

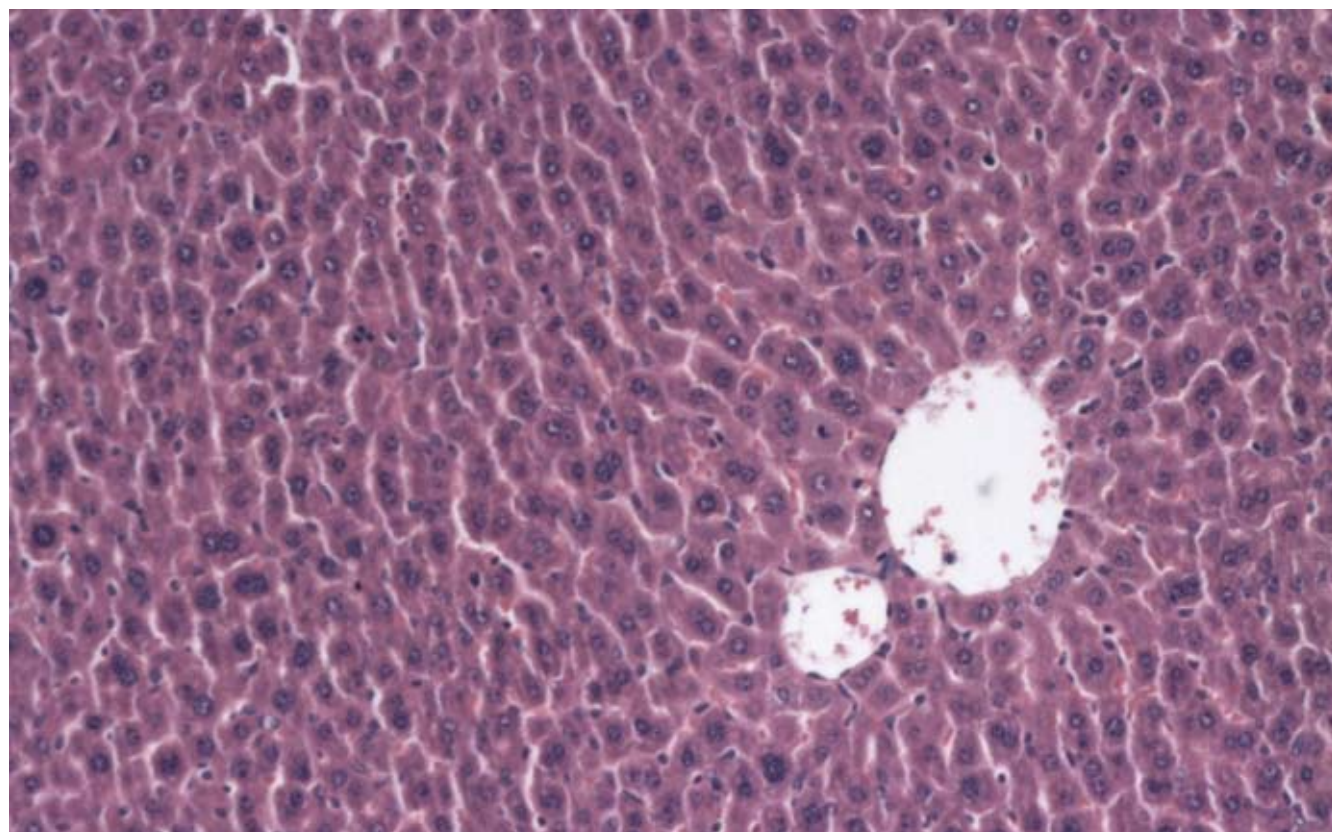
ISSN 1009-3079 (print)
ISSN 2219-2859 (online)
CN 14-1260/R

世界华人消化杂志®

**WORLD CHINESE
JOURNAL OF DIGESTOLOGY**

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

2012 年 3 月 28 日 第 20 卷 第 9 期 (Volume 20 Number 9)



9/2012

ISSN 1009-3079



《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
陈凇教授
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
崔云南教授
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
徐决副主任医师
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

消化中医药学

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

刘绍能主任医师
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
李璦教授
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 28 日 第 20 卷 第 9 期 (总第377期)

基础 研究

721 肝细胞中HBV X基因的表达及其共培养的肝星状细胞的增殖和迁移

陈红英, 王小众, 陈治新

临 床 研 究

729 HBV cccDNA的水平及临床因素对肝细胞癌术后预后的判断价值

白彦楼, 高英堂, 李莹, 王毅军, 韩涛, 任超逸, 杜智

文 献 综 述

737 猪胰岛细胞异种移植治疗糖尿病的研究进展

朱海涛, 于良, 王博

743 腹泻与肠道离子转运关系的研究进展

张志博, 韩雪峰, 谭支良, 肖文军

研 究 快 报

749 腺病毒介导的KDR-CDglyTK系统在治疗胃癌中的旁观者效应机制

李强, 黄宗海, 陈飞, 俞金龙

754 基因富集及Meta分析对影响肝癌发生发展关键基因的筛选

曹骥, 卢晓旭, 胡艳玲, 李媛, 朱伶俐, 杨春, 欧超, 唐艳萍

759 小鼠急性酒精性肝损伤模型的建立

齐慧慧, 宋佳, 陈岳祥

764 XPD对SMMC-7721肝癌细胞中DNp73和GADD45 β 的调控及意义

王芬芬, 张吉翔

771 大黄素对脱氧胆酸诱导的AR42J细胞损伤的调节

张桂信, 陈海龙, 纪军, 吴圆圆, 尚东, 张利

临 床 经 验

776 食管炎性纤维性息肉的临床病理特征

谢飞来, 姚丽青, 余英豪

781 Ghrelin在食管腺癌、Barrett's食管黏膜中的表达

甄云飞, 曲海霞, 王青

784 进展期食管胃交界腺癌临床病理分析319例

杨琳, 朱玥璐, 王斌, 袁燕玲, 郭蕾, 张海峰, 薛新华, 吕宁

790 肝断面血流阻断器在肝癌切除术中的应用

周松, 薛小军, 李冉冉, 陈达丰, 陈文有, 刘广欣, 柯恩明, 郑硕云

795 Fascin和MMP-9在肝门胆管癌组织中的表达及临床意义

刘俊, 李灼日, 毛先海

800 早期连续性血液净化治疗重症急性胰腺炎14例

周俊杰, 罗琼湘, 章雄军, 徐小强

附 录	804 《世界华人消化杂志》投稿须知 809 2012年国内国际会议预告
志 谢	810 志谢世界华人消化杂志编委
消 息	728 《世界华人消化杂志》正文要求 742 2011年度《世界华人消化杂志》发文情况 770 《世界华人消化杂志》修回稿须知 775 《世界华人消化杂志》出版流程 780 《世界华人消化杂志》栏目设置 789 《世界华人消化杂志》被评为中国精品科技期刊 794 《世界华人消化杂志》性质、刊登内容及目标 799 百世登出版集团推出12种开放获取生物医学期刊全部被PubMed和PMC收录 803 《世界华人消化杂志》入选《中国学术期刊评价研究报告-RCCSE权威、核心期刊排行榜与指南》
封面故事	齐慧慧, 宋佳, 陈岳祥. 小鼠急性酒精性肝损伤模型的建立. 世界华人消化杂志 2012; 20(9): 759-763 http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/759.asp
本期责任人	编务 周媛; 送审编辑 李军亮, 张姗姗; 组版编辑 闫晋利; 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

<p>世界华人消化杂志</p> <p>Shijie Huaren Xiaohua Zazhi</p> <p>吴阶平 题写封面刊名 陈可冀 题写版权刊名 (旬刊)</p> <p>创 刊 1993-01-15 改 刊 1998-01-25 出 版 2012-03-28 原刊名 新消化病学杂志</p> <p>期 刊 名 称 世界华人消化杂志 主 管 单 位 山西省科学技术厅 主 办 单 位 太原消化病研治中心</p> <p>编 辑 世界华人消化杂志编辑委员会 030001, 山西省太原市双塔西街77号 电话: 0351-4078656 E-mail: wcjd@wjgnet.com http://www.wjgnet.com</p> <p>出 版 世界华人消化杂志编辑部 030001, 山西省太原市双塔西街77号 电话: 0351-4078656 E-mail: wcjd@wjgnet.com http://www.wjgnet.com</p>	<p>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 吕宾, 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</p> <p>编 辑 部 主 任 李军亮</p>	<p>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</p> <p>《世界华人消化杂志》是一份同行评议性的旬刊, 是一份被《中国科技论文统计源期刊》和《中文核心期刊要目总览》收录的学术类期刊.《世界华人消化杂志》的英文摘要被美国《化学文摘》, 荷兰《医学文摘库/医学文摘》和俄罗斯《文摘杂志》收录.</p> <p>《世界华人消化杂志》正式开通了在线办公系统(http://www.baishideng.com/wcjd/ch/index.aspx), 所有办公流程一律可以在线进行, 包括投稿、审稿、编辑、审读, 以及作者、读者、编者之间的信息反馈交流.</p> <p>特别声明 本刊刊出的所有文章不代表本刊编辑部和本刊编委会的观点, 除非特别声明. 本刊如有印装质量问题, 请向本刊编辑部调换.</p> <p>2012年版权归世界华人消化杂志所有</p>
---	--	---

World Chinese Journal of Digestology

March 2012 Contents in Brief Volume 20 Number 9

BASIC RESEARCH	721 Expression of the hepatitis B virus X gene in liver cells promotes the proliferation and migration of co-cultured hepatic stellate cells <i>Chen HY, Wang XZ, Chen ZX</i>
CLINICAL RESEARCH	729 Significance of HBV cccDNA and clinical factors in evaluating prognosis of hepatocellular carcinoma following surgical resection <i>Bai YL, Gao YT, Li Y, Wang YJ, Han T, Ren CY, Du Z</i>
REVIEW	737 Advances in research of pig islet xenotransplantation for diabetes <i>Zhu HT, Yu L, Wang B</i> 743 Progress in understanding the relationship between diarrhea and intestinal ion transport <i>Zhang ZB, Han XF, Tan ZL, Xiao WJ</i>
RAPID COMMUNICATION	749 Mechanism of bystander effect in therapy of stomach cancer with the KDR-CDglyTK suicide gene system <i>Li Q, Huang ZH, Chen F, Yu JL</i> 754 Applying gene set enrichment analysis and meta-analysis to screen key genes controlling the development and progression of hepatic carcinoma <i>Cao J, Lu XX, Hu YL, Li Y, Zhu LQ, Yang C, Ou C, Tang YP</i> 759 Development of a mouse model of alcohol-induced acute liver injury <i>Qi HH, Song J, Chen YX</i> 764 Overexpression of XPD decreases DNp73 expression and increases GADD45 β expression in SMMC-7721 hepatoma cells <i>Wang FF, Zhang JX</i> 771 Emodin protects from deoxycholic acid-induced AR42J cell damage <i>Zhang GX, Chen HL, Ji J, Wu YY, Shang D, Zhang L</i>
CLINICAL PRACTICE	776 Clinicopathologic features of inflammatory fibroid polyp of the esophagus <i>Xie FL, Yao LQ, Yu YH</i> 781 Ghrelin expression in esophageal adenocarcinoma and Barrett's esophagus <i>Zhen YF, Qu HX, Wang Q</i> 784 Clinicopathological and prognostic analysis of 319 cases of advanced esophageal gastric adenocarcinoma <i>Yang L, Zhu YL, Wang B, Yuan YL, Guo L, Zhang HF, Xue XH, Lv N</i> 790 Application of hepatic blood blocker to control bleeding during hepatectomy <i>Zhou S, Xue XJ, Li RR, Chen DF, Chen WY, Liu GX, Ke EM, Zheng SY</i> 795 Clinical significance of expression of fascin and MMP-9 in hilar cholangiocarcinoma <i>Liu J, Li ZR, Mao XH</i> 800 Early continuous blood purification for treatment of severe acute pancreatitis: an analysis of 14 cases <i>Zhou JJ, Luo QX, Zhang XJ, Xu XQ</i>

APPENDIX	804 Instructions to authors of <i>World Chinese Journal of Digestology</i> 809 Meeting events calendar in 2012
ACKNOWLEDGMENT	810 Acknowledgments to reviewers of <i>World Chinese Journal of Digestology</i>
COVER	<i>Qi HH, Song J, Chen YX.</i> Development of a mouse model of alcohol-induced acute liver injury. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2012; 20(9): 759-763 http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/759.asp
RESPONSIBLE EDITORS FOR THIS ISSUE	Assistant Editor: <i>Yuan Zhou</i> Review Editor: <i>Jun-Liang Li, Shan-Shan Zhang</i> Electronic Page Editor: <i>Jin-Li Yan</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 28, 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

PRINTING
Beijing Kexin Printing House

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

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

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

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

肝细胞中HBV X基因的表达及其共培养的肝星状细胞的增殖和迁移

陈红英, 王小众, 陈治新

陈红英, 王小众, 陈治新, 福建医科大学附属协和医院消化内科 福建省福州市 350001

陈红英, 博士, 主要从事消化系统疾病的研究。

福建省科技人才基金资助项目, No. 2008F3043

福建省卫生厅青年基金立项医院基金资助项目, No. XH200801

作者贡献分布: 此课题由陈红英设计; 研究过程由陈红英操作完成; 研究所用新试剂及分析工具部分由王小众提供, 陈治新协助购买和筹备; 数据分析由陈红英完成; 本论文写作由陈红英完成。

通讯作者: 陈红英, 副主任医师, 350001, 福建省福州市, 福建医科大学附属协和医院消化内科. zxl16@sina.com

电话: 0591-83357896-8482

收稿日期: 2011-12-23 修回日期: 2012-01-19

接受日期: 2012-02-27 在线出版日期: 2012-03-28

Expression of the hepatitis B virus X gene in liver cells promotes the proliferation and migration of co-cultured hepatic stellate cells

Hong-Ying Chen, Xiao-Zhong Wang, Zhi-Xin Chen

Hong-Ying Chen, Xiao-Zhong Wang, Zhi-Xin Chen, Department of Gastroenterology, Union Hospital of Fujian Medical University, Fuzhou 350001, Fujian Province, China

Supported by: the Science and Technology Talent Foundation of Fujian, No. 2008F3043; and the Young Scholar Foundation of Health Department of Fujian, No. XH200801

Correspondence to: Hong-Ying Chen, Associate Chief Physician, Department of Gastroenterology, Union Hospital of Fujian Medical University, Fuzhou 350001, Fujian Province, China. zxl16@sina.com

Received: 2011-12-23 Revised: 2012-01-19

Accepted: 2012-02-27 Published online: 2012-03-28

Abstract

AIM: To determine whether the hepatitis B virus X (HBV X) gene is involved in the pathogenesis of hepatitis B-related cirrhosis.

METHODS: A eukaryotic expression vector containing the HBV X gene (pHBV-X-IRES2-EGFP) was constructed and transfected into HL-7702 cells. The transfected cells were divided into two groups. One group was selected with G418 and named L02/x, which could express the HBV X gene stably, and another group was transfected with pHBV-X-IRES2-EGFP for 48 h and named L02/48x. The expression of HBV X was detected

by real-time PCR and Western blot. L02/x and L02/48x cells were then co-cultured with hepatic stellate cells (HSCs) for 36 h, and the proliferation and migration of HSCs were detected.

RESULTS: Real-time PCR and Western blot analyses showed that L02/x and L02/48x cells could express HBV X. Compared to HSCs co-cultured with HL-7702 cells transfected with empty vector and non-transfected cells, the proliferation and migration of HSCs co-cultured with L02/x or L02/48x cells significantly increased.

CONCLUSION: The expression of the HBV X gene in HL-7702 cells could promote the proliferation and migration of HSCs and may play an important role in the pathogenesis of hepatitis B virus-induced liver fibrosis.

Key Words: Hepatitis B virus X gene; Hepatic stellate cells; Co-culture; Proliferation; Migration

Chen HY, Wang XZ, Chen ZX. Expression of the hepatitis B virus X gene in liver cells promotes the proliferation and migration of co-cultured hepatic stellate cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2012; 20(9): 721-728

摘要

目的: 研究乙型肝炎病毒X(hepatitis B virus X, HBV X)基因在乙型肝炎病毒致肝纤维化中的作用。

方法: 构建HBV X基因真核表达载体pHBV-X-IRES2-EGFP, 将其转染人肝细胞HL-7702后分成2组, 一组经G418筛选出稳定表达HBV X基因的肝细胞株(L02/x), 另一组予瞬时转染48 h(L02/48x)。Real-time PCR、Western blot鉴定2组细胞HBV X基因的表达。与转染空质粒和未转染的肝细胞组对照, 将L02/x和L02/48x细胞分别与肝星状细胞(hepatic stellate cells, HSCs)共培养36 h, 并检测各组HSCs增殖和迁移情况。

结果: Real-time PCR和Western blot实验显

■背景资料

慢性乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)感染可以导致慢性肝炎、肝纤维化和肝细胞癌的发生, 每年因乙型肝炎死亡者约为75万例。

■同行评议者

杨江华, 副教授, 皖南医学院弋矶山医院感染科

■ 研发前沿

目前认为HSCs活化是肝纤维化发生、发展的关键环节,各种致纤维化因子激活HSCs,使其活化、增殖,转化为肌成纤维细胞样细胞,合成多种细胞因子、大量合成细胞外基质,直接参与损伤修复,加速胶原沉积,促进纤维化进程。

示,转染pHBV-X-IRES2-EGFP载体的L02/x和L02/48x细胞均有HBV X基因的表达.与转染空质粒和未转染的肝细胞组对照,与L02/x和L02/48x细胞共培养的HSCs的增殖和迁移均显著增多。

结论: HBV X基因在肝细胞中的表达可以促进HSCs发生增殖和迁移,从而在乙型肝炎病毒致肝纤维化过程中起重要作用。

关键词: 乙型肝炎病毒X基因; 肝星状细胞; 共培养; 增殖; 迁移

陈红英, 王小众, 陈治新. 肝细胞中HBV X基因的表达及其共培养的肝星状细胞的增殖和迁移. 世界华人消化杂志 2012; 20(9): 721-728
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/721.asp>

0 引言

慢性乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)感染可以导致慢性肝炎、肝纤维化和肝细胞癌的发生,每年因乙型肝炎死亡者约为75万例. HBV基因组是一个不全双链的环状DNA分子,其长链含有4个开放读码框架(open reading frame, ORF),分别为编码前S1蛋白,前S2蛋白及S蛋白的S基因,编码前C蛋白与C蛋白的C基因,编码DNA聚合酶蛋白的P基因,以及编码X蛋白的X基因. X基因是HBV DNA中最小的一个ORF,编码区位于1374-1818核苷酸之间,其编码的HBx蛋白由154个氨基酸组成,分子量为17 kDa. 已有大量的研究显示,HBx是一个多功能调节因子,他可以通过调节转录、影响细胞增殖^[1,2]与凋亡^[3-6]、干扰细胞周期^[7-9]及各种信号传导途径^[10-15]、影响细胞修复^[16-18]等从而在肝细胞癌发生发展中起重要的作用^[19-22]. HBV是肝纤维化形成的重要因素之一, Liu等^[23]研究发现HBV可以通过调节I型胶原纤维增殖和表达而影响肝星状细胞(hepatic stellate cells, HSCs)的增殖. Martín-Vilchez等^[24]进一步研究证实HBx能激活HSCs而促进肝纤维化. 为进一步探讨HBV X基因在肝纤维化形成和发展中的作用,本文通过构建HBV X基因真核表达载体,使其在HL-7702人肝细胞中表达,观察与肝细胞共培养的肝星状细胞增殖和迁移的情况,揭示HBx与肝纤维化的关系。

1 材料和方法

1.1 材料 用于获取目的基因HBV X的质粒

pUCmT-x为本研究所保存,真核荧光表达载体pIRES2-EGFP购自Clontech公司,两者双酶切后连接构建表达HBV X基因的重组质粒pHBV-X-IRES2-EGFP. HL-7702肝细胞为本研究室保存,质粒转染试剂盒lipo2000购自Invitrogen公司,转染后经G418(购自sigma公司)筛选构建稳定表达X基因的肝细胞株. β -actin蛋白抗体(Mouse mAb to Beta-actin)购自abmart公司,HBV X蛋白抗体[Hepatitis B Virus X antigen antibody(X36C)]购自Abcam公司(ab2741),经Realtime-PCR、Western blot进一步鉴定X基因的表达. 采用购自corning公司的Transwell非接触式共培养小室,将购自中国科学院上海细胞库HSCs细胞与肝细胞共培养,采用DMEM+10%FBS+1%P/S+1%Glutamax培养基(培养基成分购自Gibco公司),50 mL/LCO₂、950 mL/L湿润空气、37 °C培养. 采用碧云天公司的CCK-8检测试剂盒、杰美公司的结晶紫试剂盒、Thermo酶标仪(MuLTiSKAN MK3)检测HSCs的增殖与迁移. 实验过程中所用的各种酶,包括内切酶、连接酶、逆转录酶等购自上海生物工程有限公司。

1.2 方法

1.2.1 构建HBV X基因真核表达载体: 用PCR法从本研究所保存的pUCmT-x质粒^[25]中扩增出HBV X基因片段,在目的基因的5'端添加Xho I酶切位点,3'端添加EcoR I酶切位点. 引物序列如下: 上游为5'-TAATctcgagATGGCTGC-TAGGCTGTGCT-3'和下游5'-GTCAgaattcTTA-ATGGTG ATGGTGATGATGGGCAGAGGT-GAAAAAGTTGC-3'. PCR条件为94 °C预变性3 min; 94 °C变性30 s, 57 °C退火30 s, 68 °C延伸30 s, 共35个循环. 将目的基因PCR产物和目的载体pIRES2-EGFP用Xho I和EcoR I内切酶分别进行酶切, T4 DNA连接酶连接上述酶切产物,构建HBV X基因真核表达载体pHBV-X-IRES2-EGFP. 经酶切及直接序列测定以确认重组质粒的成功构建。

1.2.2 HBV X基因转染肝细胞: 将肝细胞株HL-7702培养于含DMEM+10%FBS中. 选择对数生长期的肝细胞HL-7702,采用脂质体转染的方法(按脂质体转染试剂盒lipo2000的说明书操作),将质粒pHBV-X-IRES2-EGFP和pIRES2-EGFP分别导入肝细胞HL-7702中(6孔板每孔中加入2 μ g DNA). 转染48 h后,荧光显微镜观察细胞的转染效率. 一部分肝细胞转染48 h后经G418

表 1 X基因qPCR检测引物序列

引物名称	引物序列	产物(bp)
HBV X-F1	5'-CCCGTCTGTGCCTTCTCATC-3'	105
HBV X-R1	5'-ATCTCCTCCCCCAACTCCTC-3'	
HBV X-F2	5'-CTAGGCTGTGCTGCCAACTG-3'	182
HBV X-R2	5'-AGAAGGCACAGACGGGGAGT-3'	
hACTB-F	5'-TCCTTCCTGGGCATGGAGT-3'	208
hACTB-R	5'-CAGGAGGAGCAATGATCTTGAT-3'	

800 mg/L选择培养2 wk后, 挑取单克隆予进一步扩增以构建稳定表达HBV X基因的肝细胞株并命名为L02/x, 转染空质粒组命名为L02/ctr. 另一部分肝细胞于重组质粒瞬时转染48 h后作为瞬时转染组直接进入共培养实验, 此细胞分别命名为L02/48x, 其相应的转染空质粒对照组命名为L02/48ctr.

1.2.3 Real-time PCR鉴定X基因的表达: (1) 抽提5组细胞(L02/x、L02/48x、L02/ctr、L02/48ctr和HL-7702空白细胞)RNA并进行反转录, 检测RNA质量、浓度和纯度; (2) 依据目的基因及内参基因ACTB(Beta Actin)设计并合成荧光定量PCR引物, 引物序列见表1. SYBR Green法荧光定量PCR分析各基因的表达, PCR条件为: 95 °C 2 min; (95 °C 20 s, 57 °C 15 s, 72 °C 20 s)×40 cycles, qPCR反应体系如下: 2X qPCR buffer mix 10 μL, Primer 1 μL, cDNA 1 μL, ddH₂O 8 μL; PCR结束后, 进行熔解曲线实验, 升温温度从60 °C到95 °C; (3) 用 $\Delta\Delta C_t$ 法进行各基因表达的相对定量.

