elevated in saliva of periodontitis patients compared with healthy subjects. *J Clin Periodontol* 2011; 38: 318-325
- 39 Erridge C. Accumulation of stimulants of Toll-like receptor (TLR)-2 and TLR4 in meat products stored at 5 °C. *J Food Sci* 2011; 76: H72-H79
- 40 Li Z, Yang S, Lin H, Huang J, Watkins PA, Moser AB, Desimone C, Song XY, Diehl AM. Probiotics and antibodies to TNF inhibit inflammatory activity and improve nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2003; 37: 343-350
- 41 Paik HD, Park JS, Park E. Effects of Bacillus polyfermenticus SCD on lipid and antioxidant metabolisms in rats fed a high-fat and high-cholesterol diet. *Biol Pharm Bull* 2005; 28: 1270-1274
- 42 Lee HY, Park JH, Seok SH, Baek MW, Kim DJ, Lee KE, Paek KS, Lee Y, Park JH. Human originated bacteria, *Lactobacillus rhamnosus* PL60, produce conjugated linoleic acid and show anti-obesity effects in diet-induced obese mice. *Biochim Biophys Acta* 2006; 1761: 736-744
- 43 Yadav H, Jain S, Sinha PR. Antidiabetic effect of probiotic dahi containing *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei* in high fructose fed rats. *Nutrition* 2007; 23: 62-68
- 44 Zeuzem S. Gut-liver axis. *Int J Colorectal Dis* 2000; 15: 59-82
- 45 Szabo G, Bala S, Petrasek J, Gattu A. Gut-liver axis and sensing microbes. *Dig Dis* 2010; 28: 737-744
- 46 Gäbele E, Dostert K, Hofmann C, Wiest R, Schölmerich J, Hellerbrand C, Obermeier F. DSS induced colitis increases portal LPS levels and enhances hepatic inflammation and fibrogenesis in experimental NASH. *J Hepatol* 2011; 55: 1391-1399
- 47 Loguercio C, De Simone T, Federico A, Terracciano F, Tuccillo C, Di Chicco M, Carteni M. Gut-liver axis: a new point of attack to treat chronic liver damage? *Am J Gastroenterol* 2002; 97: 2144-2146
- 48 Loguercio C, Federico A, Tuccillo C, Terracciano F, D'Auria MV, De Simone C, Del Vecchio Blanco C. Beneficial effects of a probiotic VSL#3 on parameters of liver dysfunction in chronic liver diseases. *J Clin Gastroenterol* 2005; 39: 540-543
- 49 Lirussi F, Mastropasqua E, Orlando S, Orlando R. Probiotics for non-alcoholic fatty liver disease and/or steatohepatitis. *Cochrane Database Syst Rev* 2007: CD005165

编辑 李军亮 电编 鲁亚静

ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) CN 14-1260/R 2012年版权归世界华人消化杂志

## • 消息 •

### WJG 成功通过评审被 PMC 收录

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

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

# 炎症性肠病肝胆并发症的研究进展

牛国超, 刘蕾, 张晓岚

## ■背景资料

炎症性肠病(IBD)是一种与感染、免疫异常、遗传及精神等多种因素有关的免疫性疾病。除肠道病变外,还可累及皮肤、关节及肝胆系统。随着临床检查手段的提高及有创检测技术的应用,肝脏并发症的检出率随之增多,逐渐引起国内外临床和基础学者的关注。

牛国超, 刘蕾, 张晓岚, 河北医科大学第二医院消化科 河北省消化病重点实验室 河北省消化病研究所 河北省石家庄市 050000

作者贡献分布: 本文综述由牛国超与刘蕾完成; 由张晓岚审校。  
通讯作者: 张晓岚, 主任医师, 教授, 博士生导师, 050000, 河北省石家庄市和平西路215号, 河北医科大学第二医院消化科, 河北省消化病重点实验室, 河北省消化病研究所。

xiaolanzh@126.com

电话: 0311-66002955

收稿日期: 2011-11-24 修回日期: 2012-01-29

接受日期: 2012-03-10 在线出版日期: 2012-03-18

## Hepatobiliary complications of inflammatory bowel disease

Guo-Chao Niu, Lei Liu, Xiao-Lan Zhang

Guo-Chao Niu, Lei Liu, Xiao-Lan Zhang, Department of Gastroenterology, the Second Hospital of Hebei Medical University, Hebei Key Laboratory of Gastroenterology, Hebei Institute of Gastroenterology, Shijiazhuang 050000, Hebei Province, China

Correspondence to: Xiao-Lan Zhang, Professor, Department of Gastroenterology, the Second Hospital of Hebei Medical University, Hebei Key Laboratory of Gastroenterology, Hebei Institute of Gastroenterology, Shijiazhuang 050000, Hebei Province, China. xiaolanzh@126.com

Received: 2011-11-24 Revised: 2012-01-29

Accepted: 2012-03-10 Published online: 2012-03-18

## Abstract

Inflammatory bowel disease (IBD) is a chronic idiopathic immune-mediated inflammatory disease of the gastrointestinal tract, including ulcerative colitis (UC) and Crohn's disease (CD). Extraintestinal manifestations (EIMs) are frequently encountered in IBD patients. Hepatobiliary manifestations are common extraintestinal manifestations of IBD, including primary sclerosing cholangitis (PSC), nonalcoholic fatty liver, cholelithiasis, primary biliary cirrhosis (PBC), small-duct PSC, IgG4-associated cholangitis (IAC), granulomatous hepatitis, amyloidosis, autoimmune hepatitis (AIH), PSC/AIH overlap syndrome, and portal vein thrombosis. In this paper, we describe the progress in understanding the hepatobiliary complications associated with IBD.

Key Words: Hepatobiliary complications; Inflammatory bowel disease; Primary sclerosing cholangitis;

## Epidemiology; Clinical feature

Niu GC, Liu L, Zhang XL. Hepatobiliary complications of inflammatory bowel disease. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2012; 20(8): 662-669

## 摘要

炎症性肠病(inflammatory bowel disease, IBD)包括溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)和克罗恩病(Crohn's disease, CD),是一种免疫介导的慢性特发性胃肠道炎症性疾病,常伴有肠外表现(extraintestinal manifestations, EIMs),且涉及多个器官。肝胆系统病变是IBD常见的肠外表现,包括原发性硬化性胆管炎(primary sclerosing cholangitis, PSC)、非酒精性脂肪肝、胆石症、原发性胆汁性肝硬化(primary biliary cirrhosis, PBC)、小胆管性PSC、IgG4相关性胆管炎(IgG4-associated cholangitis, IAC)、肉芽肿性肝炎、淀粉样变性、自身免疫性肝炎(autoimmune hepatitis, AIH)、PSC/AIH重叠综合征和门静脉血栓形成等。本综述从IBD相关的肝胆并发症方面简述了该领域的研究进展,以期能为认识IBD相关肝病的发生机制和临床治疗提供新的启示。

关键词: 肝胆并发症; 炎症性肠病; 原发性硬化性胆管炎; 流行病学; 临床特征

牛国超, 刘蕾, 张晓岚. 炎症性肠病肝胆并发症的研究进展. 世界华人消化杂志 2012; 20(8): 662-669

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/662.asp>

## 0 引言

炎症性肠病(inflammatory bowel disease, IBD)包括溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)和克罗恩病(Crohn's disease, CD),是一种免疫介导的慢性复发性胃肠道炎症性疾病,常伴有多个器官受累的肠外表现(extraintestinal manifestations, EIMs)。有报道显示,IBD的EIMs发生率为21%-47%<sup>[1-4]</sup>。其中累及皮肤、眼和关节的EIMs常与IBD疾病活动平行,而肝胆系统病变,主要包括原发性硬化性胆管炎(primary sclerosing

## ■同行评议者

杜奕奇, 副教授, 中国人民解放军第二军医大学长海医院

cholangitis, PSC)、非酒精性脂肪肝、胆石症和原发性胆汁性肝硬化(primary biliary cirrhosis, PBC)等却与IBD的疾病进程不相一致, 往往独立于肠道炎症发生, 因此, 很难为临床医生所识别. 本综述主要从IBD相关肝胆并发症的流行病学、临床诊断及治疗和预后等方面简述该领域的研究进展, 以期为更好地认识IBD相关肝胆病变并进一步指导临床治疗提供新思路.

## 1 原发性硬化性胆管炎

PSC是一种病因不明, 以胆管的进行性炎症、纤维化和多发性狭窄为主要病理特征的慢性胆汁淤积性肝病. 大部分PSC患者最终演变成终末期肝病, 约10%-30%的患者还可并发胆管上皮癌<sup>[5,6]</sup>.

1.1 流行病学 目前, 有关PSC流行病学的报道较少, 主要来自西方国家, 现已公认PSC是IBD最常见的肝胆并发症. PSC好发于30-50岁之间, 特别是有IBD易患因素者, 男女比例为2:1. 与IBD的关系密切是PSC的独特特征, 事实上, 至少有70%的PSC患者同时患有IBD, 尤其是UC, 而仅有2.5%-7.5%的IBD患者发展为PSC<sup>[7]</sup>. UC中有2%-7.5%的患者并发PSC, 而CD中则为1.4%-3.4%<sup>[8-10]</sup>. PSC可与其他许多疾病共存, 包括腹膜后纤维化、纵膈纤维化、甲状腺炎、关节炎、脉管炎、胰腺炎、迟发性皮肤卟啉病、结节病、乳糜泻、干燥综合征、嗜酸粒细胞增多症、系统性肥大细胞增多症、抗磷脂抗体综合征和系统性硬化病<sup>[11]</sup>.

1.2 临床特征与诊断 大多数PSC患者在就诊时无症状, 仅在体检时发现血清碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)升高. 症状发展隐匿, 以乏力、皮肤瘙痒、右上腹痛和体质量减轻等表现最为常见<sup>[12]</sup>. 除非在胆道探查后, 否则很少出现发热、寒战等急性胆管炎的表现<sup>[13]</sup>. 约有50%的患者可出现异常体征, 最常见的是黄疸和肝、脾肿大<sup>[6]</sup>. 晚期患者可并发诸如静脉曲张出血、腹水和肝性脑病等失代偿期肝病的并发症<sup>[12]</sup>.

PSC的诊断条件如下, 包括: (1)除外硬化性胆管炎明确病因; (2)临床表现和实验室检查相符合; (3)胆管造影术的典型表现. 而肝脏组织的病理学证据却不是必需的.

肝脏生化学检测指标主要以胆道淤积性损伤为主, 多数患者ALP升高至正常上限的3-4倍, 而转氨酶仅轻、中度升高, 早期患者血清总胆红素(total bilirubin, TBIL)和总胆固醇(total

cholesterol, TC)水平多在正常范围, 进展期患者两者水平均升高; 血清白蛋白和凝血酶原时间通常正常, 直到病程晚期才出现异常<sup>[5]</sup>. 除非为了排除如PBC或AIH等其他疾病, 一般情况下, 血清学指标对PSC的诊断作用不大, 也不是疾病预后的指标. 此外, 在PSC患者血清中可检测到多种自身抗体, 包括抗中性粒细胞胞浆抗体、抗核抗体、抗平滑肌抗体、抗内皮细胞抗体、抗心磷脂抗体等, 有报道其检出率分别为50%-80%、7%-77%、13%-20%、35%和4%-66%<sup>[12]</sup>, 但这些自身抗体在PSC或PSC-IBD诊断与鉴别诊断中的价值尚未确定.

内镜下逆行胰胆管造影(endoscopic retrograde cholangiography, ERCP)仍是目前诊断PSC的金标准. 典型的胆管造影显示多处不规则的狭窄和扩张, 肝内肝外胆管呈串珠样或枯树枝样表现<sup>[14]</sup>, 肝内胆管支减少. ERCP诊断PSC的敏感性和特异性都较高. 同时, 核磁共振胆道造影(magnetic resonance cholangiography, MRCP)因具有非侵入性和良好的操作性也越来越多地被用于PSC的诊断. 通常MRCP可特异性地发现胆道节段性纤维化狭窄伴囊状扩张, 但也必须指出, 他可能漏检PSC的早期病变. 一项针对疑有PSC患者进行的456例Meta分析显示, MRCP诊断PSC的敏感性为86%, 特异性达94%<sup>[15]</sup>. 此外, PSC患者的胆道造影表现也可见于硬化性胆管炎的继发原因, 如IgG4相关性胆管炎(IgG4-associated cholangitis, IAC)、胆管局部缺血损伤、先前胆道手术、AIDS相关胆道病变、肿瘤转移、肝细胞癌、淀粉样变性或肉瘤样病等浸润病变以及射线或毒素损伤等<sup>[12]</sup>. PSC诊断前需排除这些疾病.

PSC的肝组织病理学检查典型表现为洋葱皮样胆管纤维化, 门脉带有淋巴细胞、多形粒细胞浸润, 肉芽肿少见或缺如. 病理学改变可作为诊断依据和确定病变程度的指标, 但因其缺乏特异性和获取率低等因素, 故其诊断价值有限. 肝穿刺活检仅适用于胆道造影正常, 但转氨酶不对称升高的小胆管PSC的确诊和排除重叠综合症时. 一项包括138例PSC患者的回顾性研究结果提示, 当PSC患者经胆道造影检查诊断后, 肝组织活检并不能提供更多的诊断信息<sup>[16]</sup>. 故有典型胆道造影病变的患者将不再推荐行肝穿刺活检术<sup>[12]</sup>; 但当诊断ERCP可疑时, 可行肝穿刺进一步明确诊断. 此外, 肝活检组织病理学也可作为判定PSC治疗疗效的指标.

■**研发前沿**  
IBD的肝胆并发症近年备受关注, IBD肝胆并发症的流行病学、临床表现、诊断及治疗是近年关注的热点, 但是其发病机制仍有待于研究.

### ■相关报道

Stawarski等报道, 50%的溃疡性结肠炎(UC)患者和80%的克罗恩病(CD)患者至少伴发一种肠外表现. 肝胆并发症检出率增多逐渐受到重视. 其中原发性硬化性胆管炎(PSC)在临床上最常见.

1.3 治疗与预后 在PSC伴或不伴IBD的治疗上, 其治疗策略无明显差别. 药物治疗方面, 目前仍没有任何一种药物可改变PSC的疾病进展或自然病程. 其中, 最常用的药物是熊去氧胆酸(ursodeoxycholic acid, UDCA), 一项关于UDCA的随机对照试验表明, 13-15 mg/(kg·d)的剂量可使PSC患者的肝酶异常得到改善, 但对其肝脏组织学却并无影响<sup>[17]</sup>. 同时, 在一项219例PSC的随机对照临床试验中也发现, 应用较高剂量UDCA 17-23 mg/(kg·d)进行治疗时, 其在死亡率、对肝移植的需求以及胆管上皮癌的预后等方面并没有显著性差异<sup>[18]</sup>. 也有研究表明, 更高剂量的UDCA 28-30 mg/(kg·d)可能提高患者的生存率<sup>[19]</sup>, 但在另一大规模、多中心、随机对照临床试验中, 却因药物不良反应明显增加而早期终止UDCA使用<sup>[20]</sup>. 上述研究表明, 尽管UDCA能使PSC患者生化指标得到改善, 但却没有临床疗效.

内镜介入和手术治疗的目的是缓解PSC患者的胆道闭塞情况, 提高生存率. 内镜介入常用的方法包括Oddi括约肌切开、探条或气囊管扩张胆管狭窄处、胆管取石、冲洗或引流和狭窄处放置内支架等<sup>[6]</sup>. 当PSC患者出现恶性黄疸、胆管炎或疑似胆管癌时, 需行内镜检查及治疗<sup>[12]</sup>. 约20%的患者伴有肝外胆管系统的完全狭窄, 行内镜下单纯球囊扩张术或内支架植入术, 在临床上均能提高患者生存率<sup>[21]</sup>. 胆管闭塞, 无论是良性的还是恶性的, 均是外科手术的指征. 手术方法主要包括胆道旁路术(胆肠吻合术)和狭窄胆管切除、肝管空肠吻合术, 但目前仍无证据表明外科手术能改变PSC的自然病程和疾病进展<sup>[6]</sup>. 内镜介入和外科手术在一定程度上可缓解胆道梗阻、减轻肝脏损害, 但对于终末期PSC或PSC并发胆管癌的治疗则应首选肝移植, 肝移植是唯一有效的方法. 肝移植对PSC治疗的意义较大, 5年和10年存活率分别为85%<sup>[22]</sup>和70%<sup>[23]</sup>, 但仍有20%-25%的患者在术后5-10 year内复发<sup>[24,25]</sup>, 因此, 易复发仍是临床PSC治疗中面临的难题之一.

PSC患者预后较差, 10年生存率仅65%<sup>[6]</sup>. 此外, PSC与IBD尤其是UC并存更增加了其发展为结直肠癌的风险.

## 2 脂肪肝

2.1 流行病学与发病机制 CD或UC患者的肝穿活检组织病理学表现主要为脂肪变性, 有报道CD和UC脂肪肝检出率高达13.5%-100.0%<sup>[26]</sup>,

以非酒精性脂肪性肝病(nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD)和非酒精性脂肪性肝炎(non-alcoholic steatohepatitis, NASH)较为常见, 并可缓慢进展为晚期肝病<sup>[27]</sup>. 其中, NAFLD是最常见的IBD并发肝损害的病因, 因其对损伤较为敏感, 因此, NAFLD发展为急性和慢性肝衰竭的风险性也增加. CD是发展为NAFLD的危险因素, 可进展为NASH. 对匈牙利的IBD患者进行研究发现, 约9.4%的UC患者发生了NASH, 而其在CD中的发生率则为19.3%<sup>[27]</sup>; 同时, 另一项调查报告也显示NAFLD在CD和UC的发病率分别是39.5%和35.5%<sup>[28]</sup>. UC患者的脂肪变性可能与结肠炎的严重程度有关, 大多数患者表现为肝功能异常. 此外, 也有研究发现, 约10%的重建性结直肠切除患者的肝功能异常与脂肪变性有关<sup>[29]</sup>.

目前, IBD并发脂肪肝的发病机制尚不明确. 有研究表明, 营养不良、蛋白丢失和应用类固醇激素治疗可能是其诱发因素<sup>[30,31]</sup>, 近来也有学者认为IBD肠源性内毒素血症可能是NAFLD的重要发病机制<sup>[32-34]</sup>.

2.2 临床诊断与治疗 此类脂肪肝患者通常无症状, 或表现为流感样症状, 转氨酶升高, 少数患者体检可发现肝肿大. 因此, 对IBD患者进行肝功能的检测显得尤为重要. 脂肪肝的治疗有利于肠道疾病和肝脏病变的诱导缓解. NASH患者则需阻止肝病进展, 减少或防止肝硬化, 肝癌及其并发症的发生<sup>[35-45]</sup>. 治疗方法包括改变生活方式, 控制体质量, 改善胰岛素抵抗、纠正代谢紊乱, 减少附加打击以免加重肝脏损, 保肝抗炎药物防治肝炎和纤维化, 积极处理肝硬化的并发症<sup>[46]</sup>.

## 3 胆石症

3.1 流行病学与发病机制 早在40年前就公认, 胆石症是IBD常见的并发症. 胆石症尤其常见于CD患者, 其发病率为13%-34%. 有研究表明, UC患者胆石症的发生率高于普通人群, 而意大利的一项对429例CD和205例UC患者进行的11年随访研究发现, 仅CD患者发展为胆结石的风险增加. 也有研究显示, CD患者的胆结石年发病率是1.4%, 而正常人群和UC为0.8%, UC患者与正常人群的胆石症患病率无显著性差异<sup>[47]</sup>. 由此可见, 胆石症与CD之间有关, 但其与UC之间是否存在联系仍有争议<sup>[48,49]</sup>.

IBD并发胆石症的发生机制尚不明确. 通常认为回肠末端病变行回肠切除的患者, 由于胆汁酸吸收减少或丢失过多, 导致胆汁中胆固醇

过饱和而促使胆结石形成,但也有CD患者行回肠切除后,胆汁胆固醇饱和度正常或较低,这表明尚有其他致病因素.对回肠和结肠病变的CD患者研究发现,脂肪餐使胆囊排空障碍,提示胆囊动力减低,促使胆固醇过饱和;IBD患者长期全肠外营养者,胆囊排空能力明显减低<sup>[50]</sup>;有研究表明住院超过40 d者全肠外营养,胆石症风险增加20倍.综上所述,IBD的病变部位、回肠切除手术、住院时间以及全肠外营养等因素均与胆石症发病相关<sup>[51]</sup>.

**3.2 临床诊断与治疗** 典型症状是餐后右上腹痛伴有恶心,有时伴有呕吐.常常出现血清ALP升高.超声检查即可确诊.治疗包括腹腔镜胆囊切除术和体外震波碎石术.

## 4 原发性胆汁性肝硬化

PBC是一种病因不明的慢性进行性肝胆疾病,他以肝脏内进行性小胆管毁损伴门静脉炎症、慢性胆汁淤积、肝纤维化为特点,最终进展为肝硬化和肝衰竭.

**4.1 流行病学** PBC是一种病因不明的慢性肝内胆汁淤积性疾病,其发病率逐年上升.目前认为PBC是一种自身免疫性疾病,其确切病因和发病机制尚不清楚,多见于35-65岁女性,男女发病率之比为1:9.从确立诊断到死亡的平均时间为5-8年.研究表明PBC的发生与自身免疫性疾病和高脂饮食关系密切,与IBD特别是UC有一定联系,伴PBC的UC病情往往较轻,结肠炎也较局限(如仅有直肠炎)<sup>[52,53]</sup>.

**4.2 临床特征与诊断** 本病起病隐匿,早期症状轻微.临床症状可表现为乏力、皮肤瘙痒、门静脉高压、骨质疏松、黄疸、脂溶性维生素缺乏、复发性无症状尿路感染等<sup>[54]</sup>.

PBC患者血清生化检测呈胆汁淤积改变,PBC患者常表现为ALP、 $\gamma$ 谷氨酰转肽酶( $\gamma$ -glutamyl transpeptidase,  $\gamma$ GGT)、TBIL及TC、甘油三酯(triglyceride, TG)水平的升高<sup>[55]</sup>.患者可出现自身抗体,95%以上患者抗线粒体抗体阳性,滴度>88.1%,为本病特征性改变.确诊有赖于肝穿刺活检,显示有胆管炎、肉芽肿、局灶性汇管区淋巴细胞积聚,汇管区周围胆汁淤积;肝小叶完整,轻度碎屑样坏死.

**4.3 治疗** 在药物治疗中,免疫抑制剂的效果尚不明确.UDCA被认为是现今治疗PBC最常用的药物<sup>[55]</sup>,有报道认为UDCA是唯一可以提高PBC存活率的药物,一般治疗剂量为13-15 mg/kg·d,长

期应用可改善各项生化指标,稳定或改善肝脏的炎症,但并不能缓解临床症状.终末期PBC可进行肝移植,肝移植后部分PBC可能复发<sup>[54]</sup>.

## 5 其他少见的肝胆病变

**5.1 小胆管PSC** 小胆管PSC,过去称为胆管周围炎,是一种与IBD相关的肝胆系统紊乱性疾病.与PSC有相同的生化和组织学特征,但胆道造影正常.一项大规模多中心研究表明,先前的小胆管PSC经过长时间随访,约有80%的患者在诊断或随访中伴有IBD发生<sup>[56]</sup>,其中78%为UC,21%为CD,1%为肠纤维化<sup>[56]</sup>.但小胆管PSC与CD的关联更密切,伴有ALP增高,而ERCP或MRCP胆道造影正常的IBD患者,在除其他肝胆系统疾病后,需要肝活检才能确诊小胆管PSC.小胆管PSC的临床进展缓慢,一项针对83例小胆管PSC患者的随访研究表明,23%患者发展为典型PSC,平均时间为7.4年(5.1-14年)<sup>[56]</sup>.目前尚无报道显示单纯小胆管PSC可发展为胆管上皮癌,除非为大胆管PSC<sup>[56]</sup>.

目前尚无有效的治疗药物,常用的药物是UDCA,但并不能延缓肝移植的时间<sup>[57]</sup>.小胆管PSC并发IBD并不影响肝脏疾病的预后.一些并发症可能行肝移植后才确诊为小胆管性PSC,而这些疾病在肝移植后可能还会复发.研究表明,小胆管型PSC较大胆管型预后好<sup>[48-60]</sup>.

**5.2 PSC/AIH重叠综合征** PSC/AIH重叠综合征是以具有AIH临床、生化、组织学改变和PSC典型胆道造影表现为特征的一种疾病<sup>[5]</sup>.

PSC/AIH重叠综合征与IBD的关系早有报道,尤其是UC患者更易并发PSC/AIH重叠综合征<sup>[61]</sup>.由于PSC/AIH重叠综合征诊断和分类困难,关于本病的流行病学报道呈多样化.有报道称,IBD伴发AIH的患者通过肝活检或ERCP证明不伴PSC者可能发展为PSC<sup>[62]</sup>.研究显示7.6%-53.8%的PSC患者伴有AIH,42%的AIH和UC患者胆道造影异常<sup>[63]</sup>.PSC/AIH重叠综合症患者以儿童多见,通常被描述为自身免疫性硬化性胆管炎.PSC/AIH重叠综合征的诊断并不完善,诊断标准尚未确立.PSC患者肝穿活检显示明显的界板性肝炎、血清IgG水平升高、出现AIH的自身抗体包括ANA、SMA和肝肾微粒体抗体、转氨酶显著升高或ALP比预期值降低应怀疑本病.相反,AIH患者出现皮肤瘙痒、ALP升高、组织学或胆道造影显示胆管异常时也应怀疑本病<sup>[63]</sup>.

### ■创新盘点

本文从IBD相关的肝胆并发症的流行病学、发病机制、临床表现、诊断及治疗等多方面综合展开论述.

### ■应用要点

本文从IBD相关的肝胆并发症等方面,较全面地概括了该领域研究的现状,为认识IBD相关肝病的发病机制和临床治疗提供参考。

治疗方面,免疫抑制剂对PSC/AIH重叠综合征患者似乎有效.患者对类固醇激素、UDCA、用或不用乙酰唑胺(AZA)/6-巯基嘌呤(6MP)的联合治疗有较轻的反应.研究显示,与单纯PSC患者相比,PSC/AIH重叠综合征患者即使不行肝移植也有更长的生存期,然而较AIH患者生存期短.PSC/AIH重叠综合征患者联合应用UDCA、免疫抑制剂治疗,血清中AST水平明显降低,ALT降低不明显,而GGT和ALP没有变化.典型的PSC患者单独用UDCA治疗,以上的血清指标没有明显改善.PSC/AIH重叠综合征患者比单纯性PSC患者生存期长<sup>[63]</sup>.

5.3 IgG4相关性胆管炎 IgG4相关性胆管炎(IgG4-associated cholangitis, IAC)是近年来才被人们认识的一种临床疾病,其特点是血清IgG4水平升高、胆管周围大量IgG4阳性浆细胞浸润以及对激素治疗敏感.

IAC以60-70岁男性好发.70%-80%PSC患者合并IBD,而大约5%IAC患者合并IBD<sup>[64]</sup>.IAC症状包括梗阻性黄疸、体质量减轻、腹部不适.HISORT诊断标准包括胆管组织学、胆道系统成像、血清学、其他系统受累和对激素治疗的反应.超过90%患者胆管活检标本IgG4免疫染色阳性(>10 IgG4+cells/hpf)<sup>[65]</sup>.IgG4诊断IAC的敏感性达75%,特异性和阳性预测值不确切.最近一项研究显示,9%PSC患者血清IgG4升高(>140 mg/dL).其他器官受累是诊断IAC的重要线索,包括胰腺、唾液腺、腹膜后器官、淋巴结和肾脏等.2010年AASLD指南建议所有可疑PSC患者检测IgG4以除外IgG4相关的硬化性胆管炎<sup>[4]</sup>.对可疑IAC患者给予激素试验性治疗可出现肝酶正常化、胆管狭窄消失或改善.

尽管只有9%的PSC患者血清IgG4水平增高<sup>[65]</sup>,但与PSC不同的是,IAC似乎有独立的组织学改变和发病机制,而且对类固醇激素治疗反应较好.在99例PSC患者的肝移植标本中,发现有23%的患者伴有IgG4+浆细胞增多<sup>[66]</sup>,2例并发IBD的同时发现IAC<sup>[67]</sup>,且这2例患者都并发UC,并对低剂量类固醇激素反应较好.

5.4 门静脉血栓形成 门静脉血栓形成是IBD患者非外科治疗少见的并发症,但其发病率高于普通人群,近期有腹部手术史的患者更常见.门静脉血栓形成是EIMs的一部分,可能与慢性肠道炎症引起的凝血异常有关.IBD患者血小板、凝血因子V和VIII、纤维蛋白原增多和抗凝血酶III减少等因素,都可导致血栓形成.其他危险因素

还包括吸烟、活动性肠道炎症和围手术期的败血症等.研究表明,UC患者行重建性结直肠切除术后可发生门静脉血栓<sup>[68]</sup>.同时,有研究对UC患者行回肠肛管吻合术(ileal pouch-anal anastomosis, IPAA)后行CT扫描也发现,45%患者出现门静脉血栓.此外,IPAA的血栓形成可能与隐窝炎发生有关,最近研究表明,45%的围手术期门静脉血栓形成患者可能发展为隐窝炎,而15.4%的患者则没有门静脉血栓形成.门静脉血栓形成的临床意义及其与隐窝炎的关系仍需进一步研究.治疗上,除非是上消化道大出血有血流动力学异常改变时,否则肝素或低分子肝素不能作为IBD患者门静脉血栓治疗和预防的禁忌证.

5.5 肝淀粉样变性 淀粉样变性是多种原因所致的以特异性糖蛋白纤维即淀粉样物质在血管壁及器官、组织细胞外沉积为特征的一种进行性疾病.淀粉样物质可沉积于局部或全身,主要累及心、肝、肾、脾、胃肠、肌肉及皮肤等组织.肝淀粉样变性是IBD罕见的并发症,在CD和UC的发病率分别为0.9%和0.07%.长期慢性肠道炎症、淀粉样蛋白沉积在血管和窦状隙导致本病发生.在18例IBD伴有淀粉样变性患者中,3例有肝淀粉样变性,有5例患者在确诊IBD之前已有淀粉样变性,这就对慢性肠道炎症对肝脏或肠道淀粉样变性的影响提出了质疑.

肝淀粉样变性可以出现肝肿大,而一些患者只能在尸检中诊断.大多数患者无症状,需肝脏活检才能诊断.诊断的参考依据是:肝组织切片刚果红染色证实存在淀粉样物质,免疫组织化学等检查证实淀粉样物质系淀粉样轻链成分 $\kappa$ 或 $\lambda$ ;血清胆红素高于85  $\mu\text{mol/L}$ ;显微镜下肝组织内有肝内胆汁淤积的证据;无肝外胆道梗阻的证据;除外多发性骨髓瘤等恶性浆细胞病所伴发的淀粉样变性及其他继发性系统性淀粉样变性<sup>[69]</sup>.IBD治疗肠道炎症缓解时可使淀粉沉积减少.

5.6 肉芽肿性肝炎 肝脏肉芽肿可能与IBD有关,见于不足1%的IBD患者,CD患者较UC患者常见.其典型表现为孤立的ALP升高.

## 6 结论

IBD相关的肝胆并发症比较常见.因此,IBD的诊断、治疗需要内科医生着重于上述肝胆表现.鉴于肝胆病变和IBD可能存在共同的免疫缺陷,而且发病机制、临床表现不典型对原发病的临床经过、治疗方案和预后有明显的影响,故在

IBD患者中重视筛查上述肝胆病变及在PSC、PBS、AIH等肝胆疾病诊断中重视筛查IBD是很有必要的, 从而为IBD的综合治疗提供思路, 使患者的痛苦程度减少到最小。

## 7 参考文献

- Bernstein CN, Blanchard JF, Rawsthorne P, Yu N. The prevalence of extraintestinal diseases in inflammatory bowel disease: a population-based study. *Am J Gastroenterol* 2001; 96: 1116-1122
- Ricart E, Panaccione R, Loftus EV, Tremaine WJ, Harmsen WS, Zinsmeister AR, Sandborn WJ. Autoimmune disorders and extraintestinal manifestations in first-degree familial and sporadic inflammatory bowel disease: a case-control study. *Inflamm Bowel Dis* 2004; 10: 207-214
- Bernstein CN, Wajda A, Blanchard JF. The clustering of other chronic inflammatory diseases in inflammatory bowel disease: a population-based study. *Gastroenterology* 2005; 129: 827-836
- Mendoza JL, Lana R, Taxonera C, Alba C, Izquierdo S, Díaz-Rubio M. [Extraintestinal manifestations in inflammatory bowel disease: differences between Crohn's disease and ulcerative colitis]. *Med Clin (Barc)* 2005; 125: 297-300
- Lichtenstein DR. Hepatobiliary complications of inflammatory bowel disease. *Curr Gastroenterol Rep* 2011; 13: 495-505
- 韩英, 时永全. 原发性硬化性胆管炎的临床诊治进展. *中华肝脏病杂志* 2010; 18: 329-331
- Rust C, Brand S. PSC: Protect and serve with colitis: does it help the liver to have severe ulcerative colitis? *Gut* 2011; 60: 1165-1166
- Schrumpf E, Elgjo K, Fausa O, Gjone E, Kolmannskog F, Ritland S. Sclerosing cholangitis in ulcerative colitis. *Scand J Gastroenterol* 1980; 15: 689-697
- Shepherd HA, Selby WS, Chapman RW, Nolan D, Barbatis C, McGee JO, Jewell DP. Ulcerative colitis and persistent liver dysfunction. *Q J Med* 1983; 52: 503-513
- Rasmussen HH, Fallingborg JF, Mortensen PB, Vyberg M, Tage-Jensen U, Rasmussen SN. Hepatobiliary dysfunction and primary sclerosing cholangitis in patients with Crohn's disease. *Scand J Gastroenterol* 1997; 32: 604-610
- Saarinen S, Olerup O, Broomé U. Increased frequency of autoimmune diseases in patients with primary sclerosing cholangitis. *Am J Gastroenterol* 2000; 95: 3195-3199
- Chapman R, Fevery J, Kalloo A, Nagorney DM, Boberg KM, Shneider B, Gores GJ. Diagnosis and management of primary sclerosing cholangitis. *Hepatology* 2010; 51: 660-678
- Larsen S, Bendtzen K, Nielsen OH. Extraintestinal manifestations of inflammatory bowel disease: epidemiology, diagnosis, and management. *Ann Med* 2010; 42: 97-114
- Lee YM, Kaplan MM. Primary sclerosing cholangitis. *N Engl J Med* 1995; 332: 924-933
- Dave M, Elmunzer BJ, Dwamena BA, Higgins PD. Primary sclerosing cholangitis: meta-analysis of diagnostic performance of MR cholangiopancreatography. *Radiology* 2010; 256: 387-396
- Burak KW, Angulo P, Lindor KD. Is there a role for liver biopsy in primary sclerosing cholangitis? *Am J Gastroenterol* 2003; 98: 1155-1158
- Lindor KD. Ursodiol for primary sclerosing cholangitis. Mayo Primary Sclerosing Cholangitis-Ursodeoxycholic Acid Study Group. *N Engl J Med* 1997; 336: 691-695
- Olsson R, Boberg KM, de Muckadell OS, Lindgren S, Hultcrantz R, Folvik G, Bell H, Gangsøy-Kristiansen M, Matre J, Rydning A, Wikman O, Danielsson A, Sandberg-Gertzén H, Ung KA, Eriksson A, Lööf L, Prytz H, Marschall HU, Broomé U. High-dose ursodeoxycholic acid in primary sclerosing cholangitis: a 5-year multicenter, randomized, controlled study. *Gastroenterology* 2005; 129: 1464-1472
- Cullen SN, Rust C, Fleming K, Edwards C, Beuers U, Chapman RW. High dose ursodeoxycholic acid for the treatment of primary sclerosing cholangitis is safe and effective. *J Hepatol* 2008; 48: 792-800
- Lindor KD, Kowdley KV, Luketic VA, Harrison ME, McCashland T, Befeler AS, Harnois D, Jorgensen R, Petz J, Keach J, Mooney J, Sargeant C, Braaten J, Bernard T, King D, Miceli E, Schmolz J, Hoskin T, Thapa P, Enders F. High-dose ursodeoxycholic acid for the treatment of primary sclerosing cholangitis. *Hepatology* 2009; 50: 808-814
- Baluyut AR, Sherman S, Lehman GA, Hoen H, Chalasani N. Impact of endoscopic therapy on the survival of patients with primary sclerosing cholangitis. *Gastrointest Endosc* 2001; 53: 308-312
- Rea DJ, Heimbach JK, Rosen CB, Haddock MG, Alberts SR, Kremers WK, Gores GJ, Nagorney DM. Liver transplantation with neoadjuvant chemoradiation is more effective than resection for hilar cholangiocarcinoma. *Ann Surg* 2005; 242: 451-458; discussion 458-461
- Graziadei IW, Wiesner RH, Marotta PJ, Porayko MK, Hay JE, Charlton MR, Poterucha JJ, Rosen CB, Gores GJ, LaRusso NF, Krom RA. Long-term results of patients undergoing liver transplantation for primary sclerosing cholangitis. *Hepatology* 1999; 30: 1121-1127
- Graziadei IW, Wiesner RH, Batts KP, Marotta PJ, LaRusso NF, Porayko MK, Hay JE, Gores GJ, Charlton MR, Ludwig J, Poterucha JJ, Steers JL, Krom RA. Recurrence of primary sclerosing cholangitis following liver transplantation. *Hepatology* 1999; 29: 1050-1056
- Campsen J, Zimmerman MA, Trotter JF, Wachs M, Bak T, Steinberg T, Kam I. Clinically recurrent primary sclerosing cholangitis following liver transplantation: a time course. *Liver Transpl* 2008; 14: 181-185
- De Dombal FT, Goldie W, Watts JM, Goligher JC. Hepatic histological changes in ulcerative colitis. A series of 58 consecutive operative liver biopsies. *Scand J Gastroenterol* 1966; 1: 220-227
- Jose FA, Heyman MB. Extraintestinal manifestations of inflammatory bowel disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2008; 46: 124-133
- Bargiggia S, Maconi G, Elli M, Molteni P, Ardizzone S, Parente F, Todaro I, Greco S, Manzionna G, Bianchi Porro G. Sonographic prevalence of liver steatosis and biliary tract stones in patients with inflammatory bowel disease: study of 511 subjects at a single center. *J Clin Gastroenterol* 2003; 36: 417-420
- Navaneethan U, Remzi FH, Nutter B, Fazio VW, Shen B. Risk factors for abnormal liver function tests in patients with ileal pouch-anal anastomosis for underlying inflammatory bowel disease. *Am J*

## ■同行评价

本研究综述了炎症性肠病的肝胆并发症, 收集资料较完整, 对PSC、胆道疾病、AIH等疾病的认识较全面, 对临床有较强的指导意义。

- Gastroenterol* 2009; 104: 2467-2475
- 30 Riegler G, D'Inca R, Sturniolo GC, Corrao G, Del Vecchio Blanco C, Di Leo V, Carratù R, Ingrosso M, Pelli MA, Morini S, Valpiani D, Cantarini D, Usai P, Papi C, Caprilli R. Hepatobiliary alterations in patients with inflammatory bowel disease: a multicenter study. Caprilli & Gruppo Italiano Studio Colon-Retto. *Scand J Gastroenterol* 1998; 33: 93-98
  - 31 Navaneethan U, Shen B. Hepatopancreatobiliary manifestations and complications associated with inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 2010; 16: 1598-1619
  - 32 赵文慧, 韩德五, 苗宇船, 张晓艳, 吕娴, 李炳蔚, 赵元昌. 肠源性内毒素血症在非酒精性脂肪性肝炎发生发展中的作用. *山西中医学院学报* 2008; 9: 50-52
  - 33 张奕乘, 林志辉. 肠源性内毒素血症与非酒精性脂肪性肝病关系的研究进展. *福建医药杂志* 2010; 32: 90-92
  - 34 Gäbele E, Dostert K, Hofmann C, Wiest R, Schölmerich J, Hellerbrand C, Obermeier F. DSS induced colitis increases portal LPS levels and enhances hepatic inflammation and fibrogenesis in experimental NASH. *J Hepatol* 2011; 55: 1391-1399
  - 35 Farrell GC, Chitturi S, Lau GK, Sollano JD. Guidelines for the assessment and management of non-alcoholic fatty liver disease in the Asia-Pacific region: executive summary. *J Gastroenterol Hepatol* 2007; 22: 775-777
  - 36 American Gastroenterological Association. American Gastroenterological Association medical position statement: nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology* 2002; 123: 1702-1704
  - 37 Grattagliano I, Portincasa P, Palmieri VO, Palasciano G. Managing nonalcoholic fatty liver disease: recommendations for family physicians. *Can Fam Physician* 2007; 53: 857-863
  - 38 Eckel RH, Grundy SM, Zimmet PZ. The metabolic syndrome. *Lancet* 2005; 365: 1415-1428
  - 39 Cohen DE, Anania FA, Chalasani N. An assessment of statin safety by hepatologists. *Am J Cardiol* 2006; 97: 77C-81C
  - 40 Vuppalanchi R, Chalasani N. Nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis: Selected practical issues in their evaluation and management. *Hepatology* 2009; 49: 306-317
  - 41 Zeng MD, Fan JG, Lu LG, Li YM, Chen CW, Wang BY, Mao YM. Guidelines for the diagnosis and treatment of nonalcoholic fatty liver diseases. *J Dig Dis* 2008; 9: 108-112
  - 42 Torres DM, Harrison SA. Diagnosis and therapy of nonalcoholic steatohepatitis. *Gastroenterology* 2008; 134: 1682-1698
  - 43 Ali R, Cusi K. New diagnostic and treatment approaches in non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Ann Med* 2009; 41: 265-278
  - 44 范建高. 糖尿病与肝病的关系及其诊治对策. *中华糖尿病杂志* 2009; 1: 244-247
  - 45 Fan JG, Farrell GC. Prevention of hepatocellular carcinoma in nonviral-related liver diseases. *J Gastroenterol Hepatol* 2009; 24: 712-719
  - 46 中华医学会肝病学会脂肪肝和酒精性肝病学会. 非酒精性脂肪性肝病诊疗指南(2010年修订版). *中华肝脏病杂志* 2010; 18: 163-166
  - 47 Parente F, Pastore L, Bargiggia S, Cucino C, Greco S, Molteni M, Ardizzone S, Porro GB, Sampietro GM, Giorgi R, Moretti R, Gallus S. Incidence and risk factors for gallstones in patients with inflammatory bowel disease: a large case-control study. *Hepatology* 2007; 45: 1267-1274
  - 48 Lapidus A, Bångstad M, Aström M, Muhrbeck O. The prevalence of gallstone disease in a defined cohort of patients with Crohn's disease. *Am J Gastroenterol* 1999; 94: 1261-1266
  - 49 Dowling RH, Bell GD, White J. Lithogenic bile in patients with ileal dysfunction. *Gut* 1972; 13: 415-420
  - 50 Jackson LM, O'Gorman PJ, O'Connell J, Cronin CC, Cotter KP, Shanahan F. Thrombosis in inflammatory bowel disease: clinical setting, procoagulant profile and factor V Leiden. *QJM* 1997; 90: 183-188
  - 51 Damião AO, Sipahi AM, Vezozzo DP, Gonçalves PL, Fukui P, Laudanna AA. Gallbladder hypokinesia in Crohn's disease. *Digestion* 1997; 58: 458-463
  - 52 Koulelaki M, Koutroubakis IE, Petinaki E, Tzardi M, Oekonomaki H, Mouzas I, Kouroumalis EA. Ulcerative colitis associated with primary biliary cirrhosis. *Dig Dis Sci* 1999; 44: 1953-1956
  - 53 Lever E, Balasubramanian K, Condon S, Wat BY. Primary biliary cirrhosis associated with ulcerative colitis. *Am J Gastroenterol* 1993; 88: 945-947
  - 54 中华医学会风湿病学分会. 自身免疫性肝病诊断和治疗指南. *中华风湿病学杂志* 2011; 15: 556-558
  - 55 宋书宁, 张福奎, 寇毅. 原发性胆汁性肝硬化52例临床分析. *北京医学* 2008; 30: 549-551
  - 56 Björnsson E, Olsson R, Bergquist A, Lindgren S, Braden B, Chapman RW, Boberg KM, Angulo P. The natural history of small-duct primary sclerosing cholangitis. *Gastroenterology* 2008; 134: 975-980
  - 57 Charatcharoenwitthaya P, Angulo P, Enders FB, Lindor KD. Impact of inflammatory bowel disease and ursodeoxycholic acid therapy on small-duct primary sclerosing cholangitis. *Hepatology* 2008; 47: 133-142
  - 58 Angulo P, Maor-Kendler Y, Lindor KD. Small-duct primary sclerosing cholangitis: a long-term follow-up study. *Hepatology* 2002; 35: 1494-1500
  - 59 Björnsson E, Boberg KM, Cullen S, Fleming K, Clausen OP, Fausa O, Schrupf E, Chapman RW. Patients with small duct primary sclerosing cholangitis have a favourable long term prognosis. *Gut* 2002; 51: 731-735
  - 60 Broomé U, Glaumann H, Lindstöm E, Löf L, Almer S, Prytz H, Sandberg-Gertzén H, Lindgren S, Fork FT, Järnerot G, Olsson R. Natural history and outcome in 32 Swedish patients with small duct primary sclerosing cholangitis (PSC). *J Hepatol* 2002; 36: 586-589
  - 61 Woodward J, Neuberger J. Autoimmune overlap syndromes. *Hepatology* 2001; 33: 994-1002
  - 62 Floreani A, Rizzotto ER, Ferrara F, Carderi I, Caroli D, Blasone L, Baldo V. Clinical course and outcome of autoimmune hepatitis/primary sclerosing cholangitis overlap syndrome. *Am J Gastroenterol* 2005; 100: 1516-1522
  - 63 Saich R, Chapman R. Primary sclerosing cholangitis, autoimmune hepatitis and overlap syndromes in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 331-337
  - 64 Mendes FD, Jorgensen R, Keach J, Katzmann JA, Smyrk T, Donlinger J, Chari S, Lindor KD. Elevated serum IgG4 concentration in patients with primary sclerosing cholangitis. *Am J Gastroenterol* 2006; 101: 2070-2075
  - 65 Ghazale A, Chari ST, Zhang L, Smyrk TC, Takahashi N, Levy MJ, Topazian MD, Clain JE, Pearson RK, Petersen BT, Vege SS, Lindor K, Farnell MB. Immunoglobulin G4-associated cholangitis: clinical profile and response to therapy. *Gastroenterology*

- 2008; 134: 706-715
- 66 Zhang L, Lewis JT, Abraham SC, Smyrk TC, Leung S, Chari ST, Poterucha JJ, Rosen CB, Lohse CM, Katzmann JA, Wu TT. IgG4+ plasma cell infiltrates in liver explants with primary sclerosing cholangitis. *Am J Surg Pathol* 2010; 34: 88-94
- 67 Dastis SN, Latinne D, Sempoux C, Geubel AP. Ulcerative colitis associated with IgG4 cholangitis: similar features in two HLA identical siblings. *J Hepatol* 2009; 51: 601-605
- 68 Ball CG, MacLean AR, Buie WD, Smith DF, Raber EL. Portal vein thrombi after ileal pouch-anal anastomosis: its incidence and association with pouchitis. *Surg Today* 2007; 37: 552-557
- 69 Ebert EC, Nagar M. Gastrointestinal manifestations of amyloidosis. *Am J Gastroenterol* 2008; 103: 776-787

编辑 曹丽鸥 电编 鲁亚静

ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) CN 14-1260/R 2012年版权归世界华人消化杂志

## • 消息 •

### 《世界华人消化杂志》性质、刊登内容及目标

**本刊讯** 《世界华人消化杂志》[国际标准刊号ISSN 1009-3079 (print), ISSN 2219-2859 (online), 国内统一刊号CN 14-1260/R, *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi/World Chinese Journal of Digestology*], 是一本由来自国内23个省、市、自治区、特别行政区的470位胃肠病学和肝病专家支持的开放存取的同行评议的旬刊杂志, 旨在推广国内各地的胃肠病学和肝病领域临床实践和基础研究相结合的最具有临床意义的原创性及各类评论性的文章, 使其成为一种公众资源, 同时科学家、医生、患者和学生可以通过这样一个不受限制的平台来免费获取全文, 了解其领域的所有的关键的进展, 更重要的是这些进展会为本领域的医务工作者和研究人员服务, 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、生长因素和受体、营养肥胖、成像及高科技技术。

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

# 内源性硫化氢对肝硬化大鼠肝细胞凋亡的影响

刘浩, 郑勇, 陈卫刚, 赵瑾, 李睿, 张宁, 刘芳, 阎继攀

## ■背景资料

硫化氢是存在于哺乳动物体内的第3种新型的内源性气体信号分子, 有着广泛的生物学效应。近年研究证实其具有调节病理状态下细胞凋亡的作用, 课题组前期研究也表明其在肝纤维化的发生发展过程中及门脉高压的调节方面起着重要作用。

刘浩, 阎继攀, 石河子大学医学院 新疆维吾尔自治区石河子市 832002

郑勇, 陈卫刚, 李睿, 张宁, 刘芳, 石河子大学医学院第一附属医院消化内科 新疆维吾尔自治区石河子市 832008

赵瑾, 石河子大学医学院第一附属医院病理科 新疆维吾尔自治区石河子市 832008

国家自然科学基金资助项目, No. 30850004

石河子大学研究生创新基金资助项目, No. YJCX2010-Z11

作者贡献分布: 本课题由刘浩、郑勇、陈卫刚、李睿及张宁设计; 研究过程由刘浩、刘芳及赵瑾完成; 研究所用试剂由郑勇与陈卫刚提供; 数据分析由刘浩与阎继攀完成; 本论文写作由刘浩、郑勇及陈卫刚完成。

通讯作者: 郑勇, 主任医师, 教授, 博士生导师, 832008, 新疆维吾尔自治区石河子市北二路32小区, 石河子大学医学院第一附属医院消化内科。zy2850@126.com

收稿日期: 2011-11-13 修回日期: 2012-01-10

接受日期: 2012-03-10 在线出版日期: 2012-03-18

## Effect of endogenous hydrogen sulfide on apoptosis of cirrhosis rat liver cells

Hao Liu, Yong Zheng, Wei-Gang Chen, Jin Zhao, Rui Li, Ning Zhang, Fang Liu, Ji-Pan Yan

Hao Liu, Ji-Pan Yan, College of Medicine of Shihezi University, Shihezi 832002, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China

Yong Zheng, Wei-Gang Chen, Rui Li, Ning Zhang, Fang Liu, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of College of Medicine of Shihezi University, Shihezi 832008, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China

Jin Zhao, Department of Pathology, the First Affiliated Hospital of Medicine College of Shihezi University, Shihezi 832008, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30850004; and the Graduate Student Innovation Fund of Shihezi University, No. YJCX2010-Z11

Correspondence to: Yong Zheng, Professor, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Medical College of Shihezi University, Shihezi 832008, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China. zy2850@126.com

Received: 2011-11-13 Revised: 2012-01-10

Accepted: 2012-03-10 Published online: 2012-03-18

## Abstract

**AIM:** To explore the effect of a metabolic inhibitor of hydrogen sulfide on apoptosis of liver cells in rats with cirrhosis, and to explore the mechanism underlying the protective effect of hydrogen sulfide against cirrhosis.

**METHODS:** Forty female SD rats were randomly divided into four groups: normal controls (group N), normal controls treated with

propargylglycine (PPG) (group P), cirrhotic rats (group H), and cirrhotic rats treated with PPG (group PH). Rats in groups H and PH were subjected to induction of cirrhosis by injecting carbon tetrachloride (CCl<sub>4</sub>). Rats in groups P and PH were injected with PPG (30 mg/kg·d) to decrease the content of hydrogen sulfide in the liver. Rats in groups N and H were injected with equal volume of normal saline. The distribution of cystathionine-γ-lyase (CSE) in the liver was examined by immunohistochemistry. The apoptosis of liver cells was detected by TUNEL assay. The expression of Bax and Bcl-2 in liver cells was detected by Western blot.

**RESULTS:** Compared to group N, apoptosis index (AI) significantly increased ( $P = 0.000$ ) and expression of Bax was significantly up-regulated ( $P = 0.001$ ) in group H. Compared to group H, AI and expression of Bax significantly increased ( $P = 0.000, 0.021$ ), and CSE decreased ( $P = 0.029$ ) in group PH.

**CONCLUSION:** Inhibition of hydrogen sulfide promotes apoptosis of liver cells in rats with cirrhosis possibly by regulating the expression of Bax.

**Key Words:** Hydrogen sulfide; Cirrhosis; Bax; Bcl-2; Apoptosis

Liu H, Zheng Y, Chen WG, Zhao J, Li R, Zhang N, Liu F, Yan JP. Effect of endogenous hydrogen sulfide on apoptosis of cirrhosis rat liver cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2012; 20(8): 670-674

## 摘要

**目的:** 探讨硫化氢(hydrogen sulfide, H<sub>2</sub>S)代谢酶抑制剂对肝硬化大鼠肝细胞凋亡的影响, 进一步了解内源性H<sub>2</sub>S在大鼠肝硬化过程中发挥保护性作用的机制。

**方法:** 将40只♀SD大鼠分为4组, 正常对照组(N组), 正常对照组+炔丙基甘氨酸(PPG)组(P组), 肝硬化组(H组), 肝硬化+PPG组(PH组)。H组、PH组利用CCl<sub>4</sub>复合因素法复制肝硬化大鼠模型, P组和PH组给予腹腔注射PPG(30

## ■同行评议者

刘海林, 主任医师, 上海交通大学医学院附属第九人民医院消化科

mg/kg·d)减少大鼠体内H<sub>2</sub>S含量; N组和H组腹腔注射同等剂量的生理盐水. 免疫组织化学法检测大鼠肝组织中细胞胱硫醚γ裂解酶(CSE)的表达, Tunel法检测大鼠肝组织中肝细胞的凋亡, Western-blot法检测大鼠肝组织中凋亡相关蛋白Bax、Bcl-2的表达.

**结果:** H组与N组相比, 凋亡指数(AI)明显升高( $P = 0.000$ ), 凋亡促进蛋白Bax表达升高( $P = 0.001$ ); PH组与H组相比, CSE表达降低( $P = 0.029$ ), AI明显升高( $P = 0.000$ ), Bax表达增高( $P = 0.021$ ), 差异均具有统计学意义. Bcl-2在各组间的表达无显著性差异( $P = 0.742$ ).

**结论:** H<sub>2</sub>S代谢酶抑制剂可促进肝硬化大鼠肝细胞的凋亡, 其作用机制可能与其调节Bax的表达有关.

**关键词:** 硫化氢; 肝硬化; Bax; Bcl-2; 凋亡

刘浩, 郑勇, 陈卫刚, 赵瑾, 李睿, 张宁, 刘芳, 阎继攀. 内源性硫化氢对肝硬化大鼠肝细胞凋亡的影响. 世界华人消化杂志 2012; 20(8): 670-674

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/670.asp>

## 0 引言

内源性硫化氢(hydrogen sulfide, H<sub>2</sub>S)是继NO和CO之后发现的第3种新型气体信号分子, 在体内主要是通过细胞胱硫醚β合成酶(CBS)、CSE催化L-半胱氨酸而产生. 目前研究证实其存在于人体多个系统中, 具有扩张血管<sup>[1]</sup>、心肌保护<sup>[2]</sup>、抗炎等作用<sup>[3]</sup>. 近年研究证实其在肝纤维化及门脉高压的发生发展过程中起着重要的保护性作用<sup>[4-6]</sup>. 本实验通过复制肝硬化大鼠模型, 给予干预措施改变大鼠体内H<sub>2</sub>S含量后观察肝组织中肝细胞凋亡的变化及凋亡相关蛋白Bax、Bcl-2表达的变化, 进而探讨H<sub>2</sub>S在肝硬化过程中发挥保护性作用的机制.

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 实验所用40只SD大鼠(SPF级)购自新疆医科大学实验动物中心, 为同期出生纯种系, ♀, 体质量200 g左右. Tunel试剂盒购自Roche公司; 小鼠抗大鼠CSE单克隆一抗购自SANTA Cruz公司; 兔抗鼠Bcl-2多克隆一抗购自Abcam公司; 兔抗鼠Bax单克隆一抗购自SANTA Cruz公司; 二抗检测试剂盒均购自北京中杉金桥有限公司, 化学光试剂盒购自Pierce公司; 变性型裂解液购自Biotek公司; PPG购自Sigma公司, 其余试剂为

国产分析纯.

### 1.2 方法

**1.2.1 大鼠分组及肝硬化模型的制备:** 将40只大鼠平均分为4组, H组、PH组给予皮下注射40%的CCL<sub>4</sub>植物油溶液, 4 d 1次, 以30%的乙醇溶液代替饮用水; 先给予高脂饮食2 wk, 再给予高胆固醇饮食; 非造模组大鼠给予同期皮下注射同等剂量的生理盐水. 造模时间为52 d. 模型制备成功后, P组与PH组大鼠给予腹腔注射PPG(30 mg/kg·d)干预体内H<sub>2</sub>S的合成, 进而降低体内H<sub>2</sub>S的含量, N组和H组给予腹腔注射同等剂量的生理盐水, 共注射7 d.

**1.2.2 标本的留取:** 干预措施完成后, 采用颈椎脱臼法处死大鼠. 取大鼠肝组织一块置于30%甲醛溶液中固定后进行石蜡包埋, 另取新鲜肝组织一块置于液氮中速冻后转移至-80 °C冰箱备用.

**1.2.3 免疫组织化学法检测肝组织中CSE蛋白的表达:** 石蜡包埋组织制作切片(4 μm). 切片常规脱蜡至水, 3%双氧水甲醇中浸泡10 min以阻断内源性过氧化物酶. 枸橼酸修复液微波炉中大火修复至冒泡后再低火修复20 min, 冷却至室温后加小鼠抗大鼠CSE一抗(1:1 200), 置于4 °C冰箱过夜. 次日PBS冲洗切片5 min×3, 后加山羊抗小鼠二抗(两步法PV60002), 37 °C温箱中孵育30 min后PBS冲洗5 min×3, DAB显色, 显微镜下边显色边观察以观察控制显色时间, 显色后用自来水冲洗去DAB, 苏木素复染, 脱水, 透明, 中性树胶封片. 阳性部位在胞质处显棕黄色. 按阳性细胞百分率及染色强度进行双评分每张标本切片随机选择5个区域, 计数阳性细胞数和阴性细胞数, 进而计算其阳性表达率(%) = 阳性细胞数/(阳性细胞数+阴性细胞数)×100%.

**1.2.4 Tunel法检测肝组织中肝细胞的凋亡:** 石蜡切片常规脱蜡至水, 3%双氧水甲醇中浸泡10 min以阻断内源性过氧化物酶, PBS冲洗5 min×3; 蛋白酶K(15 mg/L)37 °C温箱中孵育7 min; 200 mL/L胎牛血清室温下封闭20 min; 用滤纸吸去残留液后滴加反应液50 μL(TdT 3 μL, 荧光素连接的核苷酸混合缓冲液47 μL, 阴性对照片不加TdT), 37 °C温箱中孵育45 min, PBS冲洗5 min×3; 20%山羊血清室温下封闭20 min, 加POD转换剂(原液1:2稀释), 置于37 °C温箱中孵育30 min, 显微镜下DAB显色, 苏木素复染, 脱水, 透明, 封片. 阳性部位在细胞核处显棕黄色或棕褐色. 计数5个高倍镜视野下100个肝细胞核中阳性细胞的个数, 取其均值为凋亡指数.

### ■ 研发前沿

肝细胞的病理性凋亡是各种肝脏疾病中最重要的影响因素之一, 研究表明其可启动并促进肝纤维化的发生, 因此, 如何能有效阻止肝细胞的病理性凋亡将成为慢性肝病治疗的新方向.

### ■ 相关报道

康凯等的研究表明,在大鼠缺血再灌注损伤模型建立后,大鼠肝细胞的凋亡明显增加,而给予H<sub>2</sub>S代谢酶抑制剂降低组织中H<sub>2</sub>S含量后,肝细胞的凋亡进一步增加,表明H<sub>2</sub>S缺乏可促进缺血再灌注所引起的这种病理性肝细胞凋亡。

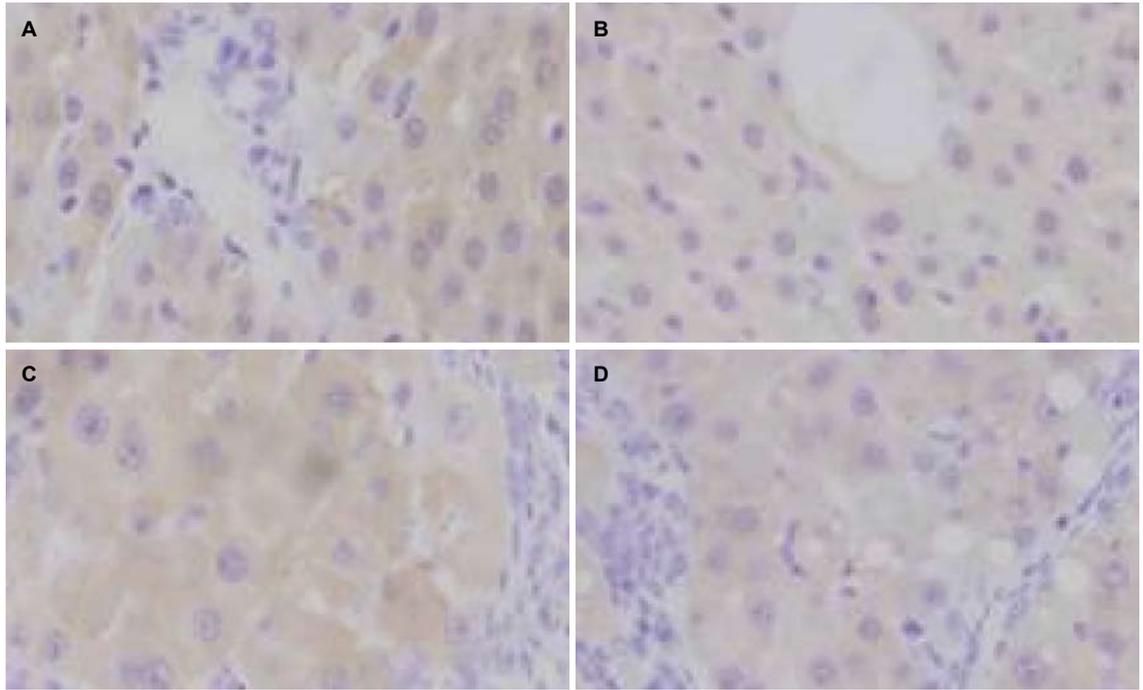


图1 CSE在各组肝组织中的表达(DABX200). A: N组; B: P组; C: H组; D: PH组.

表1 肝组织中CSE蛋白的表达及凋亡指数

分组	n	CSE			阳性率(%)	凋亡指数(AI)
		±	+	++		
N组	10	0	6	4	100.0	4.10 ± 3.02
P组	10	2	7	1	80.0	3.82 ± 2.47
H组	9	1	6	2	88.9	12.58 ± 3.45 <sup>b</sup>
PH组	10	6	4	0	40.0 <sup>a</sup>	16.51 ± 3.08 <sup>ab</sup>

<sup>a</sup>P<0.05 vs H组; <sup>b</sup>P<0.01 vs N组.

**1.2.5 Western Blot法检测肝组织中Bax、Bcl-2的表达:**组织裂解液提取肝组织中总蛋白,核算测定仪测定蛋白浓度,均衡各组间蛋白浓度后加上样缓冲液煮沸,置于-20℃冰箱保存备用.加样10 μL在SDS-PAGE凝胶中进行电泳分离,Mark进行位置标记.湿转法将蛋白从凝胶中转至PVDF膜上(21 V 40 min).5%BSA室温下封闭2 h,分别加Bax(1:400)、Bcl-2(1:400)一抗,室温下孵育2 h后转至4℃冰箱过夜.TBST洗膜后加入辣根过氧化物酶标记的二抗,室温下孵育90 min, TBST洗膜后加入化学发光试剂曝光,显影、定影后将胶片置于凝胶成像系统中测条带吸光度值(A).

**统计学处理** 采用SPSS17.0软件进行统计学分析,采用完全随机设计方差分析及 $\chi^2$ 检验对数据进行组间比较,P<0.05有统计学意义.

## 2 结果

**2.1 肝组织中CSE蛋白的表达** CSE蛋白定位于细胞浆,染色后呈棕黄色(图1).主要表达于肝细胞,各组大鼠肝组织CSE蛋白表达(表1).PH组(40%)较H组(88.9%)表达降低,两组之间的差异有统计学意义(P<0.05).H组较N组阳性率略降低,差异无统计学意义.

**2.2 肝组织中肝细胞的凋亡** 凋亡肝细胞核呈棕黄色或黄褐色.N组大鼠偶见肝细胞凋亡,P组大鼠较N组大鼠其凋亡指数略降低,差异无统计学意义.H组大鼠凋亡指数较N组明显增高(P<0.01),给予PPG干预后的PH组其凋亡指数较H组明显升高(P<0.05),差异均具有统计学意义(表1).

**2.3 肝组织中Bax、Bcl-2的表达** 凋亡抑制蛋白Bcl-2条带的A值在各组之间无明显差异.与N组比较,H组Bax条带的A值降低,表明其蛋白表达升高(P<0.05);与H组相比,PH组Bax条带的A值降低,表明其蛋白表达增高(P<0.05),差异均具有统计学意义(表2).

## 3 讨论

肝硬化是一种由不同损伤因素长期作用于肝脏,引起的以肝组织弥漫性纤维化、假小叶和结节再生形成特征的慢性肝病.临床上有多系统受累,以肝功能损害和门静脉高压为主要表现,

表 2 Bcl-2与Bax 吸光度值(mean ± SD)

分组	Bcl-2	Bax	Bax/Bcl-2
N组	225.3 ± 20.8	151.9 ± 32.6	0.67
P组	227.3 ± 19.4	181.7 ± 31.8	0.79
H组	230.7 ± 19.4	196.4 ± 31.2 <sup>a</sup>	0.85
PH组	227.1 ± 18.4	220.1 ± 14.9 <sup>bc</sup>	0.97

<sup>a</sup>*P*<0.05 vs N组; <sup>c</sup>*P*<0.05 vs H组.

晚期常出现消化系出血、肝性脑病、继发感染等严重并发症。H<sub>2</sub>S是一种新型的内源性气体信号分子,存在于人体多个系统中,有着广泛的生物学效应。课题组前期研究结果表明H<sub>2</sub>S在肝硬化的发生发展过程中表达逐渐降低且门静脉血中H<sub>2</sub>S的下降程度大于下腔静脉<sup>[6,7]</sup>;肝硬化大鼠给予H<sub>2</sub>S代谢酶抑制剂后门静脉压力升高<sup>[4,5]</sup>;且H<sub>2</sub>S与先前的2种气体信号分子NO、CO存在相互作用<sup>[8]</sup>。提示H<sub>2</sub>S在肝硬化的发生发展过程中及调节门静脉压力方面发挥重要的作用。

肝细胞凋亡是肝脏疾病中最重要的影响因素之一,在正常肝脏发育及多种肝脏疾病的发生过程中起着重要作用<sup>[9,10]</sup>。肝脏在受到持续性损伤因素作用时,体内预存的肝细胞死亡程序被激活,肝细胞凋亡增加,产生大量的凋亡小体。凋亡小体被肝星状细胞吞噬后则可激活肝星状细胞,进而产生大量的细胞外基质及胶原蛋白,最终导致肝纤维化的形成。因此,可以认为肝细胞病理性凋亡和肝纤维化发生密切相关,病理性肝细胞的凋亡启动并促进了肝纤维化的发生<sup>[11]</sup>。在细胞凋亡过程中,Bcl-2家族成员起着至关重要的作用。Bcl-2家族可以分为2大类:一类凋亡促进基因,包括Bax、Bad、Bak等;另一类是以Bcl-2为代表的凋亡抑制基因。研究发现Bax/Bcl-2两蛋白之间的比例关系是决定对细胞凋亡抑制作用强弱的关键因素,因此认为,Bax是极重要的促细胞凋亡基因之一。已有研究表明,H<sub>2</sub>S在调节各种病理性细胞凋亡中发挥重要作用。在自发性高血压大鼠中,H<sub>2</sub>S缺乏可引起大鼠主动脉平滑肌细胞凋亡减少<sup>[12]</sup>,促进了血管的重建,加重自发性高血压的高压状态;另外,H<sub>2</sub>S还可调节由缺氧诱导的人胚肺成纤维细胞的凋亡<sup>[13]</sup>;在心肌及肝脏缺血再灌注损伤中,H<sub>2</sub>S缺乏均可加重由缺血再灌注引起的心肌细胞及肝细胞的凋亡<sup>[14,15]</sup>。

本实验的研究结果表明,正常肝组织中存在CSE的表达,肝硬化大鼠肝组织中CSE的表达较正常组略降低,肝硬化大鼠在给予H<sub>2</sub>S代谢酶

抑制剂PPG后CSE表达明显降低,这与课题组前期研究结果一致,表明PPG可下调H<sub>2</sub>S/CSE体系,进而引起肝组织中H<sub>2</sub>S含量的降低。细胞凋亡在确保组织的正常发育及维持内环境稳定方面发挥重要作用,因此正常大鼠中偶可见凋亡细胞,正常大鼠给予PPG后凋亡指数无明显变化,表明在正常大鼠中,病理性凋亡程序未被启动时H<sub>2</sub>S对细胞的凋亡无明显调节作用;肝硬化发生时体内预存的肝细胞死亡程序被激活,所以凋亡细胞较正常大鼠明显增多,而给予H<sub>2</sub>S代谢酶抑制剂降低肝组织H<sub>2</sub>S含量后肝硬化大鼠肝细胞凋亡进一步增多,说明H<sub>2</sub>S缺乏可促进肝硬化大鼠肝细胞凋亡。

有研究表明,H<sub>2</sub>S在心肌缺血再灌注损伤时发挥其保护性作用是通过调节心肌中Bax的表达来实现的,而该过程中Bcl-2的表达则无明显变化;关于H<sub>2</sub>S调节中性粒细胞的凋亡实验也表明H<sub>2</sub>S可调节中性粒细胞的凋亡,而在该调节过程中凋亡抑制蛋白Bcl-2的表达则无明显变化<sup>[16]</sup>。Bax和Bcl-2作为线粒体凋亡通路上的2个凋亡调节蛋白,具有相互拮抗的作用,每一种蛋白的表达变化均不能反应凋亡的发展,而最终能决定凋亡进展方向的是Bax/Bcl-2的比值。在本实验中,尽管给予PPG后Bcl-2的表达无明显变化,但由于Bax的明显升高引起Bax/Bcl-2的升高,仍可以促使细胞向凋亡方向发展。

所以,我们推测肝硬化大鼠给予了H<sub>2</sub>S代谢酶抑制剂后H<sub>2</sub>S/CSE体系表达下调,H<sub>2</sub>S的下调引起Bax表达的上调,而对Bcl-2的表达无显著影响,故Bax/Bcl-2比值增高,进而促使肝细胞向凋亡方向发展,使肝细胞凋亡增多。而肝细胞凋亡后产生的凋亡小体被肝星状细胞吞噬后引起肝星状细胞激活,进而引起细胞因子生成增加,细胞外基质合成增加,I、III型胶原合成增多。同时,由于肝细胞凋亡增多,肝细胞代谢、降解细胞外基质及胶原的能力降低,引起细胞外基质的生成与降解的失衡,进而促进肝纤维化的发生与发展。另外,肝内细胞外基质及胶原的增多,可引起肝血窦闭塞或窦周纤维化,进而引起窦性门静脉循环受阻,最终导致H<sub>2</sub>S缺乏状态下门静脉压力的进一步升高。

总之,我们的研究结果表明,在H<sub>2</sub>S缺乏的状态下,肝硬化大鼠肝细胞的凋亡增加,进而促进肝纤维化启动与发生甚至引起门静脉压力的进一步增高。而在调节凋亡这一过程中,H<sub>2</sub>S又有可能通过调节肝组织中Bax的表达进而改变

#### ■创新盘点

本研究结果表明,肝硬化大鼠H<sub>2</sub>S缺乏可促进肝细胞的病理性凋亡,而病理性凋亡又可能通过相应的途径加快肝纤维化的进展,甚至增加门静脉压力。因此,如何避免体内H<sub>2</sub>S缺乏甚至增加体内H<sub>2</sub>S含量可能会成为肝硬化及门脉高压治疗的新的发展方向。

#### ■同行评价

本文设计合理, 结果可靠, 具有一定的学术价值.

Bax/Bcl-2比值来实现的.