1.2.4 Western blot实验鉴定X基因的表达: 取稳定和瞬时转染X基因的肝细胞株L02/x和L02/48x, 其相应的转染空质粒细胞株L02/ctr和L02/48ctr, 以及相应的空白细胞对照组L02/NC和L02/48NC. Loading Buffer裂解此6组细胞并抽提蛋白, BSA法进行蛋白定量后行SDS-PAGE电泳, 恒压80 V, 30 min之后恒压120 V, 75-90 min, 恒压20 V条件下半干电转1 h, 将蛋白转移到PVDF膜上. 用封闭液(含5%脱脂奶粉的PBST溶液)室温封闭膜1 h; 用新配制的封闭液稀释一抗(HBV X蛋白抗体稀释比1:1 000; actin蛋白抗体稀释比1:4 000); 4 °C, 一抗孵育过夜; 用PBST洗膜30 min后室温下二抗孵育膜1 h, 再次洗膜后ECL显影.

1.2.5 肝细胞与肝星状细胞共培养: 将上述6组肝细胞及HSCs培养于DMEM+10%FBS+1%P/S+1%Glutamax培养液中. 采用Transwell共培养

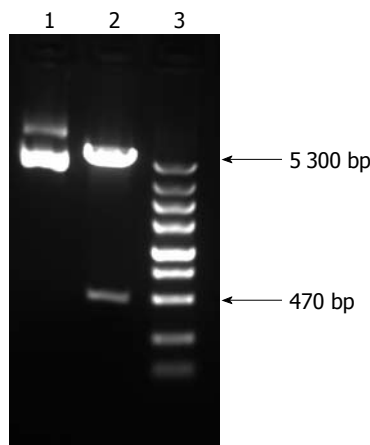


图 1 pHBV-X-IRES2-EGFP重组载体酶切鉴定. 1: HBV X重组质粒; 2: BamH I酶对重组载体质粒进行酶切; 3: 5 000 bp Marker.

体系, 取HSCs悬液(细胞数约为 6×10^5)接种到PBS浸润的上层小室中; 用镊子将小室仔细放于培养肝细胞的孔板中, 避免底部产生气泡, 放回培养箱中于50 mL/LCO₂、950 mL/L湿润空气、37 °C培养. 共培养36 h后进行下述实验.

1.2.6 CCK-8检测HSCs增殖: 在共培养36 h后, 每孔加入10 μL CCK-8, 混匀后培养箱中孵育3 h, 测定450 nm处的吸光度(A)值. 酶标仪读取待测样品和空白对照在450 nm处的A值, 将各待测样本的A值记为测量值, 空白对照的A值记为空白值, 则终值 = 测量值 - 空白值.

1.2.7 检测HSCs的迁移: 共培养36 h后取出小室, 去除小室中的培养基, 用湿润的棉签仔细擦掉小室上层的细胞; 在室温下, 用PBS润洗小室上表层, 将小室转移到新的6孔板中, 用4%的多聚甲醛室温固定细胞15 min, 用结晶紫染色试剂盒对细胞进行染色(按试剂盒说明书进行操作), 后用酶标仪检测570 nm处的A值, 然后计算细胞迁移.

统计学处理 重复上述实验3次, 将终值绘制柱状图, 结果用mean±SD表示, 用SPSS17软件进行单因素方差分析, 以 $P < 0.05$ 为有统计学差异.

2 结果

2.1 重组克隆的成功构建 重组克隆的酶切鉴定如

■ 相关报道

研究显示, HBx是一个多功能调节因子, 他可以通过调节转录影响细胞增殖与凋亡, 干扰细胞周期及各种信号传导途径, 影响细胞修复等, 从而在肝细胞癌发生发展中起重要的作用.

同行评价

本文有一定的科学性、创新性和可读性,为HBV X基因与肝纤维化的临床研究提供了较为可靠的参考依据。

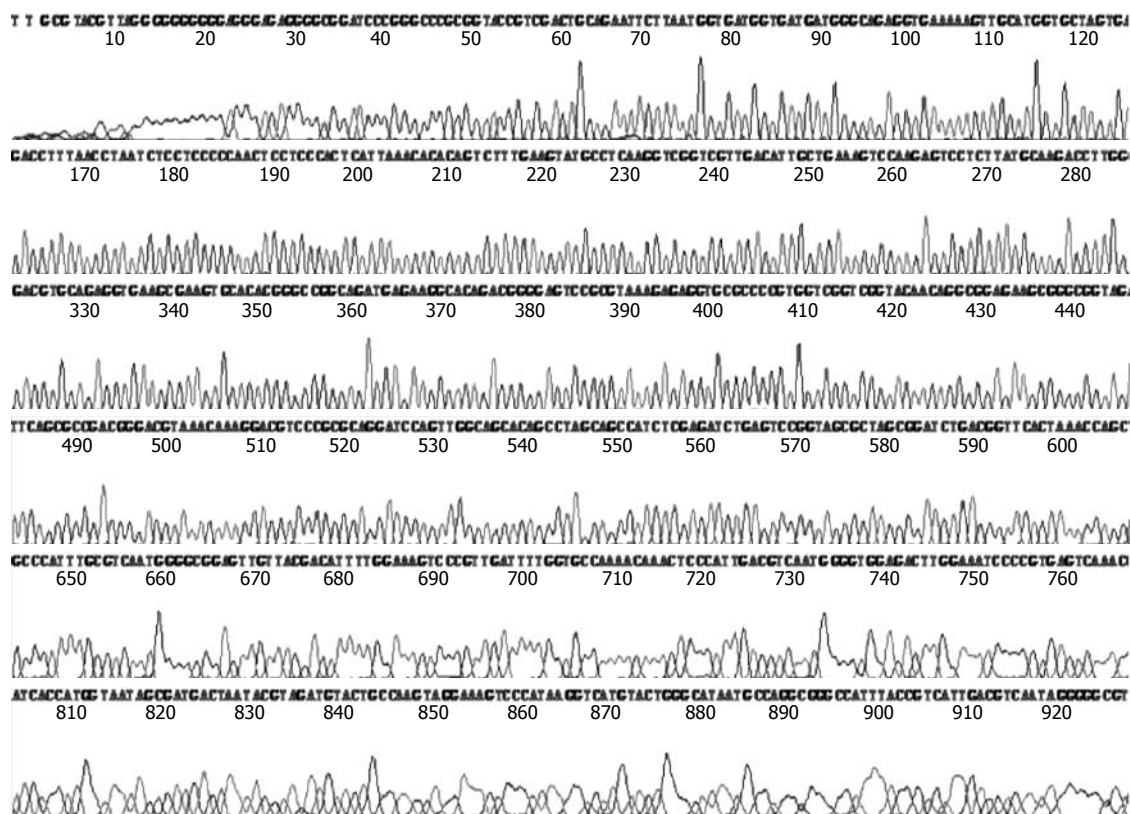


图2 重组克隆pHBV-X-IRES2-EGFP的测序。

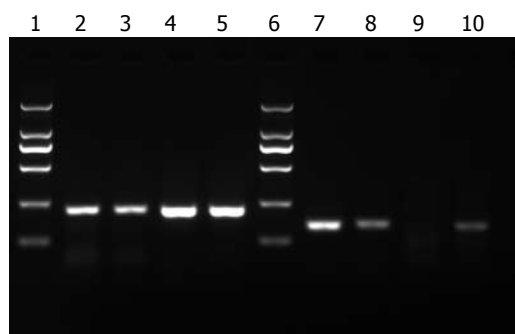


图3 RT-PCR检测各个细胞株中目的基因的表达. 1, 6: 2 000 bp Marker; 2-5: 内参引物hACTB在质粒、L02/48x、HL-7702和L02/x中的扩增; 7-10: X基因引物在质粒、L02/48x、HL-7702和L02/x中的扩增。

图1所示, pHBV-X-IRES2-EGFP重组载体经酶切电泳后可见HBV X基因目的条带(约470 bp)。NCBI网上比对测序序列,显示与HBV X基因99%相似度,结果证明已成功构建HBV X重组质粒(图2)。

2.2 PCR检测各个细胞株中目的基因的mRNA表达 重组质粒、L02/x、L02/48x和空白对照组HL-7702细胞均有内参基因的表达,前3组亦可见HBV X mRNA表达,而空白对照组HL-7702细胞则未见目的基因表达,即稳定和瞬时HBV X基因的肝细胞中有HBV X mRNA表达(图3)。

△△Ct法对各组目的基因表达相对定量,结果显示在稳定转染株中,L02/x的HBV X mRNA表达量为对照组L02/ctr的4倍,L02/48x的HBV X mRNA表达量为其对照L02/48ctr的54 855倍,进一步证实稳定和瞬时HBV X基因的肝细胞中有HBV X mRNA表达(表2,图4,5)。

2.3 Western blot检测各个细胞株中目的基因的表达 稳定和瞬时转染HBV X基因的肝细胞,即L02/x和L02/48x,均可见HBV X蛋白(17 kDa)的表达,而转染空质粒组L02/ctr和L02/48ctr,以及相应的空白细胞对照组L02/NC和L02/48NC均未有该蛋白的表达,即成功构建了稳定表达X基因的肝细胞株,同时验证了瞬时转染X基因的肝细胞确有目的基因的表达(图6)。

2.4 CCK-8检测HSCs细胞增殖 运用SPSS17软件进行统计分析,结果显示与稳定和瞬时HBV X基因的肝细胞共培养的HSCs增殖数值显著高于相应的转染空质粒组和空白组,差别有显著意义(表3,图7, $P < 0.05$)。

2.5 检测及计算HSCs的迁移 结晶紫染色后,运用SPSS17软件进行统计分析,结果显示与稳定和瞬时HBV X基因的肝细胞共培养的HSCs迁移数值显著高于相应的转染空质粒组和空白组,差别有显著意义(表4,图8, $P < 0.05$)。

表 2 各组细胞HBV X基因的Real-time PCR检测

样品	基因Actin				基因HBV X				ΔCt	$-\Delta\Delta Ct$	$2^{-\Delta\Delta Ct}$
	Ct1	Ct2	Ct3	Ct-Ave	Ct1	Ct2	Ct3	Ct-Ave			
L02/48x	23.71	23.58	23.53	23.61	13.18	13.37	13.60	13.38	-10.22	-15.74	54854.92
L02/48ctr	21.79	21.81	21.73	21.78	27.02	27.62	27.25	27.30	5.52	0	1
L02/x	17.04	16.80	17.15	17.00	29.05	28.89	28.54	28.80	11.83	-2.01	4.03
L02/ctr	16.97	16.74	16.70	16.80	30.86	30.51	30.43	30.60	13.84	0.00	1.00

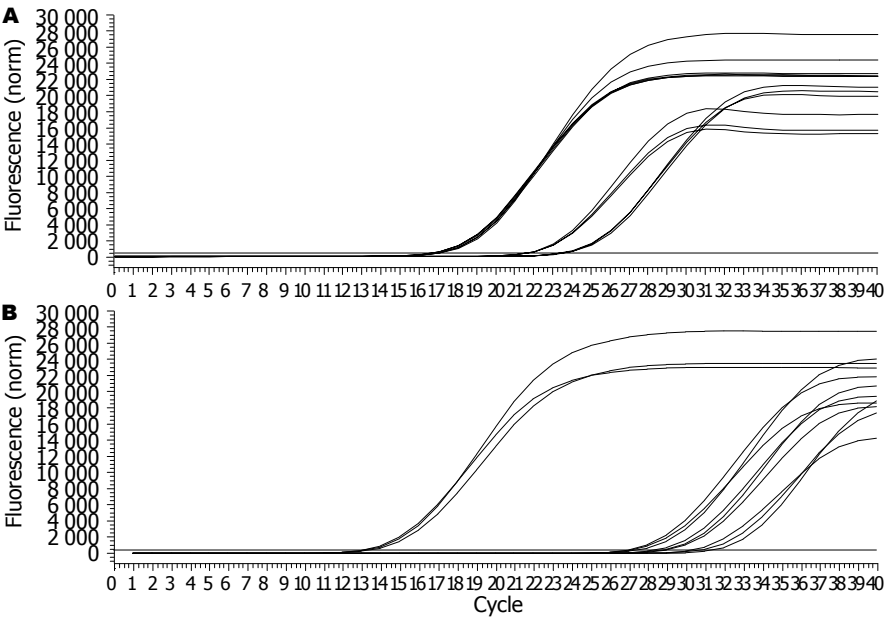


图 4 各组细胞目的基因及内参基因的qPCR扩增曲线. A: 目的基因扩增曲线; B: 内参基因扩增曲线.

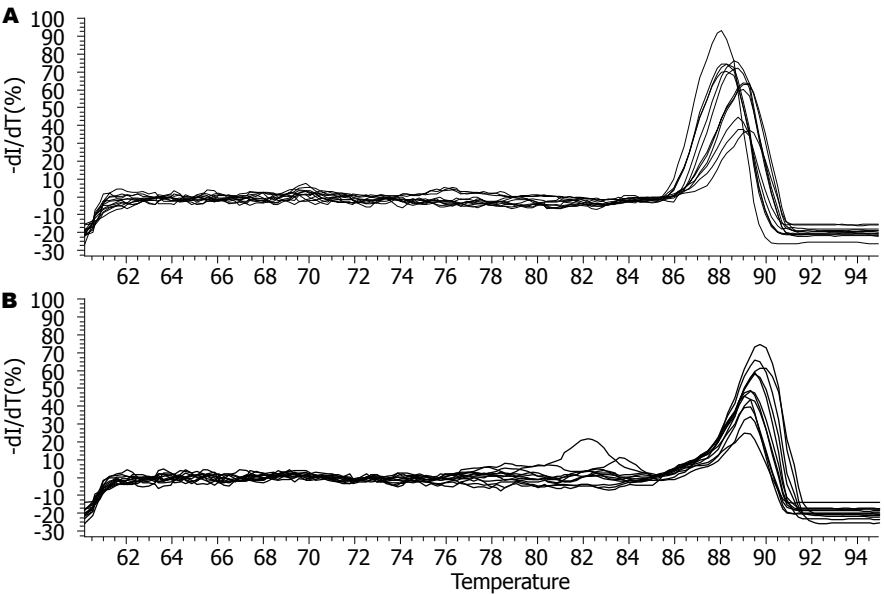


图 5 各组细胞目的基因及内参基因的qPCR溶解曲线. A: 目的基因在各组细胞cDNA中的溶解曲线; B: 内参基因hACTB在各组细胞cDNA中的溶解曲线.

3 讨论

我国属于HBV感染的高发病区, 每年有11-13万人死于HBV感染所致的肝硬化和肝细胞癌. 1989年Shirakata等^[26]将HBV X基因转染小鼠成纤维细胞, 并将其移植裸鼠发现该基因可诱发肿瘤形成, 从而揭示了HBV X基因的致癌作

用. 近30年来, 大量的分子生物学及动物实验已证实HBx蛋白可以通过影响PI-3激酶、p38和JNK等信号通路^[5,27]、干扰细胞修复^[17,18]等机制使细胞的增殖和凋亡失衡而致肝细胞癌的发生. 然而HBV X基因与肝纤维化的相关研究却少有报道, 二者关系未完全明确.

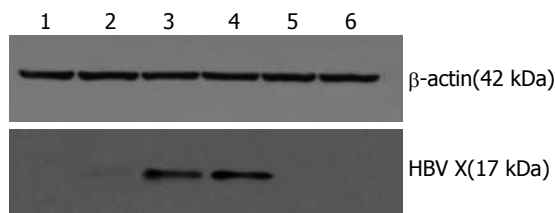


图 6 各组细胞中蛋白的Western blot检测. 1-3: 稳定转染组L02/NC、L02/ctr、L02/x; 4-6: 瞬时转染组L02/48x、L02/48ctr、L02/48NC.

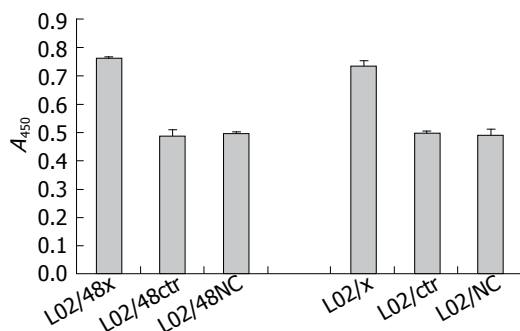


图 7 CCK8检测各组HSCs细胞增殖情况.

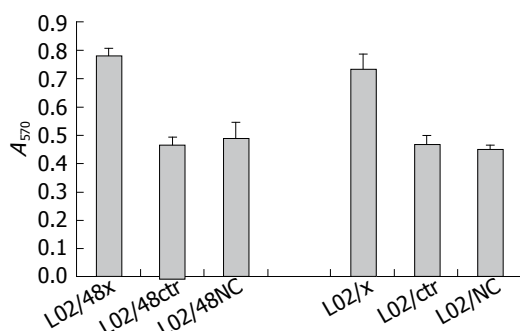


图 8 各组HSCs细胞迁移情况.

目前认为HSCs活化是肝纤维化发生、发展的关键环节,各种致纤维化因子激活HSCs^[28],使其活化、增殖,转化为肌成纤维细胞样细胞,合成多种细胞因子、大量合成细胞外基质,尤其是I、III型胶原等,并获得细胞运动和收缩功能,向损伤部位迁移聚集,直接参与损伤修复,加速胶原沉积,促进纤维化进程^[29].近年来仅有少数研究报道HBx有可能通过各种细胞因子旁分泌激活HSCs并促进其增殖,从而参与肝纤维化进程^[30].为进一步明确HBV X基因与肝纤维化的关系,本实验通过构建X基因真核表达载体,以此为平台构建稳定和瞬时转染该基因的HL-7702肝细胞,检测与其共培养的HSCs的增殖与迁移情况,最后统计学分析HBV X基因对HSCs增殖和迁移的影响,从而确立HBV X基因在肝纤维化中的作用.

表 3 CCK-8检测各组共培养HSCs细胞增殖情况

	第1次	第2次	第3次	mean ± SD
L02/48x	0.763	0.758	0.764	0.7617 ± 0.0032
L02/48ctr	0.487	0.470	0.508	0.4883 ± 0.0190
L02/48NC	0.497	0.503	0.492	0.4973 ± 0.0055
L02/x	0.753	0.735	0.725	0.7377 ± 0.0142
L02/ctr	0.496	0.506	0.489	0.4970 ± 0.0085
L02/NC	0.486	0.512	0.476	0.4913 ± 0.0186

表 4 各组共培养HSCs细胞迁移情况

	第1次	第2次	第3次	mean ± SD
L02/48x	0.424	0.427	0.448	0.4330 ± 0.0131
L02/48ctr	0.244	0.259	0.272	0.2583 ± 0.0140
L02/48NC	0.279	0.235	0.297	0.2703 ± 0.0319
L02/x	0.439	0.389	0.395	0.4077 ± 0.0273
L02/ctr	0.256	0.247	0.278	0.2603 ± 0.0159
L02/NC	0.246	0.247	0.257	0.2500 ± 0.0061

在实验中,我们首先构建了HBV X基因的荧光真核表达载体pHBV-X-IRES2-EGFP,经酶切及直接测序证实重组载体的成功构建.其次是肝细胞的选择,目前国内外大多数肝细胞研究选用HepG2为实验细胞,但是此细胞具有部分肝癌细胞的特性,不宜用于HBV致肝纤维化的研究.为了更好模拟体内环境,本实验选用具有正常肝细胞特性的HL-7702肝细胞,通过脂质体转染技术,获得稳定和瞬时转染HBV X基因的肝细胞,PCR和蛋白印迹实验均证实两组细胞中X基因的mRNA和蛋白的表达.最后是肝细胞与HSCs的共培养实验.既往研究已发现瞬时转染X基因24 h即有表达,并逐渐上升,于72 h达到最高峰,之后回落^[9].以此为依据,本实验选取瞬时转染48 h和稳定转染的肝细胞与HSCs于Transwell非接触培养体系中共培养36 h,之后检测HSCs的增殖与迁移情况,结果显示,与转染空质粒和未转染肝细胞共培养的HSCs做对照,与转染X基因组共培养的HSCs的增殖和迁移数值显著升高($P < 0.05$).

实验结果说明HBV X基因在肝细胞中的表达可促进与其共培养的HSCs发生增殖与迁移.如上所述,HSCs的活化与增殖是肝纤维化进程的一重要环节,HBx对HSCs的这一作用揭示了其在肝纤维化发生与发展中的作用,即HBV X基因的表达能促使HSCs增殖和迁移,从而促进肝纤维化进程.

志谢 感谢唐南洪、李秀金及王晓茜同志在本试验中给予的大力帮助。

4 参考文献

- Gearhart TL, Bouchard MJ. The hepatitis B virus X protein modulates hepatocyte proliferation pathways to stimulate viral replication. *J Virol* 2010; 84: 2675-2686
- Mao Y, Da L, Tang H, Yang J, Lei Y, Tiollais P, Li T, Zhao M. Hepatitis B virus X protein reduces starvation-induced cell death through activation of autophagy and inhibition of mitochondrial apoptotic pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 2011; 415: 68-74
- Clippinger AJ, Gearhart TL, Bouchard MJ. Hepatitis B virus X protein modulates apoptosis in primary rat hepatocytes by regulating both NF-kappaB and the mitochondrial permeability transition pore. *J Virol* 2009; 83: 4718-4731
- Kuo TC, Chao CC. Hepatitis B virus X protein prevents apoptosis of hepatocellular carcinoma cells by upregulating SATB1 and HURP expression. *Biochem Pharmacol* 2010; 80: 1093-1102
- Liu Q, Chen J, Liu L, Zhang J, Wang D, Ma L, He Y, Liu Y, Liu Z, Wu J. The X protein of hepatitis B virus inhibits apoptosis in hepatoma cells through enhancing the methionine adenosyltransferase 2A gene expression and reducing S-adenosyl-methionine production. *J Biol Chem* 2011; 286: 17168-17180
- Knoll S, Fürst K, Thomas S, Villanueva Baselga S, Stoll A, Schaefer S, Pützer BM. Dissection of cell context-dependent interactions between HBx and p53 family members in regulation of apoptosis: a role for HBV-induced HCC. *Cell Cycle* 2011; 10: 3554-3565
- Gearhart TL, Bouchard MJ. The hepatitis B virus HBx protein modulates cell cycle regulatory proteins in cultured primary human hepatocytes. *Virus Res* 2011; 155: 363-367
- Martin-Lluesma S, Schaeffer C, Robert EI, van Breugel PC, Leupin O, Hantz O, Strubin M. Hepatitis B virus X protein affects S phase progression leading to chromosome segregation defects by binding to damaged DNA binding protein 1. *Hepatology* 2008; 48: 1467-1476
- Chen HY, Tang NH, Li XJ, Zhang SJ, Chen ZX, Wang XZ. Transfection and expression of hepatitis B virus x gene and its effect on apoptosis in HL-7702 cells. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 959-964
- Yang WJ, Chang CJ, Yeh SH, Lin WH, Wang SH, Tsai TF, Chen DS, Chen PJ. Hepatitis B virus X protein enhances the transcriptional activity of the androgen receptor through c-Src and glycogen synthase kinase-3beta kinase pathways. *Hepatology* 2009; 49: 1515-1524
- Kim K, Kim KH, Cheong J. Hepatitis B virus X protein impairs hepatic insulin signaling through degradation of IRS1 and induction of SOCS3. *PLoS One* 2010; 5: e8649
- Wei C, Ni C, Song T, Liu Y, Yang X, Zheng Z, Jia Y, Yuan Y, Guan K, Xu Y, Cheng X, Zhang Y, Yang X, Wang Y, Wen C, Wu Q, Shi W, Zhong H. The hepatitis B virus X protein disrupts innate immunity by downregulating mitochondrial antiviral signaling protein. *J Immunol* 2010; 185: 1158-1168
- Hsieh A, Kim HS, Lim SO, Yu DY, Jung G. Hepatitis B viral X protein interacts with tumor suppressor adenomatous polyposis coli to activate Wnt/beta-catenin signaling. *Cancer Lett* 2011; 300: 162-172
- Chen L, Hu L, Li L, Liu Y, Tu QQ, Chang YX, Yan HX, Wu MC, Wang HY. Dysregulation of beta-catenin by hepatitis B virus X protein in HBV-infected human hepatocellular carcinomas. *Front Med China* 2010; 4: 399-411
- Ha HL, Yu DY. HBx-induced reactive oxygen species activates hepatocellular carcinogenesis via dysregulation of PTEN/Akt pathway. *World J Gastroenterol* 2010; 16: 4932-4937
- Matsuda Y, Ichida T. Impact of hepatitis B virus X protein on the DNA damage response during hepatocarcinogenesis. *Med Mol Morphol* 2009; 42: 138-142
- Qadri I, Fatima K, AbdeL-Hafiz H. Hepatitis B virus X protein impedes the DNA repair via its association with transcription factor, TFIIH. *BMC Microbiol* 2011; 11: 48
- Chen HY, Tang NH, Lin N, Chen ZX, Wang XZ. Hepatitis B virus X protein induces apoptosis and cell cycle deregulation through interfering with DNA repair and checkpoint responses. *Hepatol Res* 2008; 38: 174-182
- Koike K. Hepatitis B virus X gene is implicated in liver carcinogenesis. *Cancer Lett* 2009; 286: 60-68
- Xiang WQ, Liu W. [Role of HBx in hepatocellular carcinoma development]. *Zhejiang Daxue Xuebao (Yixueban)* 2010; 39: 333-338
- Pár A. [Hepatitis B virus (HBV) infection and hepatocarcinogenesis]. *Orv Hetil* 2010; 151: 1045-1053
- Kew MC. Hepatitis B virus x protein in the pathogenesis of hepatitis B virus-induced hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol Hepatol* 2011; 26 Suppl 1: 144-152
- Liu X, Zhu ST, You H, Cong M, Liu TH, Wang BE, Jia JD. Hepatitis B virus infects hepatic stellate cells and affects their proliferation and expression of collagen type I. *Chin Med J (Engl)* 2009; 122: 1455-1461
- Martín-Vílchez S, Sanz-Cameno P, Rodríguez-Muñoz Y, Majano PL, Molina-Jiménez F, López-Cabrera M, Moreno-Otero R, Lara-Pezzi E. The hepatitis B virus X protein induces paracrine activation of human hepatic stellate cells. *Hepatology* 2008; 47: 1872-1883
- 陈红英, 唐南洪, 张生君, 陈治新, 王小众. 乙肝病毒X基因真核表达载体的构建及人肝细胞株HL-7702转染. *世界华人消化杂志* 2004; 12: 614-617
- Shirakata Y, Kawada M, Fujiki Y, Sano H, Oda M, Yaginuma K, Kobayashi M, Koike K. The X gene of hepatitis B virus induced growth stimulation and tumorigenic transformation of mouse NIH3T3 cells. *Jpn J Cancer Res* 1989; 80: 617-621
- Shukla R, Yue J, Siouda M, Gheit T, Hantz O, Merle P, Zoulim F, Krutovskikh V, Tommasino M, Sylla BS. Proinflammatory cytokine TNF-alpha increases the stability of hepatitis B virus X protein through NF-kB signaling. *Carcinogenesis* 2011; 32: 978-985
- Shimada H, Staten NR, Rajagopalan LE. TGF-beta1 mediated activation of Rho kinase induces TGF-beta2 and endothelin-1 expression in human hepatic

- stellate cells. *J Hepatol* 2011; 54: 521-528
- 29 Wirkowska A, Paczek L. [Liver fibrosis and cirrhosis--causes. Part I]. *Przegl Lek* 2011; 68: 222-227
- 30 Guo GH, Tan DM, Zhu PA, Liu F. Hepatitis B

virus X protein promotes proliferation and up-regulates TGF-beta1 and CTGF in human hepatic stellate cell line, LX-2. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2009; 8: 59-64

编辑 张姗姗 电编 闫晋利

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: ^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ ($P > 0.05$ 不注)。如同一表中另有一套 P 值, 则^c $P < 0.05$, ^d $P < 0.01$; 第3套为^e $P < 0.05$, ^f $P < 0.01$ 。 P 值后注明何种检验及其具体数字, 如 $P < 0.01$, $t = 4.56$ vs 对照组等, 注在表的左下方。表内采用阿拉伯数字, 共同的计量单位符号应注在表的右上方, 表内个位数、小数点、±、-应上下对齐。“空白”表示无此项或未测, “-”代表阴性未发现, 不能用同左、同上等。表图勿与正文内容重复。表图的标目尽量用 t/min , $c/(\text{mol/L})$, p/kPa , V/mL , $t/^\circ\text{C}$ 表达。黑白图请附黑白照片, 并拷入光盘内; 彩色图请提供冲洗的彩色照片, 请不要提供计算机打印的照片。彩色图片大小 $7.5\text{ cm} \times 4.5\text{ cm}$, 必须使用双面胶条粘贴在正文内, 不能使用浆糊粘贴。(5)志谢 后加冒号, 排在讨论后及参考文献前, 左齐。

HBV cccDNA的水平及临床因素对肝细胞癌术后预后的判断价值

白彦楼, 高英堂, 李莹, 王毅军, 韩涛, 任超逸, 杜智

白彦楼, 天津医科大学第三中心临床学院 天津市 300170
高英堂, 杜智, 天津市第三中心医院 天津市人工细胞重点实验室 天津市 300170
李莹, 韩涛, 天津市第三中心医院肝内科 天津市 300170
王毅军, 任超逸, 天津市第三中心医院肝胆外科 天津市 300170
白彦楼, 在读硕士, 主要从事肝、胆、胰腺疾病的研究。
天津市应用基础与前沿技术研究计划基金资助项目, No. 08 JCYBJC08300
天津市卫生局科技攻关基金资助项目, No. 11KG112
作者贡献分布: 此课题由杜智与高英堂设计; 研究过程由高英堂、李莹、韩涛及白彦楼完成; 数据分析由白彦楼与高英堂完成; 论文撰写由白彦楼完成; 文章修改和审阅由杜智与高英堂完成; 实验标本收集、管理由王毅军与李莹完成; 病例随访由任超逸完成。
通讯作者: 杜智, 教授, 300170, 天津市河东区津塘路83号, 天津市第三中心医院。zhi-du@163.com
电话: 022-84112205 传真: 022-84112205
收稿日期: 2012-01-07 修回日期: 2012-02-18
接受日期: 2012-03-06 在线出版日期: 2012-03-28

Significance of HBV cccDNA and clinical factors in evaluating prognosis of hepatocellular carcinoma following surgical resection

Yan-Lou Bai, Ying-Tang Gao, Ying Li, Yi-Jun Wang, Tao Han, Chao-Yi Ren, Zhi Du

Yan-Lou Bai, the Third Central Clinical College of Tianjin Medical University, Tianjin 300170, China
Ying-Tang Gao, Zhi Du, Key Laboratory of Artificial Cells, the Third Central Hospital of Tianjin, Tianjin 300170, China
Ying Li, Tao Han, Department of Hepatology, the Third Central Hospital of Tianjin, Tianjin 300170, China
Yi-Jun Wang, Chao-Yi Ren, Department of Hepatobiliary Surgery, the Third Central Hospital of Tianjin, Tianjin 300170, China
Supported by: the Tianjin Basic Science and Frontier Technology Research Project, No. 08JCYBJC08300; and the Key Research Project of Tianjin Healthy Bureau, No. 11KG112
Correspondence to: Zhi Du, Professor, the Third Central Hospital of Tianjin, Tianjin 300170, China. zhi-du@163.com
Received: 2012-01-07 Revised: 2012-02-18
Accepted: 2012-03-06 Published online: 2012-03-28

Abstract

AIM: To investigate the correlation of HBV cccDNA and clinical factors with the survival of patients with hepatocellular carcinoma (HCC)

after hepatectomy.

METHODS: A retrospective analysis was carried out in 60 HCC patients who underwent radical operation from 2003 to 2006 at our hospital. Serum HBV DNA and covalently closed circular DNA (cccDNA) levels were detected by real-time PCR. In 55 patients with complete follow-up data, serum HBV DNA, cccDNA in liver tissue and clinical characteristics were retrospectively analyzed. The overall survival and recurrence-free survival (RFS) were calculated using the Kaplan-Meier method. All the data were analyzed using Log-rank test and Cox regression model.

RESULTS: HBV cccDNA was positive in only one serum sample (1/35) and in 20% (11/55) of tumor tissues. There was a significant correlation between intrahepatic cccDNA in tumor tissue and total HBV DNA in serum ($r = 0.364$, $P = 0.006$). The 1-, 3-, 5-year overall survival and RFS rates for 55 patients after HCC resection were 73%, 51% and 38%, and 63%, 29% and 19%, respectively. The independent prognostic factor influencing RFS was the level of intrahepatic cccDNA in tumor tissue. The independent prognostic factors influencing overall survival were tumor numbers and vessel invasion.

CONCLUSION: HCC patients with solitary tumor and without vessel invasion showed a higher overall survival. HCC patients with an intrahepatic HBV cccDNA level of less than 1 000 copies/ μ g had a higher RFS.

Key Words: Hepatocellular carcinoma; Hepatectomy; HBV cccDNA; Prognosis; Neoplasm metastasis; Recurrence

Bai YL, Gao YT, Li Y, Wang YJ, Han T, Ren CY, Du Z. Significance of HBV cccDNA and clinical factors in evaluating prognosis of hepatocellular carcinoma following surgical resection. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2012; 20(9): 729-736

摘要

目的: 研究HBV cccDNA水平及临床因素对肝

■背景资料

与肝癌术后复发相关的主要因素包括: 肿瘤大小、结节数目、血管浸润、肿瘤有无包膜和术前AFP水平等。HBeAg、HBV DNA、cccDNA也是影响肝癌预后的相关因素。

■同行评议者

杨江华, 副教授, 皖南医学院弋矶山医院感染科

■相关报道

Hosaka等报道在接受抗病毒治疗的患者中,多因素分析表明血清HBV DNA水平与肝癌复发无相关性,而高水平肝组织内cccDNA的患者有较高复发率。

细胞癌术后预后的影响。

方法: 回顾性分析2003-2006年我院收治60例术后病理证实原发性肝癌患者,采用荧光定量PCR检测乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)共价闭合环状DNA(cccDNA)和HBV DNA; 55例获得完整随访,选择血清HBV DNA、肝组织cccDNA及临床、病理特征等指标分析其对无瘤生存率、总体生存率的影响。采用Kaplan-Meier法计算无瘤生存率、总体生存率, Log-rank检验比较组间差异,多因素分析采用Cox回归模型。

结果: 血清cccDNA仅有1例阳性(1/35), 肝组织cccDNA阳性率20.0%(11/55), 肝癌组织cccDNA与血清HBV DNA之间存在相关性($r = 0.364$; $P = 0.006$)。全组1、3、5年总体生存率为73%、51%和38%, 无瘤生存率为63%、29%和19%; 多因素分析结果表明, 肿块数目($P = 0.011$)、血管侵犯($P = 0.001$)是影响术后总体生存率的独立危险因素; 癌组织cccDNA水平($P = 0.007$)、生长方式($P = 0.002$)是影响术后无瘤生存率的独立危险因素。

结论: 单发肿瘤、无血管侵犯的患者术后总体生存率较高。癌组织cccDNA水平 $<3\log_{10}$ copies/ μg 、肝癌膨胀性生长的患者术后无瘤生存率较高。

关键词: 肝细胞癌; 肝切除术; HBV cccDNA; 预后; 肿瘤转移; 复发

白彦楼, 高英堂, 李莹, 王毅军, 韩涛, 任超逸, 杜智. HBV cccDNA的水平及临床因素对肝细胞癌术后预后的判断价值. 世界华人消化杂志 2012; 20(9): 729-736
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/729.asp>

0 引言

手术切除为肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)的主要治疗手段, 随着手术和围手术期管理技术的提高, 在一定程度上提高了患者术后长期生存率^[1]。与其他肿瘤相比, HCC有较高复发率并缺乏有效的辅助治疗, HCC患者术后长期生存率仍不满意^[2]。术后高复发率是最终导致患者死亡的重要原因。目前文献报道与肝癌术后复发相关的主要因素包括: 肿瘤大小、结节数目、血管浸润、肿瘤有无包膜和术前AFP水平等^[3-5]。在我国, 乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)感染及其导致的肝脏病变与肝癌密切相关, Kubo等^[6,7]报道高水平HBeAg、HBV DNA是

影响肝癌术后预后的独立危险因素。但对作为HBV复制模板的共价闭合环状DNA(covalently closed circular DNA, cccDNA)与肝癌术后预后的关系, 仅有Hosaka等^[8]报道在接受抗病毒治疗的肝癌患者中, 经局部消融治疗或手术治疗后, 高水平的肝组织内cccDNA有较高复发率($P = 0.0438$)。本文对我院肝胆外科收治的60例经根治性切除的HCC患者, 定量测定肝组织cccDNA水平, 回顾性分析临床病理因素, 以期发现影响肝癌切除术预后的因素, 特别是cccDNA对肝癌切除术预后的影响, 为原发性肝癌的临床综合治疗及判断预后提供依据。

1 材料和方法

1.1 材料 收集60例天津市第三中心医院2003-12/2006-08住院的乙型肝炎相关性HCC患者, 诊断依据病史、临床表现、实验室检查、B超或CT等影像学检查、组织学病理检查结果^[9]。记录患者术前Child-Pugh分级、是否肝硬化、AFP、肿瘤数目、大小、生长方式等指标, 所有HCC病例留取新鲜的癌组织、癌旁组织和外周血标本, 于-80℃冰箱保存。组织病理学诊断均为原发性肝细胞癌, 肿瘤组织切除完整, 手术切缘处无癌细胞残留。所有标本取材均通过医院伦理委员会审核, 家属签字知情同意。HBV DNA荧光定量检测试剂盒购自上海科华公司; 限制性内切酶Hind III酶购自Toyobo公司; 不降解质粒的ATP依赖的DNA酶购自EpiCentre公司; Realtime PCR Master Mix购自Toyobo公司; ABI7000荧光定量PCR扩增仪购自ABI公司。

1.2 方法

1.2.1 HBV DNA、cccDNA定量检测: 参照文献^[10]进行实时荧光定量PCR分析, 简述如下: (1)血清标本处理: 参照HBV DNA荧光定量检测试剂盒说明书提取血清HBV DNA, -20℃保存; (2)肝组织标本处理: 提取肝组织DNA, 行限制性内切酶Hind III酶切及不降解质粒的ATP依赖的DNA酶(Plasmid-safe™ ATP-Dependent DNase, PSAD)酶切, 设置阴性空白对照和重组质粒阳性对照; (3)荧光定量PCR检测: 应用ABI7000荧光定量PCR扩增仪进行检测。反应体系: 上游引物1 μL 、下游引物1 μL 、探针1 μL 、Realtime PCR Master Mix 20 μL 、模板2 μL , 总反应体积25 μL 。反应条件: 37℃保温5 min; 94℃预变性2 min, 然后94℃变性15 s、60℃延伸40 s, 45个循环。每次实验检测均设空白对照。

表 1 患者临床资料

因素	癌组织cccDNA		P值
	<3log10 copies/μg(n = 44)	≥3log10 copies/μg(n = 11)	
性别 男(%)	37(84.1)	9(81.8)	1.000
年龄(年)	52.4 ± 11.5	51.4 ± 9.7	0.770
表面抗原 阳性(%)	33(75)	11(100)	0.096
Child分级A(%)	34(77.3)	10(90.9)	0.555
AFP(μg/L)	70.72(10.66–4001)	401(14.04–1144.9)	0.552
肝硬化 有(%)	39(88.6)	11(100)	0.571
生长方式 膨胀性(%)	20(45.5)	7(63.6)	0.281
肿块直径(cm)	9.2 ± 6.0	8.1 ± 4.9	0.603
肿块数目 单发(%)	29(65.9)	6(54.5)	0.726
血管侵犯 无(%)	30(68.2)	7(63.6)	1.000
TNM分期 I(%)	21(47.7)	4(36.4)	0.498
病理分级			0.788
1	16(36.4)	4(36.4)	
2	16(36.4)	5(45.5)	
3	12(27.3)	2(18.2)	
血清HBV DNA (log10 copies/mL)	3.59(0–5.24)	5.07(4.78–6.36)	0.007
癌组织总HBV DNA (log10 copies/μg)	6.258 ± 1.512	7.71 ± 0.850	0.003
癌旁组织总HBV DNA (log10 copies/μg)	6.062 ± 1.458	7.68 ± 1.515	0.001
癌旁组织cccDNA (log10 copies/μg)	0(0–2.93)	3.90(0–4.32)	0.020

■创新盘点

本研究应用实时荧光定量PCR法检测肝癌组织cccDNA水平,证明其是影响肝癌术后无瘤生存率的独立危险因素。

1.2.2 随访观察: 所有患者均在门诊检测复发指标, 每月复查血清AFP, 2-4 mo复查1次B超或强化CT, 必要时行MRI、肝动脉造影, 未能按时复查者则电话随访。总体生存时间计算: 自手术至死亡或最后随访日。复发以影像学检查(B超、CT、胸片)发现复发病灶, 必要时行经皮穿刺组织学活检。无瘤生存时间的计算: 自手术至复发事件出现之日。随访截止日期为2011-08-17。

统计学处理 所有资料应用SPSS16.0统计软件分析, 符合正态分布数据, 变量值用mean ± SD表示, 两组间比较采用 t 检验; 不符合正态分布计量资料, 用四分位数表示, 2组间比较采用Mann-Whitney检验; 相关性分析采用Spearman检验; 计数资料分析采取 χ^2 检验或Fisher确切概率法; 累积生存率采用寿命表法; 单因素分析采用Kaplan-Meier, 差异显著性用Log-rank法检验, 将单因素分析有统计学意义的变量引入Cox比例风险模型, 进行多因素分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 患者的临床病理特征 60例患者中男性51人,

女性9人, 年龄22-75岁, 平均年龄53.37岁 ± 11.49岁。5例死因与癌无关, 其余病例经过规律随访, 获得完整的随访资料, 最长随访时间88 mo。HCC患者癌组织cccDNA < 3log10 copies/μg组及 ≥ 3log10 copies/μg组的组间血清HBV DNA、癌组织总HBV DNA、癌旁组织总HBV DNA、癌旁组织cccDNA差异有统计学意义, 其余临床资料差异无统计学意义(表1)。1、3、5年无瘤生存率分别为63%、29%和19%, 中位无瘤生存期16.0 mo; 1、3、5年总体生存率分别为73%、51%和38%, 中位总体生存期36.3 mo, 生存期超过6年9例, 生存期超过7年2例。

2.2 HCC患者血清HBV DNA与cccDNA、肝组织总HBV DNA与cccDNA定量结果 血清HBV DNA阳性率69.1%(38/55), 38例阳性病例定量值(5.0 ± 1.4) copies/mL, 而35例血清中cccDNA仅有1例阳性(1/35), 定量值2.7log10 copies/mL; 癌组织总HBV DNA阳性率100.0%(55/55), 定量值(6.6 ± 1.5)log10 copies/μg, 癌组织cccDNA阳性率20.0%(11/55), 11例阳性病例定量值(4.71 ± 1.64)log10 copies/μg; 癌旁组织总HBV DNA阳性率100.0%(55/55), 定量值(6.4 ± 1.5)log10 copies/μg,

■应用要点

抗病毒药物对肝组织cccDNA水平影响较小,术后肝组织cccDNA水平可以代表较长时间内cccDNA水平。在血清HBV DNA存在波动时,肝组织内cccDNA水平仍可用于评价肝癌预后。

表 2 临床因素与术后总体生存率单因素分析

因素	1年总体生存率	3年总体生存率	5年总体生存率	χ^2 值	P值
性别					
男	74	52	37	0.015	0.901
女	67	44	44		
年龄					
≥60	86	64	50	1.236	0.266
<60	68	46	34		
表面抗原					
阳性	69	44	36	0.042	0.838
阴性	67	67	50		
Child 分级					
A	73	50	39	0.009	0.922
B	73	55	36		
术前AFP水平($\mu\text{g/L}$)					
≥400	52	39	26	4.247	0.039
<400	88	59	47		
肝硬化					
有	72	50	36	0.782	0.377
无	80	60	60		
生长方式					
浸润	54	29	18	14.481	<0.001
膨胀	93	74	59		
肿块数目					
1	80	60	51	7.787	0.005
>1	60	35	15		
肿块直径					
≥5	67	42	30	4.848	0.028
<5	92	83	67		
血管侵犯					
有	33	22	17	14.773	<0.001
无	92	65	48		
TNM分期					
1	92	68	56	7.337	0.007
2	57	37	23		
病理分级					
1	90	70	55	5.666	0.059
2	62	29	24		
3	64	57	36		
血清总HBV DNA(\log_{10} copies/mL)					
≥5	63	37	32	1.065	0.425
<5	78	58	41		
癌组织总HBV DNA(\log_{10} copies/ μg)					
≥5	74	48	37	0.176	0.675
<5	67	67	44		
癌旁组织总HBV DNA(\log_{10} copies/ μg)					
≥5	76	51	38	0.001	0.979
<5	60	50	40		
癌组织cccDNA(\log_{10} copies/ μg)					
≥3 \log_{10}	55	45	27	0.77	0.38
<3 \log_{10}	77	52	41		
癌旁组织cccDNA(\log_{10} copies/ μg)					
≥3 \log_{10}	71	53	41	0.068	0.794
<3 \log_{10}	74	50	37		

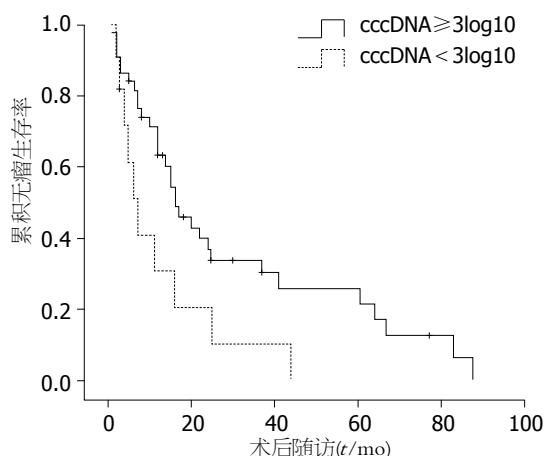


图1 肝癌组织cccDNA $<3\log_{10}$ copies/ μg 组及 $\geq 3\log_{10}$ copies/ μg 组的生存曲线. $P = 0.028$.

癌旁组织cccDNA阳性率36.4%(20/55), 20例阳性病例定量值(4.22 ± 1.13) \log_{10} copies/ μg . 癌组织cccDNA与血清HBV DNA之间存在相关性($r = 0.364$; $P = 0.006$); 癌组织cccDNA与癌旁cccDNA之间存在相关性($r = 0.319$; $P = 0.018$).

2.3 影响HCC切除术后患者预后的单因素和多因素 单因素分析显示术前AFP水平($P = 0.039$)、生长方式($P < 0.001$)、肿块数目($P = 0.005$)、血管侵犯($P < 0.001$)、TNM分期($P = 0.007$)、肿块直径($P = 0.028$)是影响术后总体生存率的预后因素(表2). Cox模型多因素分析显示肿块数目($P = 0.011$)、血管侵犯($P = 0.001$)是影响术后总体生存率的危险因素(表3). 单因素分析显示癌组织cccDNA水平($P = 0.028$)、术前AFP水平($P = 0.021$)、生长方式($P = 0.019$)、肿块数目($P = 0.006$)、血管侵犯($P = 0.048$)、TNM分期($P = 0.027$)、病理分级($P = 0.030$)是术后无瘤生存率的预后因素(表4, 图1). Cox模型多因素分析显示癌组织cccDNA水平($P = 0.007$)、生长方式($P = 0.002$)是影响术后无瘤生存率的危险因素(表5).

3 讨论

影响肝癌术后预后的因素较多, 在肿瘤性因素中, 如肿瘤大小、结节数目、血管浸润、肿瘤有无包膜、术前AFP水平等对总体生存率和无瘤生存率有着显著影响^[3-5]. 在非肿瘤性因素中, HBV感染与肝癌预后有密切的联系^[11], 高水平HBeAg、HBV DNA病例肝癌预后较差^[5,12]. Hosaka等^[8]报道高水平的肝组织内cccDNA患者有较高复发率, 但仅55例病例纳入研究, 结论尚需进一步论证.