#### 4 参考文献

- 1 Mel'nik AV, Voloshchouk NI, Pentyuk NO, Znichko KO. Role of Hydrogen Sulfide and Sulfur-Containing Amino Acids in Regulation of Tone of Smooth Muscles of the Vascular Wall in Rats. *Neurophysiology* 2010; 42: 104-109
- 2 黄晓伟, 姚玲玲, 姚泰, 朱依纯. 外源性H<sub>2</sub>S在大鼠心肌缺血再灌注损伤中的作用. *复旦学报(医学版)* 2008; 35: 216-219
- 3 Hirata I, Naito Y, Takagi T, Mizushima K, Suzuki T, Omatsu T, Handa O, Ichikawa H, Ueda H, Yoshikawa T. Endogenous hydrogen sulfide is an anti-inflammatory molecule in dextran sodium sulfate-induced colitis in mice. *Dig Dis Sci* 2011; 56: 1379-1386
- 4 陈卫刚, 郑勇, 宋丽秀, 刘维国, 李文娟, 刘清华, 张宁, 齐翠花. 内源性H<sub>2</sub>S对大鼠实验性肝硬化门脉高压的影响. *世界华人消化杂志* 2011; 19: 467-471
- 5 李文娟, 郑勇, 陈卫刚. 内源性硫化氢对实验性肝硬化门静脉高压调节作用. *中华实用诊断与治疗杂志* 2010; 24: 429-432
- 6 张宁, 郑勇, 王于理, 李睿, 孙侃, 常向云, 陈卫刚, 赵瑾, 李洪安. 内源性硫化氢在不同时期大鼠肝硬化中的作用. *世界华人消化杂志* 2009; 17: 307-311
- 7 张宁, 郑勇, 李睿, 周婷, 孙侃, 陈卫刚, 常向云, 杨军. 不同时期肝硬化大鼠门静脉血与下腔静脉血中内源性硫化氢的比较. *石河子大学学报(自然科学版)* 2009; 27: 51-54
- 8 宋丽秀, 郑勇, 陈卫刚, 刘清华, 张宁, 刘维国, 李文娟. 大鼠肝硬化形成中气体信号分子一氧化氮、一氧化硫对硫化氢/胱硫醚- $\gamma$ 裂解酶体系的影响. *现代生物医学进展* 2010; 10: 1213-1216
- 9 Kiliçarslan A, Kahraman A, Akkiz H, Yildiz Menziletoğlu S, Fingas CD, Gerken G, Canbay A. Apoptosis in selected liver diseases. *Turk J Gastroenterol* 2009; 20: 171-179
- 10 Guicciardi ME, Gores GJ. Apoptosis as a mechanism for liver disease progression. *Semin Liver Dis* 2010; 30: 402-410
- 11 周滔, 刘成海. 肝细胞凋亡在肝纤维化中的作用. *肝脏* 2007; 12: 503-505
- 12 闫辉, 杜军保, 唐朝枢. 硫化氢对自发性高血压大鼠主动脉平滑肌细胞增殖与凋亡的影响. *实用儿科临床杂志* 2004; 19: 188-190
- 13 潘际刚, 刘新宇, 周华, 陈丽, 郑煜. 硫化氢对人胚肺成纤维细胞缺氧后增殖活力及细胞凋亡的影响. *中国药理学通报* 2010; 26: 302-304
- 14 李钢, 杨双强. 硫化氢对大鼠MIRL心肌细胞凋亡的影响及机制研究. *重庆医科大学学报* 2011; 36: 932-935
- 15 康凯, 姜洪池, 赵鸣雁, 孙学英, 潘尚哈. 胱硫醚 $\gamma$ 裂解酶/硫化氢系统在大鼠肝脏缺血再灌注损伤中的保护作用. *中华外科杂志* 2010; 48: 924-928
- 16 黄新莉, 周晓红, 蒯晓辉, 周君琳, 丁春华, 范亚敏, 凌亦凌. 硫化氢对人PMN凋亡及P53/Bcl-2表达的影响. *中国病理生理杂志* 2010; 26: 581-583

编辑 曹丽鸥 电编 鲁亚静

ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) CN 14-1260/R 2012年版权归世界华人消化杂志

#### • 消息 •

### WJG 总被引频次排名位于第 174 名

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

# 帕瑞昔布对人胰腺癌细胞株BxPC-3、AsPC-1增殖凋亡的影响及其机制

李鹏, 刘江伟, 许永华, 朱淑萍, 郭飞, 董翔

李鹏, 新疆石河子大学医学院 新疆维吾尔自治区石河子市 832000

刘江伟, 郭飞, 中国人民解放军兰州军区乌鲁木齐总医院肝胆外科 新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市 830000

许永华, 朱淑萍, 董翔, 中国人民解放军兰州军区乌鲁木齐总医院 新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市 830000

李鹏, 在读硕士, 主要从事消化系统肿瘤的研究。

中国博士后基金资助项目, No. 20100481517

作者贡献分布: 李鹏与刘江伟对此文所作贡献均等; 此课题由李鹏与刘江伟设计; 研究过程由李鹏与刘江伟操作完成; 研究用新试剂及分析工具由许永华与朱淑萍提供; 数据分析由李鹏、郭飞及董翔完成; 本论文写作由李鹏与刘江伟完成。

通讯作者: 刘江伟, 教授, 主任医师, 830000, 新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市友好北路359号, 中国人民解放军兰州军区乌鲁木齐总医院肝胆外科, ljw273@sohu.com

收稿日期: 2011-11-26 修回日期: 2012-01-10

接受日期: 2012-03-10 在线出版日期: 2012-03-18

## Parecoxib inhibits cell proliferation and induces apoptosis in human pancreatic cancer cell lines BxPC-3 and AsPC-1

Peng Li, Jiang-Wei Liu, Yong-Hua Xu, Shu-Ping Zhu, Fei Guo, Xiang Dong

Peng Li, Medical School of Shihezi University, Shihezi 832000, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China

Jiang-Wei Liu, Fei Guo, Department of Hepatobiliary Surgery, Urumqi General Hospital of Lanzhou Military Region, Urumqi 830000, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China

Yong-Hua Xu, Shu-Ping Zhu, Xiang Dong, Urumqi General Hospital of Lanzhou Military Region, Urumqi 830000, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China

Supported by: the Chinese Postdoctoral Science Foundation, No. 20100481517

Correspondence to: Jiang-Wei Liu, Professor, Department of Hepatobiliary Surgery, Urumqi General Hospital of Lanzhou Military Region, Urumqi 830000, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China. ljw273@sohu.com.

Received: 2011-11-26 Revised: 2012-01-10

Accepted: 2012-03-10 Published online: 2012-03-18

## Abstract

**AIM:** To investigate the effect of parecoxib on cell proliferation and apoptosis in human pancreatic cancer cell lines BxPC-3 and AsPC-1 and to explore possible mechanisms involved.

**METHODS:** After BxPC-3 and AsPC-1 cells

were incubated with different concentrations of parecoxib, cell viability was measured by MTT assay to calculate the half maximal inhibitory concentration (IC<sub>50</sub>); cell apoptosis was evaluated by TUNEL assay; and the expression of COX-2 was detected RT-PCR.

**RESULTS:** Cell viability was apparently inhibited by parecoxib in both cell types, and the inhibitory effect was time- and dose-dependent. The IC<sub>50</sub> values in the two cell lines were 400.98 μmol/L ± 10.78 μmol/L and 256.3 μmol/L ± 2.98 μmol/L, respectively. Treatment with parecoxib increased apoptosis rate and down-regulated COX-2 expression in both cell lines.

**CONCLUSION:** Parecoxib potently inhibits cell proliferation and induces apoptosis in human pancreatic cancer cell lines BxPC-3 and AsPC-1 possibly by suppressing the expression of COX-2.

**Key Words:** Pancreatic cancer; Parecoxib; Proliferation; Apoptosis; COX-2

Li P, Liu JW, Xu YH, Zhu SP, Guo F, Dong X. Parecoxib inhibits cell proliferation and induces apoptosis in human pancreatic cancer cell lines BxPC-3 and AsPC-1. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2012; 20(8): 675-679

## 摘要

**目的:** 研究帕瑞昔布(parecoxib, PCB)对人胰腺癌细胞株BxPC-3和AsPC-1的增殖、凋亡及其可能的分子机制。

**方法:** BxPC-3、AsPC-1细胞用不同浓度PCB的培养液孵育后, 利用MTT法测定细胞活性, 计算IC<sub>50</sub>值, TUNEL法检测处理后细胞的凋亡情况, RT-PCR验证相关蛋白的变化表达。

**结果:** PCB对两种细胞生长呈时间和剂量依赖性抑制; PCB处理后BxPC-3、AsPC-1两种细胞IC<sub>50</sub>值为: 400.98 μmol/L ± 10.78 μmol/L、256.3 μmol/L ± 2.98 μmol/L; TUNEL法检测证明凋亡率增加; RT-PCR显示COX-2表达明显降低。

## 背景资料

胰腺癌已成为全球第4大死因, 5年生存率仅1%-4%。胰腺癌由于诊断困难、预后差、发生率高, 已成为一个世界性的健康问题。

**同行评议者**  
谭晓冬, 教授, 中国医科大学附属盛京医院

## ■ 研发前沿

药物治疗仍然是胰腺癌治疗的基础,而COX-2抑制剂的研究已经进入白热化的阶段,随着新型COX-2抑制剂的上市,COX-2抑制剂应用于肿瘤领域成为研究的重要课题。

**结论:** PCB可以抑制胰腺癌细胞增殖,并诱导其凋亡生长,其可能机制是通过抑制COX-2表达来实现的。

**关键词:** 胰腺癌; 帕瑞昔布; 增殖; 凋亡; COX-2

李鹏, 刘江伟, 许永华, 朱淑萍, 郭飞, 董翔. 帕瑞昔布对人胰腺癌细胞株BxPC-3、AsPC-1增殖凋亡的影响及其机制. 世界华人消化杂志 2012; 20(8): 675-679

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/675.asp>

## 0 引言

胰腺癌(pancreatic cancer, PC)是一种起源于胰腺导管上皮的恶性肿瘤,恶性程度高,侵袭和转移率高,早期诊断困难,进展期症状缺乏特异性,是消化系统治疗效果差的恶性肿瘤之一。胰腺癌已成为全球第4大死因<sup>[1]</sup>, 5年生存率仅1%-4%<sup>[2]</sup>。胰腺癌由于诊断困难、预后差、发生率高成为了一个世界性的健康问题<sup>[3,4]</sup>。胰腺癌明确诊断时已经为晚期,还可能发生远处转移。因此手术切除已经不能延长大多数患者的生存时间。药物治疗是胰腺癌治疗的基础,尽管开展很多大规模的药物治疗临床试验,但结果却令人沮丧。因此,寻找有效的口服药物成为治疗胰腺癌的必经之路。帕瑞昔布(parecoxib, PCB)是非甾体抗炎药的其中一个亚型,选择性COX-2抑制剂<sup>[5]</sup>。非甾体抗炎药物抑制COX-1、COX-2,仅有COX-2抑制剂发挥止痛、抗炎、解热的功效。PCB是一种COX-2抑制剂的新药,广泛应用于术后镇痛。流行病学研究显示非甾体抗炎药能够降低结直肠癌的风险<sup>[3,4]</sup>。非甾体抗炎药是花生四烯酸转化成前列腺素过程中的关键酶,COX有2种亚型: COX-1和COX-2,之前的报道显示胰腺癌中COX-2 mRNA和蛋白的表达增加,且COX-2高表达与肿瘤细胞凋亡相关<sup>[5-9]</sup>。自美国FDA将塞来昔布(celecoxib, CCB)的适用范围扩大,用于治疗家族性腺瘤病,COX-2抑制剂的应用范围较之前更为广阔,也成为了众多学者研究的焦点所在。COX-2抑制剂显示了强大的解热镇痛作用。而在大多数的研究中,COX-2抑制剂也不负重望地发挥了抗肿瘤作用。PCB的上市为患者术后镇痛带来了福音,但其在肿瘤中的作用仍未见相关文献报道。为此,PCB能否像CCB那样发挥抗肿瘤的作用,其抗肿瘤的可能机制是我们研究的着眼点。

## 1 材料和方法

1.1 材料 PCB购自辉瑞制药; 高糖DMEM培养

基和胎牛血清购自Gibco公司; 四甲基偶氮唑盐(MTT)及二甲基亚砜(DMSO)购自Amersco; Trizol及琼脂糖购自Invitrogen; RT-PCR试剂盒、Marker购自TaKaRa; TUNEL试剂盒购自Promega;  $\beta$ -actin、COX-2引物由上海生工合成; 所用仪器包括C1000核酸扩增仪、酶标仪、电泳槽(Bio-Rad, 美国)。

### 1.2 方法

1.2.1 细胞系和细胞培养: 在含有50 mL/L CO<sub>2</sub> 37 °C 95%湿度培养箱中培养。培养液为含100 mL/L胎牛血清和双抗(100 U/mL青霉素和100 U/mL链霉素)的高糖DMEM培养基。当细胞融合90%时,用0.25%胰酶消化传代,对数生长期的细胞为实验对象。

1.2.2 PCB药液配置: PCB用高糖DMEM稀释为不同浓度,针式过滤后,4 °C保存。

1.2.3 MTT法检测药物对细胞抑制率: 细胞接种于96孔板中( $5 \times 10^3$ /孔)。贴壁24 h后,分别加入含有不同浓度(0、10、40、160、320、640、1 000  $\mu$ mol/L)PCB孵育,分别加入MTT,再孵育4 h,弃去孔内液体,加入二甲基亚砜,在酶标仪490 nm波长处检测各孔吸光度(A)值,抑制率 = (1-实验组A/对照组)  $\times$  100%。

1.2.4 TUNEL法检测细胞凋亡: 细胞接种于24孔板,贴壁后分别用不同浓度(0、10、40、160、320、640、1000  $\mu$ mol/L)PCB孵育。48 h后弃去孔内培养液,按照TUNEL试剂盒方法操作, DAB显色后镜下观察并照相。

1.2.5 RT-PCR法检测COX-2表达: 细胞接种于6孔板中,贴壁后分别用1/2 PCB孵育48 h。收获细胞 $1 \times 10^6$ , TRIzol法提取RNA后反转录为cDNA,反转录体系为: 5  $\times$  PrimeScript Buffer 5  $\mu$ L, PrimeScript Enzyme Mix I 1.25  $\mu$ L, Oligo dT primer 1.25  $\mu$ L, Random 6 mers 5  $\mu$ L, RNA 500 ng, dd H<sub>2</sub>O(免酶)补齐至25  $\mu$ L。PCR反应体系: TaKaRa Ex Taq 0.125  $\mu$ L, 10  $\times$  Ex Taq Buffer 2.5  $\mu$ L, MgCl<sub>2</sub> 0.5  $\mu$ L, dNTP Mix 2  $\mu$ L, cDNA 1  $\mu$ L, Primer forward 1  $\mu$ L, Primer reverse 1  $\mu$ L, dd H<sub>2</sub>O补齐至25  $\mu$ L。COX-2引物(上游: 5'-TCCA-GATCACATTTGATTGACAG-3', 下游: 5'-TGTGGGAGGATACATCTCTCC-3');  $\beta$ -actin为内参(上游: 5'-GGACTTCGAGCAGGAGATGG-3', 下游: 5'-GCACCGTGTGGCGTAGAGG-3')。PCR产物扩增条件为: 94 °C 5 min; 94 °C 30 s, 60.5 °C 30 s, 72 °C 1 min, 35个循环; 72 °C 5 min。COX-2扩增产物440 bp,  $\beta$ -actin产物322 bp。电泳后凝胶成像仪紫外成像, Quantity One软件行灰度扫描。

## ■ 相关报道

刘江伟等学者研究发现,COX-2在胰腺癌中的表达率为74.5%,认为COX-2可能在胰腺癌的发生、发展及肿瘤的浸润和转移中其重要作用,COX-2的过表达可能是反映胰腺癌预后的有用指标。

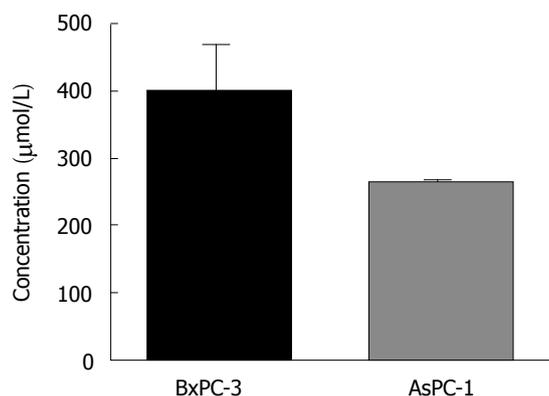


图1 帕瑞昔布对人胰腺癌细胞株IC50值.

表1 BxPC-3、AsPC-1 2种细胞RT-PCR灰度值比较

	实验组	对照组
BxPC-3细胞	0.161 ± 0.171 <sup>a</sup>	1.011 ± 0.774
AsPC-1细胞	0.171 ± 0.017 <sup>a</sup>	0.863 ± 0.036

<sup>a</sup> $P < 0.05$  vs 对照组.

**统计学处理** 所得数据采用SPSS17.0软件分析. 计量资料以 $\text{mean} \pm \text{SD}$ 表示, 多个样本比较采用单因素方差分析, 两样本均数采用 $t$ 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义.

## 2 结果

**2.1 PCB对细胞增殖的影响** 随着药物浓度升高和时间延长, 2种细胞活性均明显下降, 2种细胞对PCB的反应稍有不同, BxPC-3、AsPC-1的IC50分别为400.98  $\mu\text{mol/L}$ 、256.3  $\mu\text{mol/L}$ . 2种细胞IC50值如图1.

**2.2 TUNEL法检测PCB对细胞凋亡的影响** BxPC-3、AsPC-1细胞正常对照组、PCB干预BxPC-3、AsPC-1细胞组凋亡率分别为: 5.35%  $\pm$  0.92%、17.52%  $\pm$  0.75%、2.44%  $\pm$  0.57%、20.35%  $\pm$  0.78%, 干预组与对照组比较, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ , 图2).

**2.3 RT-PCR检测COX-2表达变化** COX-2的表达明显下调, 结果见图3, 表1.

## 3 讨论

PCB是选择性COX-2抑制剂, PCB在癌症领域的研究尚属空白, 其大部分的研究都立足于其极强的术后镇痛作用<sup>[10,11]</sup>, 而COX-2抑制剂CCB早已成为肿瘤界研究的热点. 很多学者<sup>[12-21]</sup>的研究证明COX-2抑制剂在肿瘤进展过程中发挥重要

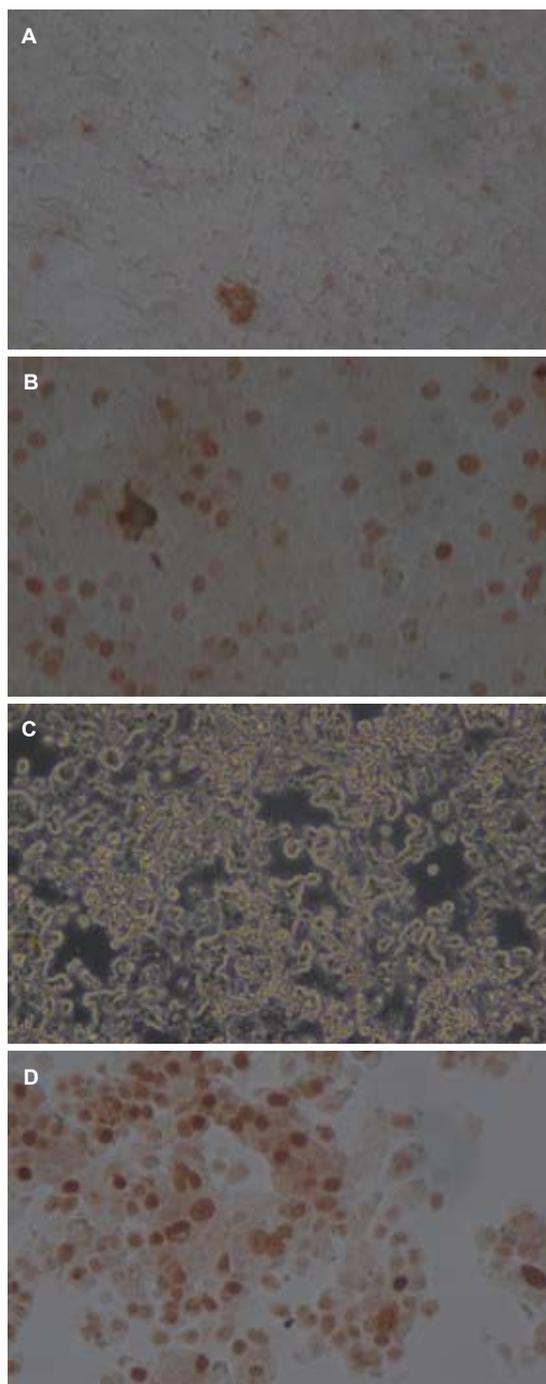


图2 TUNEL法检测帕瑞昔布对细胞凋亡的影响( $\times 200$ ). A: BxPC-3细胞对照组; B: BxPC-3细胞帕瑞昔布组; C: AsPC-1细胞正常组; D: AsPC-1细胞帕瑞昔布组.

作用, 其具体机制尚未阐明.

胰腺癌发病后病情隐匿, 早期诊断极为困难, 很多患者晚期时才有明显症状, 且很多药物耐药成为胰腺癌治疗的难点<sup>[22]</sup>. COX-2抑制剂有望被应用于抗肿瘤药物的范围内. 国内学者<sup>[23-28]</sup>研究发现, COX-2在胰腺癌中的表达率为74.5%, 认为COX-2可能在胰腺癌的发生、发展及肿瘤的浸润和转移中起重要作用, COX-2的高表达可

**■创新亮点**  
新型COX-2抑制剂帕瑞昔布在胰腺癌中的研究并探讨其可能机制是本文的一大亮点.

### 应用要点

本研究显示新型COX-2抑制剂可诱导胰腺癌凋亡, 抑制其增殖, 这为胰腺癌的药物治疗提供新思路及实验基础。

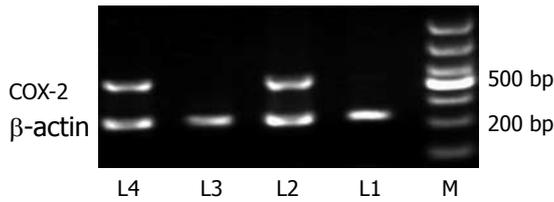


图3 帕瑞昔布对BxPC-3、AsPC-1细胞mRNA表达的影响。M: Marker; L1: BxPC-3 PCB; L2: BxPC-3正常对照组; L3: AsPC-1 PCB; L4: AsPC-1正常对照组。

能是反映胰腺癌预后的有用指标。COX-2在胰腺癌组织中高表达, 而在相邻正常组织中不表达, 其高表达均与胰腺癌细胞增殖、血管生成、抗凋亡有关。我们曾将CCB与顺铂联合作用于胰腺癌BxPC-3, 可明显抑制细胞的增殖, 诱导细胞凋亡并增加胰腺癌细胞对化疗药物的敏感性。本研究应用PCB处理胰腺癌细胞, 发现其增殖抑制, 凋亡增加。

COX-2的过度表达具有以下作用: (1)刺激肿瘤细胞的增殖; (2)抗凋亡; (3)促进肿瘤血管形成; (4)促浸润和转移。因此, COX-2抑制剂是抗胰腺癌很有潜力的药物之一。

本研究中PCB的应用验证了在体外细胞水平上抑制细胞增殖, 并诱导细胞凋亡, 这种作用的可能机制是抑制了COX-2的表达, 从而发挥重要作用。还有很多分子机制是在整个肿瘤发生发展过程中COX-2表达产生了重要影响。故此, 对于COX-2抑制剂在肿瘤中的重要作用还有待进一步从体内试验证明。

PCB不仅有强大的镇痛作用, 尤其是外科手术后的镇痛, 而且为胰腺癌的治疗提供了新希望, 本研究为PCB治疗胰腺癌提供理论依据。

### 4 参考文献

- Jemal A, Siegel R, Xu J, Ward E. Cancer statistics, 2010. *CA Cancer J Clin* 2010; 60: 277-300
- Hidalgo M. Pancreatic cancer. *N Engl J Med* 2010; 362: 1605-1617
- 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
- McKenna S, Eatock M. The medical management of pancreatic cancer: a review. *Oncologist* 2003; 8: 149-160
- Molina MA, Sitja-Arnau M, Lemoine MG, Frazier ML, Sinicrope FA. Increased cyclooxygenase-2 expression in human pancreatic carcinomas and cell lines: growth inhibition by nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Cancer Res* 1999; 59: 4356-4362
- Yip-Schneider MT, Barnard DS, Billings SD, Cheng L, Heilman DK, Lin A, Marshall SJ, Crowell PL, Marshall MS, Sweeney CJ. Cyclooxygenase-2 expression in human pancreatic adenocarcinomas.

- Carcinogenesis* 2000; 21: 139-146
- Franco L, Doria D, Bertazzoni E, Benini A, Bassi C. Increased expression of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 in pancreatic cancer. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 2004; 73: 51-58
- Crowell PL, Schmidt CM, Yip-Schneider MT, Savage JJ, Hertzler DA, Cummings WO. Cyclooxygenase-2 expression in hamster and human pancreatic neoplasia. *Neoplasia* 2006; 8: 437-445
- Nasir A, Lopez A, Boulware D, Malafa M, Coppola D. Correlation between COX-2 and APC expression in left versus right-sided human colon cancer. *Anticancer Res* 2011; 31: 2191-2195
- Gehling M, Arndt C, Eberhart LH, Koch T, Krüger T, Wulf H. Postoperative analgesia with parecoxib, acetaminophen, and the combination of both: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial in patients undergoing thyroid surgery. *Br J Anaesth* 2010; 104: 761-767
- Kyriakidis AV, Perysinakis I, Alexandris I, Athanasidou K, Papadopoulos Ch, Mpesikos I. Parecoxib sodium in the treatment of postoperative pain after Lichtenstein tension-free mesh inguinal hernia repair. *Hernia* 2011; 15: 59-64
- Gamradt SC, Feeley BT, Liu NQ, Roostaeian J, Lin YQ, Zhu LX, Sharma S, Dubinett SM, Lieberman JR. The effect of cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibition on human prostate cancer induced osteoblastic and osteolytic lesions in bone. *Anticancer Res* 2005; 25: 107-115
- Ferrandina G, Lauriola L, Zannoni GF, Fagotti A, Fanfani F, Legge F, Maggiano N, Gessi M, Mancuso S, Ranalletti FO, Scambia G. Increased cyclooxygenase-2 (COX-2) expression is associated with chemotherapy resistance and outcome in ovarian cancer patients. *Ann Oncol* 2002; 13: 1205-1211
- Kim YM, Park SY, Pyo H. Cyclooxygenase-2 (COX-2) negatively regulates expression of epidermal growth factor receptor and causes resistance to gefitinib in COX-2-overexpressing cancer cells. *Mol Cancer Res* 2009; 7: 1367-1377
- Liu Z, Wang X, Lu Y, Han S, Zhang F, Zhai H, Lei T, Liang J, Wang J, Wu K, Fan D. Expression of 15-PGDH is downregulated by COX-2 in gastric cancer. *Carcinogenesis* 2008; 29: 1219-1227
- Talar-Wojnarowska R, Gasiorowska A, Olakowski M, Lampe P, Smolarz B, Romanowicz-Makowska H, Malecka-Panas E. Role of cyclooxygenase-2 gene polymorphisms in pancreatic carcinogenesis. *World J Gastroenterol* 2011; 17: 4113-4117
- Zhao D, Xu D, Zhang X, Wang L, Tan W, Guo Y, Yu D, Li H, Zhao P, Lin D. Interaction of cyclooxygenase-2 variants and smoking in pancreatic cancer: a possible role of nucleophosmin. *Gastroenterology* 2009; 136: 1659-1668
- Zhang XM, Zhong R, Liu L, Wang Y, Yuan JX, Wang P, Sun C, Zhang Z, Song WG, Miao XP. Smoking and COX-2 functional polymorphisms interact to increase the risk of gastric cardia adenocarcinoma in Chinese population. *PLoS One* 2011; 6: e21894
- Bu X, Zhao C, Dai X. Involvement of COX-2/PGE(2) Pathway in the Upregulation of MMP-9 Expression in Pancreatic Cancer. *Gastroenterol Res Pract* 2011; 2011: 214269
- Özhan G, Lochan R, Leathart JB, Charnley R, Daly AK. Cyclooxygenase-2 polymorphisms and pancreatic cancer susceptibility. *Pancreas* 2011; 40: 1289-1294

- 21 Lashinger LM, Malone LM, McArthur MJ, Goldberg JA, Daniels EA, Pavone A, Colby JK, Smith NC, Perkins SN, Fischer SM, Hursting SD. Genetic reduction of insulin-like growth factor-1 mimics the anticancer effects of calorie restriction on cyclooxygenase-2-driven pancreatic neoplasia. *Cancer Prev Res (Phila)* 2011; 4: 1030-1040
- 22 Wang Z, Ahmad A, Li Y, Azmi AS, Miele L, Sarkar FH. Targeting notch to eradicate pancreatic cancer stem cells for cancer therapy. *Anticancer Res* 2011; 31: 1105-1113
- 23 刘伟, 李开宗, 窦科峰. COX-2在胰腺癌组织中的表达及其与p53的相关性研究. *世界华人消化杂志* 2003; 11: 229-232
- 24 刘伟, 李开宗, 窦科峰. 环氧酶-2和血管内皮生长因子在胰腺癌组织中的表达及其相关性研究. *中国普外基础与临床杂志* 2003; 10: 539-541
- 25 刘伟, 李开宗, 窦科峰, 马福成, 王映梅. 胰腺癌组织中survivin和COX-2表达的相关性. *第四军医大学学报* 2004; 25: 635-636
- 26 刘伟, 李开宗, 窦科峰, 宋振顺, 苏明权, 于文彬. COX-2抑制剂联合顺铂对胰腺癌细胞增生和凋亡的影响. *世界华人消化杂志* 2004; 12: 1139-1143
- 27 刘伟, 张永久, 李开宗, 窦科峰, 许永华, 张东, 闫兵. COX-2抑制剂联合survivin反义寡核苷酸抗胰腺癌BxPC-3细胞的效应. *世界华人消化杂志* 2007; 15: 3178-3183
- 28 贾福鑫, 刘伟, 张东, 李鹏, 李建英, 冯玉玲, 冯德元. MMP-9和COX-2蛋白的表达对胰腺癌预后的影响. *中华临床医师杂志(电子版)* 2011; 5: 1917-1922

■同行评价  
本研究立意有一定新意, 实验设计合理, 数据详实准确, 论文逻辑性较强, 研究结果有助于进一步明确胰腺癌细胞增殖及凋亡的调控机制, 具有较好的科学价值。

编辑 曹丽鸥 电编 鲁亚静

ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) CN 14-1260/R 2012年版权归世界华人消化杂志

## • 消息 •

### 《世界华人消化杂志》正文要求

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

# PRL-3基因对结直肠癌细胞增殖能力的影响

柳玉红, 温寿青, 陈蕾, 邱立, 汪春福, 曹亚平, 邹桂华

## ■背景资料

PRL-3属于蛋白质酪氨酸磷酸酶家族成员, 与大肠癌的肝转移关系密切。PRL-3基因是大肠癌转移治疗的重要潜在靶点, 其参与的信号通路还不清楚。

柳玉红, 温寿青, 陈蕾, 邱立, 汪春福, 曹亚平, 邹桂华, 深圳市宝安区人民医院病理科 广东省深圳市 518101

柳玉红, 博士, 主治医师, 主要从事肿瘤病理研究。

深圳市宝安区科学技术局社会公益科研基金资助项目, No. 2009316

国家自然科学基金资助项目, No. 81001110

作者贡献分布: 此课题由柳玉红设计; 研究过程由柳玉红、温寿青、陈蕾、邱立及汪春福操作完成; 研究所用新试剂及分析工具由曹亚平提供; 数据分析由邹桂华完成; 本论文写作由柳玉红完成。

通讯作者: 柳玉红, 主治医师, 518101, 广东省深圳市, 深圳市宝安区人民医院病理科. liuyuhongyantai@163.com

收稿日期: 2011-11-02 修回日期: 2012-01-15

接受日期: 2012-03-10 在线出版日期: 2012-03-18

## Role of the PRL-3 gene in the proliferation of human colon cancer SW480 cells

Yu-Hong Liu, Shou-Qing Wen, Lei Chen, Li Qiu, Chun-Fu Wang, Ya-Ping Cao, Gui-Hua Zou

Yu-Hong Liu, Shou-Qing Wen, Lei Chen, Li Qiu, Chun-Fu Wang, Ya-Ping Cao, Gui-Hua Zou, Department of Pathology, Baoan People's Hospital, Shenzhen 518101, Guangdong Province, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 81001110

Correspondence to: Yu-Hong Liu, Attending Physician, Department of Pathology, Baoan People's Hospital, Shenzhen 518101, Guangdong Province, China. liuyuhongyantai@163.com

Received: 2011-11-02 Revised: 2012-01-15

Accepted: 2012-03-10 Published online: 2012-03-18

## Abstract

**AIM:** To establish human colon cancer SW480 cell lines in which the phosphatase of regenerating liver-3 (PRL-3) gene is stably overexpressed or knocked down to study the role of this gene in regulating the biological behaviors of SW480 cells.

**METHODS:** The impact of PRL-3 overexpression and knockdown on cell proliferation was assessed by MTT assay, colony formation assay and flow cytometry *in vitro*.

**RESULTS:** Knockdown of the PRL gene significantly reduced the proliferation of SW480 cells when compared to control cells. In addition, knockdown of the PRL gene significantly im-

paired the ability of SW480 cells to form colonies compared to control cells.

**CONCLUSION:** The PRL-3 gene plays an important role in the proliferation of human colon cancer SW480 cells.

**Key Words:** Colon cancer; PRL-3 gene; Proliferation

Liu YH, Wen SQ, Chen L, Qiu L, Wang CF, Cao YP, Zou GH. Role of the PRL-3 gene in the proliferation of human colon cancer SW480 cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2012; 20(8): 680-684

## 摘要

**目的:** 探讨PRL-3的过表达或敲低对结直肠癌细胞增殖能力的影响。

**方法:** 利用MTT法、平板克隆形成实验检测PRL-3对细胞体外增殖的影响; 应用流式细胞术检测PRL-3对细胞周期的影响。

**结果:** 应用MTT法, 检测PRL-3对SW480/EGFP、SW480-EGFP-PRL-3、SW480/EGFP/Mock及SW480-PRL-3-KD1细胞体外增殖能力的影响, 经析因方差分析, 4组差异具有显著性( $F = 23.463, P = 0.000$ ); 不同时间点对细胞体外增殖的影响差异具有显著性( $F = 71.515, P = 0.000$ ); 各组细胞与各时间组两因素交互效应显著( $F = 2.128, P = 0.008$ ); 除第1天外, 其他各时间点细胞组间的细胞增殖差异具有显著性。经LSD法多重比较, 结果表明, 与SW480/EGFP/Mock和SW480/EGFP细胞相比, SW480-EGFP-PRL-3细胞的增殖速度加快, 而SW480-PRL-3-KD1细胞的增殖速度减慢。平板克隆形成实验显示SW480-EGFP-PRL-3细胞克隆形成能力明显增强, 而SW480-PRL-3-KD1细胞克隆形成能力显著下降, 差异具有显著的统计学意义( $F = 44.411, P = 0.000$ )。

**结论:** PRL-3基因可促进结直肠癌细胞的增殖。

**关键词:** 结直肠癌; PRL-3; 肿瘤增殖

柳玉红, 温寿青, 陈蕾, 邱立, 汪春福, 曹亚平, 邹桂华. PRL-3基因对结直肠癌细胞增殖能力的影响. *世界华人消化杂志* 2012;

## ■同行评议者

郝立强, 副教授, 上海长海医院普外二科

20(8): 680-684

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/680.asp>

## 0 引言

PRL-3(phosphatase of regenerating liver-3, PRL-3)是现已发现与结直肠癌转移相关的少数特异性表达分子之一<sup>[1,2]</sup>, 研究发现, 将PRL-3转染到上皮细胞, 可引起细胞形态发生改变, 且形态改变与细胞运动能力相关<sup>[3]</sup>; 另外, PRL-3可调节肿瘤细胞与细胞外基质的粘附<sup>[3]</sup>. Fagerli等<sup>[4]</sup>将PRL-3特异性小干扰RNA转染到多发性骨髓瘤细胞系INA-6中, 发现下调细胞PRL-3的表达降低了细胞的迁移能力. 我们已经建立了PRL-3基因过表达<sup>[5]</sup>及基因敲低<sup>[6]</sup>2种细胞模型, 利用这2种细胞模型, 我们从正反两方面来研究PRL-3对结直肠癌细胞的增殖能力的影响.

## 1 材料和方法

1.1 材料 胎牛血清、DMEM细胞干粉培养基购自美国HyClone公司; MTT购自Sigma公司; Transwell Chamber购自Chemicon公司.

### 1.2 方法

1.2.1 噻唑蓝(MTT)比色试验检测细胞增殖能力: 以每孔 $1 \times 10^3$ 个细胞接种于96孔培养板中, 每孔体积200  $\mu$ L, 每组4孔, 同时设空白对照(仅加培养液), 置CO<sub>2</sub>培养箱中孵育, 分别于1 d, 2 d, 3 d, 4 d, 5 d, 6 d, 7 d取出, 每孔加入5 g/L的四氮唑蓝盐(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, MTT)20  $\mu$ L, 37  $^{\circ}$ C继续孵育4 h, 终止培养, 小心吸弃孔内培养上清液, 加入二甲亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)150  $\mu$ L, 室温孵育10 min, 振荡10 min, 使结晶物充分溶解, 以空白对照孔调零, 酶标仪上490 nm测定各孔吸光度(A)值, 以相对应A比值表示细胞增殖能力大小. 各组取4孔平均值, 绘制增殖曲线.

1.2.2 平板克隆形成实验: 生长状态良好的培养细胞, 用D-Hanks液洗3次, 0.25%胰酶消化, 细胞悬液反复吹打, 使细胞充分分散, 接种100个细胞到6孔培养板中, 每种细胞接种3孔, 十字形轻轻晃动培养板, 使细胞分散均匀, 37  $^{\circ}$ C、50 mL/L CO<sub>2</sub>培养箱中培养2 wk. 出现肉眼可见的细胞克隆时, 终止培养, 弃去培养液, 用PBS液洗2次, 空气干燥; 甲醇固定15 min, 弃甲醇后空气干燥; 用Giemsa应用液染色15 min, 流水缓慢洗去染液, 空气干燥; 在显微镜下对形成的克隆计数( $\geq 50$ 个细胞为1个克隆), 平板克隆形成率 = 形成克隆

数/接种细胞数 $\times 100\%$ , 实验重复3次.

1.2.3 利用流式细胞术检测细胞生长周期: 生长状态良好的培养细胞, 用D-Hanks液洗3次, 0.25%胰酶消化, 细胞悬液离心, PBS洗3次, 用750 mL/L乙醇固定, 标本送中山医中心实验室检测.

**统计学处理** 用SPSS 13.0软件进行数据分析, 细胞体外生长实验采用析因方差检验, 细胞生长周期、平板克隆形成实验、细胞粘附实验及运动小室实验采用One-Way ANOVA检验.

## 2 结果

2.1 PRL-3与结直肠癌细胞增殖的关系 经析因方差分析, 4组差异具有显著性( $F = 23.463, P = 0.000$ ); 不同时间点对细胞体外增殖的影响差异具有显著性( $F = 71.515, P = 0.000$ ); 各组细胞与各时间组两因素交互效应显著( $F = 2.128, P = 0.008$ ); 除第1天外, 其他各时间点细胞组间的细胞增殖差异具有显著性(表1, 图1). 经LSD法多重比较, 结果表明, 与SW480/EGFP/Mock和SW480/EGFP细胞相比, SW480-EGFP-PRL-3细胞的增殖速度加快, 而SW480-PRL-3-KD1细胞的增殖速度减慢. 平板克隆形成实验, 经One-Way ANOVA检验, 3组差异具有显著性( $F = 44.411, P = 0.000$ ); 经LSD多重比较显示SW480-PRL-3-KD1细胞的增殖速度较其他组缓慢, 差异有统计学意义( $51.667\% \pm 3.786\% \text{ vs } 64.000\% \pm 3.606\%, 76.667\% \pm 2.082\%, F = 44.411, P = 0.000$ , 图2).

2.2 对细胞周期的影响 SW480/EGFP、SW480-EGFP-PRL-3、SW480/EGFP/Mock和SW480-PRL-3-KD1 4种细胞的S期细胞平均比例分别为 $17.633\% \pm 0.351\%$ 、 $27.467\% \pm 0.503\%$ 、 $18.600\% \pm 0.400\%$ 和 $14.067\% \pm 0.306\%$ , 统计分析结果显示4种细胞的S期差异有统计学意义( $F = 617.59, P = 0.000$ , 图3), 同时, 4种细胞的流式分析结果中均未见到细胞凋亡峰的存在, 表明PRL-3基因的表达变化并不导致细胞凋亡的出现.