在本研究的55例获完整随访病例中, 最长

随访时间88 mo, 5年生存率38%, 与樊嘉等^[13](41.76%)报道近似. 在肿瘤因素方面, Shah等^[14]报道肿瘤数目、血管侵犯是影响HCC切除术后患者总体生存率的重要因素. Ercolani等^[15]报道肿瘤包膜与无瘤生存率显著相关. 本组资料通过多因素分析结果证实, 肿块数目、血管侵犯是影响肝癌术后总体生存率的独立危险因素, 生长方式(即肿瘤有无包膜)是影响肝癌术后无瘤生存率的独立危险因素, 提示尽管手术已切除肿瘤, 但肿瘤细胞在术前已沿血管或淋巴管播散至肝内外, 并继续发展, 形成复发转移灶. 部分临床因素对肝癌预后的影响文献报道不一, Hanazaki等^[16]报道AFP $>1\,000\,\mu\text{g/L}$ 和血管浸润是影响患者生存的独立负相关因素; 而 $>1\,000\,\mu\text{g/L}$ 是唯一影响无瘤生存期的独立预后因素. 然国内多因素研究未见AFP值与预后有关^[17]. Kim等^[18]报道, 肿瘤的大小与HCC患者的无瘤生存期有着密切关系, 而Ercolani等^[15]报道未见肿瘤的大小与HCC患者的无瘤生存期有关. 本组资料未见AFP、肿瘤的大小与预后有关.

由于抗病毒治疗在较短时间内可引起HBV DNA载量较大变化, 单次测定很难反映较长时间内HBV DNA水平. 相对于单次测定HBV DNA载量, 持续监测可能更好地反映HBV引起的慢性肝脏损害以及由于慢性肝脏损害而导致的肝硬化及HCC. Kim等^[19]报道在除外抗病毒治疗病例后, 持续高载量血清HBV DNA是增加肝癌术后晚期复发率的独立危险因素. Hosaka等^[8]报道在接受抗病毒治疗的患者中, 多因素分析表明血清HBV DNA水平与肝癌复发无相关性, 而高水平肝组织内cccDNA的患者有较高复发率($P = 0.0438$). 在本组病例中血清总HBV DNA水平、肝组织总HBV DNA水平不是影响肝癌术后预后的因素, 可能与本组部分患者HBV DNA水平波动有关. HBV cccDNA在被感染肝细胞内的持续存在是慢性乙型肝炎患者持续感染的原因^[20], 而抗病毒药物对肝组织cccDNA水平影响较小^[21,22], 术后肝组织cccDNA水平可以代表较长时间内cccDNA水平. 在血清HBV DNA存在波动时, 肝组织内cccDNA仍可独立影响肝癌预后. 在本研究中肝癌组织cccDNA水平是影响肝癌术后无瘤生存率的独立危险因素($P = 0.007$), 肝癌组织cccDNA水平 $<3\log_{10}$ copies/ μg 组患者术后无瘤生存率较高. 虽然在总体生存率方面, cccDNA $<3\log_{10}$ copies/ μg

■名词解释

HBV cccDNA: 乙型肝炎病毒共价闭合环状DNA. 病毒颗粒脱去外膜进入胞质, 在胞质内脱去核壳, 形成HBV rcDNA. rcDNA进入肝细胞核解旋脱负链5'端连接的末端蛋白、正链5'端的RNA寡聚物, 在宿主和病毒DNA聚合酶作用下, 以负链DNA为模板, 延长正链DNA, 将缺口封闭, 形成cccDNA. cccDNA是HBV的原始复制模板.

■同行评价

本研究有一定的创新性,对临床上肝癌的早期诊断和治疗提供了较可靠的参考依据。

表 3 影响术后总体生存率的Cox模型多因素分析

因素	回归系数	标准误	Wald值	P值	相对危险度
肿块数目	0.889	0.349	6.467	0.011	2.432
血管侵犯	1.248	0.360	12.019	0.001	3.483

表 4 临床因素与术后无瘤生存率单因素分析

因素	1年无瘤生存率	3年无瘤生存率	5年无瘤生存率	χ^2 值	P值
性别					
男	63	35	24	1.392	0.238
女	66	0	0		
年龄					
≥60	71	27	27	0.656	0.418
<60	60	30	15		
表面抗原					
阳性	60	30	19	0.138	0.710
阴性	73	20	20		
Child 分级					
A	62	25	13	3.5	0.061
B	68	43	43		
肝硬化					
有	63	30	20	0.399	0.527
无	60	0	0		
术前AFP水平(μg/L)					
≥400	37	21	11	5.353	0.021
<400	80	33	23		
生长方式					
浸润	44	17	17	5.465	0.019
膨胀	81	40	23		
肿块数目					
1	76	34	30	7.537	0.006
>1	38	17	0		
肿块直径(cm)					
≥5	58	29	17	2.243	0.134
<5	81	28	28		
血管侵犯					
有	38	15	15	3.917	0.048
无	74	34	22		
TNM分期					
1	87	34	27	4.887	0.027
2	41	24	12		
病理分级					
1	84	37	37	7.033	0.030
2	54	20	0		
3	47	29	10		
血清总HBV DNA(log10 copies/mL)					
≥5	42	7	7	4.51	0.125
<5	74	39	25		
癌组织总HBV DNA(log10 copies/μg)					
≥5	65	22	22	0.001	0.975
<5	62	31	18		

癌旁组织总HBV DNA(log10 copies/ μ g)					
≥ 5	61	26	26	1.023	0.312
< 5	66	32	13		
癌组织cccDNA(log10 copies/ μ g)					
≥ 3	31	10	0	4.802	0.028
< 3	71	33	25		
癌旁组织cccDNA(log10 copies/ μ g)					
≥ 3	61	23	23	0.462	0.497
< 3	64	31	18		

表 5 影响术后无瘤生存率的Cox模型多因素分析

因素	回归系数	标准误	Wald值	P值	相对危险度
生长方式	1.491	0.488	9.332	0.002	4.442
癌组织cccDNA	1.248	0.466	7.184	0.007	3.484

组患者术后1、3、5年总体生存率均较高,但对肝癌术后总体生存率影响无统计学意义,延长随访时间可能会更好的界定这些患者的生存获益。

肝癌组织cccDNA影响肝癌预后的原因可能有以下几个方面: (1)cccDNA的形成是HBV侵入细胞后在细胞内进行复制的起始步骤,是建立病毒感染状态的最重要标志^[23],也是HBV持续和稳定存在的标志^[24]。Kim等^[19]报道血清乙型肝炎病毒持续存在是肝癌术后晚期复发的独立危险因素。cccDNA可能通过整合入肝细胞基因组导致肝癌,文献报道在81%的肿瘤组织中,HBV仅以cccDNA的形式存在,cccDNA在肝癌的形成中可能起直接的作用^[25]; (2)cccDNA也可以转录编码HBsAg、HBcAg、HBeAg的RNA,HBsAg、HBcAg、HBeAg可以加重炎症反应,持续的炎症反应和纤维化可加重患者病情并促进肿瘤的发生^[26]; (3)cccDNA可以转录编码HBx的RNA,HBx蛋白与肿瘤新生血管的生成和侵袭转移密切相关^[27]。潘爱萍等^[28]报道在癌及癌旁组织中,HBx蛋白表达阳性者cccDNA水平明显高于HBx蛋白表达阴性者($P<0.05$),同时发现HBx蛋白的表达与cccDNA水平呈正相关($r = 0.778$, $P<0.01$),推测cccDNA可能通过增加HBx蛋白的表达而致癌。

本研究同时发现肝癌组织cccDNA水平与血清HBV DNA之间存在相关性,但相关系数仅为0.364,两者相关度较低,变化并不完全一致,单纯血清HBV DNA很难反应肝癌组织cccDNA水平,这与Chan等^[29]持相同观点。肝癌组织cccD-

NA水平的定量测定是有必要的。

总之,尽管本组病例样本量较小,但通过5年以上的随访观察,单发肿瘤、无血管侵犯的患者术后总体生存率较高;癌组织cccDNA水平 $< 3\log_{10}$ copies/ μ g、肝癌膨胀性生长的患者术后无瘤生存率较高。更准确的结果有待大样本、多中心的临床病例分析。

4 参考文献

- 1 Fan ST, Mau Lo C, Poon RT, Yeung C, Leung Liu C, Yuen WK, Ming Lam C, Ng KK, Ching Chan S. Continuous improvement of survival outcomes of resection of hepatocellular carcinoma: a 20-year experience. *Ann Surg* 2011; 253: 745-758
- 2 Poon RT. Prevention of recurrence after resection of hepatocellular carcinoma: a daunting challenge. *Hepatology* 2011; 54: 757-759
- 3 Yamanaka N, Okamoto E, Toyosaka A, Mitunobu M, Fujihara S, Kato T, Fujimoto J, Oriyama T, Furukawa K, Kawamura E. Prognostic factors after hepatectomy for hepatocellular carcinomas. A univariate and multivariate analysis. *Cancer* 1990; 65: 1104-1110
- 4 Ercolani G, Grazi GL, Ravaioli M, Del Gaudio M, Gardini A, Cescon M, Varotti G, Cetta F, Cavallari A. Liver resection for hepatocellular carcinoma on cirrhosis: univariate and multivariate analysis of risk factors for intrahepatic recurrence. *Ann Surg* 2003; 237: 536-543
- 5 Poon RT, Fan ST, Lo CM, Liu CL, Ng IO, Wong J. Long-term prognosis after resection of hepatocellular carcinoma associated with hepatitis B-related cirrhosis. *J Clin Oncol* 2000; 18: 1094-1101
- 6 Kubo S, Hirohashi K, Yamazaki O, Matsuyama M, Tanaka H, Horii K, Shuto T, Yamamoto T, Kawai S, Wakasa K, Nishiguchi S, Kinoshita H. Effect of the presence of hepatitis B e antigen on prognosis after liver resection for hepatocellular carcinoma in patients with chronic hepatitis B. *World J Surg* 2002; 26: 555-560

- 7 Yeh CT, So M, Ng J, Yang HW, Chang ML, Lai MW, Chen TC, Lin CY, Yeh TS, Lee WC. Hepatitis B virus-DNA level and basal core promoter A1762T/G1764A mutation in liver tissue independently predict postoperative survival in hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2010; 52: 1922-1933
- 8 Hosaka T, Suzuki F, Kobayashi M, Hirakawa M, Kawamura Y, Yatsuji H, Sezaki H, Akuta N, Suzuki Y, Saitoh S, Arase Y, Ikeda K, Kobayashi M, Kumada H. HBcrAg is a predictor of post-treatment recurrence of hepatocellular carcinoma during antiviral therapy. *Liver Int* 2010; 30: 1461-1470
- 9 Bruix J, Sherman M. Management of hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2005; 42: 1208-1236
- 10 Gao YT, Han T, Li Y, Yang B, Wang YJ, Wang FM, Jing X, Du Z. Enhanced specificity of real-time PCR for measurement of hepatitis B virus cccDNA using restriction endonuclease and plasmid-safe ATP-dependent DNase and selective primers. *J Virol Methods* 2010; 169: 181-187
- 11 Ou DP, Yang LY, Huang GW, Tao YM, Ding X, Chang ZG. Clinical analysis of the risk factors for recurrence of HCC and its relationship with HBV. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 2061-2066
- 12 Huang Y, Wang Z, An S, Zhou B, Zhou Y, Chan HL, Hou J. Role of hepatitis B virus genotypes and quantitative HBV DNA in metastasis and recurrence of hepatocellular carcinoma. *J Med Virol* 2008; 80: 591-597
- 13 樊嘉, 周俭, 吴志全, 汤钊猷, 周信达, 马曾辰, 钦伦秀, 王征. 原发性肝癌的外科治疗: 20年7566例的临床经验. *中华消化外科杂志* 2009; 8: 99-102
- 14 Shah SA, Cleary SP, Wei AC, Yang I, Taylor BR, Hemming AW, Langer B, Grant DR, Greig PD, Gallinger S. Recurrence after liver resection for hepatocellular carcinoma: risk factors, treatment, and outcomes. *Surgery* 2007; 141: 330-339
- 15 Ercolani G, Grazi GL, Ravaioli M, Del Gaudio M, Gardini A, Cescon M, Varotti G, Cetta F, Cavallari A. Liver resection for hepatocellular carcinoma on cirrhosis: univariate and multivariate analysis of risk factors for intrahepatic recurrence. *Ann Surg* 2003; 237: 536-543
- 16 Hanazaki K, Kajikawa S, Koide N, Adachi W, Amano J. Prognostic factors after hepatic resection for hepatocellular carcinoma with hepatitis C viral infection: univariate and multivariate analysis. *Am J Gastroenterol* 2001; 96: 1243-1250
- 17 张智坚, 吴孟超, 沈锋. TNM分期对评价肝细胞癌切除术后预后的价值. *中华肿瘤杂志* 1999; 21: 293-295
- 18 Kim H, Choi GH, Na DC, Ahn EY, Kim GI, Lee JE, Cho JY, Yoo JE, Choi JS, Park YN. Human hepatocellular carcinomas with "Stemness"-related marker expression: keratin 19 expression and a poor prognosis. *Hepatology* 2011; 54: 1707-1717
- 19 Kim BK, Park JY, Kim do Y, Kim JK, Kim KS, Choi JS, Moon BS, Han KH, Chon CY, Moon YM, Ahn SH. Persistent hepatitis B viral replication affects recurrence of hepatocellular carcinoma after curative resection. *Liver Int* 2008; 28: 393-401
- 20 Chou YC, Jeng KS, Chen ML, Liu HH, Liu TL, Chen YL, Liu YC, Hu CP, Chang C. Evaluation of transcriptional efficiency of hepatitis B virus covalently closed circular DNA by reverse transcription-PCR combined with the restriction enzyme digestion method. *J Virol* 2005; 79: 1813-1823
- 21 Werle-Lapostolle B, Bowden S, Locarnini S, Wursthorn K, Petersen J, Lau G, Trepo C, Marcellin P, Goodman Z, Delaney WE, Xiong S, Brosgart CL, Chen SS, Gibbs CS, Zoulim F. Persistence of cccDNA during the natural history of chronic hepatitis B and decline during adefovir dipivoxil therapy. *Gastroenterology* 2004; 126: 1750-1758
- 22 Wursthorn K, Lutgehetmann M, Dandri M, Volz T, Buggisch P, Zollner B, Longerich T, Schirmacher P, Metzler F, Zankel M, Fischer C, Currie G, Brosgart C, Petersen J. Peginterferon alpha-2b plus adefovir induce strong cccDNA decline and HBsAg reduction in patients with chronic hepatitis B. *Hepatology* 2006; 44: 675-684
- 23 赵克开, 廖晓辉. 乙型肝炎病毒cccDNA检测的方法与临床意义. *中华肝脏病杂志* 2005; 13: 315-317
- 24 Laras A, Koskinas J, Dimou E, Kostamena A, Hadziyannis SJ. Intrahepatic levels and replicative activity of covalently closed circular hepatitis B virus DNA in chronically infected patients. *Hepatology* 2006; 44: 694-702
- 25 Wong DK, Yuen MF, Poon RT, Yuen JC, Fung J, Lai CL. Quantification of hepatitis B virus covalently closed circular DNA in patients with hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 2006; 45: 553-559
- 26 Portolani N, Coniglio A, Ghidoni S, Giovanelli M, Benetti A, Tiberio GA, Giulini SM. Early and late recurrence after liver resection for hepatocellular carcinoma: prognostic and therapeutic implications. *Ann Surg* 2006; 243: 229-235
- 27 Xie H, Song J, Liu K, Ji H, Shen H, Hu S, Yang G, Du Y, Zou X, Jin H, Yan L, Liu J, Fan D. The expression of hypoxia-inducible factor-1alpha in hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma: correlation with patients' prognosis and hepatitis B virus X protein. *Dig Dis Sci* 2008; 53: 3225-3233
- 28 潘爱萍, 黄古叶, 陈晶, 何燕玲. 乙型肝炎病毒cccDNA与HBx蛋白在肝细胞性肝癌中表达的关系及意义. *世界华人消化杂志* 2009; 17: 712-715
- 29 Chan HL, Wong VW, Tse AM, Tse CH, Chim AM, Chan HY, Wong GL, Sung JJ. Serum hepatitis B surface antigen quantitation can reflect hepatitis B virus in the liver and predict treatment response. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2007; 5: 1462-1468

编辑 张姗姗 电编 闫晋利

猪胰岛细胞异种移植治疗糖尿病的研究进展

朱海涛, 于良, 王博

朱海涛, 于良, 王博, 西安交通大学医学院第一附属医院肝胆外科 陕西省西安市 710061

朱海涛, 医师, 主要从事细胞移植与移植免疫方面的研究.

国家自然科学基金资助项目, No. 30700772

作者贡献分布: 本文综述由朱海涛写作完成; 于良与王博审校.

通讯作者: 王博, 副教授, 硕士生导师, 710061, 陕西省西安市, 西安交通大学医学院第一附属医院肝胆外科.

bobwang75@sina.com

电话: 029-85323900

收稿日期: 2011-12-03 修回日期: 2012-02-19

接受日期: 2012-03-06 在线出版日期: 2012-03-28

Advances in research of pig islet xenotransplantation for diabetes

Hai-Tao Zhu, Liang Yu, Bo Wang

Hai-Tao Zhu, Liang Yu, Bo Wang, Department of Hepatobiliary Surgery, the First Affiliated Hospital of Medical School of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, Shaanxi Province, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30700772

Correspondence to: Bo Wang, Associate Professor, Department of Hepatobiliary Surgery, the First Affiliated Hospital of Medical School of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, Shaanxi Province, China. bobwang75@sina.com

Received: 2011-12-03 Revised: 2012-02-19

Accepted: 2012-03-06 Published online: 2012-03-28

Abstract

Pig islet xenotransplantation is effective in treating diabetes. Nowadays, the research of islet xenotransplantation is still in the research phase, and its clinical use is mainly restricted by the shortage of functional islets and graft rejection. In recent years, several studies have demonstrated the feasibility of successful preclinical pig islet xenotransplantation. Moreover, promising results concerning prolonged insulin independence were achieved with the improvement of islet isolation technologies, application of novel immunotherapeutic strategies, and the development of transplantation surgery. This review aims to elucidate the advances in the separation and preparation of transplanted pig islet, immunological rejection and treatments, potential safety problems, and clinical studies.

Key Words: Pig islet; Xenotransplantation; Diabe-

tes; Immunological rejection

Zhu HT, Yu L, Wang B. Advances in research of pig islet xenotransplantation for diabetes. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2012; 20(9): 737-742

摘要

猪胰岛细胞移植是一种极具潜力治疗糖尿病的方法. 目前仍以实验室研究为主, 其临床应用主要面临两大挑战: 高质量的活性胰岛短缺与异种免疫排斥反应. 近年来随着胰岛分离纯化技术的改进、新型免疫耐受诱导策略的出现及移植技术的发展等, 猪胰岛细胞异种移植取得了巨大的进展并进入临床前期研究. 本文就猪胰岛移植物的制备、排斥反应与防治措施、移植安全性及临床研究等方面的进展作一综述.

关键词: 猪胰岛细胞; 异种移植; 糖尿病; 免疫排斥

朱海涛, 于良, 王博. 猪胰岛细胞异种移植治疗糖尿病的研究进展. *世界华人消化杂志* 2012; 20(9): 737-742

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/737.asp>

0 引言

糖尿病是影响人类健康的全球性疾病之一, 胰岛细胞移植在治疗1型糖尿病(type 1 diabetes mellitus, T1DM)方面逐渐显示出良好的应用前景^[1]. 随着21世纪初Edmotion方案^[2]的临床应用, 标志着同种个体间胰岛细胞移植已取得显著成效, 但胰岛供者数量的短缺却极大限制了临床胰岛细胞移植的广泛开展. 利用动物源性胰岛细胞行异种移植为这一难题提供了解决方法, 其中猪是人类胰岛最为理想的供者^[3,4]. 近年来随着胰岛细胞移植技术的日趋成熟和临床应用的发展^[2,5], 猪胰岛细胞异种移植有望成为治疗糖尿病的根本方法之一. 现就目前的研究进展作一简要综述.

1 猪胰岛细胞的供体来源

猪胰岛移植大致分为4种供体来源, 即猪胚胎、胎猪、新生猪与成年猪. 尽管研究多年, 但

■背景资料

近年来随着胰岛分离技术的进步、新型免疫抑制手段的出现及移植外科技术的完善, 猪胰岛异种移植治疗糖尿病取得了巨大的进展并进入临床前期研究.

■同行评议者

吕云福, 教授, 海南省人民医院外一科; 高国全, 教授, 中山大学中山医学院生物化学教研室

■研发前沿

如何获取大量高质量的功能性猪胰岛细胞及有效地抑制异种免疫排斥反应的发生,是近年来猪胰岛异种移植研究的热点与重点。猪胰岛移植在临床前期研究中的具体问题(最佳供体选择、移植部位与途径、胰岛再生血管化与功能性存活、生物安全性等)仍有待进一步研究。

何种类型的供体可作为灵长类动物的最佳异种胰岛细胞来源,学者们仍未达成一致共识^[6-9]。

胎猪来源的胰岛样细胞团(islet-like cell clusters, ICCs)属于未成熟细胞,体内移植实验表明^[10], ICCs通常需要8-12 wk才能将血糖降至正常水平,在此期间, ICCs对高血糖几乎不产生胰岛素应答,这是其作为移植供体的主要缺点。其次,胎猪胰岛细胞表面较高表达 α -1, 3-半乳糖(α -1, 3-galactose, Gal), 约11%, 使得此类细胞比成年猪胰岛细胞(adult pig islets, APIs)更易发生体液免疫排斥反应^[11]。此外,由于胎猪胰腺的体积较小,仅能分离出少量的ICCs,因而在治疗糖尿病时常需要大量的胎猪供体才能提供足量的胰岛细胞,由此产生动物伦理问题,限制其临床应用。

新生猪胰岛细胞(neonatal pig islets, NPIs)主要由完全分化的内分泌细胞(约35%)与内分泌前体细胞(约50%)组成,故而对高血糖反应较ICCs更灵敏^[10,12]。研究发现, NPIs与仔猪(4周龄左右)胰岛细胞相互差异较小,体外培养对葡萄糖刺激具有相似的反应性,且 β 细胞的数量及功能也基本相同,因此被认为是APIs的有效替代来源。新生猪与胎猪的胰腺一般可分离获得 5×10^4 个胰岛细胞^[10],对于体质量为4 kg的灵长类糖尿病动物模型,一般需要3-5只胎猪或新生猪作为供体,但以NPIs作为供体细胞,则可避免ICCs所带来的伦理问题。

成年猪是目前异种胰岛移植的主要供体来源,可提供充足的移植细胞。实验证实^[8,13,14],从1只成年猪胰腺分离出的胰岛细胞,可以为2只糖尿病猕猴进行异种移植,且在植入后数小时内便可对高血糖产生应答反应。对于灵长类糖尿病动物模型,植入APIs与NPIs均可产生良好的降糖治疗效果^[10,15],此2种细胞目前可能是异种移植的最佳细胞来源。

2 猪胰岛细胞的制备

有效分离并纯化可供移植的功能性猪胰岛细胞,一直是异种胰岛移植领域的研究热点。猪胰岛细胞常用的分离方法有机械分离法、酶消化法及自动分离法等。由于单纯的机械分离法获得的胰岛纯度、质量不高,现已很少采用。胎猪与新生猪胰腺所含的外分泌组织较少,一般采用剪碎加酶消化胰腺组织法,可很容易获得ICCs或NPIs,经体外培养可形成纯度很高的胰岛细胞,故而不需要进行纯化技术操作。

成年猪胰腺结缔组织较多,故而胰岛细胞的分离提取相对较难,方法也多种多样,但基本上还是采用Ricordi等所确立的分离模式。在此基础上,各研究小组^[16-18]通过改变消化酶的种类及pH值、缩短热缺血与冷缺血时间及优化操作流程等方法,获得细胞约80 000-300 000胰岛当量(islet equivalent quantity, IEQ)。成年猪胰岛细胞分离后需经过纯化方可移植,目前主要是采用聚蔗糖(Ficoll)作为密度分离介质来纯化胰岛,但其含有的内毒素可能对细胞功能有较大的不良影响,因而并不适用于临床移植实验。碘克沙醇(Iodixanol)作为临床上广泛使用的造影剂,具有低内毒素、等渗透压、对细胞损伤少等优点。本研究小组的实验结果表明^[19],与Ficoll-400分离液相比, Iodixanol混合液可显著提高成年猪胰岛细胞的产量、活性及胰岛素的分泌,可成为Ficoll分离液纯化的替代方案。

近年来,随着半自动与自动分离法的出现^[20],进一步提高了胰岛收获量,达160 000-440 000 IEQ,为开展前期临床实验奠定了坚实的基础。

3 猪胰岛细胞异种移植后的免疫排斥反应及其防治措施

3.1 猪胰岛细胞移植后的排斥反应 免疫排斥反应目前仍是猪胰岛细胞移植应用的主要障碍,直接影响着移植疗效。研究表明^[21],当猪胰岛细胞经门静脉途径注入异种受者体内后,胰岛内分泌细胞产生与表达的组织因子首先会触发血液介导的即刻炎症反应(instant blood-mediated inflammatory reaction, IBMIR)。其特征是血小板聚集于胰岛细胞表面,激活凝血与补体系统,引起炎症细胞浸润,从而导致胰岛细胞损伤或凋亡。IBMIR出现于异种胰岛移植早期阶段,是引起大量(约60%-80%)移植物体内丢失的主要原因^[7];此外, IBMIR还可加速移植后期细胞特异性免疫排斥反应。IBMIR是目前影响临床异种胰岛移植成功率的重要障碍。

IBMIR产生后,受体针对猪胰岛将产生体液与细胞免疫反应。猪胰岛细胞移植属于新生血管化异种移植,且猪胰岛细胞表面Gal分子的表达较实体组织器官更低,故而很少发生受体血清中天然预存抗体(抗Gal抗体)介导的超急性排斥反应(hyperacute rejection, HAR)。尽管如此,在胰岛移植表面仍可见Gal特异性IgM沉积,可能引起补体经典途径的激活,表明Gal在体液排斥反应中仍具重要作用^[7,14,22],但其具体机制目

前还不明确. 但是, 另有研究发现^[10,23,24], 应用Gal基因敲除(Gal knockout, Gal KO)猪作为胰岛供体, 并不能减少早期移植物的丢失; 且于移植数天后, 可见大量非特异性IgM及中等量以上的补体C3、C5与C9在猪胰岛移植物表面沉积, 均提示非Gal类抗原在体液免疫反应中可能具有更重要的作用.

尽管存在天然抗体等体液免疫因素参与排斥反应, 但一般认为^[3,25,26], 猪胰岛细胞异种移植的排斥反应仍以细胞免疫应答为主, 主要效应细胞为CD4⁺ T细胞. 通过单克隆抗体阻断CD4⁺ T细胞可有效预防APIs异种移植排斥反应, 而CD8单抗治疗却不能有效延长移植物的存活时间; Friedman等^[27]也证实CD4⁺ T细胞在猪ICCs异种移植的排斥反应中起主要作用. 除此之外, 巨噬细胞、自然杀伤细胞(natural killer cell, NK cell)及B淋巴细胞等也参与急性排斥反应, 推测CD4⁺ T细胞分泌的干扰素等因子能够激活巨噬细胞和NK细胞.

3.2 免疫排斥反应的防治 化学免疫抑制剂对于控制排斥反应具有十分重要的作用. 同种移植中常用的免疫抑制剂如环孢素、皮质类激素等, 已被证实可延长异种猪胰岛移植物的存活时间, 但对胰岛却有直接的不良反应. 研究表明^[28,29], 新型免疫抑制剂芬戈莫德(FTY720)、来氟米特与传统抑制剂联用, 几乎可完全预防异种排斥反应的发生, 猪胰岛移植物可保持良好功能达数月之久; 此外, 他们对移植物既无不良反应, 同时又对自身免疫性疾病具有良好的控制能力. 提示在未来的猪胰岛异种移植中, 此类免疫抑制剂具有巨大的应用价值.

避免异种排斥反应的另一有效方法是免疫隔离技术, 包括微胶囊技术与免疫隔离室. 其基本原理是将猪胰岛包被于有选择性与生物相容性的半透膜中, 以躲避受体免疫系统的攻击; 同时又可与外部环境进行物质代谢交换. 近年来, 学者们^[14,30,31]利用多种生物材料(如鱼精蛋白-肝素复合物、琼脂糖、海藻酸等)制成微囊或大包裹, 包被猪胰岛进行异种移植动物实验, 均可有效地延长移植物功能存活时间. 从理论而言, 免疫隔离技术是克服排斥反应的一种有效手段; 但其进入临床大规模应用还受多种因素制约, 如包被胰岛如何获得充足的血供与氧气, 材料的组织相容性及炎性因子对移植物的损伤等. 新近有学者^[32]利用内皮祖细胞作为包被材料进行猪-鼠异种胰岛移植, 有效地抑制了IBMIR的

发生, 并取得了良好的长期降糖效果; 因其生物相容性较合成材料更好, 有望应用于临床异种胰岛移植.

影响猪胰岛生存的最大障碍是发生在移植后数周内的T细胞介导的免疫排斥反应. 相关实验表明^[15], 阻断共刺激通路策略可有效抑制异种胰岛移植后T细胞的活化, 诱导混合性嵌合体形成. Zhai等^[26]利用猪源性细胞毒性T淋巴细胞抗原-4免疫球蛋白(porcine cytotoxic T lymphocyte antigen-4 immunoglobulin, pCTLA4Ig)阻断直接识别途径中CD28-B7共刺激通路, 可显著延长成年猪胰岛移植物存活时间, 并可诱导辅助性T细胞(helper T cell, Th cell)分化偏移; Arefanian等^[33]通过短期应用抗淋巴细胞功能相关抗原1(lymphocyte function associated antigen-1, LFA-1)和抗CD154单克隆抗体联合阻断T细胞活化信号, 诱导了受者对NPIs的免疫耐受. 但由于共刺激通路之间存在协同作用, 目前仍不能达到长期稳定的耐受状态, 所以多途径联合阻断将是有前景的治疗方案. 除共刺激分子阻断策略外, 学者们^[34,35]还利用分子嵌合法、猪胸腺组织移植及骨髓细胞或脾细胞联合输注等方法, 在猪-鼠移植模型中诱导了程度不同的免疫耐受.

随着基因工程技术的成熟, 以转基因猪作为异种胰岛供体具有良好的发展前景. 研究发现^[10,23,36], 以敲除组织因子并过表达凝血调节因子(CD39/血栓调节蛋白)的克隆猪为胰岛供体, 有助于控制IBMIR的发生; 表达补体调节因子CD55、CD56及CD59的Gal KO猪可保护移植物免受HAR损伤. 这表明, 对于异种移植排斥反应, 遗传修饰及克隆技术是可行的治疗手段, 有望从根本上解决排斥反应等问题.

此外, 猪胰岛细胞的移植疗效还与早期排斥反应监测技术的改进、移植部位的选择、植入胰岛微循环的建立等密切相关. 聂唯等^[37]发现, 在猪-鼠异种胰岛移植模型中, 可通过纳米生物探针磁共振成像对异种胰岛移植后的早期免疫排斥反应进行检测, 具有无创、客观准确且实时动态等优点, 为移植效果的评价提供了客观的标准与全新的技术平台. 多项研究证实, 胰岛移植物不能及时重建微循环是引起植入细胞功能丧失甚至凋亡的重要因素; 故而植入部位的局部环境及移植后促进新生血管化的相关措施将直接影响移植疗效. 猪胰岛细胞移植现大多主张选择网膜、肾包囊等植入部位^[38,39]. 因该处组织血供丰富, 利于胰岛细胞的存活与生长; 另

■相关报道

Elliott等将猪胰岛细胞种植于T1DM患者腹腔内, 长期随访发现患者病情可得到较好控制, 未出现PERV感染征象, 组织活检表明受者体内仍存在大量具有分泌功能的猪胰岛细胞.

■创新盘点

本文总结了近年来关于猪胰岛移植物的制备、供体来源、排斥反应的产生及防治、生物安全风险评估及临床应用等方面的研究成果,详细、系统地阐述了猪胰岛异种移植治疗糖尿病的研究进展。

一方面,此部位的细胞植入操作简便,对受者的手术创伤较小。最近有研究者^[40]利用间充质干细胞(mesenchymal stem cell, MSC)与内皮细胞共同包被入胰岛细胞, MSC可根据微环境的变化来释放促进新生血管化的细胞因子,加速了内皮细胞的增殖及胰岛新生血管的形成;同时, MSC自身具有良好的免疫调节作用,或可减轻受者对胰岛移植物的免疫损伤。此项研究进展对有效延长猪胰岛细胞在受者体内的功能性存活时间具有积极的指导与借鉴意义。

4 猪胰岛细胞移植的生物安全性

猪胰岛异种移植存在一个很大的潜在危险因素,即猪内源性逆转录病毒(porcine endogenous retrovirus, PERV)能否感染人类。体外实验表明^[41,42],当猪细胞与人类HEK-293细胞系体外联合培养时, PERV在其间传递。除此之外,在猪胰岛细胞移植给免疫缺陷型糖尿病小鼠的体内实验中,同样证实物种间传染PERV的可能性^[43]。但迄今为止,通过对接受猪胰岛细胞异种移植的T1DM患者进行长期随访观察与DNA检测,尚未发现PERV跨种属感染现象^[44];但异种移植的生物安全性问题已引起学者们的足够重视。因此在猪胰岛细胞移植研究中,对可能出现的病毒感染进行预先安全评价是十分必要的;而将来PERV基因敲除的克隆猪的问世,或可彻底消除生物安全风险。

5 猪胰岛细胞移植的临床应用

较为系统地将猪胰岛细胞用于临床移植尝试始于瑞典学者Groth等^[45]。该小组报告了10位T1DM患者接受猪ICCs移植的研究,术后常规使用免疫抑制剂,尽管所有患者的外源性胰岛素用量未减少,但有4例患者尿中均检测出了猪源性C肽,持续至术后近400 d。这对于异种胰岛的临床应用,是一个良好的开端。

Elliott等^[46]将猪NPIs种植于T1DM患者腹腔内,可显著降低受者血糖水平;术后10年随访,患者病情得到较好控制,未出现PERV感染征象,组织活检发现腹膜组织中仍存在大量具有分泌功能的猪胰岛细胞。表明猪胰岛的临床应用具有良好的远期安全性及治疗效果。

近年,新西兰生命细胞技术有限公司(living cell technologies Ltd, LCT)开发出商品化的糖尿病治疗细胞—胶囊化猪胰岛细胞(Diabecell),自2007年起于莫斯科进行了I/IIa期临床研究^[47]。

共有7例T1DM患者接受了Diabecell腹腔种植(5 000-10 000 IEQ/kg),术后未见明显不良反应发生,2年随访发现有5例患者的血糖降至正常水平(5.8-8.2 mmol/L),2例患者停用胰岛素。LCT随后在新西兰开展的II期临床试验目前也收到良好的治疗效果。

6 结论

猪胰岛细胞异种移植治疗糖尿病现已显示出广阔的应用前景^[7,46-48]。但如何获取大量高质量的功能性猪胰岛细胞及有效地抑制异种免疫排斥反应的发生,仍是异种胰岛移植所面临的主要问题^[14,49,50]。猪胰岛移植制备的相关研究目前大多集中于操作方法的改良及新型消化酶的尝试^[51];而关于移植物的有效保存与最佳供体的选择(如猪的品系、遗传背景及体质量)等问题,尚缺乏系统性的对比研究;这或是今后研究的努力方向,但最终应尽快确立简便、经济及标准化的猪胰岛移植制备与鉴定标准。多项研究证明了诱导猪胰岛细胞异种免疫耐受的可能性,但这些工作大多是在啮齿类动物上开展的^[26,32,33,52];今后应大量进行猪-灵长类糖尿病模型的研究,其实验结果将会为异种胰岛移植的临床应用提供更为安全有效的理论基础及免疫耐受诱导方案;个人认为,免疫隔离与共刺激分子联合阻断或是最具前景的异种排斥反应治疗策略。此外,猪胰岛异种移植还面临着植入细胞高死亡率、自身免疫排斥及人畜感染等诸多障碍^[4,25,53,54];然而,随着胰岛再血管化技术的发展,新型生物免疫抑制剂的应用及改良型转基因猪的出现,上述问题或可得到有效解决。可以预见,猪胰岛异种移植仍然是未来细胞移植研究领域的热点,此方面的研究经验也将为其他异种细胞移植提供推动与借鉴作用。

7 参考文献

- 1 Noguchi H. Pancreatic islet transplantation. *World J Gastrointest Surg* 2009; 1: 16-20
- 2 Shapiro AM, Lakey JR, Ryan EA, Korbitt GS, Toth E, Warnock GL, Kneteman NM, Rajotte RV. Islet transplantation in seven patients with type 1 diabetes mellitus using a glucocorticoid-free immunosuppressive regimen. *N Engl J Med* 2000; 343: 230-238
- 3 赵勇. 异种移植免疫学. 第1版. 北京: 中国医药科技出版社, 2003: 141-189
- 4 Koulmanda M, Qipo A, Smith RN, Auchincloss H. Pig islet xenografts are resistant to autoimmune destruction by non-obese diabetic recipients after anti-CD4 treatment. *Xenotransplantation* 2003; 10: 178-184
- 5 Sabek OM, Hamilton DJ, Gaber AO. Prospects for

- future advancements in islet cell transplantation. *Minerva Chir* 2009; 64: 59-73
- 6 Prabhakaran S, Hering BJ. What strain of pig should be used? *Xenotransplantation* 2008; 15: 83-86
 - 7 Marigliano M, Bertera S, Grupillo M, Trucco M, Bottino R. Pig-to-nonhuman primates pancreatic islet xenotransplantation: an overview. *Curr Diab Rep* 2011; 11: 402-412
 - 8 Bottino R, Balamurugan AN, Smetanka C, Bertera S, He J, Rood PP, Cooper DK, Trucco M. Isolation outcome and functional characteristics of young and adult pig pancreatic islets for transplantation studies. *Xenotransplantation* 2007; 14: 74-82
 - 9 Dufrane D, Goebbels RM, Fdilat I, Guiot Y, Gianello P. Impact of porcine islet size on cellular structure and engraftment after transplantation: adult versus young pigs. *Pancreas* 2005; 30: 138-147
 - 10 Dufrane D, Gianello P. Pig islets for clinical islet xenotransplantation. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2009; 18: 495-500
 - 11 Bennet W, Björklund A, Sundberg B, Davies H, Liu J, Holgersson J, Korsgren O. A comparison of fetal and adult porcine islets with regard to Gal alpha (1,3)Gal expression and the role of human immunoglobulins and complement in islet cell cytotoxicity. *Transplantation* 2000; 69: 1711-1717
 - 12 Vizzardelli C, Molano RD, Pileggi A, Berney T, Cattani P, Fenjves ES, Peel A, Fraker C, Ricordi C, Inverardi L. Neonatal porcine pancreatic cell clusters as a potential source for transplantation in humans: characterization of proliferation, apoptosis, xenoantigen expression and gene delivery with recombinant AAV. *Xenotransplantation* 2002; 9: 14-24
 - 13 Dufrane D, D'hoore W, Goebbels RM, Saliez A, Guiot Y, Gianello P. Parameters favouring successful adult pig islet isolations for xenotransplantation in pig-to-primate models. *Xenotransplantation* 2006; 13: 204-214
 - 14 Rood PP, Buhler LH, Bottino R, Trucco M, Cooper DK. Pig-to-nonhuman primate islet xenotransplantation: a review of current problems. *Cell Transplant* 2006; 15: 89-104
 - 15 Cardona K, Korbutt GS, Milas Z, Lyon J, Cano J, Jiang W, Bello-Laborn H, Hacquoil B, Strobert E, Gangappa S, Weber CJ, Pearson TC, Rajotte RV, Larsen CP. Long-term survival of neonatal porcine islets in nonhuman primates by targeting costimulation pathways. *Nat Med* 2006; 12: 304-306
 - 16 Yonekawa Y, Matsumoto S, Okitsu T, Arata T, Iwanaga Y, Noguchi H, Nagata H, O'Neil JJ, Tanaka K. Effective islet isolation method with extremely high islet yields from adult pigs. *Cell Transplant* 2005; 14: 757-762
 - 17 张伟杰, Schrezenmeir J. 成年猪胰岛的分离与纯化. *中华器官移植杂志* 2000; 21: 341-343
 - 18 Wee YM, Kim SC, Koo SK, Kim YH, Jung EJ, Choi MY, Park YH, Park KT, Lim DG, Han DJ. Improved islet yields after purification following the novel endogenous trypsin inhibitor and histidine-trypsin-ketoglutarate treatment in pigs. *Transplant Proc* 2008; 40: 2585-2587
 - 19 Min T, Yi L, Chao Z, Haitao Z, Wei W, Liang Y, Bo W. Superiority of visipaque (iodixanol)-controlled density gradient over Ficoll-400 in adult porcine islet purification. *Transplant Proc* 2010; 42: 1825-1829
 - 20 Qiao AY, Zhang WH, Chen XJ, Zhang J, Xiao GH, Hu YX, Tang DC. Isolation and purification of islet cells from adult pigs. *Transplant Proc* 2010; 42: 1830-1834
 - 21 Nilsson B. The instant blood-mediated inflammatory reaction in xenogeneic islet transplantation. *Xenotransplantation* 2008; 15: 96-98
 - 22 Komoda H, Miyagawa S, Kubo T, Kitano E, Kitamura H, Omori T, Ito T, Matsuda H, Shirakura R. A study of the xenoantigenicity of adult pig islets cells. *Xenotransplantation* 2004; 11: 237-246
 - 23 van der Windt DJ, Bottino R, Casu A, Campanile N, Smetanka C, He J, Murase N, Hara H, Ball S, Loveland BE, Ayares D, Lakkis FG, Cooper DK, Trucco M. Long-term controlled normoglycemia in diabetic non-human primates after transplantation with hCD46 transgenic porcine islets. *Am J Transplant* 2009; 9: 2716-2726
 - 24 Casu A, Echeverri GJ, Bottino R, van der Windt DJ, He J, Ekser B, Ball S, Ayares D, Cooper DK. Insulin secretion and glucose metabolism in alpha 1,3-galactosyltransferase knock-out pigs compared to wild-type pigs. *Xenotransplantation* 2010; 17: 131-139
 - 25 Pierson RN, Dorling A, Ayares D, Rees MA, Seebach JD, Fishman JA, Hering BJ, Cooper DK. Current status of xenotransplantation and prospects for clinical application. *Xenotransplantation* 2009; 16: 263-280
 - 26 Zhai C, Yu L, Zhu H, Tian M, Xiaogang Z, Bo W. Porcine CTLA4-Ig prolong islet xenografts in rats by downregulating the direct pathway of T-cell activation. *Xenotransplantation* 2011; 18: 40-45
 - 27 Friedman T, Smith RN, Colvin RB, Iacomini J. A critical role for human CD4+ T-cells in rejection of porcine islet cell xenografts. *Diabetes* 1999; 48: 2340-2348
 - 28 Hering BJ, Wijkstrom M, Graham ML, Hårdstedt M, Aasheim TC, Jie T, Ansit JD, Nakano M, Cheng J, Li W, Moran K, Christians U, Finnegan C, Mills CD, Sutherland DE, Bansal-Pakala P, Murtaugh MP, Kirchhof N, Schuurman HJ. Prolonged diabetes reversal after intraportal xenotransplantation of wild-type porcine islets in immunosuppressed nonhuman primates. *Nat Med* 2006; 12: 301-303
 - 29 黄跃南, 田素礼, 郭欣, 吴德全, 单世光, 齐忠全. 异种胰岛移植联合应用免疫抑制剂FK506和LEF的实验研究. *世界华人消化杂志* 2004; 12: 1868-1871
 - 30 李涛, 杜智, 孙铭, 周道标, 孙以鲁, 宋继昌, 孙绵方. APA微囊胰岛的实验研究. *中国生物医学工程学报* 2005; 24: 507-509
 - 31 Omer A, Duvivier-Kali V, Fernandes J, Tchipashvili V, Colton CK, Weir GC. Long-term normoglycemia in rats receiving transplants with encapsulated islets. *Transplantation* 2005; 79: 52-58
 - 32 Endothelial Colony-forming Cell Coating of Pig Islets Prevents Xenogeneic Instant Blood-mediated Inflammatory Reaction. *Cell Transplant* 2011; Mar 7. [Epub ahead of print]
 - 33 Arefanian H, Tredget EB, Rajotte RV, Gill RG, Korbutt GS, Rayat GR. Short-term administrations of a combination of anti-LFA-1 and anti-CD154 monoclonal antibodies induce tolerance to neonatal porcine islet xenografts in mice. *Diabetes* 2010; 59: 958-966
 - 34 Tang TH, Li CL, Li X, Jiang FQ, Zhang YK, Ren HQ, Su SS, Jiang GS. Immune tolerance in pancreatic islet xenotransplantation. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 1457-1461
 - 35 Tang TH, Li CL, Li X, Jiang FQ, Zhang YK, Ren HQ. The role of donor hepatocytes and/or splenocytes pre-injection in reducing islet xenotransplanta-

■应用要点

本文阐述了猪胰岛细胞异种移植治疗糖尿病所面临的主要问题、已取得的进展及个人认识, 为未来猪胰岛异种移植的研究方向及临床应用提供参考。

■同行评价

本文总结了猪胰岛细胞移植治疗糖尿病的研究进展,选题新颖,内容丰富,有很好的学术价值。

- 36 d'Apice AJ, Cowan PJ. Gene-modified pigs. *Xenotransplantation* 2008; 15: 87-90
- 37 聂唯, 唐医亚, 容鹏飞, 叶斌, 叶征, 童琼娟, 王维. CD4 T细胞抗体标记超顺磁性氧化铁MR成像诊断异种胰岛移植免疫排斥反应的实验研究. *中华放射学杂志* 2008; 42: 1084-1088
- 38 Dufrane D, Goebbels RM, Saliez A, Guiot Y, Gianello P. Six-month survival of microencapsulated pig islets and alginate biocompatibility in primates: proof of concept. *Transplantation* 2006; 81: 1345-1353
- 39 Elliott RB, Escobar L, Calafiore R, Basta G, Garkavenko O, Vasconcellos A, Bamba C. Transplantation of micro- and macroencapsulated piglet islets into mice and monkeys. *Transplant Proc* 2005; 37: 466-469
- 40 Johansson U, Rasmusson I, Niclou SP, Forslund N, Gustavsson L, Nilsson B, Korsgren O, Magnusson PU. Formation of composite endothelial cell-mesenchymal stem cell islets: a novel approach to promote islet revascularization. *Diabetes* 2008; 57: 2393-2401
- 41 Fishman JA, Patience C. Xenotransplantation: infectious risk revisited. *Am J Transplant* 2004; 4: 1383-1390
- 42 Yu P, Zhang L, Li SF, Li YP, Cheng JQ, Lu YR, Bu H. Long-term effects on HEK-293 cell line after coculture with porcine endogenous retrovirus. *Transplant Proc* 2005; 37: 496-499
- 43 van der Laan LJ, Lockey C, Griffeth BC, Frasier FS, Wilson CA, Onions DE, Hering BJ, Long Z, Otto E, Torbett BE, Salomon DR. Infection by porcine endogenous retrovirus after islet xenotransplantation in SCID mice. *Nature* 2000; 407: 90-94
- 44 Valdes-Gonzalez R, Dorantes LM, Bracho-Blanchet E, Rodríguez-Ventura A, White DJ. No evidence of porcine endogenous retrovirus in patients with type 1 diabetes after long-term porcine islet xenotransplantation. *J Med Virol* 2010; 82: 331-334
- 45 Groth CG, Korsgren O, Tibell A, Tollemar J, Möller E, Bolinder J, Ostman J, Reinholt FP, Hellerström C, Andersson A. Transplantation of porcine fetal pancreas to diabetic patients. *Lancet* 1994; 344: 1402-1404
- 46 Elliott RB, Escobar L, Tan PL, Muzina M, Zwain S, Buchanan C. Live encapsulated porcine islets from a type 1 diabetic patient 9.5 yr after xenotransplantation. *Xenotransplantation* 2007; 14: 157-161
- 47 Elliott RB. Towards xenotransplantation of pig islets in the clinic. *Curr Opin Organ Transplant* 2011; 16: 195-200
- 48 Sachs DH, Sykes M, Yamada K. Achieving tolerance in pig-to-primate xenotransplantation: reality or fantasy. *Transpl Immunol* 2009; 21: 101-105
- 49 Ekser B, Cooper DK. Overcoming the barriers to xenotransplantation: prospects for the future. *Expert Rev Clin Immunol* 2010; 6: 219-230
- 50 黄跃南, 郭欣, 田素礼, 吴德全, 单世光. 成年猪胰岛分离纯化方法的改良. *世界华人消化杂志* 2005; 13: 1912-1914
- 51 李玥, 杨永强. 胰岛分离纯化研究进展. *中国修复重建外科杂志* 2010; 24: 1392-1396
- 52 Ramji QA, Bayrack K, Arefanian H, Marcet-Palacios M, Bleackley RC, Rajotte RV, Rayat GR. Protection of porcine islet xenografts in mice using sertoli cells and monoclonal antibodies. *Transplantation* 2011; 92: 1309-1315
- 53 Mueller NJ, Takeuchi Y, Mattiuzzo G, Scobie L. Microbial safety in xenotransplantation. *Curr Opin Organ Transplant* 2011; 16: 201-206
- 54 Honkanen-Scott M, Johnson J, Hering B, Bansal-Pakala P. Blockade of OX40 signals enhance survival of xenoislet grafts in spontaneously diabetic NOD mice. *Transplant Proc* 2008; 40: 483-485