## 3 讨论

PRL-3又称为PTP4A3, 属于蛋白质酪氨酸磷酸酶(protein tyrosine phosphatase, PTP)家族成员, 家族中3个成员PRL-1、PRL-2及PRL-3蛋白质分子量大约为20 kDa, 具有超过75%的同源性, 在功能上具有相似性<sup>[7-9]</sup>. 本实验对PRL-3基因过

### ■应用要点

PRL-3基因可促进结直肠癌细胞的增殖, 为进一步揭示PRL-3与结直肠癌的关系提供新的实验依据.

## ■ 相关报道

最新研究报道 PRL-3 通过上调 MMP-7 促进结肠癌细胞侵袭与转移。

表 1 SW480/EGFP、SW480-EGFP-PRL-3、SW480/EGFP/Mock 和 SW480-PRL-3-KD1 cells 4 组细胞体外 MTT 法增殖能力比较

	SW480/EGFP cells	SW480-EGFP-PRL-3 cells	SW480-PRL-3-KD1 cells	SW480/EGFP/Mock cells	合计	F 值	P 值
第1天	0.294 ± 0.097	0.261 ± 0.147	0.353 ± 0.125	0.245 ± 0.128	0.288 ± 0.125	0.861	0.478
第2天	0.570 ± 0.045	0.628 ± 0.050	0.4853 ± 0.061	0.417 ± 0.238	0.5250 ± 0.144	3.217	0.045
第3天	0.623 ± 0.075	0.704 ± 0.090	0.480 ± 0.115	0.6173 ± 0.121	0.606 ± 0.126	4.966	0.010
第4天	0.636 ± 0.059	0.844 ± 0.165	0.510 ± 0.147	0.618 ± 0.107	0.652 ± 0.170	7.326	0.002
第5天	0.714 ± 0.216	0.944 ± 0.158	0.637 ± 0.105	0.773 ± .172	0.767 ± 0.194	3.633	0.031
第6天	0.957 ± 0.098	1.274 ± 0.201	0.797 ± 0.131	0.966 ± 0.268	0.998 ± 0.247	7.639	0.001
第7天	1.020 ± 0.223	1.245 ± 0.244	0.779 ± 0.045	1.004 ± 0.185	1.012 ± 0.245	5.962	0.004
合计	0.6875 ± 0.261	0.843 ± 0.366	0.574 ± 0.181	0.663 ± 0.310	0.696 ± 0.302	23.463	0.000 <sup>1</sup>
F 值	19.930	28.980	13.808	13.697	71.515	2.128	
P 值	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000 <sup>1</sup>	0.008 <sup>2</sup>	

<sup>1</sup>主效应的 F 统计量和 P 值; <sup>2</sup>交互效应的 F 统计量和 P 值。

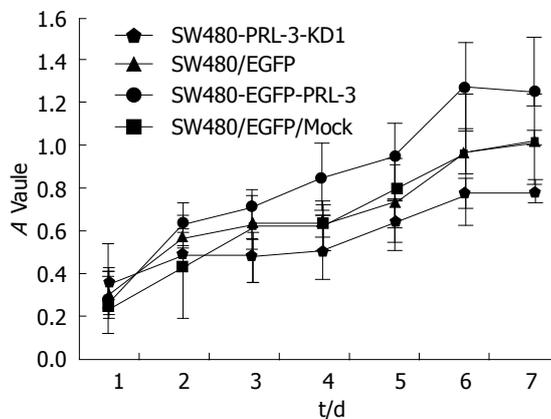


图 1 胰 SW480/EGFP、SW480-EGFP-PRL-3、SW480/EGFP/Mock 及 SW480-PRL-3-KD1 细胞的体外生长曲线。

表达与敲低的 SW480 细胞体外生物学特性进行了对比实验研究, 从正反 2 个方面确定 PRL-3 对结直肠癌细胞增殖等生物学特性的影响, 希望能为进一步揭示 PRL-3 与结直肠癌的关系提供新的实验依据, 并为探讨结直肠癌侵袭转移的具体机制提供新的思路。

肿瘤的主要特征是细胞的无限增殖能力. 肿瘤增殖标签 (proliferation signature) 概念的提出, 最初是在分析乳腺癌基因表达谱时发现的肿瘤组织中存在一类与肿瘤增殖率高度相关的基因群, 将这一类基因群命名为增殖标签<sup>[10]</sup>. 虽然增殖标签在肿瘤发病机制中的作用及增殖标签作为肿瘤诊断和预后的标志物 (biomarker) 可行性仍待进一步研究, 但肿瘤生长动力学的大量研究已经显示, 肿瘤细胞的增殖能力和肿瘤的浸润、转移及复发等生物学行为密切相关, 也与患者的预后显著相关<sup>[11,12]</sup>. Rhodes 等<sup>[13]</sup>利用荟萃分析 (meta-analysis) 的方法对 40 个已公布的肿瘤

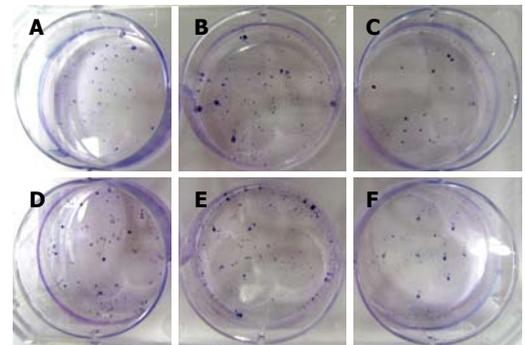
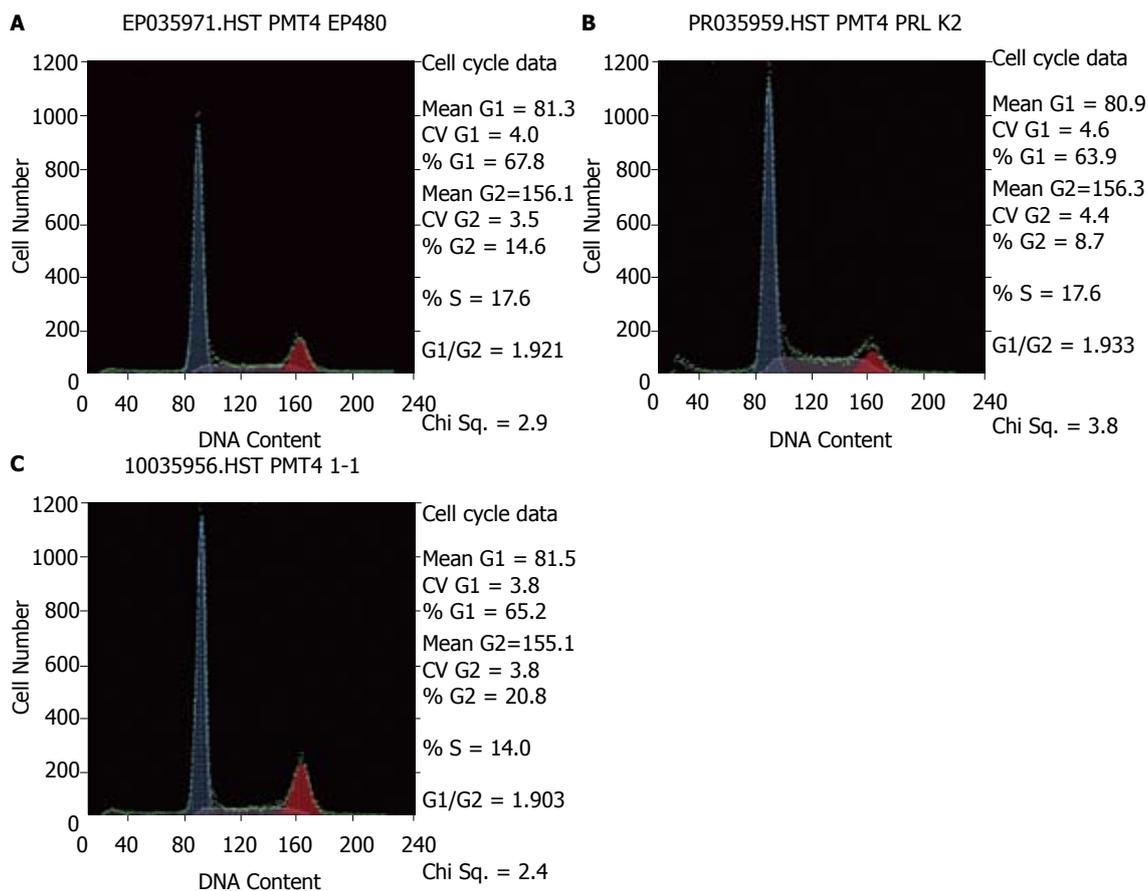


图 2 细胞的平板克隆形成实验. A, D: SW480/EGFP; B, E: SW480-EGFP-PRL-3; C, F: SW480-PRL-3-KD1.

芯片表达谱数据库 (包含 3 700 个肿瘤样本) 进行数据分析, 结果发现, 这群增殖标签基因高表达于肿瘤组织中, 并且随着肿瘤恶性程度的增加而表达上调. 由于增殖相关基因的鉴定简便, 展示了广阔的临床应用前景, 如 Ki-67, 核增殖抗原 (proliferating cell nuclear antigen, PCNA) 已经广泛应用于肿瘤的辅助诊断中. 因此, 如果能明确鉴定更多的肿瘤相关增殖基因, 并结合基因芯片技术, 建立增殖标签芯片, 不仅有助于更好地理解肿瘤发生的分子机制, 而且也可以作为临床上肿瘤诊断及预后判断的重要工具。

在本研究中, 我们观察到 PRL-3 基因与结直肠癌细胞的增殖相关. 我们以真核表达载体在 SW480 细胞中稳定过表达 PRL-3 基因和慢病毒干扰载体稳定沉默结直肠癌细胞株 PRL-3 的表达, 通过 MTT 法, 我们检测了 PRL-3 对结直肠癌细胞增殖的影响, 通过 7 d 的连续观察及比较, 我们发现 PRL-3 沉默明显降低了结直肠癌细胞的增殖能力. 平板克隆形成实验结果也显示 PRL-3 基因敲低的细胞其生存活力显著下降. 流式细胞



**■创新盘点**  
本研究利用已经建立起来的PRL-3基因过表达及基因敲低的2种细胞模型, 从正反两方面来研究PRL-3对结直肠癌细胞增殖能力的影响。

图 3 流式细胞术检测PRL-3转染与干扰前后细胞周期的变化. A: SW480/EGFP; B: SW480-EGFP-PRL-3; C: SW480-PRL-3-KD1.

术检测细胞周期发现PRL-3基因沉默的细胞其S期比例明显减少, 表明其细胞DNA合成减少. 这些结果均说明PRL-3表达水平沉默后, 能显著性地抑制肿瘤细胞体外生长, 这与其他小组的研究也是一致的<sup>[14,15]</sup>. 结果表明PRL-3基因可促进结直肠癌细胞的增殖.

4 参考文献

- 1 Kozlov G, Cheng J, Ziomek E, Banville D, Gehring K, Ekiel I. Structural insights into molecular function of the metastasis-associated phosphatase PRL-3. *J Biol Chem* 2004; 279: 11882-11889
- 2 Kim KA, Song JS, Jee J, Sheen MR, Lee C, Lee TG, Ro S, Cho JM, Lee W, Yamazaki T, Jeon YH, Cheong C. Structure of human PRL-3, the phosphatase associated with cancer metastasis. *FEBS Lett* 2004; 565: 181-187
- 3 Li Z, Zhan W, Wang Z, Zhu B, He Y, Peng J, Cai S, Ma J. Inhibition of PRL-3 gene expression in gastric cancer cell line SGC7901 via microRNA suppressed reduces peritoneal metastasis. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 348: 229-237
- 4 Saha S, Bardelli A, Buckhaults P, Velculescu VE, Rago C, St Croix B, Romans KE, Choti MA, Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B. A phosphatase associated with metastasis of colorectal cancer. *Science* 2001; 294: 1343-1346
- 5 柳玉红, 李建国, 周军, 丁彦青. PRL-3真核绿色荧光蛋

- 白表达载体的构建及其在结肠癌SW480细胞中的表达. *世界华人消化杂志* 2008; 16: 602-606
- 6 Liu YH, Li JM, Zhou J, Ding YQ. [Construction of a lentiviral vector for RNA interference of PRL-3 gene and its stable expression in SW480 cells]. *Nanfang Yike Daxue Xuebao* 2008; 28: 509-512
- 7 Diamond RH, Cressman DE, Laz TM, Abrams CS, Taub R. PRL-1, a unique nuclear protein tyrosine phosphatase, affects cell growth. *Mol Cell Biol* 1994; 14: 3752-3762
- 8 Cates CA, Michael RL, Stayrook KR, Harvey KA, Burke YD, Randall SK, Crowell PL, Crowell DN. Prenylation of oncogenic human PTP(CAAX) protein tyrosine phosphatases. *Cancer Lett* 1996; 110: 49-55
- 9 Zeng Q, Si X, Horstmann H, Xu Y, Hong W, Pallen CJ. Prenylation-dependent association of protein-tyrosine phosphatases PRL-1, -2, and -3 with the plasma membrane and the early endosome. *J Biol Chem* 2000; 275: 21444-21452
- 10 Bardelli A, Saha S, Sager JA, Romans KE, Xin B, Markowitz SD, Lengauer C, Velculescu VE, Kinzler KW, Vogelstein B. PRL-3 expression in metastatic cancers. *Clin Cancer Res* 2003; 9: 5607-5615
- 11 Zeng Q, Dong JM, Guo K, Li J, Tan HX, Koh V, Pallen CJ, Manser E, Hong W. PRL-3 and PRL-1 promote cell migration, invasion, and metastasis. *Cancer Res* 2003; 63: 2716-2722
- 12 Wu X, Zeng H, Zhang X, Zhao Y, Sha H, Ge X, Zhang M, Gao X, Xu Q. Phosphatase of regenerating liver-3 promotes motility and metastasis of mouse melanoma cells. *Am J Pathol* 2004; 164:

### ■同行评价

本文立题明确, 实验方法得当, 结果可靠, 初步揭示了PRL-3基因具有促进细胞增殖的功能。

- 2039-2054
- 13 Guo K, Li J, Tang JP, Koh V, Gan BQ, Zeng Q. Catalytic domain of PRL-3 plays an essential role in tumor metastasis: formation of PRL-3 tumors inside the blood vessels. *Cancer Biol Ther* 2004; 3: 945-951
- 14 Lai W, Chen S, Wu H, Guan Y, Liu L, Zeng Y, Zhao H, Jiang J, Chu Z. PRL-3 promotes the proliferation of LoVo cells via the upregulation of KCNN4 channels. *Oncol Rep* 2011; 26: 909-917
- 15 Wang Z, Cai SR, He YL, Zhan WH, Chen CQ, Cui J, Wu WH, Wu H, Song W, Zhang CH, Peng JJ, Huang XH. High expression of PRL-3 can promote growth of gastric cancer and exhibits a poor prognostic impact on patients. *Ann Surg Oncol* 2009; 16: 208-219

编辑 曹丽鸥 电编 鲁亚静

ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) CN 14-1260/R 2012年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

## 2011年度《世界华人消化杂志》发文情况

**本刊讯** 2011-01-01/2011-12-31,《世界华人消化杂志》共收到稿件1576篇,退稿932篇,退稿率59.13%,发表文章644篇,所有文章均经过编委专家同行评议。其中,发表述评35篇(5.43%),基础研究135篇(20.96%),临床研究71篇(11.02%),焦点论坛17篇(2.64%),文献综述111篇(17.24%),研究快报58篇(9.01%),临床经验189篇(29.35%),病例报告24篇(3.73%);文章作者分布遍及全国各地,绝大多数来自高等院校及附属医院。在此,特别感谢为《世界华人消化杂志》进行同行评议的各位编委专家,你们的同行评价对文章发表质量做出了重要贡献;也希望各位编委踊跃为《世界华人消化杂志》继续撰写高质量的评论性文章,为科学知识的传播做出贡献!(编辑部主任:李军亮 2012-01-01)

# 原发性胆汁反流性胃炎与胃食管反流病的关系

刘芳, 姚萍

刘芳, 姚萍, 新疆医科大学第一附属医院消化科 新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市 830054

刘芳, 硕士, 主要从事消化系统疾病的研究。

作者贡献分布: 此课题由姚萍设计; 研究过程由姚萍与刘芳操作完成; 数据分析、论文写作由刘芳完成; 论文修改由姚萍完成。

通讯作者: 姚萍, 副教授, 830054, 新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市鲤鱼山路137号, 新疆医科大学第一附属医院消化科。

pingyaozh@sina.com

电话: 0991-4362608

收稿日期: 2012-01-30 修回日期: 2012-02-18

接受日期: 2012-03-06 在线出版日期: 2012-03-18

## Relationship between primary bile reflux gastritis and gastroesophageal reflux disease

Fang Liu, Ping Yao

Fang Liu, Ping Yao, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, 137 South Liyushan Road, Urumqi 830054, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China

Correspondence to: Ping Yao, Associate Professor, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, 137 South Liyushan Road, Urumqi 830054, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China. pingyaozh@sina.com

Received: 2012-01-30 Revised: 2012-02-18

Accepted: 2012-03-06 Published online: 2012-03-18

### Abstract

**AIM:** To investigate the relationship between primary bile reflux gastritis (PBRG) and gastroesophageal reflux disease (GERD).

**METHODS:** A total of 1 060 patients diagnosed with PBRG comprised the observation group, and 1 060 people without PBRG were used as controls. The incidence rate of GERD in the two groups was compared. The patients with PBRG and GERD were divided into mild group, moderate group, severe group based on the severity of PBRG. The degree of esophageal mucosal injury and the distribution of GERD symptoms were then compared.

**RESULTS:** The incidence rate of GERD in the PBRG group was higher than that in the control group (24.5% vs 9.8%,  $P < 0.05$ ). The incidence rate of esophageal mucosal injury increased with

the aggravation of PBRG. The degree of PBRG showed no significant association with the distribution of GERD symptoms.

**CONCLUSION:** PBRG has a positive correlation with the formation of reflux esophagitis (RE), and PBRG does not play a major role in producing typical GERD symptoms.

**Key Words:** Primary bile reflux gastritis; Gastroesophageal reflux disease; GERD symptoms

Liu F, Yao P. Relationship between primary bile gastritis and gastroesophageal reflux disease. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2012; 20(8): 685-689

### 摘要

**目的:** 探讨原发性胆汁反流性胃炎(primary bile reflux gastritis, PBRG)与胃食管反流病(gastroesophageal reflux disease, GERD)之间的相关性。

**方法:** 选取我院确诊为PBRG的患者1 060例为观察组, 无痛胃镜下未查见有PBRG的体检者1 060例为对照组, 比较两组GERD的发生率; 依据内镜下PBRG的诊断标准, 将260例PBRG伴有GERD的患者分为轻度、中度及重度3组, 对比各组食管黏膜损伤的程度以及GERD症状积分的分布。

**结果:** PBRG组GERD的发生率高于对照组(24.5% vs 9.8%,  $P < 0.05$ )。食管黏膜损伤程度加深的发生率随着PBRG程度的加重而增加。PBRG的程度与GERD症状分级无相关性。

**结论:** PBRG与反流性食管炎(reflux esophagitis, RE)形成存在正性相关, PBRG并非是引起GERD症状的主要原因。

**关键词:** 原发性胆汁反流性胃炎; 胃食管反流病; 胃食管反流症状

刘芳, 姚萍. 原发性胆汁反流性胃炎与胃食管反流病的关系. *世界华人消化杂志* 2012; 20(8): 685-689

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/685.asp>

### ■背景资料

长期以来胃酸一直被认为是引起胃食管反流病(GERD)患者食管损伤的主要因素, 随着对动物实验模型的观察研究, 食管内24 h PH监测及胆红素监测的应用, 胆汁反流在GERD发生发展中的作用日益受到重视。

### ■同行评议者

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。

## ■ 研发前沿

PBRG患者的胆汁反流究竟是否是食管黏膜损伤发生的一个独立危险因素尚需系统全面的基础研究。症状只是主观感觉,其发生有复杂的机制且与个体敏感性有关,这可能需要转向大规模的基础研究。

## 0 引言

胆汁反流又称为十二指肠胃反流(duodenogastric reflux, DGR),是机体普遍存在的一种生理现象,而过多的胆汁反流可致胃黏膜损伤,称之为胆汁反流性胃炎(bile reflux gastritis, BRG)<sup>[1]</sup>,其中发生于非手术胃的称为原发性胆汁反流性胃炎(primary bile reflux gastritis, PBRG)。胃食管反流病(gastroesophageal reflux disease, GERD)<sup>[2]</sup>是基于胃或十二指肠内容物反流入食管,引起不适症状和/或并发症的一种疾病,分为非糜烂性反流病(nonerosive reflux disease, NERD)、反流性食管炎(reflux esophagitis, RE)、巴雷特食管(Barrett's esophagus, BE)3种类型。长期以来胃酸一直被认为是引起GERD患者食管损伤的主要因素,随着对动物实验模型的研究,食管内24 h pH监测及胆红素监测的应用,胆汁反流在GERD发生发展中的作用日益受到重视。原发性胆汁反流性胃炎与胃食管反流病之间的相关性为目前的研究焦点之一,我们通过对大样本资料的统计分析,以探讨二者之间的相关性,为临床治疗原发性胆汁反流性胃炎及胃食管反流病时药物的选择及抗反流手术的应用提供一定的参考依据。

## 1 材料和方法

1.1 材料 选取2010-09/2012-02我院确诊为PBRG的患者1 060例为观察组,其中男540例,女520例,平均年龄44.8岁±17.9岁,无痛胃镜下未查见有PBRG的体检者1 060例为对照组,其中男530例,女530例,平均年龄44.2岁±17.9岁。两组研究对象的性别、年龄、体质量等一般资料无显著差异。以上入选者均要求无消化性溃疡,无上消化道手术史,无肝脏及胰腺疾病,无糖尿病、腹部占位等可能导致腹压增高的疾病,孕妇及哺乳期妇女不纳入选择范围。

### 1.2 方法

1.2.1 纳入标准及分级标准: PBRG的内镜下诊断标准<sup>[3]</sup>: (1)胃黏膜尤其是胃窦部黏膜有水肿、出血或脆性增加; (2)胃镜插至胃内静止1 min后仍可见含有胆汁的十二指肠液呈泡沫状或水流状从幽门口反流入胃; (3)胃黏液湖有黄色或绿色胆汁染色; (4)胃黏膜有胆汁染色; (5)无胃肠道手术史,其中包括胆囊切除术,无消化性溃疡、胃息肉、胃癌等疾病。胆汁反流分3度,轻度:少量黄色泡沫从幽门口涌出或/和黏液湖呈淡黄色;中度:黄色泡沫从幽门口涌出或/和黏液湖呈黄

绿色;重度:黄色从幽门口频繁涌出或/和持续性喷射出或胃内布满黄绿色黏液物。

GERD的内镜下诊断标准: (1)虽然内镜检查无反流性食管炎,但有典型的、不少于3 mo的反流及反流引起的刺激症状(如反食、反酸、嗝气和烧心),排除继发因素可诊断为NERD<sup>[4,5]</sup>; (2)内镜下有反流性食管炎的表现,并按照第10届洛杉矶国际消化会议提出的内镜分级标准<sup>[6]</sup>: A级为病灶局限于食管黏膜皱襞,其长径<0.5 cm; B级为病灶局限于食管黏膜皱襞,互相不融合,但其长径>0.5 cm; C级病灶在黏膜顶部有融合,但不超过75%食管壁环周; D级为病灶互相融合,且病变累及大于75%食管壁环周。

GERD的症状分级标准采用王其璋《胃食管反流病学》中的评分标准: (1)根据烧心、反酸、吞咽痛、吞咽困难这几个GERD的常见症状的发作频率, <1次/mo: 1分; <1次/wk: 2分; <1次/d: 3分; 每日均有发作: 4分; (2)病程长短, <6 mo: 1分; <6-24 mo: 2分; <24-60 mo: 3分; >60 mo: 4分; (3)患者自觉的严重程度,轻度厌烦: 1分; 影响生活兴趣: 2分; 干扰正常生活: 3分; 难以忍受: 4分。分别计分,总分=(发作频率+病程)×严重程度,2-7分为轻度、8-15分为中度、16-23分为重度、24-32分为极重度。

1.2.2 样本处理: 比较PBRG组与对照组两组GERD的发生率; 依据内镜下PBRG的诊断标准,将260例PBRG伴有GERD的患者分为轻度PBRG、中度PBRG及重度PBRG 3组,对比各组食管黏膜损伤的程度以及GERD症状积分的分布。

统计学处理 应用SPASS17.0统计学软件进行分析。

## 2 结果

2.1 PBRG组与对照组GERD发生情况 PBRG组GERD的发生率高于对照组GERD的发生率(表1)。

2.2 不同程度PBRG的食管黏膜损伤情况 随着PBRG程度的加重,食管黏膜严重损害的发生率也随之增加(表2, 3)。

2.3 PBRG与GERD症状的相关性 PBRG的严重程度与GERD症状分级无相关性(表4)。

## 3 讨论

食管有3道保护屏障以抵抗反流物的损伤作用<sup>[7]</sup>,第1道屏障是食管下括约肌和膈肌;第2道屏障是食管腔廓清机制,主要包括食管蠕动、

表1 PBRG组与对照组GERD的发生情况

分组	存在GERD(n)	无GERD(n)	合计	GERD发生率(%)
对照组	104	956	1060	9.8
PBRG组	260	620	1060	24.5
合计	364	1576	2120	17.2

$\chi^2 = 111.450, P < 0.05.$

表2 不同程度PBRG患者食管黏膜损伤情况n(%)

分组(PBRG组)	GERD症状(n)			合计
	轻度	中度	重度	
轻度	65(73.9)	20(22.7)	3(3.4)	88
中度	47(54.7)	29(33.7)	10(11.6)	86
重度	24(27.9)	47(54.7)	15(17.4)	86
合计	136	96	28	260

$\chi^2 = 38.099, P < 0.05.$

食物重力、唾液腺和食管黏膜下分泌的碳酸氢盐;第3道屏障是食管黏膜屏障,这一屏障在反流物与黏膜上皮直接接触时发挥着重要的作用。胃食管反流病的发生与食管的抗反流防御因素与反流物的侵袭因素之间的不平衡有关<sup>[8]</sup>。胆汁反流需要2个前提<sup>[9]</sup>:(1)逆行的十二指肠收缩活动推动十二指肠内容物逆向移动;(2)幽门口开放。任何导致胃肠动力紊乱和解剖结构异常的因素均可能导致胆汁反流的发生,如胃部分切除后胃十二指肠运动异常、胆囊功能障碍等,同样可引起胃食管返流病的因素(如食管廓清能力障碍、抗返流屏障功能减低等)均有可能使返流入胃内的十二指肠内容物,其中包含有胆汁,连同胃内容物一起反流入食管,引起食管黏膜的损伤或临床症状。本研究发现PBRG患者GERD的发生率高于不伴有PBRG的人群。临床上很多胃食管反流病患者都同时合并有胆汁反流性胃炎,尤其是对那些长期抑酸治疗效果欠佳的患者应当考虑到胆汁反流的存在,进而考虑到是否还存在胆汁反流性胃炎。而对于已确诊为PBRG的患者,在行胃镜检查时应仔细观察患者是否还存在胆汁反流相关性食管炎。这一点对于临床治疗原发性胆汁反流性胃炎及胃食管反流病时,药物的选择应用具有指导意义。

在GERD食管黏膜损伤的发生机制中,对胃酸、胃蛋白酶的研究已较多、较明确,两者可直接损伤食管黏膜,导致严重的食管炎<sup>[10]</sup>。胆汁在GERD的发生、发展中的作用也已逐步被认

表3 组间食管黏膜损伤情况

对比组	$\chi^2$ 值	P值	$\alpha'$
轻度PBRG组与中度PBRG组	8.293	0.016	0.017
轻度PBRG组与重度PBRG组	37.750	0.000	0.017
中度PBRG组与重度PBRG组	12.714	0.002	0.017

表4 PBRG患者的GERD症状分级

分组(PBRG组)	GERD症状(n)			
	轻度	中度	重度	极重度
轻度	41	32	9	6
中度	38	33	10	5
重度	35	34	9	8
合计	114	99	28	19

识。胆汁是混合性液体,其主要成分包括结合型胆汁酸、未结合型胆汁酸和磷脂,磷脂在肠道内胰液中的磷脂酶A的作用下被水解为溶血卵磷脂。生理浓度的胆汁酸对食管黏膜的损伤作用表现为黏膜屏障的破坏,导致跨食管电阻和跨膜电位差降低,黏膜对各种离子和分子的通透性增高,但不引起显著的黏膜病理改变,当其浓度超过生理水平并延长作用时间时,则能引起黏膜糜烂和溃疡<sup>[11]</sup>。在酸性环境中,结合型胆汁酸及溶血卵磷脂的损伤作用显著增强<sup>[4]</sup>,其中结合型胆汁酸在酸性溶液中保持非离子化状态而具有脂溶性,能穿透细胞膜进入细胞内,在细胞碱性环境中,结合型胆汁酸转变成非离子化状态而失去脂溶性,不能再通过细胞膜回到细胞外,导致其在细胞内大量积聚从而破坏细胞的膜性结构,使酸和胃蛋白酶到达黏膜下而造成深部严重损害<sup>[12]</sup>。在碱性环境下,非结合型胆汁酸起主要破坏作用<sup>[13]</sup>。中性环境下对黏膜损伤作用最大的可能为未结合型低羟化胆汁酸,此时离子化及非离子化状态的胆汁酸可同时存在,非离子化胆汁酸更容易弥散入黏膜而被认为损伤作用更大<sup>[14]</sup>。

此次研究发现PBRG与食管黏膜损伤程度间存在正性相关,与国内外一些学者<sup>[15,16]</sup>的观点相一致。然而此次研究实际上是评估了胃酸和胆汁的协同作用,随着PBRG患者胆汁反流的加重其GERD的严重程度也随之加深,那么胆汁反流是GERD发生的一个独立危险因素还是继发于酸反流的增加呢?根据反流物的性质可分为酸性反流、胆汁反流及混合反流3种形式。多数

#### ■ 相关报道

张莉等根据症状积分将41例GERD患者分为轻度、中度、重度、极重度组,观察各组胆汁反流的情况,发现无论是反流次数、反流强度还是反流指数,均与GERD症状严重程度无相关性。

### ■应用要点

本研究结果可为临床治疗PBRG及GERD时,药物的选择及抗反流手术的应用提供一定的参考依据。

研究<sup>[13,14,17]</sup>表明混合反流是GERD患者中最常见的病理性反流类型,在酸反流的基础上合并胆汁反流会增加反流性食管炎的程度,2种成分对食管黏膜的损伤有协同作用。上海<sup>[14]</sup>的一项对胆汁反流在GERD发病机制中的作用的研究中,通过胆汁反流与食管病变严重程度的相关性分析后发现A、B、C、D级食管炎中胆汁反流发生的百分比分别为67%、68%、80%、100%。由此提出随着食管炎程度的加重,胆汁反流的发生率也相应增加。张俊等<sup>[18]</sup>通过对86例有病理性反流的GERD患者行24 h食管pH和胆汁反流监测,发现RE组单纯酸反流、单纯胆汁反流、混合反流所占百分比分别为20%、11.42%、68.57%,从而认为混合反流对食管黏膜的损害较单纯反流严重。综上所述,PBRG患者的胆汁反流在食管黏膜损伤的发生发展中扮演了重要的角色,然而胆汁反流究竟是否作为食管黏膜损伤发生的一个独立危险因素尚需系统全面的基础研究。临床上当我们遇见GERD并PBRG的患者时,除抑酸、促动力之外尚需给予相应的中和胆汁的药物治。

目前多数学者<sup>[19-21]</sup>认为胃食管反流症状的发生更多地与混合反流相关,其中酸反流占主导地位,胆汁反流似乎并非是引起食管症状的主要因素。胆汁反流引起GERD症状的机制尚未明确,酸反流引起GERD症状考虑原因在于酸性反流物可致食管上皮细胞屏障功能异常,进而活化食管化学感受器,从而产生胸骨后疼痛症状<sup>[22]</sup>。张峻等<sup>[23]</sup>对有典型反流症状的56例患者进行24 h食管内pH及胆汁联合监测,发现56例患者中共发生典型症状事件357次,其中大部分症状(27.25%)与酸反流有关,仅7.56%的症状与单纯胆汁反流有关。RE组的243次症状事件中,105次(43.21%)事件与酸反流相关,而21次(8.64%)与胆汁反流有关,两种症状相关指数均值比较差异有显著性。这些结果提示引发大多数患者症状的机制可能还是酸反流或是混合反流的作用。张莉等<sup>[24]</sup>根据症状积分将41例GERD患者分为轻度、中度、重度、极重度组,观察各组胆汁反流的情况,发现无论是反流次数、反流强度还是反流指数,均与GERD症状严重程度无相关性。此次调查研究我们也发现PBRG与GERD患者症状的严重程度无明显相关性,PBRG并非是引起GERD症状的主要原因,但症状只是主观感觉,其发生有复杂机制且与个体敏感性有关,这可能需要我们转向大规模的基础研究,旨在了

解易感细胞、分子及遗传因素等。

### 4 参考文献

- 1 Chan DC, Fan YM, Lin CK, Chen CJ, Chen CY, Chao YC. Roux-en-Y reconstruction after distal gastrectomy to reduce enterogastric reflux and Helicobacter pylori infection. *J Gastrointest Surg* 2007; 11: 1732-1740
- 2 林三仁, 许国铭, 胡品津, 周丽雅, 陈旻湖, 柯美云, 袁耀宗, 房殿春, 萧树东. 中国胃食管反流病共识意见(2006.10三亚). *中华内科杂志* 2007; 46: 170-173
- 3 林金坤, 胡品津, 李初俊, 曾志荣, 晓光. 原发性胆汁反流性胃炎诊断的探讨. *中华内科杂志* 2003; 42: 81-83
- 4 罗和生, 陈敏. 胆汁反流与急性胃黏膜病变. *世界华人消化杂志* 2005; 13: 1489-1492
- 5 Calabrese C, Montanaro L, Liguori G, Brighenti E, Vici M, Gionchetti P, Rizzello F, Campieri M, Derenzini M, Trerè D. Cell proliferation of esophageal squamous epithelium in erosive and non-erosive reflux disease. *World J Gastroenterol* 2011; 17: 4496-4502
- 6 DeVault KR, Castell DO. Updated guidelines for the diagnosis and treatment of gastroesophageal reflux disease. *Am J Gastroenterol* 2005; 100: 190-200
- 7 罗访, 刘纯伦, 李章勇, 周成会, 周旭春. 多潘立酮对功能性消化不良患者阻抗式胃动力的影响. *中国实用内科杂志* 2010; 30: 58-60
- 8 彭玄杰. 幽门螺杆菌与胃食管反流病的关系. *临床医学* 2007; 27: 49-50
- 9 卢王, 黄裕新, 王景杰. 胆汁反流性胃炎的诊断及发病机制的研究现状. *胃肠病学和肝病杂志* 2008; 17: 950-956
- 10 Pace F, Tonini M, Pallotta S, Molteni P, Porro GB. Systematic review: maintenance treatment of gastro-oesophageal reflux disease with proton pump inhibitors taken 'on-demand'. *Aliment Pharmacol Ther* 2007; 26: 195-204
- 11 淘金, 胡品津. 胆汁在胃食管反流病中的作用. *国际内科学杂志* 2007; 34: 194-197
- 12 Oh DS, Hagen JA, Fein M, Bremner CG, Dunst CM, Demeester SR, Lipham J, Demeester TR. The impact of reflux composition on mucosal injury and esophageal function. *J Gastrointest Surg* 2006; 10: 787-796; discussion 796-797
- 13 魏菊荣, 金润铭, 周少明, 罗宏英, 王莉, 白大明, 李成荣. 胆汁和胃泌素在小儿胃食管反流病中的作用. *中国当代儿科杂志* 2006; 8: 287-290
- 14 Xu XR, Li ZS, Zou DW, Xu GM, Ye P, Sun ZX, Wang Q, Zeng YJ. Role of duodenogastroesophageal reflux in the pathogenesis of esophageal mucosal injury and gastroesophageal reflux symptoms. *Can J Gastroenterol* 2006; 20: 91-94
- 15 苏帅, 王邦茂. 胃食管反流病的非酸反流和治疗. *国际消化病杂志* 2010; 30: 83-85
- 16 Yumiba T, Kawahara H, Nishikawa K, Inoue Y, Ito T, Matsuda H. Impact of esophageal bile exposure on the genesis of reflux esophagitis in the absence of gastric acid after total gastrectomy. *Am J Gastroenterol* 2002; 97: 1647-1652
- 17 Bredenoord AJ, Weusten BL, Curvers WL, Timmer R, Smout AJ. Determinants of perception of heartburn and regurgitation. *Gut* 2006; 55: 313-318
- 18 张俊, 徐有青, 杨昭徐. Barrett's食管、糜烂性食管炎及非糜烂性反流病发生机制的比较. *世界华人消化杂志* 2009; 17: 3249-3250
- 19 王琨, 段丽萍, 陈洪, 夏志伟, 林三仁. 反流性食管炎与非糜烂性反流病食管酸暴露的特点比较. *中华内科杂*

- 志 2005; 44: 5-8
- 20 Conchillo JM, Schwartz MP, Selimah M, Samsom M, Sifrim D, Smout AJ. Acid and non-acid reflux patterns in patients with erosive esophagitis and non-erosive reflux disease (NERD): a study using intraluminal impedance monitoring. *Dig Dis Sci* 2008; 53: 1506-1512
- 21 Savarino E, Zentilin P, Tutuian R, Pohl D, Casa DD, Frazzoni M, Cestari R, Savarino V. The role of non-acid reflux in NERD: lessons learned from impedance-pH monitoring in 150 patients off therapy. *Am J Gastroenterol* 2008; 103: 2685-2693
- 22 孙常波, 吕宾. 胃食管反流病发病机制研究进展. *国际消化病杂志* 2008; 28: 480-482
- 23 张峻, 杨昭徐. 酸和胆汁反流与胃食管反流症状的关系. *临床内科杂志* 2004; 21: 460-462
- 24 张莉, 陈胜红, 张周龙, 刘旻. 十二指肠胃反流与胃食管反流病的相关性研究. *中国实用医刊* 2011; 38: 20-24

■同行评价  
本研究通过临床观察PBRG及GERD, 并揭示二者相关性, 对诊断和治疗胃肠动力性疾病有帮助, 具有一定的临床价值。

编辑 张姗姗 电编 鲁亚静

ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) CN 14-1260/R 2012年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

## 《世界华人消化杂志》被评为中国精品科技期刊

本刊讯 2011-12-02, 中国科学技术信息研究所在北京发布2010年中国科技论文统计结果, 经过中国精品科技期刊遴选指标体系综合评价, 《世界华人消化杂志》被评为2011年度中国精品科技期刊. 中国精品科技期刊以其整体的高质量示范作用, 带动我国科技期刊学术水平的提高. 精品科技期刊的遴选周期为三年. (编辑部主任: 李军亮 2012-01-01)

# MTHFR基因多态性与胃癌的相关性

郭威, 陈萍, 郑立红, 李松

## ■背景资料

近些年来, 随着对胃癌研究的不断深入, 遗传因素在胃癌发病中所起的作用日益引起人们的重视。亚甲基四氢叶酸还原酶(MTHFR)基因突变可能也会影响DNA合成和甲基化, 进而影响许多疾病的遗传易感性。

郭威, 李松, 齐齐哈尔医学院第一附属医院消化内科 黑龙江省齐齐哈尔市 161041

陈萍, 郑立红, 齐齐哈尔医学院生物遗传教研室 黑龙江省齐齐哈尔市 161006

作者贡献分布: 此课题由郭威与陈萍设计; 研究过程由郭威、陈萍及李松操作完成; 数据分析由郭威与陈萍完成; 本论文写作由郭威与陈萍完成; 郑立红对研究过程、论文撰写进行了指导。

通讯作者: 郭威, 副教授, 副主任医师, 161041, 黑龙江省齐齐哈尔市富拉尔基区向阳大街26号, 齐齐哈尔医学院第一附属医院消化内科. guowei19720904@sina.com

电话: 0452-6866034

收稿日期: 2011-11-23 修回日期: 2012-01-10

接受日期: 2012-03-10 在线出版日期: 2012-03-18

## Association between methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphisms (C677T and G1793A) and risk of gastric cancer

Wei Guo, Ping Chen, Li-Hong Zheng, Song Li

Wei Guo, Song Li, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Qiqihar Medical University, Qiqihar 161041, Heilongjiang Province, China

Ping Chen, Li-Hong Zheng, Department of Biology and Genetics, Qiqihar Medical College, Qiqihar 161006, Heilongjiang Province, China

Correspondence to: Wei Guo, Associate Professor, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Qiqihar Medical University, Qiqihar 161041, Heilongjiang Province, China. guowei19720904@sina.com

Received: 2011-11-23 Revised: 2012-01-10

Accepted: 2012-03-10 Published online: 2012-03-18

## Abstract

**AIM:** To explore the association between two non-synonymous single nucleotide polymorphisms (C677T and G1793A) of the methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene and risk of gastric cancer.