编辑 张姗姗 电编 闫晋利

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)

腹泻与肠道离子转运关系的研究进展

张志博, 韩雪峰, 谭支良, 肖文军

张志博, 湖南农业大学国家植物功能成分利用工程技术研究中心 湖南省长沙市 410128

张志博, 韩雪峰, 谭支良, 中国科学院亚热带农业生态研究所 亚热带农业生态过程重点实验室 湖南省长沙市 410125

肖文军, 湖南农业大学国家植物功能成分利用工程技术研究中心 湖南省长沙市 410128

国家自然科学基金资助项目, No. 30972166

湖南省教育厅重点课题基金资助项目, No. 08A031

作者贡献分布: 本文综述由张志博写作完成; 韩雪峰负责修改; 谭支良与肖文军负责审核。

通讯作者: 肖文军, 教授, 410128, 湖南省长沙市, 湖南农业大学国家植物功能成分利用工程技术研究中心。

xiaowenjungong@163.com

电话: 0731-84673760

收稿日期: 2011-11-12 修回日期: 2012-02-20

接受日期: 2012-03-06 在线出版日期: 2012-03-28

Progress in understanding the relationship between diarrhea and intestinal ion transport

Zhi-Bo Zhang, Xue-Feng Han, Zhi-Liang Tan, Wen-Jun Xiao

Zhi-Bo Zhang, National Research Center of Engineering & Technology for Utilization of Functional Ingredients from Botanicals of Hunan Agricultural University, Changsha 410128, Hunan Province, China

Zhi-Bo Zhang, Xue-Feng Han, Zhi-Liang Tan, Key Laboratory of Agro-ecological Processes in Subtropical Region, Institute of Subtropical Agriculture, Chinese Academy of Sciences, Changsha 410125, Hunan Province, China

Wen-Jun Xiao, National Research Center of Engineering & Technology for Utilization of Functional Ingredients from Botanicals of Hunan Agricultural University, Changsha 410128, Hunan Province, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 39072166; and the Key Research Project of the Education Department of Hunan Province, No. 08A031

Correspondence to: Wen-Jun Xiao, Professor, National Research Center of Engineering & Technology for Utilization of Functional Ingredients from Botanicals of Hunan Agricultural University, Changsha 410128, Hunan Province, China. xiaowenjungong@163.com

Received: 2011-11-12 Revised: 2012-02-20

Accepted: 2012-03-06 Published online: 2012-03-28

Abstract

Diarrhea is a major cause of morbidity and mortality in the world. There are millions of people dying of diarrhea, and most of them are children. Diarrhea can be divided into acute diarrhea and chronic diarrhea based on the length of the course, and into infectious diarrhea and noninfectious diarrhea according to the etiology.

Diarrhea is an imbalance in absorption and secretion of water and electrolytes in the intestine, which involves abnormal ion transport. This paper reviews recent advances in understanding the causes of diarrhea, the relationship between intestinal ion transport and diarrhea, and ion transport in different kinds of diarrhea, with an aim to providing a reference and some new ideas on the comprehensive understanding of the pathogenesis, pathophysiology and treatment of diarrhea.

Key Words: Diarrhea; Intestine; Ion transport

Zhang ZB, Han XF, Tan ZL, Xiao WJ. Progress in understanding the relationship between diarrhea and intestinal ion transport. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2012; 20(9): 743-748

摘要

腹泻作为全球性发病率和致死率较高的疾病之一, 全世界每年有数百万的人因腹泻而死, 其中绝大部分是婴幼儿。腹泻按病程的长短可分为急性腹泻和慢性腹泻两类, 而根据病因学又可分为感染性腹泻和非感染性腹泻, 其本质上是肠道中水、电解质吸收和分泌功能的紊乱, 这其中就与肠道离子的异常转运密切相关。本文从腹泻的发病原因, 腹泻症状的产生与肠道不同离子转运的关系以及不同类型腹泻中的各种离子的转运过程进行了综述, 以期更全面地了解不同类型腹泻的相关发生发病机制, 并为腹泻的病理生理学研究及相关肠道病症的治疗提供一定的依据。

关键词: 腹泻; 肠道; 离子转运

张志博, 韩雪峰, 谭支良, 肖文军. 腹泻与肠道离子转运关系的研究进展. *世界华人消化杂志* 2012; 20(9): 743-748

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/743.asp>

0 引言

肠道腹泻是指正常人排便次数明显超过平日习惯的频率, 粪质稀薄, 水分增加, 每日排便量超过200 g, 或粪便含未消化食物或脓血、黏液的一种常见症状^[1-3]。腹泻每年可造成世界上数以

■背景资料

腹泻作为全球性发病率和致死率较高的疾病之一, 其发病是多方面因素综合作用的结果, 其本质上是肠道中水和电解质吸收和分泌功能的紊乱, 这其中就与肠道离子的异常转运密切相关。近年来对肠道离子转运及离子通道的研究已成为一个热点。

■同行评议者

高泽立, 副教授, 上海浦东新区周浦医院消化科, 上海交通大学医学院九院周浦分院

■ 研发前沿

由于腹泻的发病是多方面综合的结果,肠道离子的异常转运只是一种重要的致泻途径。目前对腹泻疾病中的离子转运变化的许多复杂机制还未能阐明,有待于进一步的研究和探索。

万计人的死亡,也是阻碍畜禽类动物快速生长及影响畜禽健康的主要病害之一,是造成畜禽类生长缓慢与幼仔死亡的主要原因^[4]。但腹泻病因是多方面的,其发病机制也较为复杂,因此,研究腹泻的病理生理机制对于腹泻疾病的防治就显得十分重要。Argenzio^[5]认为不论何种因素导致的腹泻,都会引起机体内环境的改变,其本质是胃肠道水电解质吸收和分泌功能的紊乱,即异常的渗透、异常的运动、异常的离子转运和异常的微生物消化作用。其中,肠道异常的离子转运与腹泻的发生密切相关^[6]。本文对近年来有关腹泻与肠道离子转运关系的研究进行了综述,以期对腹泻的病理生理研究以及腹泻疾病的防治提供一定的参考。

1 腹泻的发病原因

腹泻产生的原因根据病因学可分为感染性腹泻和非感染性腹泻。感染性腹泻主要是由病原微生物及其产物或寄生虫所引发的,包括细菌(大肠杆菌、沙门氏杆菌、痢疾杆菌、金黄色葡萄球菌)、病毒(轮状病毒、Norwalk病毒、肠道腺病毒)和寄生虫(球虫、梨形鞭毛虫)等^[7-11];非感染性腹泻主要由气候、环境变化等外界应激和饲料成分及饲养管理不科学等因素引起的。

腹泻按病程长短分为急性和慢性两类。全世界约有近70%的急性腹泻由食源性引起的,细菌、病毒、寄生虫引发的肠道感染及旅途中被感染均可引起急性腹泻^[12-15]。而肠道炎症、肠消化和吸收功能障碍以及药物作用则引发慢性腹泻^[16-20]。慢性腹泻是许多药物常见的不良反应之一,据统计7%的药物不良反应以及700多种药物均能引起不同程度的腹泻^[21]。

2 腹泻与肠道离子转运的关系

在肠道细胞表面存在着钠钾泵^[22,23]、钙离子通道^[24]、氯离子通道^[25,26]、钠氢交换体等不同类型的离子通道,在这些离子通道正常工作的状况下,可保证离子和有机物质在肠道的正常运转。当肠黏膜吸收功能受损或面积减少时,大量水分和电解质未被吸收而留在肠腔中引起肠腔渗透压的升高而发生渗透性腹泻;当肠黏膜隐窝细胞水和电解质的分泌量超过了肠绒毛上皮细胞的吸收能力时,肠道中水和电解质发生过度分泌也会引起腹泻^[27,28]。

环磷酸腺苷(cyclic adenosine monophosphate, cAMP)作为细胞内的第二信使,在肠道离

子转运过程中发挥着重要作用。Tabcharani等^[29]研究表明cAMP能够使低电导的氯离子通道开放的概率增加,间接造成顶端氯离子通道打开使细胞内氯离子含量减少,从而促使更多的氯离子转运到胞外;同时在肠道组织中cAMP还能够增强基底膜的钠钾二氯离子协同转运蛋白的活性,促进更多钠钾泵、钾离子通道等离子转运体进入至肠上皮细胞顶膜,随着顶膜中转运蛋白的数量增加,选择性吸收的电解质的转运量增加,使肠上皮细胞对电解质的吸收平衡破坏,造成吸收不良而产生腹泻。而Kunzelmann等^[30]对大鼠结肠上皮细胞钾离子通道的功能研究后证明基底膜上cAMP激活的钾离子通道的开放能促使细胞的再极化,抵消了基底膜氯离子通道开放引起的去极化效应,从而维持了氯离子渗出进入内腔的电驱动力,并使氯离子分泌到肠腔中,氯离子含量的增加促使肠道电解质分泌增加而引起腹泻。

在肠道刷状缘上的钠氢交换过程的研究中发现^[31]人和兔子小肠、结肠刷状缘膜上存在一类蛋白质—钠氢交换体(Na/H exchangers, NHEs),包括NHE1、NHE2和NHE3三种类型。首先在大鼠远端结肠隐窝中发现了具有氯离子依赖性的NHE1,其仅存在于结肠上皮细胞的基底膜上且与碳酸氢根离子的分泌密切相关;而NHE2、NHE3在小肠和结肠中均有发现^[32-34]。Moeser等^[35,36]的研究表明敲除NHE2的小鼠更容易发生胃功能紊乱,但肠道功能不受影响,而敲除NHE3的小鼠却易患上慢性腹泻,从而证明NHE3在从黏膜到浆膜的钠离子转运中发挥了更重要的作用;Yun等^[37]发现2种cAMP依赖的调节蛋白—NHE3激酶调节蛋白(E3KARP)和钠氢交换体调节因子(NHERF)^[38],他们可以影响cAMP依赖性蛋白激酶PKA的活性,PKA通过对NHE3的磷酸化而介导或加强NHE3的抑制效应,进而使cAMP对NHE3抑制,使NHE3失活,从而使肠上皮细胞刷状缘膜上的钠离子吸收和分泌的失衡而产生腹泻。

3 不同腹泻类型中的离子转运

按照腹泻的病理生理机制,可将腹泻分为渗透性腹泻、分泌性腹泻、渗出性腹泻、运动性腹泻等。但并不是所有类型的腹泻都与离子转运相关,现将不同的腹泻类型中的离子转运分述如下。

3.1 渗透性腹泻中的离子转运 渗透性腹泻是指

大量高渗性或难吸收的溶质进入肠腔, 其导致血浆与肠腔之间的渗透压差增大, 水分透过肠黏膜由血浆向肠腔返流, 直到肠内容物被稀释成等张为止, 从而使肠腔内存留大量液体刺激肠运动而引起腹泻。

Hammer等^[39]对正常人摄入聚乙二醇和果糖而产生的渗透性腹泻进行了研究。在聚乙二醇引起的腹泻中, 肠道细胞中的钠、钾、氯离子被大量保留下来; 而在果糖诱发的腹泻中, 未被吸收的有机酸使无机阳离子在腹泻分泌液中积累, 积累量顺序为钠最多, 依次为钙、钾, 镁的积累最少。Hammer等^[40]随后又研究了碳水化合物吸收不良对腹泻的影响, 发现腹泻的一个原因是碳水化合物在粪便中排出的增加, 可通过增加还原糖、有机酸和有用的阳离子来调节碳水化合物吸收不良造成的渗透性腹泻。这些研究显示了肠道离子在渗透性腹泻发生和防治中的作用, 但其具体作用机制仍待进一步研究。

Wapnir等^[41]对口服再水化方法治疗幼龄小鼠腹泻过程中钠离子的吸收进行了研究, 当腹泻小鼠被喂食适量钠盐以及含有适量L-丙氨酸的葡萄糖水化液时, 其水分和钠离子的吸收有明显提高, 说明口服水化方案能通过钠离子吸收状况的改善来辅助治疗婴幼儿腹泻。Go等^[42]通过小鼠的急性渗透模型研究了口服补液中添加羧甲基纤维素(carboxymethyl cellulose, CMC)对水和钠离子吸收的作用, 发现CMC的补充可能增加肠道细胞表面的渗透活性物质(谷氨酸和电解质)的量, 导致水分的吸收; 另外一种可能是CMC导致肠上皮表面静水层的局部变化, 这些相互作用可能发生在绒毛和隐窝黏膜的刷状缘膜上, 在绒毛上可能表现为促进钠离子吸收, 在隐窝表现为抑制钠离子分泌, 说明口服补液可改善水分和钠的吸收来减轻腹泻。

3.2 分泌性腹泻中的离子转运 分泌性腹泻是指肠黏膜隐窝细胞水和电解质的分泌量超出了肠绒毛上皮细胞的吸收能力, 引起肠道中水和电解质过度分泌而产生的腹泻^[43]。细胞中的第二信使如cAMP、环磷酸鸟苷(cGMP)以及钙离子相关运输通道的改变、内分泌肿瘤的激素分泌、胆盐和长链脂肪酸及炎症介质都可能刺激黏膜细胞, 导致分泌性腹泻^[44]。

目前已知至少有10余种能产生促进肠道分泌的肠毒素的细菌, 其中最典型的是霍乱弧菌^[45], 当霍乱弧菌进入小肠后, 依靠其黏附分子贴于小肠上皮细胞表面, 大量繁殖并产生霍乱

毒素(CT)。CT包括A、B两个亚基, 其借助于B亚基与细胞膜表面的神经节苷脂(GM1)结合, 促使A亚基进入细胞膜, 而A亚基具有二磷酸腺苷(ADP)-核糖转移酶的活性, 刺激ADP核糖, 使其转移到具有控制腺苷环化酶(AC)活性的三磷酸鸟嘌呤核苷(GTP)结合蛋白中, 使GTP酶活性受到抑制, GTP不能水解成GDP, 使AC活性相对增强, 使细胞内的ATP转化为cAMP。cAMP的含量增加, 抑制小肠黏膜细胞对钠离子的正常吸收, 并刺激隐窝细胞分泌氯离子和水分, 导致肠腔水分和电解质大量聚集, 超出其吸收限度而产生剧烈的腹泻^[46]。

在大多数的组织中都存在一种囊性纤维化跨膜转运调节体(cystic fibrosis transmembrane conductance regulator, CFTR), 他是ATP结合转运体超家族的一员, 由5个功能结构域组成: 2个跨膜结构域(membrane-spanning domain, MSD), 2个核苷酸结合的结构域(nucleotide-binding domain, NBD)以及1个调节结构域(regulatory domain, RD)^[47,48]。其中MSDs组成一低电导的阴离子选择性孔道, 2个NBDs组成头尾相对的二聚体, 在二聚体之间的接触面上有2个与ATP的结合位点(位点1和2)(图1)^[49]。CFTR的调控机制是: ATP分子与位点1和2相互作用促使NBD二聚体的结合与解离, 从而引起MSDs的构象发生变化进而使通道孔打开和关闭。而RD含有多个磷酸化位点, 这些位点可被蛋白激酶A(protein kinase A, PKA)和蛋白激酶C(PKC)磷酸化, RD的磷酸化促进NBDs与ATP的结合, 使CFTR得以激活, 使氯离子的跨上皮分泌增加引起腹泻^[50,51]。

但CFTR也可能通过与其他分子的结合而使自身的结构或功能变化而最终引起腹泻的发生。Li等^[52]研究发现溶血磷脂酸(lysophosphatidic acid, LPA)受体的一种亚型LPA2能抑制CFTR依赖的碘化物的外流, 具体过程是LPA2与另一钠氢交换体调节因子(NHERF2)结合, 随后与CFTR结合形成一种大分子复合物(LPA2-NHERF2-CFTR), 从而抑制CFTR调节的短路电流, 进而抑制CT诱导的CFTR依赖型肠流体的分泌, 而当其过量分泌时会发生腹泻。推知CFTR依赖的蛋白质相互作用可抑制CT诱导的分泌性腹泻。随后其又报道了一种cAMP转运体(MRP4), 可以在肠上皮细胞顶膜表面与一种PDZ骨架蛋白(PDZK1)结合形成复杂的大分子, 其中PDZK1与CFTR的活性和功能有关。cAMP经由MRP4的转运增加可调节MRP4与CFTR的耦合, 进而影响

■创新盘点

本文从近年来对不同类型腹泻与肠道离子转运关系的研究出发, 搜集了相关的详细资料进行综述, 在选题和研究思路上有创新。

应用要点

本文系统阐述了肠道离子转运与腹泻的研究,可对腹泻的病理生理学研究及相关肠道疾病的治疗提供一定的依据。

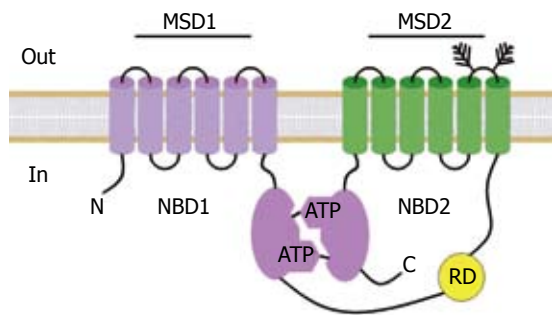


图1 CFTR型氯离子通道的结构示意图。

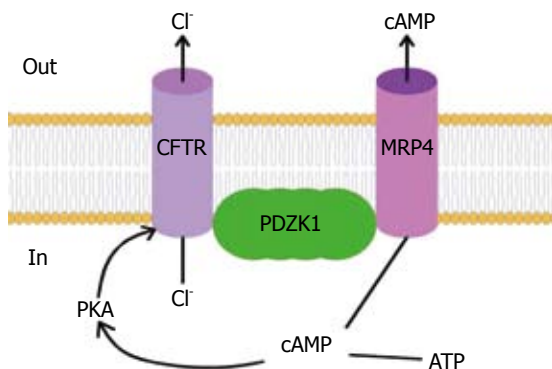


图2 MRP4与CFTR型氯离子通道的耦合过程。

CFTR的功能,使氯离子的分泌增加从而产生肠道腹泻;cAMP也可直接影响PKA的活性来影响CFTR介导的氯离子分泌(图2),有实验表明敲除MRP4的小鼠更易患CFTR介导的分泌性腹泻^[53]。

Sandle等^[54]对人体结肠顶膜上高电导的钾通道(BK)研究后发现这是一种cAMP依赖的钾通道,他在小肠氯离子和水分分泌的同时能增加结肠钾离子的分泌,在分泌性腹泻发生时与结肠中的钾流失有关,但这并不是分泌性腹泻有关的唯一的钾通道,人体结肠细胞基底膜钙离子敏感的中电导的钾通道(KCNN4)和cAMP敏感的低电导的钾通道(KCNQ1/KCNE3)都可能与不同病因引起的分泌性腹泻有关^[55-57]。后者可能的机制是KCNQ1/KCNE3能通过上皮细胞基底膜钾离子的重复利用而增加顶端氯离子外排的电化学驱动,从而使跨上皮的氯离子分泌变的容易,而氯离子的过量分泌会引起分泌性腹泻^[58]。

van Dinter等^[59]研究发现结肠假性梗阻患者粪便中高浓度的钾是由于结肠自主神经系统的激活和结肠假性梗阻,引起结肠扩张而使结肠中钾的大量分泌随粪便排出,但粪便中钠含量维持在较低水平,说明钠的主动吸收未受影响。Blondon等^[60]在随后对与结肠假性梗阻有关的新类型腹泻的研究中证实以上观点,并指出伴随着钠的被动分泌或抑制钠吸收的氯离子主动分泌

也是分泌性腹泻的原因。由此推测,钾的主动分泌可能是引起分泌性腹泻的一个新机制,但尚未发现有具体机制性的报道。

另外,体内与水分和离子转运有关转运体的先天性缺乏也是造成分泌性腹泻的一个原因。Murayama等^[61]发现一个日本男孩缺乏肠上皮细胞线粒体呼吸链复合物I,而这种复合物缺乏可阻断维持跨膜离子梯度运输的ATP的供应,进而抑制NHEs的活性,使体内水分和离子的转运发生异常,最终导致肠道分泌性腹泻。

3.3 渗出性腹泻中的离子转运 渗出性腹泻是指肠黏膜受到感染或其他因素的破坏,炎症渗出物使肠道渗透压升高,发生炎症或渗出而引起的腹泻。肠炎性疾病是造成炎症腹泻的最常见的原因之一^[62]。产毒性生物体(如肠道聚集性大肠杆菌、肠道出血性大肠杆菌)^[63,64]和入侵肠道的生物体(如沙门氏菌、痢疾杆菌、弯曲杆菌、产气单胞菌)等均可诱发肠道炎症^[65,66],激活细胞因子和炎症介质而引起渗出腹泻。

溃疡性结肠炎患者的肠黏膜上钠离子的吸收显著降低,上皮组织的通透性增强,基底膜外侧的钠钾泵活性降低,钠离子和氯离子的渗出减少,钾离子的分泌增加,并伴有明显的肠功能受损^[67,68],还可能与离子通道的损伤有关^[69]。Amasheh等^[70]对溃疡性结肠炎时上皮细胞钠离子通道(ENaC)进行了研究,表明在溃疡性结肠炎时促炎细胞因子的增加可有选择的减少ENaC上 β 、 γ 亚基mRNA的表达,使该钠离子通道的功能受阻,通过ENaC的电中性的氯化钠的吸收量减少。随着远端结肠钠离子的吸收降低,进而产生更为严重的肠道炎症,从而导致肠炎性腹泻的发生。Sugi等^[71]研究发现干扰素 γ 可抑制钠钾泵的活性,引起胞内钠离子浓度和细胞体积的上升,这也是肠上皮损伤相关的慢性肠炎的显著标志,也说明肠道黏膜功能下降导致肠腔内水分、电解质等积累而引起肠炎相关性腹泻。

4 结论

腹泻的发病机制比较复杂,是很多因素综合作用的结果,总的来说就是胃肠道分泌、吸收、消化和运动等功能发生障碍,以致分泌量增加、吸收量减少、消化不良和运动能力加速,最终导致腹泻的发生。肠道离子浓度变化及离子通道的功能性改变是各种不同类型腹泻发生过程中的一种重要现象,也是一种重要的致泻原因或途径。肠道离子的异常转运是在各种

外因和内因作用下发生的, 目前, 对腹泻疾病中的离子转运变化的研究还不够深入, 许多复杂的机制还未能阐明. 通过进一步加强分子生物学、药理学、遗传学、病理学的多学科交叉研究, 深入探讨腹泻疾病中的离子通道及离子转运变化发生和发展的过程和机制, 将可为特异性离子通道的协同或拮抗药品的开发利用以及腹泻疾病的预防和治疗提供一定的科学依据.

5 参考文献

- Guerrant RL, Van Gilder T, Steiner TS, Thielman NM, Slutsker L, Tauxe RV, Hennessy T, Griffin PM, DuPont H, Sack RB, Tarr P, Neill M, Nachamkin I, Reller LB, Osterholm MT, Bennish ML, Pickering LK. Practice guidelines for the management of infectious diarrhea. *Clin Infect Dis* 2001; 32: 331-351
- Talley NJ, Weaver AL, Zinsmeister AR, Melton LJ. Self-reported diarrhea: what does it mean? *Am J Gastroenterol* 1994; 89: 1160-1164
- Pawlowski SW, Warren CA, Guerrant R. Diagnosis and treatment of acute or persistent diarrhea. *Gastroenterology* 2009; 136: 1874-1886
- Fairbrother JM, Nadeau E, Gyles CL. Escherichia coli in postweaning diarrhea in pigs: an update on bacterial types, pathogenesis, and prevention strategies. *Anim Health Res Rev* 2005; 6: 17-39
- Argenzio RA. Physiology of diarrhea--large intestine. *J Am Vet Med Assoc* 1978; 173: 667-672
- Coté GA, Buchman AL. Antibiotic-associated diarrhoea. *Expert Opin Drug Saf* 2006; 5: 361-372
- Stephen J. Pathogenesis of infectious diarrhea. *Can J Gastroenterol* 2001; 15: 669-683
- Navaneethan U, Giannella RA. Mechanisms of infectious diarrhea. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol* 2008; 5: 637-647
- 朱朝敏, 辛琳琳. 感染性腹泻的发病机制. 实用儿科临床杂志 2010; 25: 1456-1457
- 聂青和. 感染性腹泻的发病机制研究进展及治疗指导. 中华实验和临床感染病杂志(电子版) 2007; 1: 188-191
- Cantey JR. Infectious diarrhea. Pathogenesis and risk factors. *Am J Med* 1985; 78: 65-75
- Navaneethan U, Giannella RA. Definition, Epidemiology, Pathophysiology, Clinical Classification, and Differential Diagnosis of Diarrhea. *Clinical Gastroenterology* 2011: 1-31
- Butler T. Loperamide for the treatment of traveler's diarrhea: broad or narrow usefulness? *Clin Infect Dis* 2008; 47: 1015-1016
- Diemert DJ. Prevention and self-treatment of traveler's diarrhea. *Clin Microbiol Rev* 2006; 19: 583-594
- Schiller LR. Chronic Idiopathic Diarrhea. *Clinical Gastroenterology* 2011: 311-324
- Schiller LR. Chronic diarrhea. *Gastroenterology* 2004; 127: 287-293
- Juckett G, Trivedi R. Evaluation of chronic diarrhea. *Am Fam Physician* 2011; 84: 1119-1126
- Al-Bayatti SM. Etiology of chronic diarrhea. *Saudi Med J* 2002; 23: 675-679
- Camilleri M. Chronic diarrhea: a review on pathophysiology and management for the clinical gastroenterologist. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2004; 2: 198-206
- Guarino A, Buccigrossi V, Armellino C. Colon in acute intestinal infection. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2009; 48 Suppl 2: S58-S62
- Chassany O, Michaux A, Bergmann JF. Drug-induced diarrhoea. *Drug Saf* 2000; 22: 53-72
- 周松, 李世根, 刘永刚, 刘希琴. 钠离子通道及其作用药物研究进展. 医药导报 2008; 27: 822-823
- 傅涛, 郝选明. 钾离子通道的研究进展. 内蒙古石油化工 2010; 36: 1-4
- 马燕, 张硕, 滕月. 钙通道与钙通道病相关研究进展. 基层医学论坛 2007; 11: 263-265
- 张勇, 杨安钢, 周士胜. 氯离子通道家族研究进展. 医学分子生物学杂志 2004; 1: 245-248
- Jentsch TJ, Stein V, Weinreich F, Zdebek AA. Molecular structure and physiological function of chloride channels. *Physiol Rev* 2002; 82: 503-568
- 黄晓东, 罗和生. 小肠水电解质转运及其细胞内调节. 世界华人消化杂志 1998; 6: 720-721
- 朱文玉. 第三讲 小肠内水和电解质的转运. 中华消化杂志 1997; 17: 168-169
- Tabcharani JA, Chang XB, Riordan JR, Hanrahan JW. Phosphorylation-regulated Cl⁻ channel in CHO cells stably expressing the cystic fibrosis gene. *Nature* 1991; 352: 628-631
- Kunzelmann K, Hübner M, Schreiber R, Levy-Holzman R, Garty H, Bleich M, Warth R, Slavik M, von Hahn T, Greger R. Cloning and function of the rat colonic epithelial K⁺ channel KVLQT1. *J Membr Biol* 2001; 179: 155-164
- Hoogerwerf WA, Tsao SC, Devuyst O, Levine SA, Yun CH, Yip JW, Cohen ME, Wilson PD, Lazenby AJ, Tse CM, Donowitz M. NHE2 and NHE3 are human and rabbit intestinal brush-border proteins. *Am J Physiol* 1996; 270: G29-G41
- Wormmeester L, Sanchez de Medina F, Kokke F, Tse CM, Khurana S, Bowser J, Cohen ME, Donowitz M. Quantitative contribution of NHE2 and NHE3 to rabbit ileal brush-border Na⁺/H⁺ exchange. *Am J Physiol* 1998; 274: C1261-C1272
- 范小琴, 高原. 钠氢交换蛋白3亚型的研究进展. 实用医学杂志 2010; 26: 334-336
- Yun CH, Lamprecht G, Forster DV, Sidor A. NHE3 kinase A regulatory protein E3KARP binds the epithelial brush border Na⁺/H⁺ exchanger NHE3 and the cytoskeletal protein ezrin. *J Biol Chem* 1998; 273: 25856-25863
- Moeser AJ, Nighot PK, Ryan KA, Simpson JE, Clarke LL, Bliklager AT. Mice lacking the Na⁺/H⁺ exchanger 2 have impaired recovery of intestinal barrier function. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2008; 295: G791-G797
- Ledoussal C, Lorenz JN, Nieman ML, Soleimani M, Schultheis PJ, Shull GE. Renal salt wasting in mice lacking NHE3 Na⁺/H⁺ exchanger but not in mice lacking NHE2. *Am J Physiol Renal Physiol* 2001; 281: F718-F727
- Yun CH, Oh S, Zizak M, Steplock D, Tsao S, Tse CM, Weinman EJ, Donowitz M. cAMP-mediated inhibition of the epithelial brush border Na⁺/H⁺ exchanger, NHE3, requires an associated regulatory protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94: 3010-3015
- 王世农. 钠氢交换调控因子1(NHERF1)的结构与功能. 吉林师范大学学报(自然科学版) 2011; 33: 39-43
- Hammer HF, Santa Ana CA, Schiller LR, Fordtran JS. Studies of osmotic diarrhea induced in normal subjects by ingestion of polyethylene glycol and lactulose. *J Clin Invest* 1989; 84: 1056-1062
- Hammer HF, Fine KD, Santa Ana CA, Porter JL, Schiller LR, Fordtran JS. Carbohydrate malabsorp-

■名词解释

CFTR: 是一种独特的氯离子通道, 主要为氯离子的跨上皮转运提供选择性通道, 对跨上皮的盐类运输、液体流动和离子浓度的调节都有很重要的作用.

■同行评价

本文选题为临床常见病,特别值得基础研究者和消化临床医师阅读。

- tion. Its measurement and its contribution to diarrhea. *J Clin Invest* 1990; 86: 1936-1944
- 41 Wapnir RA, Zdanowicz MM, Teichberg S, Lifshitz F. Oral hydration solutions in experimental osmotic diarrhea: enhancement by alanine and other amino acids and oligopeptides. *Am J Clin Nutr* 1988; 48: 84-90
- 42 Go JT, Harper RG, Sia CG, Teichberg S, Wapnir RA. Oral rehydration solutions: increased water and sodium absorption by addition of a viscosity-enhancing agent in a rat model of chronic osmotic diarrhea. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1994; 19: 410-416
- 43 Schiller LR. Secretory diarrhea. *Curr Gastroenterol Rep* 1999; 1: 389-397
- 44 Field M. Intestinal ion transport and the pathophysiology of diarrhea. *J Clin Invest* 2003; 111: 931-943
- 45 Terrin G, Canani RB. Diarrhea from Enterotoxins. *Clinical gastroenterology* 2011; 281-298
- 46 郭学青, 邹学明. 霍乱毒素及大肠杆菌不耐热肠毒素生物学特性的研究. *世界华人消化杂志* 2000; 8: 325-326
- 47 郭晓强. CFTR型氯离子通道研究进展. *生命科学* 2007; 19: 189-193
- 48 Sheppard DN, Welsh MJ. Structure and function of the CFTR chloride channel. *Physiol Rev* 1999; 79: S23-S45
- 49 Schultz BD, Singh AK, Devor DC, Bridges RJ. Pharmacology of CFTR chloride channel activity. *Physiol Rev* 1999; 79: S109-S144
- 50 Li H, Cai Z, Chen JH, Ju M, Xu Z, Sheppard DN. The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator Cl(-) channel: a versatile engine for transepithelial ion transport. *Sheng Li Xue Bao* 2007; 59: 416-430
- 51 Berger AL, Ikuma M, Welsh MJ. Normal gating of CFTR requires ATP binding to both nucleotide-binding domains and hydrolysis at the second nucleotide-binding domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102: 455-460
- 52 Li C, Dandridge KS, Di A, Marrs KL, Harris EL, Roy K, Jackson JS, Makarova NV, Fujiwara Y, Farrar PL, Nelson DJ, Tigyi GJ, Naren AP. Lysophosphatidic acid inhibits cholera toxin-induced secretory diarrhea through CFTR-dependent protein interactions. *J Exp Med* 2005; 202: 975-986
- 53 Li C, Krishnamurthy PC, Penmatsa H, Marrs KL, Wang XQ, Zaccolo M, Jalink K, Li M, Nelson DJ, Schuetz JD, Naren AP. Spatiotemporal coupling of cAMP transporter to CFTR chloride channel function in the gut epithelia. *Cell* 2007; 131: 940-951
- 54 Sandle GI, Hunter M. Apical potassium (BK) channels and enhanced potassium secretion in human colon. *QJM* 2010; 103: 85-89
- 55 Lomax RB, Warhurst G, Sandle GI. Characteristics of two basolateral potassium channel populations in human colonic crypts. *Gut* 1996; 38: 243-247
- 56 Warth R, Barhanin J. Function of K⁺ channels in the intestinal epithelium. *J Membr Biol* 2003; 193: 67-78
- 57 Jespersen T, Grunnet M, Olesen SP. The KCNQ1 potassium channel: from gene to physiological function. *Physiology (Bethesda)* 2005; 20: 408-416
- 58 Preston P, Wartosch L, Günzel D, Fromm M, Kongsuphol P, Ousingsawat J, Kunzelmann K, Barhanin J, Warth R, Jentsch TJ. Disruption of the K⁺ channel beta-subunit KCNE3 reveals an important role in intestinal and tracheal Cl⁻ transport. *J Biol Chem* 2010; 285: 7165-7175
- 59 van Dinter TG, Fuerst FC, Richardson CT, Ana CA, Polter DE, Fordtran JS, Binder HJ. Stimulated active potassium secretion in a patient with colonic pseudo-obstruction: a new mechanism of secretory diarrhea. *Gastroenterology* 2005; 129: 1268-1273
- 60 Blondon H, Béchade D, Desramé J, Algayres JP. Secretory diarrhoea with high faecal potassium concentrations: a new mechanism of diarrhoea associated with colonic pseudo-obstruction? Report of five patients. *Gastroenterol Clin Biol* 2008; 32: 401-404
- 61 Murayama K, Nagasaka H, Tsuruoka T, Omata Y, Horie H, Tregoning S, Thorburn DR, Takayanagi M, Ohtake A. Intractable secretory diarrhea in a Japanese boy with mitochondrial respiratory chain complex I deficiency. *Eur J Pediatr* 2009; 168: 297-302
- 62 钱家鸣, 沈冰冰. 肠道菌群与炎症性肠病. *现代消化及介入治疗* 2010; 15: 161-162, 166
- 63 张冬梅. 肠致病性大肠杆菌致病机制的研究进展. *国际流行病学传染病学杂志* 2001; 28: 27-30
- 64 史云, 计融. 肠致病性大肠杆菌的致病因子及致病机制的研究进展. *国外医学·卫生学分册* 2003; 30: 205-211
- 65 蒋丽蓉. 肠道菌群与炎症性肠病. *临床儿科杂志* 2011; 29: 906-909
- 66 沈峰. 小肠细菌过度生长在肠易激综合征发病机制中的作用. *上海交通大学学报(医学版)* 2010; 30: 852-855
- 67 孙贵张, 卜平, 孔桂美. 溃疡性结肠炎免疫学发病机制进展. *胃肠病学和肝病学杂志* 2008; 17: 266-269
- 68 毛一雷, 杜顺达. 炎性肠道疾病与免疫和介质的关系. *中国实用外科杂志* 2001; 21: 747-749
- 69 Urayama S, Chang EB. Mechanisms and treatment of Diarrhea in Inflammatory Bowel Diseases. *Inflammatory Bowel Diseases* 1997; 3: 114-131
- 70 Amasheh S, Barmeyer C, Koch CS, Tavalali S, Mankertz J, Eppe HJ, Gehring MM, Florian P, Kroesen AJ, Zeitz M, Fromm M, Schulzke JD. Cytokine-dependent transcriptional down-regulation of epithelial sodium channel in ulcerative colitis. *Gastroenterology* 2004; 126: 1711-1720
- 71 Sugi K, Musch MW, Field M, Chang EB. Inhibition of Na⁺,K⁺-ATPase by interferon gamma down-regulates intestinal epithelial transport and barrier function. *Gastroenterology* 2001; 120: 1393-1403

编辑 李军亮 电编 闫晋利

腺病毒介导的KDR-CDglyTK系统在治疗胃癌中的旁观者效应机制

李强, 黄宗海, 陈飞, 俞金龙

李强, 黄宗海, 陈飞, 俞金龙, 南方医科大学珠江医院普外科
广东省广州市 510282

李强, 副教授, 副主任医师, 主要从事胃肠道肿瘤的临床与基础研究.

通讯作者: 李强, 副教授, 副主任医师, 510282, 广东省广州市, 南方医科大学珠江医院普外科. lq642@hotmail.com

电话: 020-616432113

收稿日期: 2011-12-30 修回日期: 2012-02-03

接受日期: 2012-02-27 在线出版日期: 2012-03-28

Mechanism of bystander effect in therapy of stomach cancer with the KDR-CDglyTK suicide gene system

Qiang Li, Zong-Hai Huang, Fei Chen, Jin-Long Yu

Qiang Li, Zong-Hai Huang, Fei Chen, Jin-Long Yu, Department of General Surgery, Zhujiang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510282, Guangdong Province, China

Correspondence to: Qiang Li, Associate Chief Physician, Department of General Surgery, Zhujiang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510282, Guangdong Province, China. lq642@hotmail.com

Received: 2011-12-30 Revised: 2012-02-03

Accepted: 2012-02-27 Published online: 2012-03-28

Abstract

AIM: To study the relation between intercellular gap connection and bystander effect in therapy of stomach cancer with the KDR-CDglyTK suicide system.

METHODS: SCG7901 and HeLa cells were infected with adenovirus-based KDR-CDglyTK system (AdKDR-CDglyTK), and the expression of CDglyTK fusion gene in infected cells was confirmed by RT-PCR. Gap junction intercellular communication was determined by fluorescence recovery after photobleaching (FRAC) in SCG7901 and HeLa cells in the presence or absence of versulin. Infected and non-infected cells were mixed with a proportion of 5% and 95% or 10% and 90%, cultured in the presence or absence of versulin, and then used to detect cell survival by MTT assay.

RESULTS: The expression of GFP was observed in both infected SCG7901 cells and HeLa cells. Fluorescence intensity was gradually recovered at different time points after bleaching in SCG7901 cells cultured with versulin. Compared to SCG7901 cells cultured without versulin, the fluorescence recovery of bleached cells cultured with versulin was more obvious at the same time points. In contrast, fluorescence intensity showed no significant changes in HeLa cells cultured with versulin. The mean fluorescence recovery rate had a significant difference between SCG7901 and HeLa cells cultured with versulin. When infected and non-infected cells were mixed at different proportions, cell survival showed a significant difference between groups of SCG7901 cells ($F = 144.42, 407.83$; both $P = 0.000$), but had no significance difference between groups of HeLa cells ($F = 0.386, 0.895$; $P = 0.765, 0.472$).

CONCLUSION: There is a relation between intercellular communication and gap connection in SCG7901 cells but not in HeLa cells. Versulin can enhance the bystander effect in therapy with the suicide gene system *in vitro*. The mechanism of bystander effect in therapy with the suicide gene system may involve gap connection.

Key Words: Stomach cancer; Fluorescence recovery after photobleaching; Gap connection; Bystander effect; Suicide gene

Li Q, Huang ZH, Chen F, Yu JL. Mechanism of bystander effect in therapy of stomach cancer with the KDR-CDglyTK suicide gene system. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2012; 20(9): 749-753

摘要

目的: 探讨重组腺病毒介导KDR-CDglyTK系统杀伤胃癌SCG7901细胞时细胞缝隙连接与旁观者效应的关系.

方法: 感染复数(multiplicity of infection, MOI) = 100时, 将携带融合基因重组腺病毒体外感染SCG7901、HeLa细胞, 检测细胞的感

■背景资料

目前, 有关单自杀基因的旁观者效应机制研究较多, 如TK基因和CD基因分别通过细胞缝隙连接和细胞介质传递毒性物质杀伤未转染自杀基因的肿瘤细胞. 而双自杀基因旁观者效应的作用机制尚不清楚.

■同行评议者

葛海燕, 教授, 同济大学附属第十人民医院普通外科

■研究前沿

双自杀基因如CD-TK等融合基因是近几年开始进行的研究,但是有关双自杀基因旁观者效应的机制文献报道很少,作用机制尚不完全清楚。

染效率以及转基因肿瘤细胞在mRNA水平上融合基因的表达;用荧光漂白恢复技术(fluorescence recovery after photobleaching, FRAP)检测SCG7901、HeLa细胞以及芹黄素作用上述两种细胞的细胞间通讯功能。将已转染细胞和未转染细胞分别按10%:90%和5%:95%两种比例混合,用含或不含芹黄素的培养基,培养24 h后,在不同组中分别加入GCV、5-FC两者的混合液,72 h后用MTT法检测细胞存活率。

结果:受感染的SCG7901和HeLa细胞中均有绿色荧光蛋白的表达。图像中观察到在芹黄素作用下SCG7901细胞淬灭后荧光强度明显降低,随后随着时间的推移,被淬灭细胞的荧光强度逐渐恢复,在相同时间内其恢复强度较未应用上调剂的SCG7901细胞要强;而在芹黄素作用下的HeLa细胞被淬灭后荧光强度明显降低,随时间的推移荧光强度无明显恢复,在上调剂芹黄素作用下的SCG7901与HeLa细胞间的荧光恢复率有差异。同时,观察到双自杀基因系统在转基因细胞比例分别占5%、10%时,SCG7901细胞在空白组、前药组、芹黄素组、前药+芹黄素组间细胞生存率有差异($F = 144.42, P = 0.000$)、($F = 407.83, P = 0.000$),而HeLa细胞在各组间的细胞生存率无统计学意义($F = 0.386, P = 0.765$)、($F = 0.895, P = 0.472$)。

结论:FRAP技术证实SCG7901细胞间通讯功能与缝隙连接有一定关系,而HeLa细胞不存在细胞间通讯功能。双自杀基因系统治疗SCG7901细胞时存在旁观者效应而且上调剂可以扩大其旁杀效应;但HeLa细胞不存在旁观者效应。双自杀基因系统治疗胃癌细胞时旁观者效应与细胞间缝隙连接有关。

关键词:胃癌;荧光漂白恢复技术;缝隙连接;旁观者效应;自杀基因

李强, 黄宗海, 陈飞, 俞金龙. 腺病毒介导的KDR-CDglyTK系统在治疗胃癌中的旁观者效应机制. 世界华人消化杂志 2012; 20(9): 749-753

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/749.asp>

0 引言

胃癌是最常见的消化系恶性肿瘤,进展期胃癌的常规治疗效果往往不尽如人意,因此人们开始关注胃癌的基因治疗。在基因治疗诸多方法中,自杀基因疗法是目前认为最具临床应用潜力的肿瘤基因治疗策略之一^[1,2]。体内外实验表

明旁观者效应是自杀基因的独特作用,即不仅转导了自杀基因的细胞可以在给予前药后被杀死,而且与其相邻的未转导自杀基因的细胞亦可被杀死。旁观者效应扩大了自杀基因的杀伤效果,在自杀基因疗法中起着相当重要的作用,至于其确切机制目前尚不完全清楚,如能阐明他的机制,将有助于提高自杀基因的治疗作用^[3,4]。本研究采用荧光漂白恢复技术(fluorescence recovery after photobleaching, FRAP)观察双自杀基因系统治疗胃癌中缝隙连接与旁观者效应的关系,为进一步研究提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 材料 重组腺病毒AdEasy-KDR-CDglyTK为珠江医院普外科构建;胃癌细胞株SCG7901、宫颈癌细胞株HeLa购自中山大学试验中心细胞库;DMEM、小牛血清及TRIzol Reagent试剂盒为Gibco公司产品;转染试剂PolyFect为QIAGEN公司提供;CD-TK引物序列为:上游 P1 5'AAGCT-TAGGCTAGCAATGTCG3',下游P2 5'TTAGT-TAGCCTCCCCCATCTC3',由上海英俊生物有限公司合成;GCV为Roche Pharma(Switzerland)公司产品,5-FC购自Sigma公司;Leica TCS SP2型激光共聚焦显微镜(德国)。

1.2 方法

1.2.1 重组腺病毒鉴定:重组腺病毒的包装、扩增与纯化,滴度测定与鉴定见参考文献[5]。

1.2.2 重组腺病毒对SCG7901细胞和HeLa细胞感染率的测定:细胞分别用含100 mL/L小牛血清的DMEM培养,以 2×10^5 个细胞数接种于6孔培养板,待细胞丰度达约80%,加入不同MOI的目的腺病毒,在37℃、50 mL/L CO₂孵箱内培养,3 d后在荧光显微镜下计数GFP阳性细胞百分比。

1.2.3 RT-PCR检测转基因细胞CDglyTK基因表达:细胞总RNA的提取按照TRIzol Reagent试剂盒说明进行,然后按照逆转录试剂盒说明合成cDNA,应用CDglyTK的上下游引物进行PCR反应,1%琼脂糖凝胶电泳,紫外灯下观察结果并拍照。

1.2.4 FRAP检测已转染和未转染的SCG7901和HeLa细胞的细胞间通讯功能:细胞接种于Petri培养皿,待细胞融合70%-80%时,用MOI = 100重组腺病毒感染细胞,24 h后每培养皿放入200 μL的5-CFDA/AM,孵育约30 min后,在共聚焦显微镜下观察。淬灭细胞的激光功率为80%,漂白脉冲时间200 ms,计算机精确定位后,发射激光束对

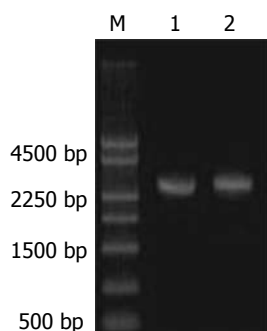


图 1 PCR检测细胞转染情况。M: Marker 250 bp DNA Ladder; 1: 转染细胞SCG7901/CD-TK(2.5 kb阳性条带); 2: 转染细胞HeLa/CD-TK(2.5 kb阳性条带)。

表 1 细胞在不同条件下的荧光恢复率 ($n = 5$, mean \pm SD)

	SCG7901	HeLa	值	P值
对照组	15.04 \pm 3.24	8.67 \pm 2.52	3.472	0.008
腺病毒组	14.96 \pm 2.92	8.71 \pm 2.16	3.774	0.005
芹黄素组	35.05 \pm 4.38 ^b	8.26 \pm 2.53	11.836	0.000
F值	51.892	0.000	—	—
P值	0.053	0.949	—	—

^b $P < 0.01$ vs 对照组。

应用要点

研究双自杀基因的旁观者效应机制有助于探索提高胃癌自杀基因治疗的方法,或据此而提出新的治疗途径,有可能使恶性肿瘤的治疗出现一个较好的局面。

选定细胞内的荧光探针进行淬灭。激光漂白后每2 s扫描摄像1次,获取扫描图像共60帧,得到漂白细胞荧光的恢复及相邻接触的未漂白细胞荧光的变化情况,观测被激光淬灭的细胞内荧光强度动态恢复过程和最终恢复水平。荧光漂白恢复速率以每个监测细胞荧光值与初始的淬灭后荧光值相比所得的百分率计算,即恢复率 = (poste-post1)/post1,数据以荧光恢复速率的平均百分率加平均数的标准误差来表示。