**METHODS:** Ninety patients with advanced gastric cancer and 114 normal controls were included in the study. DNA samples isolated from peripheral blood which were used to genotype C677T and G1793A polymorphisms by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP).

**RESULTS:** No significant differences in allele

frequencies and genotype frequencies were found between the patients and controls, suggesting that there might be no association between the two MTHFR gene polymorphisms and risk of gastric cancer.

**CONCLUSION:** It is necessary to classify gastric cancer according to causes of disease to investigate the association between MTHFR gene polymorphisms and risk of this disease since MTHFR gene polymorphisms may be associated with only some subtypes.

**Key Words:** Gastric cancer; MTHFR; Gene polymorphisms; C677T; G1793A

Guo W, Chen P, Zheng LH, Li S. Association between methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphisms (C677T and G1793A) and risk of gastric cancer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2012; 20(8): 690-693

## 摘要

**目的:** 探讨MTHFR基因多态性与胃癌发病风险的相关性。

**方法:** 收集进展期胃癌患者97例, 应用PCR对C677T、G1793A多态位点进行检测; 采用病例对照研究设计, 比较病例组和对照组多态位点基因频率和基因型频率。

**结果:** 677T等位基因频率在病例组和对照组中差异无显著性意义, 病例组CC基因型频率、CT基因型频率、TT基因型频率与对照组相应基因型频率差异无显著性意义; 1793A等位基因频率在病例组和对照组中差异无显著性意义, 病例组GG基因型频率、GA基因型频率与对照组相应基因型频率差异无显著性意义。

**结论:** MTHFR多态性可能参与了胃癌的发生、发展, 但他仅是导致胃癌发生的因素之一。因此研究MTHFR多态性与胃癌发生之间的关系, 有必要对胃癌病因进行分类, MTHFR多态性可能参与了某一类胃癌的发生。

**关键词:** 胃癌; MTHFR; 基因多态性; C677T; G1793A

## ■同行评议者

邹小明, 教授, 哈尔滨医科大学附属第二医院普外科

郭威, 陈萍, 郑立红, 李松. MTHFR基因多态性与胃癌的相关性. 世界华人消化杂志 2012; 20(8): 690-693  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/690.asp>

## 0 引言

胃癌是最常见的消化系恶性肿瘤, 在我国的发病率也较高, 一般北方比南方高. 在胃癌的发生中, 遗传因素起到了非常重要的作用, 约10%-15%的胃癌患者有家族聚集现象, 这已被一些研究所证实<sup>[1]</sup>. 多数学者认为遗传因素使致癌物质对易感者更易致癌. 亚甲基四氢叶酸还原酶(MTHFR)活性的改变会导致5-甲基四氢叶酸生成障碍, 从而造成同型半胱氨酸复甲基化障碍, 引起高半胱氨酸血症、高半胱氨酸尿症和血浆低甲硫氨酸<sup>[2,3]</sup>; 同时可能也会影响DNA合成和甲基化, 进而影响许多疾病的遗传易感性. 现已发现MTHFR基因上有近30个SNP位点, 其中C677T和G1793A突变是较为常见的2种类型. 我们采用分子生物学方法对97例进展期胃癌与这2个基因多态性的关系进行了研究.

## 1 材料和方法

1.1 材料 根据“知情同意”的原则, 收集齐齐哈尔医学院第一附属医院消化内科进展期胃癌患者97例, 所有患者均经胃镜活检病理支持. 所有患者均为汉族, 男62例、女35例, 年龄15-83岁, 平均年龄55.53岁±12.80岁; 114例健康对照来自齐齐哈尔医学院第一附属医院同期健康体检者, 根据年龄和性别与病例组进行频数配对. 所有样本之间无血缘关系. 取外周静脉血, 用ACD抗凝, -20℃保存, 提取基因组DNA.

### 1.2 方法

1.2.1 MTHFR基因型分析: C677T多态位点: PCR反应体系(20 μL): 模板DNA 50 ng、4×dNTP 2.5 mmol、PCR引物各5 μmol、rTaq 0.5 U; PCR反应条件: 95℃预变性5 min, 94℃ 30 s, 64℃ 20 s, 72℃ 20 s, 共30个循环, 72℃延伸10 min; 电泳检测PCR扩增产物: 取PCR产物5 μL, 加1 μL加样缓冲液, 在1%琼脂糖凝胶上200 V恒压电泳20 min; *Hinf* I 酶切: 酶切体系15 μL: 含PCR扩增产物7 μL, *Hinf* I 酶2.5 U, 37℃水浴过夜; 琼脂糖凝胶电泳检测酶切产物: 取酶切产物8 μL, 加2 μL加样缓冲液, 在3%琼脂糖凝胶上200 V恒压电泳40 min.

1.2.2 MTHFR基因型分析: G1793A多态位点: PCR反应体系(20 μL): 模板DNA 50 ng、4×dNTP

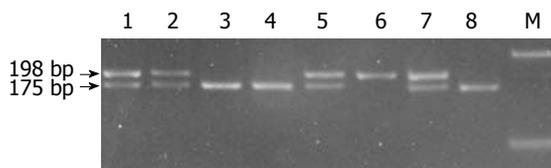


图1 MTHFR C677T位点3%琼脂糖凝胶电泳检测结果. M: Marker(DL2000); 1, 2, 5, 7: 677CT(198 bp, 175 bp and 23 bp); 3, 4, 8: 677TT(175 bp and 23 bp); 6: 677CC(198 bp).

2.5 mmol、PCR引物各5 μmol、rTaq 0.5 U; PCR反应条件: 95℃预变性5 min, 94℃ 30 s, 68℃ 20 s, 72℃ 20 s, 共30个循环, 72℃延伸10 min; 电泳检测PCR扩增产物: 取PCR产物5 μL, 加1 μL加样缓冲液, 在1%琼脂糖凝胶上200 V恒压电泳20 min; *Bsr*B I 酶切: 酶切体系15 μL: 含PCR扩增产物7 μL, *Bsr*B I 酶2.5 U, 37℃水浴过夜; 琼脂糖凝胶电泳检测酶切产物: 取酶切产物8 μL, 加2 μL加样缓冲液, 在2%琼脂糖凝胶上200 V恒压电泳40 min.

统计学处理 采用SPSS13.0软件进行分析, 计算MTHFR C677T和G1793A基因突变率、等位基因频率、基因型频率、基因多态性与疾病的相关性及相对危险度. 计算资料组间比较用 $\chi^2$ 检验, 基因型及等位基因相对风险率以比数比(odds ratios, OR)及95%可信区间(CI)表示.

## 2 结果

2.1 琼脂糖凝胶电泳检测C677T基因型 通过PCR-RFLP(*Hinf* I), 其CC野生型只有一条198 bp长度的片段, CT杂合型有198 bp、175 bp和23 bp 3条片段, TT纯合突变型有175 bp和23 bp 2条片段. 用3%的琼脂糖凝胶电泳检测, 23 bp的片段将跑出凝胶(图1). 经 $\chi^2$ 检验, 677T等位基因频率在病例组和对照组中差异无显著性意义, 病例组CC基因型频率、CT基因型频率、TT基因型频率与对照组相应基因型频率差异无显著性意义(表1).

2.2 琼脂糖凝胶电泳检测 G1793A基因型 G1793A位点PCR扩增产生310 bp长度片段, 经*Bsr*B I 酶切后产生233 bp和77 bp 2种长度片段. 由于MTHFR1793位点出现G→A的突变, 消除了1个*Bsr*B I 酶切位点, 故野生型GG产生233 bp和77 bp 2种片段, 突变型AA只产生310 bp 1种片段, 杂合型GA产生310 bp、233 bp和77 bp 3种片段. 电泳结果(图2). 经 $\chi^2$ 检验, 1793A等位基因频率在病例组和对照组中差异无显著性意义, 病例组GG基因型频率、GA基因型频率与对照组相应基因型频率差异无显著性意义(表2).

## ■ 研究前沿

大量研究表明, 癌基因的低甲基化和抑癌基因的高甲基化参与了多种肿瘤的发生、发展. 探讨MTHFR基因多态性、DNA甲基化与各种肿瘤(包括胃癌)之间的关系已成为当前肿瘤病因学研究的一项重要课题.

### ■相关报道

有研究表明, C677T突变引起的MTHFR活性下降会引起血中同型半胱氨酸水平升高, 甲硫氨酸含量下降, 进而产生高半胱氨酸血症、高半胱氨酸尿症和低甲硫氨酸血症, 是心脑血管疾病、出生缺陷疾病, 尤其是神经管畸形的肯定危险因素不是导致胃癌发生的主要危险因素。

表 1 MTHFR C677T基因型及等位基因频率在病例和对照中的分布及其与胃癌的关系

	病例组n(%)	对照组n(%)	OR(95%CI)	P值
CC	22(22.68)	32(28.07)	1(参考值)	
CT	48(49.48)	57(50.00)	1.225(0.630-2.382)	0.550
TT	27(27.84)	25(21.93)	1.57(0.728-3.388)	0.248
对照组相应基因型频率	0.5258	0.4693	-	0.248

表 2 MTHFR G1793A基因型及等位基因频率在病例和对照中的分布及其与胃癌的关系

基因型	病例组n(%)	对照组n(%)	OR(95%CI)	P值
GG	89(91.75)	106(92.98)	1(参考值)	-
GA	8(8.25)	8(7.02)	0.840(0.303-2.328)	0.737
AA	0(-)	0(-)	-	-
对照组相应基因型频率	0.0412	0.0351	-	0.728

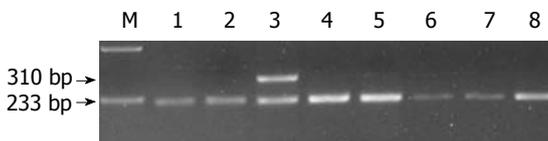


图 2 MTHFR G1793A位点2%琼脂糖凝胶电泳检测结果. M: Marker(DL2000); 1, 2, 4, 8: 1793GG(233 bp and 77 bp); 3, 5, 6, 7: 1793GA(310 bp, 233 bp and 77bp).

在我们的研究中, MTHFR基因C677T突变和G1793A突变与胃癌的发生没有统计学意义的关联。

### 3 讨论

导致胃癌发生的病因是多方面的, 既有诸多的遗传因素, 又有环境因素, 包括幽门螺杆菌感染、胃病史、生活方式和习惯、精神心理因素等<sup>[4]</sup>。有研究表明, C677T突变引起的MTHFR活性下降会引起血中同型半胱氨酸水平升高, 甲硫氨酸含量下降, 进而产生高半胱氨酸血症、高半胱氨酸尿症和低甲硫氨酸血症, 是心脑血管疾病、出生缺陷疾病, 尤其是神经管畸形的肯定危险因素<sup>[5,6]</sup>不是导致胃癌发生的主要危险因素。

DNA甲基化是生物体在DNA甲基转移酶(DNMT)的作用下, 以S-腺苷蛋氨酸(SAM)作为甲基供体, 将活化的甲基引入到DNA链中特定碱基上。DNA甲基化是基因的表现遗传修饰形式之一, DNA甲基化的高低与基因的表达程度往往呈负相关。通常甲基化水平较低时, 基因表达水平高; 甲基化水平较高时, 基因表达水平低, 从而在维持细胞的正常功能方面发挥着重要作用<sup>[7]</sup>。

大量研究表明, 癌基因的低甲基化和抑癌基因的高甲基化参与了胃癌的发生、发展<sup>[8,9]</sup>。

有研究认为MTHFR基因C677T多态性通过影响DNA的甲基化和核酸的稳定性, 参与了胃癌的发生。在Homberger和Weisberg的研究中, 纯合突变型(TT)的酶活性仅为野生型(CC)的30%, 杂合突变型(TC)的酶活性仅为野生型(CC)的60%, 同时酶的热稳定性下降<sup>[10,11]</sup>酶活性的降低间接改变了SAM水平, 导致DNA低甲基化, 同时增加了染色体的不稳定性<sup>[12]</sup>。一般来讲, 5%-10%的酶活性即可使该酶所催化的代谢反应正常进行, 并维持底物和产物在适当的水平。当然也有一些酶需要具有较高活性才能使机体代谢途径正常进行。在我们的研究中, 未得出MTHFR基因C677T和G1793A突变与胃癌的发生具有相关性的结论, 可能是由于MTHFR基因突变导致酶活性降低尚不足以影响机体的DNA甲基化过程。

5, 10-亚甲基四氢叶酸在MTHFR催化下转变为5-甲基四氢叶酸, 后者通过合成SAM参与了多种甲基化过程。研究表明, 叶酸缺乏可导致DNA低甲基化和染色体损害<sup>[13,14]</sup>。在我国北方地区, 冬天气候寒冷, 而且持续时间较长, 较易发生蔬菜和水果摄入不足, 导致叶酸缺乏。Ma等<sup>[15]</sup>研究发现, 叶酸摄入充足, 虽然MTHFR活性降低, 仍可保证DNA甲基化的正常进行; 而叶酸摄入不足, C677T变异基因型携带者可能既有DNA甲基化异常, 又有DNA合成、修复异常, 使细胞癌变风险增加。故而叶酸摄入不足和MTHFR基因突变导致的酶活性降低可能存在协同作用。在我们的研究中, 未得出MTHFR基因C677T和

G1793A突变与胃癌的发生具有相关性的结论,也可能是由于叶酸摄入不足,不论MTHFR基因突变是否存在,都可导致DNA低甲基化的发生。

胃癌的发生是多途径、多因素、多步骤的,MTHFR多态性可能参与了胃癌的发生、发展,但他仅是导致胃癌发生的因素之一。因此,研究MTHFR多态性与胃癌发生之间的关系,有必要对胃癌病因进行分类,MTHFR多态性可能参与了某一类胃癌的发生。对于MTHFR基因多态性与胃癌发生、发展的关系,仍有待于今后更大样本的研究来证实。

#### 4 参考文献

- 1 Barber M, Fitzgerald RC, Caldas C. Familial gastric cancer - aetiology and pathogenesis. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2006; 20: 721-734
- 2 Kawamoto R, Kohara K, Tabara Y, Miki T, Doi T, Tokunaga H, Konishi I. An association of 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene polymorphism and common carotid atherosclerosis. *J Hum Genet* 2001; 46: 506-510
- 3 Matthews RG, Vanoni MA, Hainfeld JF, Wall J. Methylenetetrahydrofolate reductase. Evidence for spatially distinct subunit domains obtained by scanning transmission electron microscopy and limited proteolysis. *J Biol Chem* 1984; 259: 11647-11650
- 4 赵凤源, 贺圣文. 胃癌危险因素研究进展. *现代预防医学* 2010; 37: 2105-2106
- 5 Arsene D, Găină G, Bălescu C, Ardeleanu C. C677T and A1298C methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) polymorphisms as factors involved in ischemic stroke. *Rom J Morphol Embryol* 2011; 52: 1203-1207
- 6 Cho SE, Hong KS, Shin GJ, Chung WS. The methylenetetrahydrofolate reductase C677T gene mutation is associated with hyperhomocysteinemia, cardiovascular disease and plasma B-type natriuretic peptide levels in Korea. *Clin Chem Lab Med* 2006; 44: 1070-1075
- 7 陶冶. DNA甲基化及其新进展. *国际妇产科学杂志* 2010; 37: 340-343
- 8 Hu SL, Kong XY, Cheng ZD, Sun YB, Shen G, Xu WP, Wu L, Xu XC, Jiang XD, Huang DB. Promoter methylation of p16, Runx3, DAPK and CHFR genes is frequent in gastric carcinoma. *Tumori* 2010; 96: 726-733
- 9 Yamamoto E, Suzuki H, Takamaru H, Yamamoto H, Toyota M, Shinomura Y. Role of DNA methylation in the development of diffuse-type gastric cancer. *Digestion* 2011; 83: 241-249
- 10 Homberger A, Linnebank M, Winter C, Willenbring H, Marquardt T, Harms E, Koch HG. Genomic structure and transcript variants of the human methylenetetrahydrofolate reductase gene. *Eur J Hum Genet* 2000; 8: 725-729
- 11 Weisberg I, Tran P, Christensen B, Sibani S, Rozen R. A second genetic polymorphism in methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) associated with decreased enzyme activity. *Mol Genet Metab* 1998; 64: 169-172
- 12 Narayanan S, McConnell J, Little J, Sharp L, Piyathilake CJ, Powers H, Basten G, Duthie SJ. Associations between two common variants C677T and A1298C in the methylenetetrahydrofolate reductase gene and measures of folate metabolism and DNA stability (strand breaks, misincorporated uracil, and DNA methylation status) in human lymphocytes in vivo. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2004; 13: 1436-1443
- 13 Shookhoff JM, Gallicano GI. A new perspective on neural tube defects: folic acid and microRNA mis-expression. *Genesis* 2010; 48: 282-294
- 14 Watanabe Y, Maekawa M. Methylation of DNA in cancer. *Adv Clin Chem* 2010; 52: 145-167
- 15 Ma J, Stampfer MJ, Giovannucci E, Artigas C, Hunter DJ, Fuchs C, Willett WC, Selhub J, Hennekens CH, Rozen R. Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism, dietary interactions, and risk of colorectal cancer. *Cancer Res* 1997; 57: 1098-1102

#### ■同行评价

本文报道并探讨了MTHFR基因多态性与胃癌发病风险的相关性。选题新颖,实验方法先进,结果可靠,虽然是阴性结果,但也有学术价值。

编辑 曹丽鸥 电编 鲁亚静

ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) CN 14-1260/R 2012年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

## 《世界华人消化杂志》栏目设置

本刊讯 本刊栏目设置包括述评,基础研究,临床研究,焦点论坛,文献综述,研究快报,临床经验,病例报告,会议纪要。文稿应具科学性、先进性、可读性及实用性,重点突出,文字简练,数据可靠,写作规范,表达准确。

# 肿块型肝内胆管细胞癌: 多排CT的动脉期强化与临床病理的相关性

周建雄, 戴洪修, 杨静

## ■背景资料

胆管癌是起源于肝内外胆管上皮细胞的腺癌。在欧洲、北美洲、亚洲, 其发病率有所上升, 死亡率也随之上升。目前, 胆管癌占有原发性肝癌的近15%-20%, 且是全球的第2位常见的原发性肝脏肿瘤。肝内胆管癌(IMCC)发生于肝内胆管的2级分支到末梢胆管, 根据形态和生长方式可分为3型: 肿块型、胆管周围浸润型和胆管内生长型。3型中, 肿块型最常见(占有IMCC的60%), 且生长迅速, 并向周围的肝实质浸润。

周建雄, 武汉大学基础医学院 湖北省武汉市 430071  
周建雄, 戴洪修, 三峡大学第一临床医学院 宜昌市中心人民医院放射科 湖北省宜昌市 443003  
杨静, 武汉大学基础医学院药理系教研室 湖北省武汉市 430071  
周建雄, 副主任医师, 硕士, 主要从事消化系统影像诊断的研究。  
通讯作者: 杨静, 教授, 430071, 湖北省武汉市东湖路185号, 武汉大学基础医学院药理系教研室. yangjing@yahoo.com.cn  
收稿日期: 2012-01-06 修回日期: 2012-02-28  
接受日期: 2012-03-16 在线出版日期: 2012-03-18

## Correlation between CT arterial enhancement patterns and clinicopathologic findings for intrahepatic mass-forming cholangiocarcinomas

Jian-Xiong Zhou, Hong-Xiu Dai, Jing Yang

Jian-Xiong Zhou, Medical College of Wuhan University, Wuhan 430071, Hubei Province, China  
Jian-Xiong Zhou, Hong-Xiu Dai, Department of Medical Imaging and Radiological Sciences, the First Clinical College of China Three Gorges University, Yichang 443003, Hubei Province, China  
Jing Yang, Medical College of Wuhan University, Wuhan 430071, Hubei Province, China  
Correspondence to: Jing Yang, Professor, Medical College of Wuhan University, 185 Donghu Road, Wuhan 430071, Hubei Province, China. yangjing@yahoo.com.cn  
Received: 2012-01-06 Revised: 2012-02-28  
Accepted: 2012-03-16 Published online: 2012-03-18

## Abstract

**AIM:** To evaluate the computed tomography (CT) imaging features of intrahepatic mass-forming cholangiocarcinomas (IMCCs), with a special emphasis on the degree and pattern of arterial enhancement, and to determine whether the clinicopathologic features of IMCCs with arterial enhancement differ from those of IMCCs with less arterial enhancement.

**METHODS:** Thirty-two patients with 34 pathologically confirmed IMCCs after surgical resection underwent multiphasic CT-unenhanced, hepatic arterial phase (HAP), portal venous phase, and/or equilibrium phase imaging. CT images were retrospectively evaluated for tu-

mor morphology and enhancement features. Patients were placed into typical or atypical enhancement groups according to the presence of enhancement in the largest volume (> 50%) of the tumors during the HAP. Imaging features of IMCCs were correlated with pathologic features. The typical and atypical enhancement groups were compared with respect to disease-free survival and overall survival. Survival rates were calculated by using the Kaplan-Meier method, and differences in survival were compared by using the log-rank test. A Cox proportional hazards model was used for multivariate survival analysis.

**RESULTS:** Twenty-four (71%) of 34 IMCCs showed typical arterial enhancement, and 10 (29%) showed atypical enhancement. The mean diameter of atypical IMCCs was significantly smaller than that of typical IMCCs ( $P = 0.001$ ). Chronic liver disease was more frequent in the group with atypical lesions ( $P = 0.021$ ). During the HAP, the prevalent enhancement pattern in this group was a mixed pattern of peripheral rim and internal heterogeneous enhancement. At pathologic evaluation, atypically enhancing IMCCs showed less central stroma and necrosis and larger cellular areas and more frequently had a cholangiolocellular component than typically enhancing IMCCs. Arterial enhancement of IMCCs was found to be an independent prognostic factor for longer disease-free survival.

**CONCLUSION:** Arterially enhancing IMCCs are not rare; thus, enhancement pattern analysis of arterially enhancing IMCCs will be helpful in differentiating them from hepatocellular carcinomas. In addition, arterial enhancement of IMCCs appears to correlate with disease-free survival.

**Key Words:** Liver neoplasms; Cholangiocarcinomas; Computed tomography; Enhancement pattern

Zhou JX, Dai HX, Yang J. Correlation between CT arterial enhancement patterns and clinicopathologic findings for intrahepatic mass-forming cholangiocarcinomas. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2012; 20(8): 694-698

## ■同行评议者

李文岗, 教授, 福建医科大学附属厦门第一医院肝胆胰血管外科

## 摘要

**目的:** 评估肿块型肝内胆管细胞癌(intrahepatic mass-forming cholangiocarcinomas, IMCCs)的CT的影像特征, 重点分析动脉期强化的方式和程度, 进而分析IMCCs典型动脉期强化与非典型强化两组的临床病理特点。

**方法:** 本研究回顾性分析了32例患者34个病理证实IMCCs病灶, 均行多排CT平扫、动脉期、门脉期和/或平衡期的影像检查, 根据肿瘤的形态和增强特点进行回顾性评估。依据肿瘤动脉期增强的体积是否>50%, 将患者分为典型(强化体积>50%)和非典型两组; 分别分析两组的影像特点与病理特点的相关性, 并且比较两组的生存状况。生存率的计算依据Kaplan-Meier法, 分析采用Log-rank检验, 生存的多变量分析采用Cox proportional hazards模型。

**结果:** 24个IMCCs病灶(占71%)呈典型的动脉期强化; 10个瘤灶(占29%)呈非典型性强化。非典型组的平均直径小于典型组的直径( $P = 0.001$ )。慢性肝病多见于非典型组( $P = 0.021$ )。动脉期强化的主要特点是周边和中央混合性不均匀强化。病理所见: 同典型组比较, 非典型组病灶的中央基质和坏死少、细胞面积较大, 且胆管细胞成分多见。

**结论:** IMCCs病灶的动脉期强化并不少见; 动脉期的强化有助于与原发性肝细胞癌的鉴别, 动脉期强化可作为病灶切除后生存期较长的独立性预后指标。

**关键词:** 肝脏肿瘤; 胆管细胞癌; 计算机断层扫描; 强化类型

周建雄, 戴洪修, 杨静. 肿块型肝内胆管细胞癌: 多排CT的动脉期强化与临床病理的相关性. 世界华人消化杂志 2012; 20(8): 694-698

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/694.asp>

## 0 引言

胆管癌是起源于肝内外胆管上皮细胞的腺癌。在欧洲、北美洲、亚洲, 其发病率有所上升, 死亡率也随之上升。目前, 胆管癌占有原发性肝癌的近15%-20%, 且是全球的第2位常见的原发性肝脏肿瘤。肝内胆管癌(intrahepatic mass-forming cholangiocarcinomas, IMCCs)发生于肝内胆管的2级分支到末梢胆管, 根据形态和生长方式可分为3型: 肿块型、胆管周围浸润型和胆管内生长型。3型中, 肿块型最常见(占有IMCCs的

60%), 且生长迅速, 并向周围的肝实质浸润。虽然, 理想的治疗是肝脏切除, 但根治性切除者不足50%, 其3年的生存期在22%-66%之间<sup>[1-6]</sup>。影像对IMCCs的诊断、分期、治疗方案确定起着重要的作用。目前, CT动态增强造影是肝脏病灶检出以及肝脏恶性肿瘤分期的主要影像学方法<sup>[7-15]</sup>。IMCCs的CT表现为肝内密度不均的肿块, 增强后的动脉期和门脉期均显示为周边不完全强化。本研究旨在评估IMCCs的CT表现特点, 重点分析动脉期的增强方式和程度, 同时分析IMCCs动脉期的临床病理特点与典型的动脉期低强化病灶有何不同。另外, 我们也试图确定病灶动脉期增强和患者手术预后的相关性。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 经过三峡大学伦理委员会批准, 回顾性分析2002-08/2011-08病理科记载的术后证实为IMCCs的患者40例。所有患者入选标准为: 均有术前CT多时相肝脏影像资料(包括3时相平扫、动脉期和门脉期或4时相的3时相平扫、动脉期、门脉期和平衡期)及选择性动脉期和门脉期的影像资料; 患者未经过术前治疗(如经动脉化疗栓塞、穿刺酒精灌注和射频消融等)。6例患者因缺乏术前肝脏多时相CT资料给予排除, 2例患者应术前CT检查前曾行经动脉化疗栓塞治疗也予除外。符合研究标准的32例患者平均年龄为62.6岁±9.1岁, 男22例, 平均年龄62.4岁±9.5岁(年龄范围40-80岁), 女10例, 平均年龄63.0±7.9岁(年龄范围49-75岁)。32例患者中, 病理证实IMCCs的病灶共有34个(30例患者为单病灶, 2例患者为双病灶)。

### 1.2 方法

**1.2.1 CT影像检查:** 32例患者中, 行CT 3时相检查者17例, 4时相检查者15例。所有CT影像资料均由2名腹部放射学医师共同商议评估(2名医师分别有24年和9年的肝胆影像工作经验)。影像分析时已知IMCCs的诊断, 各病灶的所在部位也给予告知。CT评估包括增强特点和形态特点。选用PACS工作站, 用软组织窗(窗宽400 HU; 窗位70-100 HU)观察。分析肿瘤CT的增强特点包括: (1)肿瘤的各时相衰减均与肝实质的衰减相对比; (2)动脉期、门脉期和/或平衡期增强程度的变化; (3)动脉期的增强方式。肿瘤增强衰减在平扫和增强后分为高衰减、等衰减和低衰减; 增强后不均与强化衰减>50%的部分为病灶的主要成分。另外, 为保证病灶相对衰减的准确性, 用兴趣

## ■ 相关报道

Nanashima等报道, 近一半肝内胆管癌为富血供强化类型。

### ■应用要点

如肝结节多时相增强CT显示动脉期周边环形强化或延迟相的持续性强化时,应想到非典型的IMCCs可能性,并建议行其他方法(如磁共振、PET或活检)进一步检查。

区(ROI)分别定位于病灶和肝实质内, (在病灶区设两个兴趣区,取CT值的平均值)并测量其CT值. 分别测量各时相(平扫、动脉期、门脉期和平衡期)衰减的CT值,该作者不参与随后的定量分析. 病灶较大者的ROI衰减相对均匀,病灶ROI平均面积 $0.5\text{ cm}^2$  (范围为 $0.2\text{--}2.4\text{ cm}^2$ ); 肝实质ROI平均面积 $2.0\text{ cm}^2$  (范围 $1.8\text{--}2.3\text{ cm}^2$ ). 肿瘤和肝实质衰减大于 $10\text{ Hu}$ 者被视为有重要意义. 根据动脉期、门脉期和平衡期的相对衰减分为3型: (1)动脉期低强化,门脉期低、等、高强化为典型组; (2)动脉期高强化,门脉期低强化为非典型组1(动脉期强化,快出); (3)动脉期和门脉期高和等强化为非典型组2(动脉期强化,并非快出). 为评估动脉期强化方式,将强化 $>50\%$ 病灶分为5种方式: 均匀强化、不均匀强化、周边强化、周边和中央混合强化、弱强化. 肿瘤的形态学评估包括: 肿瘤的直径、形态(圆形、分叶或不规则)、边界(清或不清)、平扫影像病灶的均匀性. 其他影像表现包括: 包囊牵拉、动门脉漏、血管受侵、胆管扩张、钙化、肝内胆管结石等也予注明. 另依据平扫所见将病灶分为均匀和不均匀两种结构. 病灶的大小以 $3\text{ cm}$ 为界进行划分.

1.2.2 病理学评估: 所有32例患者的34个病灶中,仅有28个病灶有病理切片. 病理医师不知病变影像特点,并对病灶的标本切片进行观察评估. 分别对肿瘤的大小、分化程度、坏死有无、中央纤维基质的含量、细胞面积的比例等进行评估. 中央纤维基质的含量用半定量方法进行分度评估: 无(任意放大无基质成分); 最小( $\times 400$ 放大,腺样成分与基质混合); 轻度( $\times 200$ 放大,无腺样成分); 中度( $\times 100$ 放大,无腺样成分); 显著( $\times 40$ 放大,无腺样成分). 另外,肿瘤细胞面积和无细胞面积(纤维和坏死面积)比例分为最小( $<25\%$ ); 轻度( $25\%\text{--}50\%$ ); 中度( $<50\%\text{--}70\%$ ); 显著( $>75\%$ ). 评估IMCCs病灶病理和CT影像特点的相关性及典型组和非典型组的病理学差异.

**统计学处理** 选用Student *t*检验、 $\chi^2$ 检验、Fisher exact检验以及linear-by-linear association检验,根据CT增强特点(典型的衰减和不典型的动脉期增强)分析其临床病理和影像特点的差异. 比较典型与非典型增强组分别与去瘤后生存和全生存的差异. 生存率的计算用Kaplan-Meier; 生存的差异用log-rank检验; 生存多变量分析采用Cox proportional hazards模型分析.

## 2 结果

2.1 病灶影像 32例IMCCs患者共34病灶的平均直

径为 $5.10\text{ cm} \pm 2.22\text{ cm}$  ( $1.5\text{--}11.0\text{ cm}$ ). 8个IMCCs病灶直径 $\leq 3\text{ cm}$ ,占23%; 26个病灶直径 $>3\text{ cm}$ ,占77%. 所有34个IMCCs病灶平扫为低衰减(33/34,占97%)或等衰减(1/34,占3%); 动脉期: 9个病灶(26%)为高衰减,1个病灶(3%)为等衰减,其他24个病灶(71%)仍为低衰减; 门脉期: 8个病灶(24%)为高衰减,1个病灶(3%)为等衰减,其他25个病灶(73%)为低衰减. 34个IMCCs病灶的32例患者中,10个病灶(占29%)为非典型性动脉增强. 10个动脉增强结节的动脉期、门脉期和/或平衡期的强化程度评估时,2个病灶显示为快出,8个病灶(占80%)为在门脉期和/或平衡期的持续性增强. 因此,32例患者34个IMCCs病灶中,24个病灶(占71%)显示为典型的相对衰减(典型强化); 2个病灶(占5%)显示动脉增强并快出(非典型强化1); 8个病灶(占24%)显示动脉期增强无快出,特点不明显(非典型强化2).

2.2 病理观察 IMCCs动脉期强化的病理观察表明: 中央基质( $P = 0.018$ )、细胞面积比例( $P = 0.046$ )、胆管细胞成分( $P < 0.001$ )、坏死( $P = 0.045$ )的显著差异. 同其他IMCCs病灶比较,IMCCs的动脉期强化显示中央基质较少、细胞面积较大和胆管细胞成分多见、坏死相对少见. 肿瘤的细胞分化分析显示动脉期的强化无显著性差异.

2.3 患者生存率 IMCCs非典型强化的1、3、5年的生存率分别为92.9%、78.6%和51.6%,而典型强化组生存率分别为93.1%、67.3%和42.0%. log-rank检验两组无显著性差异( $P = 0.298$ ). 然而,单变量检验表明: IMCCs动脉强化与去瘤后生存(disease-free survival)显著相关( $P = 0.010$ ). 非典型增强组的去瘤后1、3年的生存率分别为65.0%和57.8%,典型低衰减组的分别为38.9%和18.8%. 其他的单变量分析表示: 肝内转移是肿瘤切除后生存预后差的指标( $P = 0.046$ ),肿瘤分化差的肿瘤切除后生存率较中等分化和分化好的生存率要低( $P = 0.084$ ). 单变量log-rank检验显示慢性肝病( $P = 0.832$ )、肿瘤大小( $P = 0.274$ )和患者年龄( $P = 0.627$ )不是肯定的肿瘤切除后生存率的预后指标. 多变量(包括肿瘤的动脉期CT强化、肝内转移和肿瘤的分化程度)分析表明: 肿瘤的动脉期增强是肿瘤切除后长期生存率的独立预后指标.

## 3 讨论

本组病例中,71%( $n = 24/34$ )的IMCCs显示: 动脉

期、门脉期和/或平衡期典型低、等、高的强化方式. 其余29%( $n = 10/34$ )为非典型CT强化. 本文结果表明: IMCCs在以往报道的可手术切除病例中, 非典型强化者更为多见<sup>[6-12]</sup>. 我们相信这种差异是不同型的肿瘤所致. 本研究中, 所有的IMCCs病灶均是外科可切除性病灶, 影像分析仅为原发性肿瘤的分析. 然而, 以前的影像分析报道的许多患者均是晚期胆管癌(>5 cm)并有多发灶<sup>[5-9]</sup>. 子灶可具有原发性肿瘤相似的影像特点, 小的子灶影像特点也可不同于小的原发胆管癌灶. 近来, Nanashima等<sup>[10]</sup>报道, 近一半IMCCs为富血供强化类型. 尽管本文的研究和以前的报道有所不同, 但有关胆管癌富血供的强化表现是一致的.

更重要的是, 本研究非典型强化组的慢性肝病(如乙型肝炎)显著高于典型强化组(20%, 10/49) ( $P = 0.021$ ), 这与Nanashima等<sup>[10]</sup>报道相似. 临床上, IMCCs非典型强化可被认为是无法确定的结节, 非典型强化可因动脉期高强化和快出表现被误诊为肝细胞癌, 然而, 30%-50%的肝细胞癌并不表现为典型的动脉期强化和快出的特点<sup>[12-15]</sup>. 如肝硬化患者, 非典型组2病灶不易与肝细胞癌相区分. 这种误诊可导致不适当的治疗方案的选择, 如经动脉化疗栓塞、射频消融或经皮穿刺酒精灌注, 这些治疗多用于肝细胞癌的治疗<sup>[14-15]</sup>而不适于胆管癌的治疗. 根据本文结果, 仔细的动脉期强化类型分析有助于避免上述误诊和不适当的治疗方案的选择. 本研究表明动脉期周边强化和中央不均匀强化的混合方式是IMCCs第2种常见的增强类型, 以往报道晚期IMCCs的CT强化特点是周边环形强化和略强化<sup>[6-12]</sup>. 因肝细胞癌的这些增强方式并不常见, 所以IMCCs的动脉期增强分析有助于与肝细胞癌的鉴别. 因此, 如肝结节多时相增强CT显示动脉期周边环形强化或延迟相的持续性强化时, 应想到非典型的IMCCs可能性, 并建议行其他方法(如磁共振、PET或活检)进一步检查.

我们还发现典型的和非典型动脉期强化IMCCs有不同的形态学特点, 包括肿瘤的大小、平扫的密度均匀性和胆管扩张等. 非典型动脉期强化IMCCs病灶的平均直径( $3.7 \text{ cm} \pm 1.5 \text{ cm}$ )显著小于典型强化组的直径( $5.6 \text{ cm} \pm 2.3 \text{ cm}$ ). 如IMCCs病灶直径 $\leq 3 \text{ cm}$ , 45%为非典型强化和14%为典型强化组. 我们认为典型的较大的IMCCs病灶CT显示为平扫的密度不均匀以及胆管扩张. 恶性肿瘤的生长常可产生坏死、纤维

化、相邻结构受压等病理改变. Nanashima等<sup>[10]</sup>报道肿瘤的大小不能区分非典型动脉增强和低血供性的肿瘤. 这可解释为: Nanashima等<sup>[10]</sup>报道的病理包含所有3型的胆管癌(导管周围浸润、肿块型和胆管内生长型), 而本研究仅为肿块型. 另外, 同肝细胞癌动脉期早期强化类型相似, 有关富血供的解释也尚不明确.

另外, 本研究的影像和病理对照中, IMCCs动脉强化显示: 中央纤维基质显著减少( $P = 0.018$ )、细胞面积显著增加( $P = 0.046$ )、胆管细胞成分更为常见( $P < 0.001$ ), 而坏死少见( $P = 0.045$ ). 这与有关胆管细胞癌的报道一致<sup>[11-13]</sup>. 肿瘤的细胞分化与IMCCs的动脉期强化无显著的相关性( $P = 0.221$ ), 这与以往报道动脉期强化的肿瘤分化高于低强化, 且分化高的预后较好的观点有所不同. 因本研究和以往报道的分化较好的胆管癌的患者例数均太少, 故需大样本的研究加以证实.

本研究显示动脉期强化的肿瘤切除后生存率相关性好于典型强化组的相关性. 多变量分析显示: IMCCs的动脉期强化是肿瘤切除后生存率的独立性预后指标. Asayama等<sup>[11]</sup>报道: 延迟强化>2/3的病灶与肝硬化基质变性有关, 这种强化类型是预后较差的独立指标. 本研究表明: 肿瘤增强>50%者与中央基质少相关, 并且是良好的预后指标, 这与Asayama等<sup>[11]</sup>报道一致. 据此我们认为: IMCCs患者的肿瘤切除后生存率评估可在术前通过多时相CT表现进行预估.

本研究的限度, 首先是回顾性分析的限度. 但本研究含有病例数量相对较多的病理和手术证实为胆管癌的多时相CT影像资料; 第2点是分析者已知诊断和肿瘤部位信息, 所以不确定多时相CT诊断的假阳性或假阴性, 但我们主要的目的是分析IMCCs强化的影像特点与临床病理的相关性; 第3个限度是我们用了不同螺旋CT设备和不同采集参数, 尽管每次CT检查动脉强化后的时间和衰减的准确性分析是可行的; 第4个限度是术后的随访时间可能不足以评估长期的生存率.

总之, IMCCs的动脉期强化并非像以往认为的少见, IMCCs的动脉期强化有助于同肝细胞癌相鉴别, 且与IMCCs患者的预后密切相关. 病理上, IMCCs动脉期强化显示中央基质、非细胞面积和坏死少, 胆管细胞成分多于其他类型的IMCCs. 同较大的病灶比较, <3 cm的IMCCs病灶密度衰减更均匀、呈圆形、动脉期高强化. 另

#### ■同行评价

本文不仅病例数量较多, 且仅从一种分型出发分析, 具有说服力, 较好的临床参考价值.

外, IMCCs的动脉强化是肿瘤切除后生存率预后评估的独立指标, 据此有助于在术前评估患者的临床预后。

#### 4 参考文献

- 1 Lim JH. Cholangiocarcinoma: morphologic classification according to growth pattern and imaging findings. *AJR Am J Roentgenol* 2003; 181: 819-827
- 2 Kamel IR, Choti MA, Horton KM, Braga HJ, Birnbaum BA, Fishman EK, Thompson RE, Bluemke DA. Surgically staged focal liver lesions: accuracy and reproducibility of dual-phase helical CT for detection and characterization. *Radiology* 2003; 227: 752-757
- 3 Chen LD, Xu HX, Xie XY, Lu MD, Xu ZF, Liu GJ, Liang JY, Lin MX. Enhancement patterns of intrahepatic cholangiocarcinoma: comparison between contrast-enhanced ultrasound and contrast-enhanced CT. *Br J Radiol* 2008; 81: 881-889
- 4 Han JK, Choi BI, Kim AY, An SK, Lee JW, Kim TK, Kim SW. Cholangiocarcinoma: pictorial essay of CT and cholangiographic findings. *Radiographics* 2002; 22: 173-187
- 5 Kim SJ, Lee JM, Han JK, Kim KH, Lee JY, Choi BI. Peripheral mass-forming cholangiocarcinoma in cirrhotic liver. *AJR Am J Roentgenol* 2007; 189: 1428-1434
- 6 Luca A, Caruso S, Milazzo M, Mamone G, Marrone G, Miraglia R, Maruzzelli L, Carollo V, Minervini MI, Vizzini G, Gruttadauria S, Gridelli B. Multidetector-row computed tomography (MDCT) for the diagnosis of hepatocellular carcinoma in cirrhotic candidates for liver transplantation: prevalence of radiological vascular patterns and histological correlation with liver explants. *Eur Radiol* 2010; 20: 898-907
- 7 Yoon SH, Lee JM, So YH, Hong SH, Kim SJ, Han JK, Choi BI. Multiphasic MDCT enhancement pattern of hepatocellular carcinoma smaller than 3 cm in diameter: tumor size and cellular differentiation. *AJR Am J Roentgenol* 2009; 193: W482-W489
- 8 Uenishi T, Yamazaki O, Yamamoto T, Hirohashi K, Tanaka H, Tanaka S, Hai S, Kubo S. Serosal invasion in TNM staging of mass-forming intrahepatic cholangiocarcinoma. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 2005; 12: 479-483
- 9 Taira N, Takabatake D, Aogi K, Ohsumi S, Takashima S, Nishimura R, Teramoto N. Phyllodes tumor of the breast: stromal overgrowth and histological classification are useful prognosis-predictive factors for local recurrence in patients with a positive surgical margin. *Jpn J Clin Oncol* 2007; 37: 730-736
- 10 Nanashima A, Sumida Y, Abo T, Oikawa M, Murakami G, Takeshita H, Fukuoka H, Hidaka S, Nagayasu T, Sakamoto I, Sawai T. Relationship between pattern of tumor enhancement and clinicopathologic characteristics in intrahepatic cholangiocarcinoma. *J Surg Oncol* 2008; 98: 535-539
- 11 Asayama Y, Tajima T, Okamoto D, Nishie A, Ishigami K, Ushijima Y, Kakihara D, Aishima S, Taketomi A, Honda H. Imaging of cholangiolocellular carcinoma of the liver. *Eur J Radiol* 2010; 75: e120-e125
- 12 Chung YE, Kim MJ, Park YN, Choi JY, Pyo JY, Kim YC, Cho HJ, Kim KA, Choi SY. Varying appearances of cholangiocarcinoma: radiologic-pathologic correlation. *Radiographics* 2009; 29: 683-700
- 13 Asayama Y, Yoshimitsu K, Irie H, Tajima T, Nishie A, Hirakawa M, Nakayama T, Kakihara D, Taketomi A, Aishima S, Honda H. Delayed-phase dynamic CT enhancement as a prognostic factor for mass-forming intrahepatic cholangiocarcinoma. *Radiology* 2006; 238: 150-155
- 14 戴洪修, 鲁际, 周建雄, 谷家林, 刘卫红, 肖治明, 李海涛. 肝转移介入治疗前后CT容积测量的价值. *世界华人消化杂志* 2006; 14: 2358-2360
- 15 戴洪修, 谷家林, 鲁际, 周建雄, 刘卫红, 肖治明, 李海涛. 良恶性胃壁增厚的CT鉴别. *世界华人消化杂志* 2005; 13: 2886-2888

编辑 张姗姗 电编 鲁亚静

ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) CN 14-1260/R 2012年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

### 《世界华人消化杂志》参考文献要求

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

## 结肠脂肪瘤6例

田新社, 张慧松

田新社, 张慧松, 襄阳市铁路中心医院消化内科 湖北省襄阳市 441003

田新社, 主任医师, 主要从事消化内科临床及内镜的研究。

作者贡献分布: 田新社与张慧松对此文所作贡献均等, 共同搜集材料、撰写论文。

通讯作者: 田新社, 主任医师, 441003, 湖北省襄阳市樊城区中原路1号, 襄阳市铁路中心医院消化内科。tianxs@xftlyy.cn

电话: 0710-3021457

收稿日期: 2011-12-21 修回日期: 2012-01-19

接受日期: 2012-03-10 在线出版日期: 2012-03-18

### Colonic lipoma: an analysis of six cases

Xin-She Tian, Hui-Song Zhang

Xin-She Tian, Hui-Song Zhang, Department of Internal Medicine, Xiangyang Tielu Central Hospital, Xiangyang 441003, Hubei Province, China

Correspondence to: Xin-She Tian, Chief Physician, Department of Internal Medicine, Xiangyang Tielu Central Hospital, Xiangyang 441003, Hubei Province, China. tianxs@xftlyy.cn

Received: 2011-12-21 Revised: 2012-01-19

Accepted: 2012-03-10 Published online: 2012-03-18

#### Abstract

**AIM:** To summarize the clinical features of colonic lipoma and to analyze reasons for misdiagnosis of this disease.

**METHODS:** The clinical data for six patients with colonic lipoma who underwent treatment at our hospital from 1995 to 2010 were reviewed retrospectively to analyze the iconographic and clinicopathologic characteristics of the disease and the reasons for misdiagnosis.

**RESULTS:** Three patients initially diagnosed with colonic carcinoma at barium enema examination revealed a radiolucent spherical filling defect with well-defined margins. One patient was initially diagnosed with colonic polyposis by abdominal CT scanning. In all patients, colonoscopy revealed a lump located in the submucosa of the colon. Of six patients, one was diagnosed with colonic lipoma, three were misdiagnosed with colonic carcinoma, and two were misdiagnosed with colonic polyposis. Only one case was accurately diagnosed before hemicolectomy, and

the misdiagnosis rate was 83.3%. The reasons for misdiagnosis included rarity, unspecific clinical manifestations, absence of typical endoscopic findings because of inflammation and erosion of tumor surface, and doctor's insufficient knowledge of colonic lipoma.

**CONCLUSION:** Correct diagnosis of colonic lipoma can be achieved by multiple endoscopic biopsies. Endoscopic electroresection or local intestinal resection can be selected in patients with colonic lipoma.

**Key Words:** Symptomatic colonic lipoma; Diagnosis; Therapy

Tian XS, Zhang HS. Colonic lipoma: an analysis of six cases. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2012; 20(8): 699-702

#### 摘要

**目的:** 探讨结肠脂肪瘤的临床特点及误诊原因, 以提高诊断率。

**方法:** 调阅病历、结肠镜、腹部CT、结肠钡剂造影图像、结肠镜活检病理切片、手术切除标本病例切片等资料。对我院1995-2010年病理确诊的6例结肠脂肪瘤病例的临床、内镜下、影像学表现、病理图片及误诊原因进行回顾性分析。

**结果:** 3例行结肠钡剂造影, 见结肠充盈缺损, 诊断结肠癌; 1例行腹部CT检查, 诊断结肠息肉; 6例均行结肠镜检查, 均发现结肠黏膜下肿块; 诊断结肠癌3例、结肠息肉2例、结肠脂肪瘤1例。6例患者中, 仅1例术前获确诊。误诊率83.3%(5/6)。误诊原因主要有: 该病发病少, 临床少见; 临床表现无特异性; 瘤体表面因炎症、糜烂等, 失去内镜下典型表现而酷似结肠癌; 医生对本病认识不足。

**结论:** 内镜检查时结肠脂肪瘤瘤体同一部位多次深挖活检应可做出正确诊断。治疗可根据情况行内镜下高频电切除或行手术作肠段切除术。

**关键词:** 结肠脂肪瘤; 诊断; 治疗

#### 背景资料

结肠脂肪瘤是消化系统良性肿瘤, 临床少见。易误诊为结肠息肉、结肠癌等。有些病例甚至进行了结肠癌根治手术。

#### 同行评议者

王正康, 教授, 北京中日友好医院普通外科

## ■ 相关报道

李智宇等对结肠脂肪瘤内镜下典型表现进行了较详细描述。黄笛鸣等介绍了B超、CT、MRI等影像学检查在本病诊断中的意义。

田新社, 张慧松. 结肠脂肪瘤6例. 世界华人消化杂志 2012; 20(8): 699-702  
http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/699.asp

## 0 引言

结肠脂肪瘤为消化系良性肿瘤, 90%患者脂肪瘤体位于结肠黏膜下层, 少数可位于肌层和浆膜下层。75%患者能出现腹痛, 大便性状及排便习惯改变等临床表现, 仅有25%患者可出现肠梗阻和肠套叠严重并发症<sup>[1]</sup>; 瘤体因炎症、糜烂及溃疡在内镜下与结肠癌极其相似, 而活检时亦难以取到特异性脂肪组织, 给内镜下活检定性带来了困难。因结肠脂肪瘤缺乏特异性临床表现及辅助检查, 所以诊断困难且易于误诊。现对1995-2010年我院病理确诊6例结肠脂肪瘤进行回顾分析。

## 1 材料和方法

1.1 材料 本组结肠脂肪瘤6例, 均来至1995-2010年在本院就诊的病例。其中男4例, 女2例, 年龄43-64岁, 平均57岁。

### 1.2 方法

1.2.1 体格检查: 右中腹、左下腹压痛各2例; 右中腹、左下腹可触及肠管各1例, 均未扪及腹部包块; 腹部无阳性体征2例。

1.2.2 影像学检查: 3例行钡剂灌肠检查, 分别于升结肠、结肠肝曲、乙状结肠见长径1.0-3.0 cm椭圆形充盈缺损。诊断考虑: 结肠占位病变, 结肠癌可能。1例行腹部CT检查, 见结肠肝曲肠腔内直径2.0 cm之类椭圆形低密度块影, 边缘光滑, CT值-101HU, 密度均匀, 增强扫描无强化。诊断考虑结肠息肉。

1.2.3 结肠镜检查: 6例均行结肠镜检查: 均见肠腔肿块, 肿块长径1.0-4.0 cm。位于升结肠、结肠肝曲各2例, 乙状结肠、指肠各1例。其中肿块表面糜烂、破溃并肠腔狭窄3例, 诊断结肠癌可能。2例肿块表面充血, 呈草莓色, 诊断为结肠息肉。1例肿块为亚蒂, 表面呈黄色, 诊断结肠脂肪瘤。

1.2.4 结肠镜活检病理检查: 黏膜慢性炎症及少量坏死组织5例; 细胞异型增生2例; 脂肪瘤1例。均未见癌细胞。

1.2.5 实验室检查: 血、尿、便常规均正常; CEA等肿瘤标志物轻度升高2例, 正常4例; 大便潜血试验(++ )3例, (+)1例。

## 2 结果

2.1 主要临床表现 出现症状2-24 mo。慢性腹痛4

例, 大便次数增多3例, 便血1例。无症状2例(因痔疮术前常规结肠镜检查发现)。

2.2 钡剂结肠造影 3例行钡剂结肠造影检查, 诊断结肠癌。

2.3 腹部CT检查 1例行腹部CT检查, 诊断结肠息肉。

2.4 结肠镜检查 均发现结肠有肿块。其中肿块表面破溃、糜烂并肠腔变窄3例; 肿块表面充血2例; 亚蒂肿块表面呈黄色1例。诊断结肠癌3例, 结肠息肉2例, 结肠脂肪瘤1例。瘤体位于升结肠、乙状结肠各2例, 肝曲、直肠各1例。肿块长径1-4 cm(图1)。

2.5 切除标本病理检查 均为结肠黏膜下脂肪瘤(图2)。

2.6 治疗 5例行开腹手术肠段切除, 1例行内镜下电凝电切术。切除标本病理检查: 均为黏膜下脂肪瘤。6例均治愈出院, 无并发症。住院时间8-18 d。

2.7 误诊情况 6例结肠脂肪瘤, 仅1例术前确诊, 误诊为结肠癌3例, 结肠息肉2例, 误诊率83.3%(5/6)。

## 3 讨论

结肠脂肪瘤的发病机制尚未阐明。可能与炎症刺激致结缔组织变性, 组织内纤维小梁的腺管周围浸润或由于组织的淋巴供应和血液循环障碍导致脂肪组织沉积有关<sup>[2]</sup>, 也可能与全身脂肪代谢缺陷和Whipple病及肠营养不良有关<sup>[3]</sup>。

结肠脂肪瘤分为6型: (1)腔内型: 肿瘤突入肠腔内生长, 组织学为黏膜下脂肪瘤, 其表面糜烂、溃疡可反复出血, 甚至出现梗阻、肠套叠等相应的临床征象; (2)腔外型: 肿瘤向腹腔突出生长, 即组织学为浆膜下脂肪瘤, 但临床多无症状, 瘤体较大者腹部可触及光滑、活动的包块; (3)腔内外型: 肿瘤既向肠腔内、也向肠腔外同时生长; (4)肠壁间型: 肿瘤局限于肠壁间生长; (5)腔内外及肠壁间型; (6)环行生长型: 肿瘤环绕肠管生长<sup>[4]</sup>。以上各型分别占82.5%、3.6%、6.2%、6.2%、1%和0.5%。本组6例均为黏膜下脂肪瘤。

结肠镜是诊断结肠脂肪瘤的重要手段<sup>[5]</sup>。结肠脂肪瘤典型内镜表现为淡黄色球形肿块, 有时被黏膜血管颜色掩盖, 在对肿块表面施压时可呈现脂肪瘤特异性的淡黄色<sup>[6]</sup>。因脂肪瘤质地松软, 活检钳推压后其表面局部凹陷, 放开后迅速恢复原状, 称为“枕垫征”(pillow or cushion sign); 活检钳掀起其表面黏膜, 其内部脂肪组



图 1 结肠脂肪瘤内镜下表现.

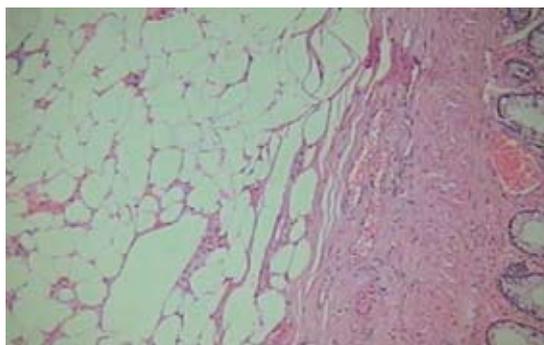


图 2 结肠脂肪瘤病理改变.

## ■ 创新盘点

本文从内镜医师的视角提出: 结肠镜检查时对瘤体同一部位多次深挖取材活检可助诊断.

织可随之隆起<sup>[7]</sup>, 称为“帐篷征”(tent sign); 对瘤体同一部位反复取活检, 其下方脂肪组织可以从黏膜破损处突出, 称为“裸脂征”(naked sign)<sup>[3]</sup>. 但有时因肿瘤表面慢性炎症、增生变硬、变厚而没有以上典型征象, 且活检难于取到深部组织送病检, 往往术前结肠镜检查未能明确诊断. 此外, 钡剂灌肠造影CT、MRI、B超等检查对结肠脂肪瘤的诊断有重要意义<sup>[3,8]</sup>. 而超声内镜检查确诊率为93.8%<sup>[9]</sup>, 并可明确脂肪瘤的类型.

结肠脂肪瘤术前诊断较为困难, 易误诊为结肠息肉、结肠癌等. 误诊原因与以下因素有关: (1)发病少、临床少见. 国外报道发生率为0.035%-4.4%<sup>[10,11]</sup>; (2)临床症状、体征缺乏特异性. 一般瘤体达到2-3 cm以上才会出现症状, 主要表现为腹痛、腹块、大便次数增多、肠梗阻等<sup>[1]</sup>. 与结肠炎、结肠癌、肠梗阻等症状相似. 本组6例, 4例有慢性腹痛, 3例有大便次数增多; (3)结肠镜下往往因瘤体表面炎症、糜烂、溃疡, 失去典型脂肪瘤内镜下表现而酷似结肠癌. 且由于反复糜烂修复, 表面黏膜增厚, 内镜活检时不易取到特征性脂肪组织; (4)临床医生, 尤其是内镜医生对本病认识不足, 仅满足于较常见的结肠癌、结肠息肉等诊断, 活检时未能深部取材而导致漏诊、误诊. 在行结肠镜时, 若医生对结肠脂肪瘤的内镜下特征有充分认识, 直视下深部取材活检应能取到瘤体脂肪组织而作出正确诊断. 本组1例采用瘤体同一部位多次深挖取材而确诊.

结肠脂肪瘤术前确诊, 关键在于与结肠癌的鉴别. 其临床意义在于: 避免行不必要的结肠癌根治术, 从而减轻患者痛苦, 降低手术风险, 减少治疗费用.

结肠脂肪瘤的治疗应根据其类型、瘤体大小、有无肠梗阻等并发症而有所选择. 脂肪瘤很

少癌变, 直径<2 cm, 无临床症状者可不予处理, 定时内镜随访; 蒂较长的腔内型脂肪瘤, 只要结肠镜圈套器能完整横断蒂部、横断部位距肠壁2-3 mm且瘤体可悬于肠腔者, 则可行内镜下电凝电切治疗. 因脂肪为不良导体, 电凝时瘤体中心脂肪组织不易凝固, 易导致出血或深部损伤, 要严格掌握适应症, 并仔细操作. 本组1例行高频电圈套切除, 未出现出血、穿孔等并发症.

非腔内型脂肪瘤及并发肠梗阻、肠套叠等并发症者, 则采用手术治疗, 作肠段切除<sup>[12,13]</sup>. 结肠脂肪瘤可伴消化系恶性肿瘤<sup>[4]</sup>. 因此术中应送快速冰冻切片, 并仔细检查结肠, 以避免遗漏另外的病灶<sup>[15]</sup>.

## 4 参考文献

- 1 Bahadursingh AM, Robbins PL, Longo WE. Giant submucosal sigmoid colon lipoma. *Am J Surg* 2003; 186: 81-82
- 2 陈志平, 潘群雄, 庄建良. 结肠脂肪瘤7例分析. *中国误诊学杂志* 2002; 2: 137
- 3 李智宇, 覃建章, 汪建平. 结肠脂肪瘤的诊断和治疗. *中华胃肠外科杂志* 2002; 5: 269-271
- 4 孙淑明, 刘婉秀, 徐新, 吴丽娥, 吴利标. 结肠脂肪瘤6例临床分析. *中国综合临床* 2005; 21: 58-59
- 5 Mason R, Bristol JB, Petersen V, Lyburn ID. Education and imaging. Gastrointestinal: lipoma induced intussusception of the transverse colon. *J Gastroenterol Hepatol* 2010; 25: 1177
- 6 Santhanam AN, Sillar RW, Roberts-Thomson IC. Education and imaging. Gastrointestinal: gastrointestinal lipomas. *J Gastroenterol Hepatol* 2006; 21: 1628
- 7 Du L, Shah TR, Zenilman ME. Image of the month—quiz case. Intussuscepted transverse colonic lipoma. *Arch Surg* 2007; 142: 1221
- 8 黄笛鸣, 谢文彪. 结肠脂肪瘤诊断与治疗(附2例报告). *南华大学学报医学版* 2008; 36: 121-123
- 9 张轶群, 姚礼庆, 秦新裕, 周平红, 徐美东, 侯英勇. 胃肠道脂肪瘤的诊断与治疗. *中华胃肠外科杂志* 2007; 10: 512-514
- 10 翟建文, 胡基刚, 徐岩. 结肠脂肪瘤误诊分析. *中国综合临床* 2002; 18: 447
- 11 Martin P, Sklow B, Adler DG. Large colonic lipoma mimicking colon cancer and causing colonic intussusception. *Dig Dis Sci* 2008; 53: 2826-2827
- 12 Paškauskas S, Latkauskas T, Valeikaitė G, Paršeliūnas

### ■同行评价

结肠脂肪瘤少见,术前确诊有一定困难,若能术前即确定诊断,常可避免不必要的手术,本文有一定参考价值。

- A, Svagždys S, Saladžinskas Z, Tamelis A, Pavalikis D. Colonic intussusception caused by colonic lipoma: a case report. *Medicina (Kaunas)* 2010; 46: 477-481
- 13 Jiang L, Jiang LS, Li FY, Ye H, Li N, Cheng NS, Zhou Y. Giant submucosal lipoma located in the descending colon: a case report and review of the literature. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 5664-5667
- 14 徐庆, 陈锦先, 崔喆, 王争, 王平治. 肠道脂肪瘤的诊断和治疗. *胃肠病学* 2004; 9: 158-160
- 15 张思宇. 大肠脂肪瘤15例报告. *中国普通外科杂志* 2003; 12: 274-275

编辑 张姗姗 电编 鲁亚静

ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) CN 14-1260/R 2012年版权归世界华人消化杂志

### • 消息 •

## 中国科技信息研究所发布《世界华人消化杂志》 影响因子 0.694

**本刊讯** 2011-12-02, 一年一度的中国科技论文统计结果由中国科技信息研究所(简称中信所)在北京发布。《中国科技期刊引证报告(核心版)》统计显示, 2010年《世界华人消化杂志》总被引频次3458次, 影响因子0.694, 综合评价总分60.6分, 分别位居内科学类49种期刊的第5位、第7位、第6位, 分别位居1 998种中国科技论文统计源期刊(中国科技核心期刊)的第79位、第320位、第190位; 其他指标: 他引率0.83, 被引半衰期4.9, 来源文献量712, 文献选出率0.90, 参考文献量17963, 平均引文数25.23, 平均作者数4.35, 地区分布数29, 机构分布数349, 基金论文比0.45, 海外论文比0.01. (编辑部主任: 李军亮 2012-01-01)

## YB-1和P53蛋白在结直肠肿瘤中的表达及意义

刘露露, 房新志, 郭云泉, 王晓璐, 杨丽丽

刘露露, 房新志, 郭云泉, 王晓璐, 杨丽丽, 新疆医科大学附属医院肿瘤病理科 新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市 830011  
作者贡献分布: 本研究由刘露露、房新志及王晓璐设计; 研究过程由房新志指导, 刘露露完成; 结果判读由房新志与郭云泉完成; 数据分析及论文撰写由房新志与杨丽丽指导, 刘露露完成。  
通讯作者: 房新志, 主任医师, 830011, 新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市苏州东街789号, 新疆医科大学附属医院肿瘤病理科。fxz19600128@126.com  
电话: 0991-7819012  
收稿日期: 2011-11-25 修回日期: 2011-12-24  
接受日期: 2012-03-10 在线出版日期: 2012-03-18

### Clinical significance of expression of YB-1 and P53 in colorectal tumors

Lu-Lu Liu, Xin-Zhi Fang, Yun-Quan Guo, Xiao-Lu Wang, Li-Li Yang

Lu-Lu Liu, Xin-Zhi Fang, Yun-Quan Guo, Xiao-Lu Wang, Li-Li Yang, Department of Pathology, Affiliated Tumor Hospital of Xinjiang Medical University, Urumuqi 830011, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China  
Correspondence to: Xin-Zhi Fang, Chief Physician, Department of Pathology, Affiliated Tumor Hospital of Xinjiang Medical University, Urumuqi 830011, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China. fxz19600128@126.com  
Received: 2011-11-25 Revised: 2011-12-24  
Accepted: 2012-03-10 Published online: 2012-03-18

### Abstract

**AIM:** To investigate the expression of YB-1 and P53 in colorectal carcinoma (CRC) of different stages and to analyze their correlation with clinicopathological features of CRC.

**METHODS:** Expression of YB-1 and P53 proteins in normal colorectal mucosa (NCM,  $n = 20$ ), low-grade colorectal intraepithelial neoplasia (LGIN,  $n = 30$ ), high-grade colorectal intraepithelial neoplasia (HGIN,  $n = 30$ ), and colorectal carcinoma (CRC,  $n = 50$ ) was detected by immunohistochemistry.

**RESULTS:** The strong positive rate of YB-1 expression in NCM was significantly lower than those in LGIN, HGIN, and CRC (0% vs 76.7%, 80.0%, 80.0%, all  $P < 0.05$ ). The strong positive expression of YB-1 was statistically correlated with lymph node metastasis and TNM stage in CRC (both  $P > 0.05$ ). The positive rate of P53

in NCM was significantly lower than those in LGIN, HGIN, and CRC (0% vs 6.7%, 40.0%, 60.0%, all  $P < 0.05$ ). The positive expression of P53 was statistically correlated with degree of tumor differentiation, lymph node metastasis and TNM stage in CRC (all  $P < 0.05$ ). The expression of YB-1 was positively correlated with that of P53 in CRC ( $r = 0.306$ ,  $P < 0.05$ ).

**CONCLUSION:** YB-1 and P53 play an important role in the development and metastasis of colorectal carcinoma. Combined detection of YB-1 and P53 proteins may be useful for judging the severity and prognosis of colorectal cancer.

**Key Words:** Colorectal tumors; YB-1; P53; Immunohistochemistry

Liu LL, Fang XZ, Guo YQ, Wang XL, Yang LL. Clinical significance of expression of YB-1 and P53 in colorectal tumors. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2012; 20(8): 703-707

### 摘要

**目的:** 探讨YB-1和P53蛋白在结直肠肿瘤不同发展阶段表达水平的差异及其与结直肠癌临床病理特征的关系。

**方法:** 采用免疫组织化学方法检测结直肠20例正常组织、30例低级别上皮内瘤变组织、30例高级别上皮内瘤变组织和50例癌组织中YB-1和P53蛋白的表达。

**结果:** YB-1蛋白在结直肠正常组织(NCM)、低级别上皮内瘤变组织(LGIN)、高级别上皮内瘤变组织(HGIN)和癌组织(CRC)中的强阳性率分别为0%、76.7%、80.0%、80.0%,低级别、高级别上皮内瘤变组织和癌组织中的强阳性表达率均与正常组织比较差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),且在癌组织中其强阳性表达与淋巴结转移和TNM分期有关( $P < 0.05$ ); P53蛋白在结直肠正常组织、低级别上皮内瘤变组织、高级别上皮内瘤变组织、癌组织中表达分别为0%、6.7%、40.0%、60.0%,高级别上皮内瘤变组织和癌组织中其表达率均与正常组织和低级别上皮内瘤变组织比较差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),其在癌组织中的表达

### ■背景资料

结直肠癌的发生发展是一个多阶段的过程,涉及癌基因、抑癌基因、错配修复基因、细胞周期调节基因还有一些蛋白质的改变。p53是与肿瘤关系最为亲密的抑癌基因,而YB-1作为细胞周期的重要正向调控因子,其在肿瘤发生、发展、调控细胞生长、介导耐药,参与DNA的转录和修复等方面也发挥重要作用。

### ■同行评议者

黄培林, 教授, 东南大学

■**研发前沿**  
结直肠癌患者的生存率是关注的重点,所以YB-1和P53蛋白的表达与患者的预后及其影响因素有待深入研究。

与分化程度、淋巴结转移和TNM分期有关( $P<0.05$ )。在癌组织中YB-1和P53的表达呈正相关性( $r = 0.306, P<0.05$ )。

**结论:** YB-1和P53蛋白在结直肠癌的发生发展、转移中起重要作用, YB-1和P53蛋白的联合检测可能为判断结直肠癌恶性程度和转移提供重要参考。

**关键词:** 结直肠肿瘤; YB-1; P53; 免疫组织化学

刘露露, 房新志, 郭云泉, 王晓璐, 杨丽丽. YB-1和P53蛋白在结直肠肿瘤中的表达及意义. 世界华人消化杂志 2012; 20(8): 703-707

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/703.asp>

## 0 引言

结直肠癌是消化系统常见的恶性肿瘤之一。近年来, 随着我国生活水平的不断提高及饮食习惯的改变, 结直肠癌的发病率及死亡率呈上升趋势<sup>[1]</sup>, 严重危害人们的健康。研究发现, 结直肠癌的发生发展除了涉及以癌基因和抑癌基因协同作用为基础的基因水平外, 还与多种蛋白质表达的差异相关。这些蛋白质往往具有不同的功能, 常与肿瘤的发生、发展、生物学行为和预后有关。本研究应用免疫组织化学方法检测结直肠肿瘤中YB-1和P53蛋白的表达, 旨在探讨二者在结直肠癌的发生发展过程中的差异及其与临床病理参数的关系和意义。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 2009-01/2010-12新疆医科大学附属肿瘤医院手术切除结直肠癌标本及内镜活检标本130例, 结直肠低级别上皮内瘤变30例, 高级别上皮内瘤变30例, 癌50例, 20例正常结直肠黏膜组织作为对照。50例结直肠癌中, 结肠癌25例, 直肠癌25例; 男26例, 女24例; 年龄36-81岁, 平均年龄为59.14岁; 均为腺癌, 高分化9例, 中分化22例, 低分化19例; I-II期20例, III-IV期30例; 有淋巴结转移22例, 无淋巴结转移28例。所有患者均为散发病例, 术前未作任何抗肿瘤治疗。兔抗人单克隆抗体YB-1购自美国Abcam公司, 兔抗人单克隆抗体P53及通用型两步法HRP二抗均购自北京中杉金桥生物制品有限公司。

**1.2 方法** 将10%中性甲醛固定、石蜡包埋的标本4  $\mu\text{m}$ 连续切片, 采用PV-9000二步法, 一抗分别为YB-1、P53兔抗人单克隆抗体, 用PBS替代一抗做阴性对照, 用已知乳腺癌阳性切片作阳

性对照。P53表达在细胞核, YB-1主要表达在细胞浆, 结果判断标准参考许良中等<sup>[2]</sup>的免疫组织化学反应结果的判断标准, 以细胞浆或细胞核出现黄至棕褐色颗粒为阳性显色, 结合染色强度和阳性细胞百分比来评定阳性表达病例。光镜下每张切片中选取癌细胞较多的5个高倍视野, 每个视野计数100个细胞。染色强度分级如下: 无着色为0分, 淡黄色为1分, 棕黄色为2分, 棕褐色为3分; 阳性细胞百分比分级为: 无阳性细胞为0分, 阳性细胞数 $\leq 10\%$ 为1分, 11%-50%为2分, 51%-75%为3分,  $>75\%$ 为4分。两项得分相乘结果 $\geq 3$ 分为阳性表达病例,  $<3$ 分为阴性表达病例, 其中0-2为(-), 3-4为(+), 6-8为(++), 9-12为(+++)。本文根据结果分析将YB-1表达为(++-+++ )者分为强阳性组, 将P53表达为(+ -+++ )者归为阳性组。

**统计学处理** 采用SPSS19.0统计软件, 计数资料率的比较采用 $\chi^2$ 检验, 相关性分析采用Spearman相关检验,  $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 YB-1和P53蛋白在4种组织中的表达** YB-1在结直肠正常组织(normal colorectal mucosa, NCM)、低级别上皮内瘤变组织(low-grade colorectal intraepithelial neoplasia, LGIN)、高级别上皮内瘤变组织(high-grade colorectal intraepithelial neoplasia, HGIN)和癌组织(colorectal carcinoma, CRC)中均表达, 但根据其表达强度不同, 其强阳性表达率(++-+++ )在4种组织中不同。LGIN、HGIN和CRC中的强阳性表达率均与NCM比较差异有统计学意义( $P<0.05$ ), 但其三者之间比较差异无统计学意义( $P>0.05$ , 图1, 表1)。P53在NCM中无表达, 在LGIN和HGIN中少量表达; 在HGIN和CRC中的阳性表达率均与NCM比较差异有统计学意义( $P<0.05$ ); 而在LGIN和HGIN及HGIN和CRC之间差异无统计学意义( $P>0.05$ , 图2, 表1)。

**2.2 YB-1和P53蛋白在结直肠癌中的表达与临床病理参数的关系** 在结直肠癌组织中YB-1强阳性表达率与淋巴结转移和TNM分期有关( $P<0.05$ ); 而与年龄、性别、肿瘤部位和分化程度无关( $P>0.05$ )。P53阳性率则与分化程度、淋巴结转移和TNM分期有关( $P<0.05$ ), 与其他病理参数无关( $P>0.05$ , 表2)。

**2.3 YB-1和P53蛋白在结直肠癌组织中表达的相关性** 在结直肠癌组织中, YB-1和P53表达呈正相关性( $r = 0.306, P<0.05$ , 表3)。

**应用要点**  
本研究用免疫组化方法检测YB-1和P53在结直肠癌组织中的表达,有助于探讨其在结直肠癌发生、发展中的作用,并为结直肠癌恶性程度判断和评估预后提供参考。

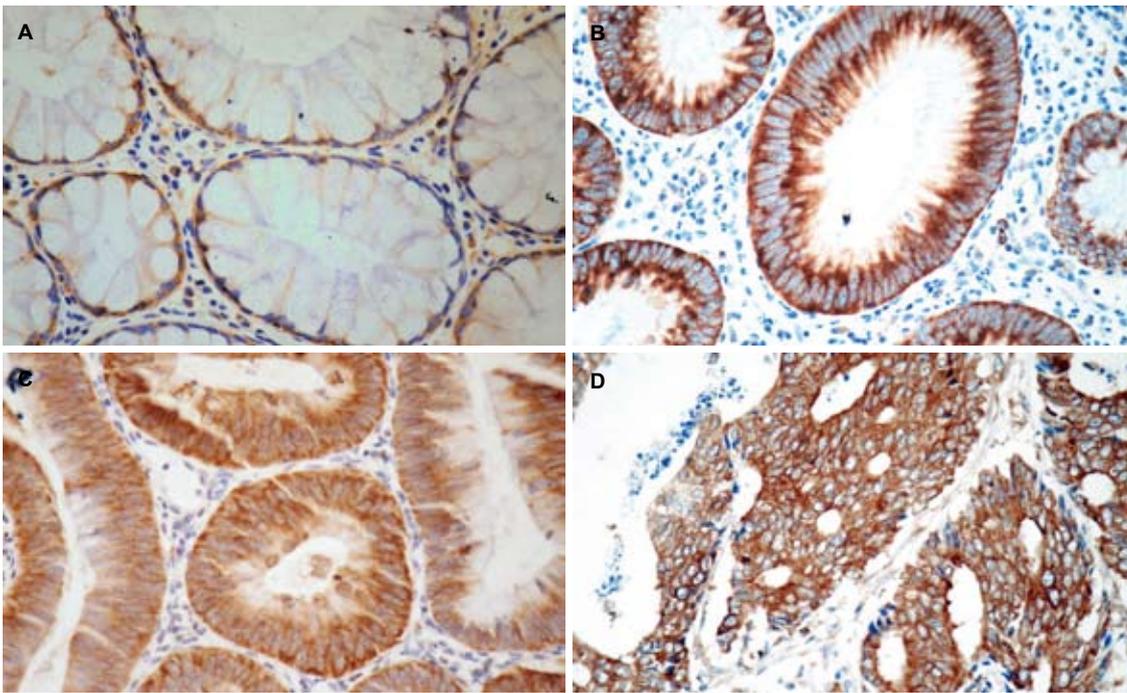


图 1 YB-1在4种组织中的表达(PV-9000, × 400). A: 结直肠正常组织; B: 低级别上皮内瘤变组织; C: 高级别上皮内瘤变组织; D: 癌组织.

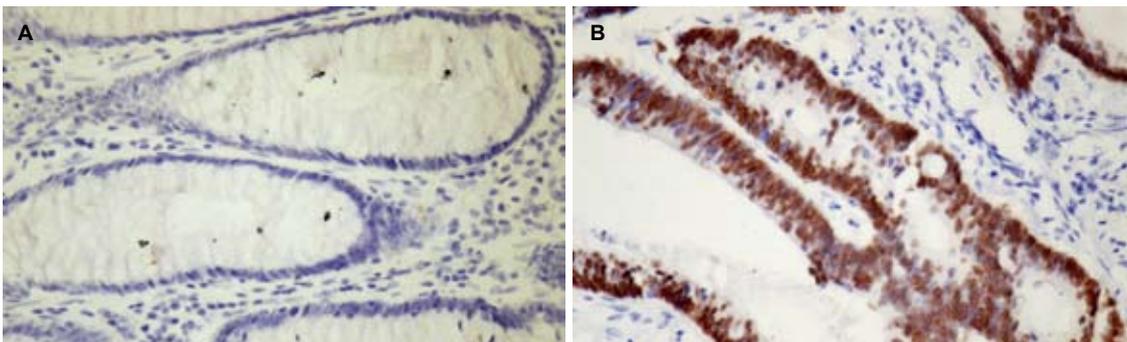


图 2 P53在结直肠正常组织和癌组织中的表达(PV-9000, × 400). A: 结直肠正常组织; B: 癌组织.

表 1 YB-1和P53蛋白在4种组织中的表达

分组	n	YB-1			强阳性率	P53				阳性率
		+	++	+++		-	+	++	+++	
正常黏膜	20	20	0	0	0%	20	0	0	0	0%
低级别上皮内瘤变	30	7	13	10	76.7% <sup>a</sup>	28	2	0	0	6.7%
高级别上皮内瘤变	30	6	11	13	80.0% <sup>a</sup>	18	4	3	5	40.0% <sup>ac</sup>
结直肠癌	50	10	19	21	80.0% <sup>a</sup>	20	2	5	23	60.0% <sup>ac</sup>

<sup>a</sup>P<0.05 vs 正常黏膜; <sup>c</sup>P<0.05 vs 低级别上皮内瘤变.

**2.4 YB-1和P53在结直肠癌组织中共表达与临床病理参数的关系** 在结直肠癌组织中, YB-1和P53的共表达率(YB-1+++和P53+和P53+++和P53++)与淋巴结转移和TNM分期有关, 有淋巴结转移组高于无淋巴结转移组, TNM分期Ⅲ-Ⅳ期组高于Ⅰ-Ⅱ期组(P<0.05, 表4); 而与年龄等无关.

### 3 讨论

YB-1属于Y-box结合蛋白家族成员, 是一类特异性结合目的基因启动子和增强子内部Y-box(CTGATTGGCCAA)序列的转录因子. YB-1存在于从细菌到人类的多种物种中, 可参与mRNA的选择性剪接、稳定和翻译功能调控、

### ■名词解释

YB-1蛋白: 即Y-box binding protein-1结合蛋白, 他结合在人类MHC ClassII基因的启动子区, 即Y-box DNA序列(CTGATTGGC-CAA), 作为顺式作用元件在基因转录调控中扮演重要角色。

表 2 YB-1和P53蛋白在结直肠癌中的表达与临床病理参数的关系

参数	n	YB-1		$\chi^2$ 值	P值	P53		$\chi^2$ 值	P值
		+	(++)-(+++)			-	(+)-(+++)		
年龄									
≥60	28	6	22			10	18		
<60	22	4	18	0.000	1.000	10	12	0.487	0.485
性别									
男	26	8	18			11	15		
女	24	2	22	2.649	0.104	9	15	0.120	0.729
肿瘤部位									
结肠	25	6	19			12	13		
直肠	25	4	21	0.500	0.480	8	17	1.333	0.248
分化程度									
高-中分化	31	7	24			16	15		
低分化	19	3	16	0.000	1.000	4	15	4.584	0.032
淋巴结转移									
有	22	1	21			1	21		
无	28	9	19	4.266	0.039	19	9	20.576	0.000
TNM分期									
I-II	20	8	12			12	8		
III-IV	30	2	28	6.380	0.012	8	22	5.556	0.018

表 3 YB-1和P53蛋白在结直肠癌组织中表达的相关性分析

P53	YB-1		r值	P值
	+	(++)-(+++)		
+	9	21		
-	1	19	0.306	0.045

DNA的修复、细胞增殖和再生调节, 表现出多功能核转录调控因子特性<sup>[3]</sup>. 研究证明, YB-1在癌旁正常组织低表达甚至不表达<sup>[4]</sup>, 但在多种应激、致癌因素及化疗药物作用下, 通过多种信号传导途径, 将诱导YB-1在细胞质中过表达<sup>[5,6]</sup>. YB-1已被证实和多种恶性肿瘤的发生发展相关, 如肺癌、乳腺癌、骨肉瘤和肠癌<sup>[7,8]</sup>等. 本研究结果显示, YB-1蛋白在结直肠正常黏膜组织中全呈弱表达, 这一点与YB-1在乳腺癌等的研究中完全不同, 原因可能归因于组织特异性<sup>[9]</sup>, 因为肠黏膜腺体不断增殖和脱落再生, 而乳腺腺体的生长却分为静止期和活动期. YB-1在低级别、高级别上皮内瘤变组织和癌组织中均呈强阳性表达, 且3者之间比较强阳性表达率差异无统计学意义 ( $P>0.05$ ), 但3者均与正常黏膜组织比较差异有统计学意义 ( $P<0.05$ ). 提示YB-1蛋白的检测在正常结直肠和结直肠低级别上皮内瘤变的鉴别诊断中具有重要意义. 在50例结直肠癌组织中, 我们发现随着临床分期的增加, YB-1蛋白的强阳

表 4 YB-1和P53共表达与临床病理参数的关系

参数	YB-1/P53(n)		P值
	(+)-(+++)/(21)	+/- (1)	
年龄			
≥60	12	0	
<60	9	1	0.455
性别			
男	11	1	
女	10	0	1.000
肿瘤部位			
结肠	8	1	
直肠	13	0	0.409
分化程度			
高-中分化	3	1	
低分化	18	0	0.182
淋巴结转移			
有	21	0	
无	0	1	0.045
TNM分期			
I-II	0	1	
III-IV	21	0	0.045

性表达率也逐渐增加, 提示YB-1蛋白表达升高与结直肠癌的进展有关, 其可能在促进肿瘤细胞浸润中起到了一定的作用. 而且, 有淋巴结转移组的YB-1蛋白强阳性表达率(95.5%)显著高于无淋巴结转移组67.9% ( $P<0.05$ ), 表明YB-1蛋白在肿瘤的转移、侵袭等活动中发挥作用.

p53基因是一种抑癌基因, 编码一种分子量为53 kDa的蛋白质, 因此命名为p53<sup>[10,11]</sup>. 正常细胞中P53蛋白是无突变的野生型P53, 他通过参与细胞周期的负调控而调节细胞的增殖与分化, 具有肿瘤生长抑制功能; 当发生缺失或突变后转变为突变型P53, 可促使细胞无限制生长, 引起癌变, 对肿瘤发生、发展起重要作用. 当组织中有P53蛋白的高表达时, 即表明有p53基因的突变. 研究表明, p53基因突变是癌变进程中的早期事件, 且随着肿瘤的发展, P53蛋白的阳性表达率明显升高. 本研究用免疫组织化学方法检测结直肠正常黏膜组织、低级别、高级别上皮内瘤变组织及癌组织中P53的表达水平, 发现他们之间存在显著差异( $P<0.05$ ). 表明p53基因突变在结肠癌的形成、发生发展中起重要作用. 在本研究中也发现, P53蛋白在TNM分期的III-IV期中的阳性表达率为73.3%, 高于TNM分期中的I-II期; 低分化组、有淋巴结转移组的阳性率也都明显升高(分别为78.9%、95.5%), 统计学差异明显( $P<0.05$ ), 且肿瘤分化程度越低, P53阳性表达率越高; 而与患者的性别、年龄、肿瘤部位无关( $P>0.05$ ), 与文献报道一致<sup>[12]</sup>. 说明P53在结直肠癌组织中的表达与TNM分期、淋巴结转移和分化程度均有相关性, 提示p53基因突变对癌细胞增殖的抑制作用减弱, 促进了癌细胞浸润及转移, 是结直肠癌发生发展及转移中的一个重要因素, 可能是反应结直肠癌生物学行为和预测预后的重要参数.

研究表明, YB-1蛋白可以作为抑癌基因p53的负调节因子<sup>[13]</sup>, 结合启动子, 从而抑制其转录<sup>[14]</sup>. YB-1蛋白减少了内生P53的水平, 从而降低了P53的活性, 这对依赖P53来达到细胞死亡的路径来说有着重要意义. 本研究也发现, YB-1与P53蛋白之间具有正相关( $P<0.05$ ), 提示YB-1可能会通过对P53的调节而促进肿瘤的发生发展. 有研究发现, 在鼠细胞中, YB-1可以和AP2、P53形成复合体, 然后结合到MMP2基因的增强子上从而激活MMP2的转录<sup>[15]</sup>, 而MMP2在肿瘤的侵袭和转移中起关键作用. 在本研究发现YB-1与P53蛋白的共表达均与肿瘤淋巴结转移和TNM分期密切相关( $P<0.05$ ), 由此推断, YB-1和P53的协同作用与结直肠癌组织的侵袭能力、转移倾向密切相关. 总而言之, YB-1和P53在结直肠的发生发展中具有重要意义, 联合检测可以作为判断结直肠

癌恶性程度和转移的重要参考.

#### 4 参考文献

- 1 王双双, 关景明, 范玉晶. 大肠癌发病的相关因素. 世界华人消化杂志 2005; 13: 534-536
- 2 许良中, 杨文涛. 免疫组织化学反应结果的判断标准. 中国癌症杂志 1996; 6: 229-231
- 3 Kohno K, Izumi H, Uchiumi T, Ashizuka M, Kuwano M. The pleiotropic functions of the Y-box-binding protein, YB-1. *Bioessays* 2003; 25: 691-698
- 4 Shibahara K, Sugio K, Osaki T, Uchiumi T, Maehara Y, Kohno K, Yasumoto K, Sugimachi K, Kuwano M. Nuclear expression of the Y-box binding protein, YB-1, as a novel marker of disease progression in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 2001; 7: 3151-3155
- 5 Bader AG, Vogt PK. Phosphorylation by Akt disables the anti-oncogenic activity of YB-1. *Oncogene* 2008; 27: 1179-1182
- 6 McCubrey JA, Steelman LS, Abrams SL, Lee JT, Chang F, Bertrand FE, Navolanic PM, Terrian DM, Franklin RA, D'Assoro AB, Salisbury JL, Mazzarino MC, Stivala F, Libra M. Roles of the RAF/MEK/ERK and PI3K/PTEN/AKT pathways in malignant transformation and drug resistance. *Adv Enzyme Regul* 2006; 46: 249-279
- 7 Gu C, Oyama T, Osaki T, Kohno K, Yasumoto K. Expression of Y box-binding protein-1 correlates with DNA topoisomerase II $\alpha$  and proliferating cell nuclear antigen expression in lung cancer. *Anti-cancer Res* 2001; 21: 2357-2362
- 8 Huang J, Tan PH, Li KB, Matsumoto K, Tsujimoto M, Bay BH. Y-box binding protein, YB-1, as a marker of tumor aggressiveness and response to adjuvant chemotherapy in breast cancer. *Int J Oncol* 2005; 26: 607-613
- 9 Shibao K, Takano H, Nakayama Y, Okazaki K, Nagata N, Izumi H, Uchiumi T, Kuwano M, Kohno K, Itoh H. Enhanced coexpression of YB-1 and DNA topoisomerase II  $\alpha$  genes in human colorectal carcinomas. *Int J Cancer* 1999; 83: 732-737
- 10 肖薇. p53在大肠癌中表达的研究. 中国当代医药 2010; 17: 82
- 11 张常华, 何裕隆, 詹文华, 王方金, 汪建平, 蔡世荣, 黄美近. 多发性结肠癌中抑癌基因p53的表达与突变. 中华实验外科杂志 2005; 23: 305-306
- 12 赵东兵, 高纪东, 单毅, 周志祥, 袁兴华, 吴健雄, 邵永孚. 结直肠癌根治术后转移复发的特点及预后分析. 中华胃肠外科杂志 2006; 9: 291-293
- 13 Lasham A, Moloney S, Hale T, Homer C, Zhang YF, Murison JG, Braithwaite AW, Watson J. The Y-box-binding protein, YB1, is a potential negative regulator of the p53 tumor suppressor. *J Biol Chem* 2003; 278: 35516-35523
- 14 Guay D, Gaudreault I, Massip L, Lebel M. Formation of a nuclear complex containing the p53 tumor suppressor, YB-1, and the Werner syndrome gene product in cells treated with UV light. *Int J Biochem Cell Biol* 2006; 38: 1300-1313
- 15 Matsumoto K, Abiko S, Ariga H. Transcription regulatory complex including YB-1 controls expression of mouse matrix metalloproteinase-2 gene in NIH3T3 cells. *Biol Pharm Bull* 2005; 28: 1500-1504

#### ■同行评价

本文联合检测YB-1和P53在结直肠癌中的表达, 更有助于结直肠癌浸润转移的判断, 立意新颖, 数据可信, 论证有据.

编辑 曹丽鸥 电编 鲁亚静

# 老年急腹症外科治疗97例

王涓滨, 司海流, 张勇, 郭晓军, 郑政, 李旭虎

## ■背景资料

老年人的急腹症起病隐匿、症状不典型、预后不佳等特点给外科医生们的诊断和处理带来困难, 社会和家庭对于老年人手术的态度又给我们带来很大的困扰, 因此有必要对这一问题进行更加深入的探讨。

王涓滨, 郭晓军, 郑政, 李旭虎, 中国人民解放军第323医院普外科 陕西省西安市 710054

司海流, 西安521医院普外科 陕西省西安市 710065

张勇, 中国人民解放军兰州军区机关门诊部 甘肃省兰州市 730000

作者贡献分布: 王涓滨与司海流对此文所作贡献均等; 此课题由王涓滨、司海流及张勇设计; 研究过程由张勇、郭晓军、郑政及李旭虎临床操作完成; 数据分析由王涓滨与司海流完成; 本论文写作由王涓滨、司海流及张勇完成。

通讯作者: 王涓滨, 医学博士, 副主任医师, 710054, 陕西省西安市建设西路6号, 中国人民解放军第323医院普外科。273052529@qq.com

收稿日期: 2011-11-09 修回日期: 2011-12-19

接受日期: 2012-03-10 在线出版日期: 2012-03-18

## Surgical treatment of acute abdomen in geriatric patients: an analysis of 97 cases

Wei-Bin Wang, Hai-Liu Si, Yong Zhang, Xiao-Jun Guo, Zheng Zheng, Xu-Hu Li

Wei-Bin Wang, Xiao-Jun Guo, Zheng Zheng, Xu-Hu Li, Department of General Surgery, the 323rd Hospital of Chinese PLA, Xi'an 710054, Shaanxi Province, China

Hai-Liu Si, Department of General Surgery, Xi'an 521 Hospital, Xi'an 710065, Shaanxi Province, China

Yong Zhang, the Clinic of Lanzhou Military Region of Chinese PLA, Lanzhou 730000, Gansu Province, China.

Correspondence to: Wei-Bin Wang, Associate Chief Physician, Department of General Surgery, the 323rd Hospital of Chinese PLA, Xi'an 710054, Shaanxi Province, China. 273052529@qq.com

Received: 2011-11-09 Revised: 2011-12-19

Accepted: 2012-03-10 Published online: 2012-03-18

## Abstract

**AIM:** To discuss the surgical treatment strategies for acute abdomen in geriatric patients.

**METHODS:** A retrospective analysis of the clinical data for 97 patients aged 60 years and above who had undergone emergency surgical interventions from 2006 to 2011 in our department was performed in terms of age, comorbidity, causes of acute abdomen, methods of surgery and outcome.

**RESULTS:** The patients ranged in age from 60 to 98 years (mean, 69 years  $\pm$  8 years), including 63 between 60-69 years, 23 between 70-79 years, and 11 above 80 years. The time between onset

of symptoms and diagnosis or surgical treatment is 2-240 h (mean, 69 h  $\pm$  61 h). Causes of acute abdomen include acute appendicitis (27%), bowel obstruction (26%), hollow viscus perforation (18%), strangulated hernia (16%), colonic neoplasm (11%), and primary peritonitis (2%). Of all patients, 22% had 1, 37% had 2, 33% had 3, and 8% have 4 or more comorbidities. Surgeries performed include appendectomy (23%), abdominal drainage (8%), ankyloenteron lysis (16%), enterostomy (13%), bowel resection (11%), perforation repair (18%), and hernia repair (16%). About 42% of patients recovered without complications; 54% experienced one or several complications, including pneumonia, stress ulcer, urinary system infection, renal dysfunction; 2% died; and 2% refused further treatment.

**CONCLUSION:** Although acute abdomen is severe and sometimes has worse results in geriatric patients, satisfactory results could be achieved through careful preparation, simple and rapid anesthesia and surgeries, and perioperative treatment.

**Key Words:** Geriatric surgery; Acute abdomen; Surgical treatment

Wang WB, Si HL, Zhang Y, Guo XJ, Zheng Z, Li XH. Surgical treatment of acute abdomen in geriatric patients: an analysis of 97 cases. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2012; 20(8): 708-711

## 摘要

**目的:** 探讨老年急腹症的外科治疗策略。

**方法:** 对2006-2011年收治的97例老年急腹症患者的年龄分布、并存病种类、急腹症原因和手术方法、预后等进行回顾性分析。

**结果:** 全组年龄60-98岁(平均69岁 $\pm$ 8岁): 60-69岁63例, 70-79岁23例, 80岁以上11例。从发病到就诊所用时间2-240 h (69 h $\pm$ 61 h)。引起急腹症的原因包括急性阑尾炎/伴穿孔26例(27%), 肠梗阻25例(26%), 空腔脏器穿孔18例(18%), 嵌顿疝15例(16%), 肠道肿瘤11例(11%), 原发性腹膜炎2例(2%)。并存1种疾病

## ■同行评议者

张进祥, 副教授, 华中科技大学同济医学院附属协和医院

者21例(22%), 2种36例(37%), 3种32例(33%), 4种以上8例(8%)。经过以外科手术为中心、多学科联合围手术期处理, 行阑尾切除术22例(23%), 腹腔引流术8例(8%), 肠粘连松解术16例(16%), 肠造瘘术13例(13%), 肠部分切除11例(11%), 穿孔修补术18例(18%), 腹股沟疝还纳、疝修补术15例(16%), 术后痊愈且没有并发症41例(42%)。共52例(54%)发生1种或数种并发症, 其中并发肺部感染38例(39%), 应激性溃疡4例(4%), 泌尿系统感染6例(6%), 肾功能异常2例(2%), 心功能不全3例(3%), 切口感染7例(7%), 切口裂开4例(4%), 维尼克脑病1例(1%), 均经及时治疗痊愈出院。死亡2例(2%), 放弃治疗2例(2%)。

**结论:** 采取快速和创伤最小的麻醉手术治疗, 配合多学科协作治疗老年急腹症可以取得满意的临床效果。

**关键词:** 老年外科; 急腹症; 外科治疗策略

王渭滨, 司海流, 张勇, 郭晓军, 郑政, 李旭虎. 老年急腹症外科治疗97例. 世界华人消化杂志 2012; 20(8): 708-711  
http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/708.asp

## 0 引言

2010年度我国首次发布了国家老龄事业数据《2009年度中国老龄事业统计公报》, 文中披露, 截止2009年底全国60岁及以上老年人口达到1.6714亿, 占总人口的12.5%。80岁以上老年人口达到1 899万, 占1.4%<sup>[1]</sup>。随着这样的老龄化进程, 外科医生们所要面对的老年患者将会越来越多, 其中急腹症是普外科较常见的急诊之一。老年人的急腹症起病隐匿、症状不典型、预后不佳等特点给外科医生们的诊断和处理带来困难, 社会和家庭对于老年人手术的态度又给临床医师带来很大的困扰, 因此有必要对这一问题进行更加深入的探讨。现将我科2006-07/2011-06收治的60岁以上老年急腹症患者的处理情况报道如下。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 本组患者共97例, 其中男56例, 女41例, 年龄60-98岁(平均69岁±8岁): 60-69岁63例, 70-79岁23例, 80岁以上11例。从发病到就诊所用时间2-240 h(±61 h)。急腹症分类: 急性阑尾炎/伴穿孔26例(27%), 肠梗阻25例(26%), 空腔脏器穿孔18例(18%), 嵌顿疝15例(16%), 肠道肿瘤11例(11%), 原发性腹膜炎2例(2%)。感染性疾病者

共采集到有效标本21例, 培养分离出病原菌26株, 其中大肠埃希氏菌12例(46%), 肺炎克雷伯菌8例(31%), 屎肠球菌5例(19%), 金黄色葡萄球菌1例(4%)。其他标本经普通培养无致病菌生长。并存病的确定标准以在二级以上医院相应专科确诊该病的病历为依据, 本组包括: 慢性支气管炎/肺气肿/肺心病35例(36%), 高血压42例(43%), 冠心病31例(32%), 脑血管疾病29例(30%), 糖尿病27例(28%), 前列腺增生25例(26%), 肾功能不全11例(11%), 其他13例(13%)。其中并存1种以上疾病者21例(22%), 2种36例(37%), 3种32例(33%), 4种以上8例(8%)。肠道肿瘤患者11例中, 并存有高血压10例(91%), 并存有糖尿病9例(82%), 并存有冠心病7例(64%), 并存有脑血管疾病7例(64%), 并存有前列腺增生4例(36%), 并存有慢性支气管炎/肺气肿/肺心病3例(27%)。肿瘤患者中并存1种疾病者为0, 并存2种疾病者3例(27%), 并存3种疾病者5例(45%), 并存4种以上疾病者3例(27%)。

**1.2 方法** 入院后或者从急诊科即开始快速、有重点的全面检查, 根据并存病情常规请心血管内科、呼吸内科、神经内科、内分泌科、肾内科、泌尿外科等相应专科会诊, 针对各种并存病提出围手术期处理意见和注意事项, 由我科与麻醉科综合评估手术风险<sup>[2]</sup>。

经过对全身状况的迅速调整、改善, 如补充液体、纠正水电解质紊乱、保护心肌等措施后, 术前30 min开始静滴敏感抗生素, 有感染性标本者及时取标本行细菌培养+药敏试验。酌情采取全麻或硬脊膜外麻醉, 以最快速度、最小创伤、最简单术式行剖腹探查, 并采用针对性手术方式迅速解决最主要病变问题, 全组共行阑尾切除术22例(23%), 腹腔引流术8例(8%), 肠粘连松解术16例(16%), 肠造瘘术13例(13%), 肠部分切除11例(11%), 穿孔修补术18例(18%), 腹股沟疝还纳、疝修补术15例(16%)。其中11例肠道肿瘤患者中2例(18%)行肿瘤根治性切除(左/右半结肠切除术), 3例(27%)行姑息性肠部分切除肠吻合术或短路术, 4例(36%)行肠造瘘术, 2例(18%)仅行剖腹探查为肿瘤晚期已无手术机会。

术后给予强力有效抗感染(依据细菌培养+药敏试验结果)、保护肺功能、保护心肌、保护肾功能、维持酸碱平衡和水电解质平衡等处理, 期间随时组织相关科室专家就全身状况和阶段性问题进行讨论和会诊。

## ■ 相关报道

Costamagna等对291例老年急腹症的研究发现, 234例(80.4%)完全缓解且没有并发症, 病死率仅5.3%。除了一些确实严重的病例以外, 绝大多数老年急腹症的手术治疗效果还是满意的。由此他们认为对老年人急腹症进行手术治疗是安全和可行的。

## ■ 研发前沿

老年人的急腹症情况比较危重, 并发症和病死率都比较高, 手术条件较差, 术后恢复效果也不及年轻人那么理想。但是, 面对日益增多的老年人口, 外科医生有责任有义务转变观念、运用现代化先进的设备技术和药品尽力去治疗老年急腹症问题。

## 2 结果

术后痊愈且没有并发症41例(42%)。52例发生1种或数种并发症, 其中并发肺部感染38例(39%), 应激性溃疡4例(4%), 泌尿系统感染6例(6%), 肾功能异常2例(2%), 心功能不全3例(3%), 切口感染7例(7%), 切口裂开4例(4%), 维尼克脑病1例(1%), 均经及时治疗痊愈出院。死亡2例(2%), 放弃治疗2例(2%)。

## 3 讨论

由于器官生理功能的衰退及各种老年病的侵袭, 老年急腹症患者较一般外科患者更为复杂多变, 其腹部情况往往症状隐蔽或不典型。老年患者都有不同程度和种类的并存病, 易与外科疾病相混淆, 造成患者或家属的麻痹和忽视, 就诊往往比较晚<sup>[3]</sup>。本组患者就诊时间平均在69 h±61 h, 很多患者来院时甚至已经发病1 wk到10 d(本组最高时长为240 h)。很多情况下, 医生在面对错综复杂的老年外科患者时也是难以定论, 鉴别诊断困难, 医生经验不足时甚至会贻误诊断和治疗, 造成严重后果。国外已经有学者开始针对老年患者的术前状况评估进行专门研究, 提出了一套针对老年肿瘤患者的规范评估程序称为PACE(preoperative assessment of cancer in the elderly)<sup>[4]</sup>。

在本组老年急腹症患者中, 尚有一部分肠道肿瘤患者(11%), 这部分患者往往病期较晚、肠道条件很差, 并存疾病比其他患者更多一些, 如糖尿病、高血压、冠心病、脑血管疾病等, 对于外科医生的临床决策带来极大挑战, 不及时手术可能会贻误病情, 盲目冒进则很容易引起全身衰竭、严重感染、并存疾病加重等危象, 需要慎之又慎<sup>[5]</sup>。即使及时诊断了老年急腹症, 由于老年人身体基础条件很差, 并存病较多且严重, 手术条件不如其他年龄患者好, 临床和麻醉医师在手术的决策方面也是难于决断<sup>[6]</sup>。老年急腹症患者的基础条件导致其术后恢复缓慢而困难, 并发症较多<sup>[7]</sup>, 甚至死亡<sup>[8]</sup>, 本组患者中就有2例因腹腔感染过重引起多器官衰竭(MOF)死亡病例。20世纪初期医学界一般认为50岁以上患者的手术是困难的, 甚至有些医院将50岁以上人群列为手术禁忌<sup>[9]</sup>。由于年龄、体质、家庭状况、风俗习惯、经济状况等因素, 有的老年人及其家属在老人病重时态度不够积极, 甚至很早就放弃治疗, 尤其是西部地区农村人群中由于经济原因放弃的情况时有发生, 令人惋惜。

虽然老年患者有着上述一些不利因素, 但是随着科学技术的进步和社会生活条件的改善, 我们已经有能力也有必要对老年外科患者尤其是急腹症患者进行积极的干预。Costamagna等<sup>[10]</sup>对291例老年急腹症的研究发现有234例(80.4%)完全缓解且没有并发症, 病死率仅5.3%, 除了一些确实严重的病例以外, 绝大多数老年急腹症的手术治疗效果还是满意的。由此他们认为对老年人的急腹症进行手术治疗是安全和可行的。本组患者普遍年龄偏大, 但是经过综合评估和多学科协作, 我们还是对大多数患者进行了手术治疗, 阑尾切除术、肠粘连松解术、穿孔修补术、腹股沟疝还纳疝修补术都取得满意的效果, 部分肿瘤患者还行根治性右或左半结肠切除术, 也都顺利康复。部分腹腔感染严重者做了腹腔引流也取得不错效果。而比较晚期或肠道条件差的肠道肿瘤患者不宜根治性切除, 而仅做了姑息性的肠部分切除甚至肠造瘘术<sup>[11]</sup>, 还有更晚期无手术机会者则只能遗憾地选择放弃手术-“开关术”。

老年急腹症的处理最重要的是多学科团队合作。本组患者大多都有一定程度的并存病, 一般都有2-3种(2种37%, 3种33%), 多者达到4种以上(8%)。外科处理之前首先要清楚患者的全身状况、并存病的种类和程度、治疗进程以及整体耐受麻醉手术的能力, 有一些并存病还需要立即进行有效干预, 比如血糖升高、心肌缺血、呼吸功能不全等, 使其达到麻醉手术的需求。老年急腹症往往同时出现腹腔感染、肺部感染、泌尿系统感染等情况, 目前认为感染又往往成为MOF的始动因子, 因此及时控制感染至关重要。我们一般在患者入院手术前先根据感染部位和经验选用常用广谱抗生素和抗厌氧菌药物, 第一时间采取标本做细菌培养+药敏试验, 以后严格根据药敏试验结果选用抗菌药物, 一方面及时治疗原发部位感染, 另一方面有效预防和治疗可能的肺部感染和泌尿系感染等感染性并发症。老年人的器官功能衰退, 免疫防御能力较弱, 组织愈合能力较差, 在麻醉和手术方式的选择方面力求简单、快速、创伤最小化<sup>[12]</sup>。尽可能缩短麻醉手术时间, 减少手术创伤, 简化手术操作和术后处理。例如对于肠梗阻患者, 在剖腹探查明确梗阻原因后, 尽快决策, 尽量以最简单的方式处理梗阻, 肿瘤患者在没有肠道准备的情况下尽可能不做肠切除肠吻合, 以先期肠造瘘较为稳妥, 待一般情况恢复、肠道情况

改善后再二期行肠切除肠吻合。个别右半结肠病变且肠道情况良好的病例也可以考虑先肠道灌洗再行肠切除肠吻合<sup>[13]</sup>。老年急腹症的术后营养支持非常必要, 我科对于此类急腹症患者常规进行静脉营养治疗, 补充足够的热量和蛋白质, 确保全身状况尽快改善, 促进手术部位愈合。肠功能恢复后尽快改用肠道内营养, 以恢复肠道正常内环境, 为手术部位和切口愈合、抵御感染、避免并发症提供足够的能量和物质基础。

应该看到, 虽然老年人的急腹症情况比较危重, 并发症和病死率都比较高, 手术条件较差, 术后恢复效果也不及年轻人那么理想<sup>[14]</sup>。但是, 面对日益增多的老年人口, 外科医生们有责任有义务转变观念、运用现代化先进的设备技术和药品尽力去治疗老年急腹症问题<sup>[15]</sup>。我们也相信, 随着技术的进步、人们观念意识的转变、经验的积累, 老年急腹症的治疗会更加成功和满意。

#### 4 参考文献

- 1 全国老龄工作委员会办公室. 2009年度中国老龄事业发展统计公报. Available from: URL: [http://www.cpdc.org.cn/tjsj/tjsj\\_gb\\_detail.asp?id=12541](http://www.cpdc.org.cn/tjsj/tjsj_gb_detail.asp?id=12541)
- 2 Pasetto LM, Lise M, Monfardini S. Preoperative assessment of elderly cancer patients. *Crit Rev Oncol Hematol* 2007; 64: 10-18
- 3 Buchholz J, Mayer M, Krawzak HW, Kruse F. [Appendicitis in the aged]. *Zentralbl Chir* 1991; 116: 253-260
- 4 Audisio RA, Pope D, Ramesh HS, Gennari R, van Leeuwen BL, West C, Corsini G, Maffezzini M, Hoekstra HJ, Mobarak D, Bozzetti F, Colledan M, Wildiers H, Stotter A, Capewell A, Marshall E. Shall we operate? Preoperative assessment in elderly cancer patients (PACE) can help. A SIOG surgical task force prospective study. *Crit Rev Oncol Hematol* 2008; 65: 156-163
- 5 Kim JP, Kim SJ, Lee JH, Kim SW, Choi MG, Yu HJ. Surgery in the aged in Korea. *Arch Surg* 1998; 133: 18-23
- 6 Bosshardt TL. Outcomes of ostomy procedures in patients aged 70 years and older. *Arch Surg* 2003; 138: 1077-1082
- 7 Page MJ, Poritz LS, Kunselman SJ, Koltun WA. Factors affecting surgical risk in elderly patients with inflammatory bowel disease. *J Gastrointest Surg* 2002; 6: 606-613
- 8 Lee JF, Leow CK, Lau WY. Appendicitis in the elderly. *Aust N Z J Surg* 2000; 70: 593-596
- 9 顾倬云. 老年外科学. 北京: 人民卫生出版社, 1995: 6-16
- 10 Costamagna D, Pipitone Federico NS, Erra S, Tribocco M, Poncina F, Botto G, Deregibus P, Zullo A, Servente G, Durando R. Acute abdomen in the elderly. A peripheral general hospital experience. *G Chir* 2009; 30: 315-322
- 11 Ramesh HS, Pope D, Gennari R, Audisio RA. Optimising surgical management of elderly cancer patients. *World J Surg Oncol* 2005; 3: 17
- 12 Di Carlo I, Toro A, Sparatore F, Primo S, Barbagallo F, Di Blasi M. Emergency gastric ulcer complications in elderly. Factors affecting the morbidity and mortality in relation to therapeutic approaches. *Minerva Chir* 2006; 61: 325-332
- 13 Koperna T, Kissler M, Schulz F. Emergency surgery for colon cancer in the aged. *Arch Surg* 1997; 132: 1032-1037
- 14 Gürleyik G, Gürleyik E. Age-related clinical features in older patients with acute appendicitis. *Eur J Emerg Med* 2003; 10: 200-203
- 15 Fornaro R, Stabilini C, Picori E, Frascio M, Ricci B, Canaletti M, Monteleone L, Davini MD, Gianetta E. [Abdominal emergency surgery in the geriatric patients. Our experience]. *G Chir* 2006; 27: 137-144

■同行评价  
本文对临床医师有一定参考价值。

编辑 曹丽鸥 电编 鲁亚静

ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) CN 14-1260/R 2012年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

### 《世界华人消化杂志》2011年开始不再收取审稿费

本刊讯 为了方便作者来稿, 保证稿件尽快公平、公正的处理, 《世界华人消化杂志》编辑部研究决定, 从2011年开始对所有来稿不再收取审稿费。审稿周期及发表周期不变。(编辑部主任: 李军亮 2011-01-01)

# 胃癌前列腺转移1例

陈颖, 金波, 刘云鹏

## ■背景资料

胃癌晚期可以出现肺脏、肝脏、网膜等多处转移, 主要转移途径有淋巴结转移, 血行转移及种植转移。但由于前列腺的血供占心排量的比例很小, 因此胃癌血行转移至前列腺的概率很小。

陈颖, 金波, 刘云鹏, 中国医科大学附属第一医院肿瘤内科  
辽宁省沈阳市 110001

陈颖, 医师, 主要从事实体肿瘤诊疗的研究。

国家自然科学基金资助项目, No. 30770993

作者贡献分布: 本文写作由陈颖完成; 由金波提供病例资料; 刘云鹏进行修改指导。

通讯作者: 刘云鹏, 教授, 110001, 辽宁省沈阳市和平区南京街155号, 中国医科大学附属第一医院肿瘤内科。

liuyunpeng@medmail.com.cn

电话: 024-83282542

收稿日期: 2012-01-04 修回日期: 2012-01-20

接受日期: 2012-03-15 在线出版日期: 2012-03-18

## Prostate metastasis from gastric tumor: a report of one case

Ying Chen, Bo Jin, Yun-Peng Liu

Ying Chen, Bo Jin, Yun-Peng Liu, Department of Medical Oncology, the First Hospital of China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30770993

Correspondence to: Yun-Peng Liu, Professor, Department of Medical Oncology, the First Hospital of China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China. liuyunpeng@medmail.com.cn

Received: 2012-01-04 Revised: 2012-01-20

Accepted: 2012-03-15 Published online: 2012-03-18

## Abstract

Here we report a case of prostate metastasis from gastric tumor in a 69-year-old man. Three years ago, he underwent gastrectomy for mucinous gastric carcinoma. He was admitted to our hospital due to micturition arduous and perineal pain. Ultrasound-guided biopsy of the prostate indicated prostate infiltration of the mucin-secreting adenocarcinoma. Immunohistochemistry indicated PSA negativity and positivity for CK20, CA19-9, and CEA. We arrived at the conclusion that we were dealing with the same neoplasia.

Key Words: Gastric tumor; Metastasis; Prostate metastasis

Chen Y, Jin B, Liu YP. Prostate metastasis from gastric tumor: a report of one case. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2012; 20(8): 712-713

## ■同行评议者

王正康, 教授, 北京中日友好医院  
普通外科

## 摘要

胃癌前列腺转移为临床少见病例。本例患者, 男性, 69岁, 3年前行胃大部切除术, 术后病理为黏液腺癌。2011-10因排尿费力伴有会阴部疼痛就诊, 前列腺穿刺活检病理考虑为黏液腺癌, 免疫组织化学PSA阴性, CK20、CK19-9、CEA阳性, 结合病史考虑为胃癌前列腺转移。

关键词: 胃癌; 转移; 前列腺转移癌

陈颖, 金波, 刘云鹏. 胃癌前列腺转移1例. 世界华人消化杂志 2012; 20(8): 712-713

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/712.asp>

## 0 引言

胃癌是我国常见消化系恶性肿瘤之一, 晚期患者可以出现肺脏、肝脏、网膜等多处转移, 但前列腺转移少见, 现将我院1例胃癌术后确诊为前列腺转移的病例报道如下。

## 1 病例报告

男, 69岁, 3年前因出现腹痛、体质量减轻就诊。行胃镜示: 胃窦部溃疡; 病理为: 黏液腺癌。2008-07行胃大部切除术, 术后病理: 黏液腺癌, 侵出浆膜, 大网膜阴性, 区域淋巴结1/25枚转移, 完善肺CT等检查未见转移; 术后分期: T4N1M0(ⅢA期)。术后给予FOLFOX方案化疗4周期, 患者因为化疗的不良反应而未再接受抗肿瘤治疗。之后每3 mo定期随访, CEA、CA19-9一直在正常范围内, 腹部增强CT未见异常, 1年前曾行胃镜检查未见异常。2011-08患者出现排尿费力, 伴有会阴部疼痛, 未在意。2 mo后患者上述症状加重遂就诊于我院泌尿外科。直肠指诊: 前列腺Ⅱ度大, 质硬, 有压痛, 右侧叶触及1枚结节。血清PSA正常。前列腺彩超示: 前列腺52×48×49 mm大小。前列腺MRI: 前列腺占位不除外。于2011-10-17行超声引导下前列腺穿刺活检。病理回报: 前列腺黏液腺癌; 免疫组织化学检查显示: PSA(-), CK20(+), CA19-9(+), CEA(+)(图1), 结合病史考虑为胃癌转移。转入我科, 进一步完

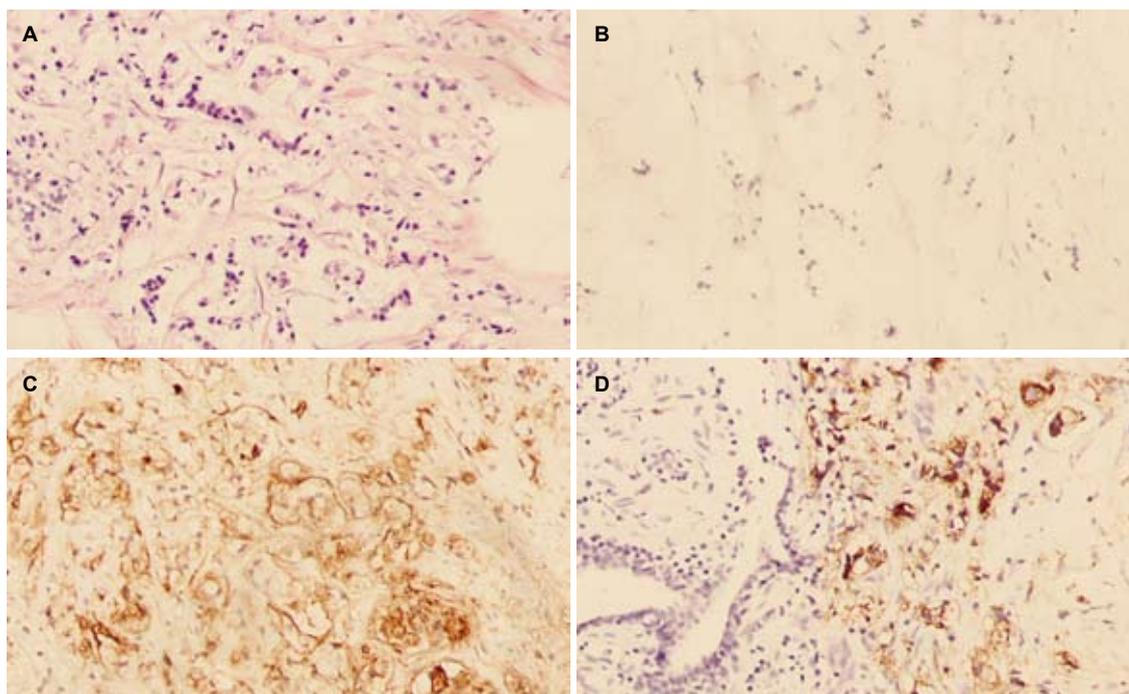


图 1 前列腺转移灶免疫组织化学染色. A: HE; B: PSA; C: CA19-9; D: CEA.

#### ■ 相关报道

Manuel等曾报道过1例胃印戒细胞癌转移至前列腺的病例, 该病例通过胃癌术后病理与前列腺转移病灶穿刺病理进行对比得以确诊, 并对其治疗和临床意义进行了分析.

善骨ECT、腹部增强CT、肺CT均未见异常.

综上诊断为胃癌(IV期, 前列腺转移), 给予患者多西他赛联合替吉奥方案化疗2周期, 排尿费力及会阴部疼痛明显好转, 现继续治疗中.

## 2 讨论

胃癌发生前列腺转移很罕见, 之前曾有相关报道多为胃印戒细胞癌转移至前列腺, 关于胃黏液腺癌转移至前列腺鲜有报道. 胃黏液腺癌是胃癌的少见亚型, 其所占比例为2.4%-4.9%, 其预后较非黏液腺癌差<sup>[1]</sup>. 胃黏液腺癌的转移方式与其他类型胃癌的转移方式相同, 主要有淋巴结转移, 血行转移及种植转移. 其血行转移以肝、肺最多见, 这与门脉系统和肺的血流动力学相关. 由于前列腺的血供占心排量的比例很小, 因此胃癌血行转移至前列腺的概率也很小. 前列腺转移病灶多是周围组织的浸润, 但该患者腹部增强CT及前列腺MRI未显示前列腺周围有受累, 且腹腔内未见种植转移病灶. 前列腺的淋巴系统由沿髂内动脉分布的髂内淋巴结汇入髂总淋巴结, 再汇入腰淋巴结. 这并不是胃癌常规的转移通路<sup>[2]</sup>, 综上考虑为血行转移. 此时我们需要注意与原发前列腺黏液腺癌相鉴别.

目前前列腺黏液腺癌的报道仍不多见, 文献统计其约占前列腺肿瘤的0.4%左右. 分泌大

量黏液为前列腺黏液腺癌的病理学特点, 前列腺黏液腺癌细胞对PAP、PSA标识阳性, 对癌胚抗原则为阴性. 有研究认为大约有77.8%的患者血清PSA可升高<sup>[3]</sup>. 该患者胃癌术后病理为黏液腺癌, 前列腺穿刺活检病理为黏液腺癌, 并且免疫组织化学检查显示: PSA(-), CK20(+), CA19-9(+), CEA(+), 结合病史考虑为胃癌前列腺转移, 不过遗憾的是患者无法提供胃癌手术的病理切片进行对比核实. 该患者根据胃癌NCCN指南, 给予多西他赛联合替吉奥化疗, 2周期后患者排尿费力及会阴部疼痛的症状明显缓解, 现仍规律治疗中. 对于该病例提示我们在临床上对于胃癌的患者, 应注意到前列腺等少见部位转移的情况, 并注意与转移病灶的原发癌鉴别, 尽量获取转移病灶的病理学资料尤为重要.

## 3 参考文献

- 1 Yan C, Zhu ZG, Yan M, Zhang H, Pan ZL, Chen J, Xiang M, Chen MM, Liu BY, Lin YZ. Clinicopathological characteristics and computed tomography features of mucinous gastric carcinoma. *J Int Med Res* 2011; 39: 291-301
- 2 郝元, 燕敏. 胃癌术后前列腺转移1例报道. *上海交通大学学报(医学版)* 2007; 27: 624-625
- 3 Saito S, Iwaki H. Mucin-producing carcinoma of the prostate: review of 88 cases. *Urology* 1999; 54: 141-144

#### ■ 同行评价

胃癌前列腺转移少见, 本文报告1例, 并分析了可能的转移途径及与原发前列腺癌的鉴别, 提供了有意义的信息.

编辑 张姗姗 电编 鲁亚静

# 《世界华人消化杂志》投稿须知

《世界华人消化杂志》为保证期刊的学术质量,对所有来稿均进行同行评议,是一份被中国科技论文统计源核心期刊、中文核心期刊要目总览收录的学术类期刊。

## 1 投稿总则

1.1 性质 《世界华人消化杂志》[ISSN 1009-3079 (print), ISSN 2219-2859 (online), CN 14-1260/R]是一份同行评议性和开放获取(open access, OA)的旬刊。OA最大的优点是面向全国本领域专家及公众开放无需注册,免费获取PDF等格式的全文,切实破除了传统性期刊阻碍科学研究成果快速传播的障碍。OA是一项真正意义上的公益性科学传播工具,编委、作者和读者利益的最大化的目标,努力推进本学科的繁荣和发展。

《世界华人消化杂志》定价68.00元,全年2448.00元,邮发代号82-262,由世界华人消化杂志编辑部出版。《世界华人消化杂志》主要报道胃肠病学、肝胆病学、胰腺病学、内镜介入与消化外科等多学科的评论及基础研究和临床实践等各类文章,具体内容涉及:食管疾病,如反流性食管炎、Barret's食管、食管静脉曲张和食管癌等;胃部疾病,胃食管反流性疾病、胃炎、胃动力障碍、胃出血、胃癌和幽门螺杆菌感染等;肠道疾病,如肠道出血、肠穿孔、肠梗阻、肠道炎症(如IBD/CD等)、肠道感染、大肠癌和大肠腺瘤等;肝胆部疾病如病毒性肝炎、肝硬化、脂肪肝、肝纤维化、肝衰竭、胆石病、胆汁郁积、梗阻性黄疸、肝癌、胆囊癌、胆管癌和门静脉高压等;胰腺疾病,如胰腺炎和胰腺癌等;全身性疾病涉及消化系统,如自身免疫性及瘀胆性疾病、腹腔疾病、消化不良和代谢性疾病等;以及与以上疾病相关的基因及基因组学、微生物及分子生物学、病因学、流行病学、免疫学、临床内外科诊断与治疗(如影像、化疗、移植、营养等);除以上外,本刊也报道诊断与筛选、内窥镜检查法、影像及先进技术。

《世界华人消化杂志》被国际检索系统美国《化学文摘》(Chemical Abstracts, CA)、荷兰《医学文摘库/医学文摘(EMBase/Excerpta Medica, EM)》和俄罗斯《文摘杂志(Abstract Journal, AJ)》收录。国内为中国科技论文统计与分析期刊(科技部列选为中国科技论文统计源期刊)、《中文核心期刊要目总览》(2008年版)内科学类的核心期刊、《中国学术期刊评价研究报告-RCCS权威、核心期刊排行榜与指南》

和中国知识资源总库收录。《中国科技期刊引证报告(核心版)》统计显示,2010年《世界华人消化杂志》总被引频次3 458次,影响因子0.694,综合评价总分60.6分,分别位居内科学类49种期刊的第5位、第7位、第6位,分别位居1 998种中国科技论文统计源期刊(中国科技核心期刊)的第79位、第320位、第190位;其他指标:他引率0.83,被引半衰期4.9,来源文献量712,文献选出率0.90,参考文献量17 963,平均引文数25.23,平均作者数4.35,地区分布数29,机构分布数349,基金论文比0.45,海外论文比0.01。

1.2 栏目 述评,基础研究,临床研究,焦点论坛,文献综述,研究快报,临床经验,病例报告,会议纪要。文稿应具科学性、先进性、可读性及实用性,重点突出,文字简练,数据可靠,写作规范,表达准确。

## 2 撰稿要求

2.1 总体标准 文稿撰写应遵照国家标准GB7713科学技术报告、学位论文和学术论文的编写格式,GB6447文摘编写规则,GB7714文后参考文献著录规则,GB/T 3179科学技术期刊编排格式等要求;同时遵照国际医学期刊编辑委员会(International Committee of Medical Journal Editors)制定的《生物医学期刊投稿的统一要求(第5版)》(Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals)。见: *Ann Intern Med* 1997; 126: 36-47。

2.2 名词术语 应标准化,前后统一,如原词过长且多次出现者,可于首次出现时写出全称加括号内注简称,以后直接用简称。医学名词以全国自然科学名词审定委员会公布的《生理学名词》、《生物化学名词与生物物理学名词》、《化学名词》、《植物学名词》、《人体解剖学名词》、《细胞生物学名词》及《医学名词》系列为准,药名以《中华人民共和国药典》和卫生部药典委员会编的《药名词汇》为准,国家食品药品监督管理局批准的新药,采用批准的药名;创新性新药,请参照我国药典委员会的“命名原则”,新译名词应附外文。公认习用缩略语可直接应用(建议第一次也写出全称),如ALT, AST, mAb, WBC, RBC, Hb, T, P, R, BP,

PU, GU, DU, ACTH, DNA, LD50, HBsAg, HCV RNA, AFP, CEA, ECG, IgG, IgA, IgM, TCM, RIA, ELISA, PCR, CT, MRI等. 为减少排印错误, 外文、阿拉伯数字、标点符号必须正确打印在A4纸上. 中医药名词英译要遵循以下原则: (1)有对等词者, 直接采用原有英语词, 如中风stroke, 发热fever; (2)有对应词者应根据上下文合理选用原英语词, 如八法eight principal methods; (3)英语中没有对等词或相应词者, 宜用汉语拼音, 如阴yin, 阳yang, 阴阳学说yinyangology, 人中renzhong, 气功qigong; 汉语拼音要以词为单位分写, 如weixibao nizhuanwan(胃细胞逆转丸), guizhitang(桂枝汤). 通常应小写.

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

2.4 计量单位 采用国际单位制并遵照有关国家

标准, GB3100-3102-93量和单位. 原来的“分子量”应改为物质的相对分子质量. 如30 kD改为 $M_r$  30 000或30 kDa(M大写斜体, r小写正体, 下角标); “原子量”应改为相对原子质量, 即 $A_r$ (A大写斜体, r小写正体, 下角标); 也可采用原子质量, 其单位是u(小写正体). 计量单位在+、-及-后列出. 在±前后均要列出, 如37.6 °C ± 1.2 °C, 45.6岁 ± 24岁, 56.4 d ± 0.5 d. 3.56 ± 0.27 pg/ml应为3.56 ng/L ± 0.27 ng/L. BP用kPa(mmHg), RBC数用 $1 \times 10^{12}/L$ , WBC数用 $1 \times 10^9/L$ , WBC构成比用0.00表示, Hb用g/L.  $M_r$ 明确的体内物质以nmol/L或mmol/L表示, 不明确者用g/L表示. 1 M硫酸, 改为1 mol/L硫酸, 1 N硫酸, 改为0.5 mol/L硫酸. 长10 cm, 宽6 cm, 高4 cm, 应写成10 cm × 6 cm × 4 cm. 生化指标一律采用法定计量单位表示, 例如, 血液中的总蛋白、清蛋白、球蛋白、脂蛋白、血红蛋白、总脂用g/L, 免疫球蛋白用mg/L; 葡萄糖、钾、尿素、尿素氮、CO<sub>2</sub>结合力、乳酸、磷酸、胆固醇、胆固醇酯、三酰甘油、钠、钙、镁、非蛋白氮、氯化物; 胆红素、蛋白结合碘、肌酸、肌酐、铁、铅、抗坏血酸、尿胆元、氨、维生素A、维生素E、维生素B1、维生素B2、维生素B6、尿酸; 氢化可的松(皮质醇)、肾上腺素、汞、孕酮、甲状腺素、睾酮、叶酸用nmol/L; 胰岛素、雌二醇、促肾上腺皮质激素、维生素B12用pmol/L. 年龄的单位有日龄、周龄、月龄和岁. 例如, 1秒, 1 s; 2分钟, 2 min; 3小时, 3 h; 4天, 4 d; 5周, 5 wk; 6月, 6 mo; 雌性♀, 雄性♂, 酶活性国际单位IU = 16.67 nkat, 对数log, 紫外uv, 百分比%, 升L, 尽量把 $1 \times 10^{-3}$  g与 $5 \times 10^{-7}$  g之类改成1 mg与0.5 mg, hr改成h, 重量γ改成mg, 长度m改成mm. 国际代号不用于无数值的文句中, 例如每天不写每d, 但每天8 mg可写8 mg/d. 在一个组合单位符号内不得有1条以上的斜线, 例如不能写成mg/kg/d, 而应写成mg/(kg·d), 且在整篇文章内应统一. 单位符号没有单、复数的区分, 例如, 2 min不是2 mins, 3 h不是3 hs, 4 d不是4 ds, 8 mg不是8 mgs. 半个月, 15 d; 15克, 15 g; 10%福尔马林, 40 g/L甲醛; 95%酒精, 950 mL/L乙醇; 5% CO<sub>2</sub>, 50 mL/L CO<sub>2</sub>; 1 : 1 000肾上腺素, 1 g/L肾上腺素; 胃黏膜含促胃液素36.8 pg/mg, 改为胃黏膜蛋白含促胃液素36.8 ng/g; 10%葡萄糖改为560 mmol/L或100 g/L葡萄糖; 45 ppm =  $45 \times 10^{-6}$ ; 离心的旋转频率(原称转速)用r/min, 超速者用g; 药物剂量若按体质量计算, 一律以“/kg”表示.

2.5 统计学符号 (1)t检验用小写t; (2)F检验用英

《世界华人消化杂志》为中国科技论文统计源核心期刊(2010年)和中文核心期刊要目总览(北京大学图书馆, 2008年版)收录的学术期刊.

《世界华人消化杂志》编辑部, 100025, 北京市朝阳区, 东四环中路62号, 远洋国际中心D座903室, 电话: 010-5908-0035, 传真: 010-8538-1893, Email: wcyj@wjgnet.com; http://www.wjgnet.com

文大写*F*; (3)卡方检验用希腊小写 $\chi^2$ ; (4)样本的相关系数用英文小写*r*; (5)自由度用希腊小写*v*; (6)样本数用英文小写*n*; (7)概率用英文斜体大写*P*. 在统计学处理中在文字叙述时平均数±标准差表示为mean±SD, 平均数±标准误为mean±SE. 统计学显著性用<sup>a</sup>*P*<0.05, <sup>b</sup>*P*<0.01(*P*>0.05不注). 如同一表中另有一套*P*值, 则<sup>c</sup>*P*<0.05, <sup>d</sup>*P*<0.01; 第三套为<sup>e</sup>*P*<0.05, <sup>f</sup>*P*<0.01等.

2.6 数字用法 遵照国家标准GB/T 15835-1995出版物上数字用法的规定, 作为汉语词素者采用汉字数字, 如二氧化碳、十二指肠、三倍体、四联球菌、五四运动、星期六等. 统计学数字采用阿拉伯数字, 如1000-1500 kg, 3.5 mmol/L±0.5 mmol/L等. 测量的数据不能超过其测量仪器的精密度, 例如6347意指6000分之一的精密度. 任何一个数字, 只允许最后一位有误差, 前面的位数不应有误差. 在一组数字中的mean±SD应考虑到个体的变差, 一般以SD的1/3来定位数, 例如3614.5 g±420.8 g, SD的1/3达一百多g, 平均数波动在百位数, 故应写成3.6 kg±0.4 kg, 过多的位数并无意义. 又如8.4 cm±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≤1000, 百分数到小数点后1位; 余类推. 小数点前后的阿拉伯数字, 每3位间空1/4阿拉伯数字距离, 如1486800.475 65. 完整的阿拉伯数字不移!

2.7 标点符号 遵照国家标准GB/T 15834-1995标点符号用法的要求, 本刊论文中的句号都采用黑圆点; 数字间的起止号采用“-”字线, 并列的汉语词间用顿号分开, 而并列的外文词、阿拉伯数字、外文缩略词及汉语拼音字母拼写词间改用逗号分开, 参考文献中作者间一律用逗号分开; 表示终了的标点符号, 如句号、逗号、顿

号、分号、括号及书名号的后一半, 通常不用于一行之首; 而表示开头的标点符号, 如括号及书名号的前一半, 不宜用于一行之末. 标点符号通常占一格, 如顿号、逗号、分号、句号等; 破折号应占两格; 英文连字符只占一个英文字符的宽度, 不宜过长, 如5-FU. 外文字符下划一横线表示用斜体, 两横线表示用小写, 三横线表示用大写, 波纹线表示用黑体.

### 3 稿件格式

3.1 题名 简明确切地反映论文的特定内容, 鲜明而有特色, 阿拉伯数字不宜开头, 不用副题名, 一般20个字. 避免用“的研究”或“的观察”等非特定词.

3.2 作者 论文作者的署名, 按照国际医学杂志编辑委员会(ICMJE, International Committee of Medical Journal Editors)作者资格标准执行. 作者标准为: (1)对研究的理念和设计、数据的获得、分析和解读做出重大贡献; (2)起草文章, 并对文章的重要的知识内容进行批评性修改; (3)接受对准备发表文章的最后一稿. 作者应符合条件1, 2, 3, 对研究工作有贡献的其他人可放入致谢中. 作者署名的次序按贡献大小排列, 多作者时姓名间用逗号, 如是单名, 则在姓与名之间空1格(正文和参考文献中不空格). 《世界华人消化杂志》要求所有署名人写清楚自己对文章的贡献. 世界华人消化杂志不设置共同第一作者和共同通信作者.

3.3 单位 作者后写单位的全称空1格后再写省市及邮政编码. 格式如: 张旭晨, 梅立新, 承德医学院病理教研室 河北省承德市 067000

3.4 第一作者简介 格式如: 张旭晨, 1994年北京中医药大学硕士, 讲师. 主要从事消化系统疾病的病理研究.

3.5 作者贡献分布 格式如: 陈湘川与庞丽娟对此文所作贡献两均等; 此课题由陈湘川、庞丽娟、陈玲、杨兰、张金芳、齐妍及李洪安设计; 研究过程由陈玲、杨兰、张金芳、蒋金芳、杨磊、李锋及曹秀峰操作完成; 研究所用新试剂及分析工具由曹秀峰提供; 数据分析由陈湘川、杨兰及庞丽娟完成; 本论文写作由陈湘川、庞丽娟及李洪安完成.

3.6 同行评议者 为了确保刊出文章的质量, 本刊即将开始实行接受稿件的同行评议公开策略, 将同行评议者姓名, 职称, 机构的名称与文章一同在脚注出版. 格式如: 房静远, 教授, 上海交通大学医学院附属医院仁济医院, 上海市消化疾

病研究所。

3.7 基金资助项目 格式如: 国家自然科学基金资助项目, No. 30224801

3.8 通讯作者 格式如: 通讯作者: 黄缘, 教授, 330006, 江西省南昌市民德路1号, 南昌大学第二附属医院消化内科, 江西省分子医学重点实验室. huang9815@yahoo.com

电话: 0351-4078656 传真: 0351-4086337

收稿日期: 修回日期:

3.9 英文摘要

题名 文章的题名应言简意赅, 方便检索, 英文题名以不超过10个实词为宜, 应与中文题名一致。

作者 作者姓名汉语拼音拼写法规定为: 先名, 后姓; 首字母大写, 双名之间用半字线“-”分开, 多作者时姓名间加逗号。格式如: “潘伯荣”的汉语拼写法为“Bo-Rong Pan”。

单位 先写作者, 后写单位的全称及省市邮政编码。例如: Xu-Chen Zhang, Li-Xin Mei, Department of Pathology, Chengde Medical College, Chengde 067000, Hebei Province, China

基金资助项目 格式如: Supported by National Natural Science Foundation of China, No.30224801

通讯作者 格式如: Correspondence to: Dr. Lian-Sheng Ma, Taiyuan Research and Treatment Center for Digestive Diseases, 77 Shuangta Xijie, Taiyuan 030001, Shanxi Province, China. wcjd@wjgnet.com

收稿及修回日期 格式如: Received: Revised:

摘要 包括目的、方法、结果、结论, 书写要求与中文摘要一致。

3.10 中文摘要 必须在300字左右, 内容应包括目的(应阐明研究的背景和设想、目的), 方法(必须包括材料或对象, 应描述课题的基本设计, 双盲、单盲还是开放性, 使用什么方法, 如何进行分组和对照, 数据的精确程度, 研究对象选择条件与标准是否遵循随机化、齐同化的原则, 对照组匹配的特征。如研究对象是患者, 应阐明其临床表现, 诊断标准, 如何筛选分组, 有多少例进行过随访, 有多少例因出现不良反应而中途停止研究), 结果(应列出主要结果, 包括主要数据, 有什么新发现, 说明其价值和局限, 叙述要真实、准确、具体, 所列数据经用何种统计学方法处理; 应给出结果的置信区间和统计学显著性检验的确切值; 概率写 $P$ , 后应写出相应显著性检验值), 结论(全文总结, 准确无误的观点及价值)。

3.11 正文标题层次 0 引言; 1 材料和方法, 1.1 材料, 1.2 方法; 2 结果; 3 讨论; 4 参考文献。序号一

律左顶格写, 后空1格写标题; 2级标题后空1格接正文。正文内序号连排用(1), (2), (3)。以下逐条陈述。

0 引言 应包括该研究的目的和该研究与其他相关研究的关系。

1 材料和方法 应尽量简短, 但应让其他有经验的研究者能够重复该实验。对新的方法应该详细描述, 以前发表过的方法引用参考文献即可, 有关文献中或试剂手册中的方法的改进仅描述改进之处即可。

2 结果 实验结果应合理采用图表和文字表示, 在结果中应避免讨论。

3 讨论 要简明, 应集中对所得的结果做出解释而不是重复叙述, 也不应是大量文献的回顾。

图表的数量要精选。表应有表序和表题, 并有足够具有自明性的信息, 使读者不查阅正文即可理解该表的内容。表内每一栏均应有表头, 表内非公知通用缩写应在表注中说明, 表格一律使用三线表(不用竖线), 在正文中该出现的地方应注出。图应有图序、图题和图注, 以使其容易被读者理解, 所有的图应在正文中该出现的地方注出。同一个主题内容的彩色图、黑白图、线条图, 统一用一个注解分别叙述。如图1 萎缩性胃炎治疗前后病理变化。A: …; B: …; C: …; D: …; E: …; F: …; G: …。曲线图可按●、○、■、□、▲、△顺序使用标准的符号。统计学显著性用:<sup>a</sup> $P<0.05$ , <sup>b</sup> $P<0.01$ ( $P>0.05$ 不注)。如同一表中另有一套 $P$ 值, 则<sup>c</sup> $P<0.05$ , <sup>d</sup> $P<0.01$ ; 第3套为<sup>e</sup> $P<0.05$ , <sup>f</sup> $P<0.01$ 。 $P$ 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 $t/\text{min}$ ,  $c/(\text{mol/L})$ ,  $p/\text{kPa}$ ,  $V/\text{mL}$ ,  $t/^\circ\text{C}$ 表达。

志谢 后加冒号, 排在讨论后及参考文献前, 左齐。

4 参考文献 本刊采用“顺序编码制”的著录方法, 即以文中出现顺序用阿拉伯数字编号排序。提倡对国内同行近年已发表的相关研究论文给予充分的反映, 并在文内引用处右上角加方括号注明角码。文中如列作者姓名, 则需在“Pang等”的右上角注角码号; 若正文中仅引用某文献中的论述, 则在该论述的句末右上角注角码号。如马连生<sup>[1]</sup>报告……, 潘伯荣等<sup>[2-5]</sup>认为……; PCR方法敏感性高<sup>[6-7]</sup>。文献序号作正

《世界华人消化杂志》自2006-01-01起改为旬刊发行, 每月8、18、28日出版。北京报刊发行局发行, 邮发代号: 82-262。

《世界华人消化杂志》坚持开放获取(open access, OA)的出版模式, 编辑出版高质量文章, 努力实现编委、作者和读者利益的最大化, 努力推进本学科的繁荣和发展, 向专业化、特色化和品牌化方向迈进。

文叙述时, 用与正文同号的数字并排, 如本实验方法见文献[8]。所引参考文献必须以近2-3年SCIE, PubMed, 《中国科技论文统计源期刊》和《中文核心期刊要目总览》收录的学术类期刊为准, 通常应只引用与其观点或数据密切相关的国内外期刊中的最新文献。期刊: 序号, 作者(列出全体作者), 文题, 刊名, 年, 卷, 起页-止页, PMID和DOI编号; 书籍: 序号, 作者(列出全部), 书名, 卷次, 版次, 出版地, 出版社, 年, 起页-止页。

5 网络版的发表前链接 本刊即将开始实行网络版的每篇文章上都有该文发表前纪录的链接, 包括首次提交的稿件, 同行评议人报告, 作者给审稿人回信和作者修回稿, 以PDF格式上传。读者可以针对论文、审稿意见和作者的修改情况发表意见, 指出问题与不足; 作者也可以随时修改完善自己发表的论文, 使文章的发表成为一个编者、同行评议者、读者、作者互动的动态过程。

## 4 写作格式实例

### 4.1 述评写作格式实例

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

### 4.2 研究原著写作格式实例

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

### 4.3 焦点论坛写作格式实例

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

### 4.4 文献综述写作格式实例

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

### 4.5 研究快报写作格式实例

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

### 4.6 临床经验写作格式实例

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

### 4.7 病例报告写作格式实例

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

## 5 投稿方式

接受在线投稿, 不接受其他方式的投稿, 如E-mail、打印稿。在线投稿网址: <http://www.baishideng.com/wcjd/ch/index.aspx>。无法在线提交的通过[submission@wjgnet.com](mailto:submission@wjgnet.com), 电话: 010-8538-1892, 传真: 010-8538-1893寻求帮助。投稿须知下载网址<http://www.wjgnet.com/1009-3079/tgxz.pdf>。审稿过程平均时间需要14-28 d。所有的来

稿均经2-3位同行专家严格评审, 2位或以上通过为录用, 否则将退稿或修改后再审。接受后的稿件作者需缴纳稿件发表费, 文章发表后可获得1本样刊及10套单行本(稿酬)。

## 6 修回稿须知

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

6.2 稿件修改 来稿经同行专家审查后, 认为内容需要修改、补充或删除时, 本刊编辑部将把原稿连同审稿意见、编辑意见寄回给作者修改, 而作者必须于15 d内将单位介绍信、作者符合要点承诺书、版权转让信等书面材料寄回编辑部, 同时将修改后的电子稿件上传至在线办公系统; 逾期寄回, 所造成的问题由作者承担责任。

6.3 版权 本论文发表后作者享有非专有权, 文责由作者自负。作者可在本单位或本人著作集中汇编出版以及用于宣讲和交流, 但应注明发表于《世界华人消化杂志》××年; 卷(期): 起止页码。如有国内外其他单位和个人复制、翻译出版等商业活动, 须征得《世界华人消化杂志》编辑部书面同意, 其编辑版权属本刊所有。

## 《世界华人消化杂志》编辑部

北京百世登生物医学科技有限公司  
100025, 北京市朝阳区东四环中路62号  
远洋国际中心D座903室  
电话: 010-5908-0035  
传真: 010-8538-1893  
E-mail: [wcjd@wjgnet.com](mailto:wcjd@wjgnet.com)  
<http://www.wjgnet.com>

## 2012年国内国际会议预告

2012-01-04/10

2011全国中医药创新发展学术交流大会

会议地点: 南宁市

联系方式: yxhy2000@163.com

2012-03-16/19

第三十二届全国超声诊断新进展暨介入超声高级研修班

会议地点: 北京市

联系方式: 13311335788@163.com

2012-03-22/25

2012年北京第六届疝和腹壁外科国际学术研讨会

会议地点: 北京市

联系方式: cmameeting@163.com

2012-03-23/25

国际肝胆胰协会中国分会第五届全国学术研讨会

会议地点: 武汉市

联系方式: lilu19870509@163.com

2012-03-31

第二届国际消化道内镜活检和病理学诊断研讨会

会议地点: 杭州市

联系方式: fyanfei@sina.com

2012-04-06/08

2012年脂质代谢与器官损害国际学术研讨会

会议地点: 重庆市

联系方式: islt2012@yahoo.com.cn

2012-04-27/30

中华医学会2012年第十三届中华肝胆胰脾外科专业学术论坛

会议地点: 九江市

联系方式: zhgdwkzz@vip.163.com

2012-04-20/22

中国医学影像技术研究会第二十六次全国学术大会

会议地点: 济南市

联系方式: camit@vip.163.com

2012-05-26/31

2012年世界医学物理与生物医学工程大会

会议地点: 北京市

联系方式: info@wc2012.org

2012-06-01/03

2012中国北京超声医师学术大会

会议地点: 北京市

联系方式: zhumin301@163.com

2012-06-15/17

第一届糖尿病大会、第二届内分泌与代谢大会

会议地点: 北京市

联系方式: medical585@163.com

2012-06-15/17

第九届全国抗菌药物临床药理学术会议

会议地点: 北京市

联系方式: doctorzhengbo@163.com; liyun1907@sina.com

2012-06-29/07-01

第二十四次全国中西医结合消化学术会议

会议地点: 宁波市

联系方式: qgzxyjhxh@163.com

2012-06-30/07-01

中华医学会肝病与代谢学术研讨会

会议地点: 哈尔滨市

联系方式: lilyjia@163.com

2012-07-01/31

第一届全国普通外科青年医师学术论坛

会议地点: 北京市

联系方式: cmacjs@cma.org.cn

2012-07-01/31

第二届全国普通外科手术技术学术会议

会议地点: 青岛市

联系方式: lining@126.com

2012-08-25/29

第八届世界华人药物化学研讨会暨第九届IUPAC化学生物学国际研讨会

会议地点: 北京市

联系方式: liangren@bjmu.edu.cn

2012-08-29/09-01

中华医学会第十一次全国内分泌学学术会议

会议地点: 广州市

联系方式: lilyjia@163.com

2012-09-14/16

中华医学会第十二次全国超声医学学术会议

会议地点: 青岛市

联系方式: lilyjia@163.com

2012-10-25/28

第13届亚太临床微生物暨感染病会议(APCCMI)

会议地点: 北京市

联系方式: bianxiaoxue@mpco.cn

## 志谢世界华人消化杂志编委

本期文章审稿中(包括退稿), 我刊编委付出了宝贵的时间和大量的精力, 提高了《世界华人消化杂志》的学术质量, 在此表示衷心感谢!

白爱平 副教授

南昌大学第一附属医院消化内科

蔡三军 主任医师

复旦大学附属肿瘤医院大肠外科

曹秀峰 教授

南京医科大学附属南京第一医院肿瘤中心

陈海龙 教授

大连医科大学附属第一医院院办

陈治水 主任医师

中国人民解放军解放军第二一一医院中医科

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

代智 副研究员

复旦大学附属中山医院肝癌研究所

杜奕奇 副教授

中国人民解放军第二军医大学长海医院消化内科

樊晓明 主任医师

复旦大学附属金山医院消化科

高国全 教授

中山大学中山医学院生化系

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

何松 教授

重庆医科大学附属第二医院消化内科

洪天配 教授

北京大学第三医院内分泌科

黄昆 教授

华中科技大学同济药学院

江学良 主任医师

中国人民解放军济南军区总医院消化科

刘宝林 教授

中国医科大学附属盛京医院普通外科

倪润洲 教授

南通大学附属医院消化内科

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

沈克平 主任医师

上海龙华医院肿瘤五科

石毓君 副研究员

四川大学华西医院外科

孙殿兴 主任医师

白求恩国际和平医院肝病科

台桂香 教授

吉林大学白求恩医学院免疫教研室

汤华 研究员

重庆医科大学感染性疾病分子生物学教育部重点实验室

万军 主任医师

中国人民解放军总医院南楼老年消化科

王小众 教授

福建医科大学附属协和医院消化内科

王忠裕 教授

大连医科大学附属第一医院普通外科二科

徐宁志 研究员

中国医学科学院肿瘤医院研究所细胞生物与分子生物学实验室

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

禹正杨 副教授

南华大学附属第一医院肿瘤外科

郁卫东 副研究员

北京大学人民医院临床分子生物学研究所/中心实验室