1.2.5 FRAP观察上调剂芹黄素对SCG7901和HeLa细胞的细胞间通讯功能的影响:实验组芹黄素溶解于DMSO后,配成含芹黄素终浓度为10 μ mol/L的培养基,对照组加等量DMSO,不含芹黄素。待细胞融合70%-80%时,加入含芹黄素的培养基,继续培养24 h,余步骤同1.2.4。

1.2.6 “旁观者效应”的检测及芹黄素对其的影响:将已转染细胞和未转染细胞分别按10%:90%和5%:95%两种比例混合,A组:加前药(GCV 60 g/L, 5-FU 1 000 g/L);B组:经apigenin(10 μ mol/L)预处理12 h(apigenin孵育12 h后去除)而不加前药;C组:经apigenin预处理后加入前药;D组:空白对照组。72 h后MTT法检测细胞杀伤率。按照下列公式计算杀伤效应:杀伤效应 = $(1 - A_{\text{实验组}}/A_{\text{对照组}}) \times 100\%$ 。

统计学处理 应用SPSS13.0软件进行数据处理,采用独立样本 t 检验和单向方差分析,组间多重比较应用SNK法。

2 结果

2.1 重组腺病毒的包装、扩增、纯化以及滴度测定 重组腺病毒质粒经Pac I酶切后用PolyFect转染试剂转染293细胞,24 h后可见GFP荧光表达,3-5 d表达达到高峰,7-10 d可收集细胞,反复扩增后CsCl密度梯度离心后所得重组腺病毒滴度为 2×10^{11} pfu/mL。

2.2 重组腺病毒的感染效率的测定 采用不同MOI的重组腺病毒分别感染SCG7901和HeLa

细胞,96 h后观察发现:细胞的感染率随腺病毒滴度的增加而递增,当MOI = 1时,仅少数细胞有荧光;当MOI = 100时,95%以上的GFP表达;MOI = 200时,几乎所有的细胞均被感染,重组腺病毒对SCG7901和HeLa细胞具有相似的感染效率。

2.3 转基因细胞CDglyTK基因表达产物的鉴定 RT-PCR检测结果显示:感染Ad-KDR-CDglyTK的SCG7901/CD-TK、HeLa/CD-TK细胞均可见约2.5 kb阳性条带(图1)。

2.4 FRAP检测已转染和未转染的SCG7901和HeLa细胞的细胞间通讯功能 光淬灭恢复技术下细胞间通讯在激光扫描共聚焦显微镜下的表现:启动激光共聚焦显微镜,在各种检测细胞中选择所要观察的细胞,淬灭其荧光后进行图像扫描。如果细胞间有通讯功能的话,未淬灭细胞的荧光物质会通过细胞间隙连接进入淬灭细胞,淬灭细胞的荧光强度会逐渐恢复,约2-5 min达到稳定。图像中观察到淬灭后的转染和未转染的SCG7901细胞的荧光强度明显降低,随着时间的推移,被淬灭细胞的荧光强度逐渐恢复;而淬灭后的转染和未转染HeLa细胞荧光强度明显降低,随时间的推移荧光强度无明显恢复。根据显微镜上的分析软件获取每个所观察细胞的荧光恢复率,在对照组、腺病毒组中SCG7901与HeLa细胞之间荧光恢复率相比较,差异有统计学意义(表1)。

2.5 FRAP观察上调剂芹黄素对SCG7901细胞和HeLa细胞的细胞间通讯功能的影响 荧光漂白恢复技术结合激光共聚焦显微镜技术在图像中观察到:在芹黄素作用下SCG7901细胞(图2A-C)淬灭后荧光强度明显降低,随着时间推移,被淬灭细胞的荧光强度逐渐恢复,在相同时间内其恢复强度较未应用上调剂的同种细胞要强;而在芹黄素作用下的HeLa细胞(图2D-F)被淬灭后荧光强度明显降低,随时间的推移荧光强度无明显恢复。根据显微镜上的分析软件获取每个

■名词解释

双自杀基因疗法: 是利用基因工程的技术将2种自杀基因整合在一起, 通过载体转入肿瘤细胞, 使其在肿瘤细胞内表达融合基因产物, 此产物具有2种自杀基因编码的酶的活性, 然后给予双药物前体治疗, 从而对2类不同的药物前体敏感, 而发挥双功能的杀伤作用。

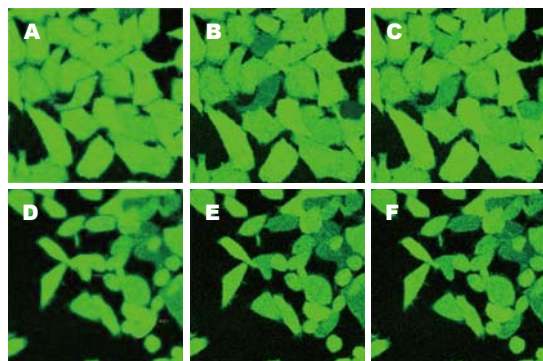


图2 荧光漂白恢复技术检测细胞间的通讯功能. A: SCG7901+AP, 未淬灭前细胞荧光扫描图像; B: SCG7901+APD, 光淬灭后初始扫描图像; C: SCG7901+APD, 光淬灭后60 s扫描图像; D: HeLa+AP, 未淬灭前细胞荧光扫描图像; E: HeLa+AP, 光淬灭后初始扫描图像; F: HeLa+AP, 淬灭后60 s扫描图像。

所观察细胞的荧光恢复率, SCG7901细胞在对照组、腺病毒组、芹黄素组间的荧光恢复率比较有统计学意义; 而HeLa细胞在对照组、腺病毒组、芹黄素组间的荧光恢复率比较无统计学意义, 用SNK法, SCG7901细胞中芹黄素组与对照组相比, 其荧光恢复率的差别有统计学意义; HeLa细胞中芹黄素组与对照组相比, 其荧光恢复率的差别无统计学意义。在芹黄素组中的SCG7901细胞与HeLa细胞之间荧光恢复率比较, 差异有统计学意义(表1)。

2.6 “旁观者效应”的检测及芹黄素对其的影响 将KDR为启动子的重组腺病毒感染的SCG7901细胞、HeLa细胞分别与未感染的同种细胞以5%和10%、10%和90%的比例混合培养, 观察该体系的旁观者效应, 转基因细胞比例分别占5%、10%时, SCG7901细胞在空白组、前药组、芹黄素组、前药+芹黄素组组间细胞的生存率差异有统计学意义, 用SNK法, 前药+芹黄素组、前药组分别与空白组间两两相比, 差异有统计学意义。HeLa细胞在空白组、前药组、芹黄素组、前药+芹黄素组组间细胞生存率间差异无统计学意义(表2)。SCG7901细胞在空白组、前药组、芹黄素组、前药+芹黄素组中, 转基因细胞比例占5%和10%时, 两种比例细胞生存率之间分别在前药组、前药+芹黄素组中的差异有统计学意义($t = 15.06, P = 0.000$)、($t = 5.99, P = 0.001$); 而两种比例细胞生存率之间分别在空白组、芹黄素组中的差异无统计学意义($t = 1.64, P = 0.152$)、($t = 0.73, P = 0.492$)。

3 讨论

旁观者效应明显扩大自杀基因的杀伤作用, 只需

要1%-2%的基因转染率就能成功抑制肿瘤生长。多数学者^[6,7]认为旁观者效应在自杀基因疗法中起着相当重要的作用。至于旁观者效应的确切机制目前尚不完全清楚, 主要倾向于缝隙连接、毒性代谢产物释放, 细胞凋亡和机体免疫反应等方面。

缝隙连接理论是大家最认同的一种假说, 该理论认为, 转染自杀基因的细胞经前药作用后产生的细胞毒性物质通过细胞间的缝隙连接传递到邻近细胞, 导致未转染自杀基因的细胞死亡。缝隙连接是细胞间的信号传导通道, 由一类称为连接素的蛋白质构成。Robe等^[8]的研究表明, BSE的表达程度与缝隙连接介导的细胞间通讯(GJIC)的表达有十分密切的关系。已知缝隙连接允许离子和小分子物质(分子量<1 000 Da或粒子直径<1.5 nm, 包括第二信使和代谢物)在细胞间作双向传递, GCV可以通过细胞膜进入细胞, 但磷酸化的GCV不能通过细胞膜, 只能通过细胞间的缝隙连接传递。缝隙连接抑制剂甘草酸能显著抑制这一作用, 证明了缝隙连接在BSE中的作用。CD/5-FC系统引发BSE的情况则与此不同。研究表明, 当应用缝隙连接抑制剂阻断细胞间的缝隙连接后, TK基因引起的BSE受到明显抑制, 但CD基因引起的BSE却不受影响, 说明由CD基因引发的BSE效应并不是通过细胞间的缝隙连接起作用。有学者认为^[9], 5-FC经CD基因产物转化为5-FU, 而5-FU能够自由进出细胞内外, 无需细胞间的接触即可对邻近细胞产生杀伤作用。

目前, 关于双自杀基因系统的旁观者效应的机制报道不多。本实验首先在此系统中应用荧光漂白恢复技术结合共聚焦显微技术观察SCG7901、ECV304、HepG2、HeLa细胞的细胞间通讯功能。

迄今已有多种技术途径用于功能性缝隙连接通讯的研究, 报道的技术有: 电耦联, 经过放射性活性代谢物转移的代谢协同, 基因突变所致的代谢协同, 刮除负载(scraper loading), 微注射和荧光染料转移。这些技术操作复杂、难度大, 且都对细胞膜造成了损伤, 影响了实验结果的准确性和可行性, 使缝隙连接细胞间通讯的研究受到限制。随着激光扫描共聚焦显微镜技术的诞生, 可以对细胞间缝隙连接的物质交换进行较为精确的测量, 从而为研究细胞间缝隙连接通讯提供了强有力的手段。

本实验结果显示: 转基因和未转基因的SCG7901细胞、HepG2细胞存在细胞间通讯功能, 而HeLa细胞不存在细胞间的通讯功能; 上调

表 2 转基因细胞比例分别占5%、10%时的旁观者效应 ($n = 4$, mean \pm SD)

	5%		10%	
	SCG7901细胞	HeLa细胞	SCG7901细胞	HeLa细胞
空白组	98.33 \pm 1.24	96.76 \pm 1.30	96.79 \pm 2.74	97.12 \pm 1.15
前药组	84.22 \pm 2.35 ^{bd}	96.27 \pm 1.35	58.87 \pm 2.40 ^{bd}	95.24 \pm 2.23
芹黄素组	95.81 \pm 0.94	96.31 \pm 1.81	96.61 \pm 1.98	96.24 \pm 2.21
前药+芹黄素组	56.34 \pm 5.74 ^{bd}	97.18 \pm 0.97	34.70 \pm 4.37 ^{bd}	95.60 \pm 0.89
F值	144.420	0.386	407.82	0.895
P值	0.000	0.765	0.000	0.472

^b $P < 0.01$ vs 空白组; ^d $P < 0.01$ vs HeLa细胞组.

剂芹黄素可以增强SCG7901细胞、HepG2细胞细胞之间的通讯功能. 将KDR为启动子的重组腺病毒感染的SCG7901细胞、HeLa细胞与未感染的同种细胞以5%和10%、10%和90%的比例混合培养, 观察到该体系的旁观者效应, 转基因细胞比例占5%、10%时, SCG7901细胞分别在空白组、前药组、芹黄素组、前药+芹黄素组组间的细胞生存率差异有统计学意义. HeLa细胞分别在空白组、前药组、芹黄素组、前药+芹黄素组组间的细胞生存率差异无统计学意义. SCG7901细胞在空白组、前药组、芹黄素组、前药+芹黄素组中, 转基因细胞比例占5%和占10%时, 两种比例细胞生存率之间在前药组、前药+芹黄素组组间差异有统计学意义; 而在空白组、芹黄素组组间差异无统计学意义.

总之, 双自杀基因系统存在存在缝隙连接的细胞中具有旁观者效应, 而且上调剂芹黄素可以增强细胞的旁观者效应, 但并未发现双自杀基因系统可以提高无缝隙连接细胞的旁观者效应, 其作用的机制有待进一步的研究.

4 参考文献

1 Shirakawa T. The current status of adenovirus-based cancer gene therapy. *Mol Cells* 2008; 25: 462-466

2 Maura D, Debarbieux L. Bacteriophages as twenty-first century antibacterial tools for food and medicine. *Appl Microbiol Biotechnol* 2011; 90: 851-859

3 Zhang JH, Wan MX, Yuan JY, Pan BR. Construction and identification of recombinant vectors carrying herpes simplex virus thymidine kinase and cytokine genes expressed in gastric carcinoma cell line SGC7901. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 26-30

4 Zhang JH, Wan MX, Yuan JY, Pan BR. Do there exist synergistic antitumor effects by coexpression of herpes simplex virus thymidine kinase with cytokine genes on human gastric cancer cell line SGC7901? *World J Gastroenterol* 2004; 10: 147-151

5 杨文宇, 黄宗海, 龚小卫, 程琦, 车小燕. 腺病毒介导双自杀基因选择性杀伤血管内皮细胞. *中华胃肠外科杂志*, 2004; 7: 65-68

6 Nicholas TW, Read SB, Burrows FJ, Kruse CA. Suicide gene therapy with Herpes simplex virus thymidine kinase and ganciclovir is enhanced with connexins to improve gap junctions and bystander effects. *Histol Histopathol* 2003; 18: 495-507

7 Tang Q, Zhang D, Wan M, Jin L. Experimental study of the RV-HSV-TK/GCV suicide gene therapy system in gastric cancer. *Cancer Biother Radiopharm* 2007; 22: 755-761

8 Robe PA, Nguyen-Khac M, Jolois O, Rogister B, Merville MP, Bours V. Dexamethasone inhibits the HSV-tk/ganciclovir bystander effect in malignant glioma cells. *BMC Cancer* 2005; 5: 32

9 Tsuchiyama T, Nakamoto Y, Sakai Y, Marukawa Y, Kitahara M, Mukaida N, Kaneko S. Prolonged, NK cell-mediated antitumor effects of suicide gene therapy combined with monocyte chemoattractant protein-1 against hepatocellular carcinoma. *J Immunol* 2007; 178: 574-583

■同行评价
本文内容较新, 研究课题重要, 对胃癌的基因治疗提供了有意义的信息, 科学性、创新性与可读性均较好.

编辑 曹丽鸥 电编 闫晋利

基因富集及Meta分析对影响肝癌发生发展关键基因的筛选

曹 骥, 卢晓旭, 胡艳玲, 李 媛, 朱伶群, 杨 春, 欧 超, 唐艳萍

■背景资料

近年来随着人类和大鼠、小鼠等动物基因组测序工程的逐步完成, 人们开始意识到那些跨种属(cross-species)在不同物种共同表达的基因, 可能具有保守和更重要的功能。跨种属的肿瘤比较基因组学研究策略遂基于这一认识而产生。

曹骥, 卢晓旭, 李媛, 朱伶群, 杨春, 欧超, 唐艳萍, 广西壮族自治区肿瘤医院防治研究所实验研究部 广西壮族自治区南宁市 530021

胡艳玲, 广西医科大学医学科学实验中心 广西壮族自治区南宁市 530021

曹骥, 副研究员, 硕士生导师, 主要从事肝癌病因学、发病机制方面的研究。

国家自然科学基金资助项目, No. 30960428

作者贡献分布: 此课题由曹骥与李媛设计; 研究过程由曹骥、卢晓旭、胡艳玲、李媛、朱伶群、杨春、欧超及唐艳萍操作完成; 数据分析和论文写作由曹骥与卢晓旭完成。

通讯作者: 曹骥, 副研究员, 530021, 广西壮族自治区南宁市, 广西壮族自治区肿瘤医院防治研究所实验研究部. caojicn@yahoo.com.cn 电话: 0771-5310593

收稿日期: 2011-10-09 修回日期: 2012-01-30

接受日期: 2012-02-27 在线出版日期: 2012-03-28

Applying gene set enrichment analysis and meta-analysis to screen key genes controlling the development and progression of hepatic carcinoma

Ji Cao, Xiao-Xu Lu, Yan-Ling Hu, Yuan Li, Ling-Qun Zhu, Chun Yang, Chao Ou, Yan-Ping Tang

Ji Cao, Xiao-Xu Lu, Yuan Li, Ling-Qun Zhu, Chun Yang, Chao Ou, Yan-Ping Tang, Research Department of Guangxi Cancer Institute, Nanning 530021, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China

Yan-Ling Hu, Medical Scientific Experimental Center of Guangxi Medical University, Nanning 530021, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China

Supported by: National Science Foundation of China, No. 30960428

Correspondence to: Ji Cao, Associate Researcher, Research Department of Guangxi Cancer Institute, Nanning 530021, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China. caojicn@yahoo.com.cn

Received: 2011-10-09 Revised: 2012-01-30

Accepted: 2012-02-27 Published online: 2012-03-28

Abstract

AIM: To analyze vast amounts of hepatic carcinoma-related microarray data and identify crucial genes that control the development and progression of hepatocellular carcinoma (HCC).

METHODS: Cross-species comparison could be used to explore the similarities between HCC-

related gene expression profiles of human beings and other species. In order to screen genes that are involved in hepatocarcinogenesis, gene set enrichment analysis (GSEA) and meta-analysis were performed to study five gene expression data sets of independent species.

RESULTS: Among the five gene expression data sets, three up-regulated and two down-regulated pathways were found to be consistent by gene set enrichment analysis. The up-regulated pathways are amino sugar and nucleotide sugar metabolism, cell cycle, and thyroid cancer, while the down-regulated pathways are linoleic acid metabolism and arachidonic acid metabolism. A total of 1 708 genes with a $P < 0.05$ were found in meta-analysis for five datasets, of which 720 could be assigned to functional pathways by DAVID and KEGG. These pathways include cell cycle, oocyte meiosis, and DNA replication. Cell cycle is the overlapping significant pathway between the two methods. Twenty-five genes with a $P < 0.05$ were identified in meta-analysis of cell cycle pathway. Five significant genes may be involved in the occurrence and progression of HCC.

CONCLUSION: Cell cycle may be the crucial pathway to affect signal transduction in hepatocarcinogenesis.

Key Words: Hepatocellular carcinoma; Gene set enrichment analysis; Meta-analysis; Cross-species; Key gene

Cao J, Lu XX, Hu YL, Li Y, Zhu LQ, Yang C, Ou C, Tang YP. Applying gene set enrichment analysis and meta-analysis to screen key genes controlling the development and progression of hepatic carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2012; 20(9): 754-758

摘要

目的: 筛选影响肝癌发生发展的关键基因。

方法: 运用跨种属肿瘤基因筛选策略比较不同种属的肝癌基因表达谱间的相似改变, 选择5套不同种属的肝癌基因表达芯片分别通过基

■同行评议者

王德盛, 副主任医师, 中国人民解放军第四军医大学西京医院肝胆外科

因组富集(gene set enrichment analysis, GSEA)以及对单套数据集单个基因元分析(meta-analysis, Meta)的分析方法, 筛选出在转录水平上影响肝癌的基因。

结果: 用GSEA方法分析, 5组数据中所得通路对比, 上调中皆有的通路为氨基糖核苷酸糖代谢、细胞周期、甲状腺癌; 下调中皆有的通路为亚油酸代谢、花生四烯酸代谢。对单套数据集单个基因进行Meta分析, 共筛出 $P<0.05$ 的基因1 708个。用DAVID和KEGG网站的分析工具发现这1 708个差异基因中有720个基因能够在KEGG库中筛出, 主要分布在细胞周期、卵母细胞减数分裂、DNA复制等通路。这两种分析方法得出的通路中, 重叠性较高的主要为细胞周期通路。在细胞周期通路中差异性有统计学意义($P<0.05$)的基因25个, 文献报道其中5个基因与肝癌有密切联系。

结论: 可能影响肝癌发生发展的信号传导通路是细胞周期通路, 后续我们将对细胞周期通路里的显著性基因进行验证。

关键词: 肝癌; 基因富集; Meta分析; 跨种属; 关键基因

曹骥, 卢晓旭, 胡艳玲, 李媛, 朱伶群, 杨春, 欧超, 唐艳萍. 基因富集及Meta分析对影响肝癌发生发展关键基因的筛选. 世界华人消化杂志 2012; 20(9): 754-758

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/754.asp>

0 前言

肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)是我国常见的恶性肿瘤, 预后较差, 如何寻找治疗HCC的药物靶点是当前攻克肝癌的重要任务。在肿瘤发生发展过程中, 有大量伴随基因参与癌基因扩增过程, 但是他们并不是我们所要找的关键基因^[1]。因此, 如何将那些影响肿瘤发生发展的关键性分子改变从伴随性改变中识别出来, 是目前肿瘤研究领域的重要挑战之一。近年来随着人类和大鼠、小鼠等动物基因组测序工程的逐步完成, 人们开始意识到那些跨种属(cross-species)在不同物种共同表达的基因, 可能具有保守和更重要的功能。跨种属的肿瘤比较基因组学研究策略遂基于这一认识而产生^[2]。Mattison等^[3]运用跨种属策略比较基因组杂交, 研究共同表达于人、小鼠、大鼠肝癌组织中的基因, 以期找到新颖的候选基因。我们考虑通过探索人和其他动物的肝癌形成过程中共同拥有的基

因改变, 有可能筛选出影响肝癌发生发展的关键基因。基因芯片已广泛用于肝癌的研究, 对于全基因组mRNA表达芯片的分析, 我们也得到可预测肝细胞癌预后、复发等HCC转录物, 但是如何挖掘出特殊的基因标记来作为治疗疾病的靶点, 还是一个巨大的挑战。为了解决这个问题, Mootha等^[4]提出基因组富集(gene set enrichment analysis, GSEA)分析, 该方法能在病例对照类型数据中, 基于基因组系统水平上来挖掘影响疾病的基因通路。通过分析一组处于2种生物学状态的基因表达谱杂交数据, 了解他们在特定功能基因集中的表达状况以及这种表达状况是否存在某种统计学显著性。另外, 因为实验平台、样本、标化方法、分析方法等问题的存在, 不同实验室的芯片数据有很多的差异, 元分析(Meta-analysis)是一种可行的解决方法, 可对同一个问题所发表相关研究报告的结果进行收集、统计上的整合, 以期获得更准确或更多的结果^[5]。因此, 本次研究我们以GSEA和Meta分析的方法对标准化以后的5套HCC全基因组表达芯片数据进行分析, 为HCC发病机制的阐明提供重要的理论基础。

1 材料和方法

1.1 材料 本文通过广泛的文献和数据库搜索, 找出迄今国内外所有已报道的任何病因引起的、无论是人还是任何其他动物的肝癌相关基因表达谱。有关数据从GEO数据库(<http://www.ncbi.nlm.gov/geo/>)中下载。搜索关键词为hepatocellular carcinoma, 限制研究类型为expression profiling by array, 结果有230篇文章提供基因芯片数据。符合以下标准的数据集将纳入我们的研究中: (1)数据集必须是全基因组的表达mRNA芯片数据; (2)这些数据是关于HCC和正常组织对照; (3)本次均考虑经标准化或者原始数据集; (4)数据集必须包括超过3个样本以上。最后, 只有5套样本纳入我们的研究中(表1)。本次研究我们以GSEA和Meta分析的方法对标准化的5套HCC全基因组表达芯片数据进行分析, 将得到的差异显著基因与我们以前的树鼯肝癌模型的mRNA芯片结果进行比较, 筛选出那些在2种以上种属(包括人)的肝癌出现特异改变的基因。

1.2 方法 通过Bioconductor^[11]的2.10.1版本来对数据进行标准化处理。用软件包affy中的RMA算法^[12,13]对affymetrix平台的原始数据进行背景校正、标准化和log2转换。对每一套数据每个探

■研发前沿

基因芯片已广泛用于肝癌的研究, 对于全基因组mRNA表达芯片的分析, 可得到预测肝细胞癌预后、复发等的HCC转录物, 但是如何挖掘出特殊的基因标记来作为治疗疾病的靶点, 还是一个巨大的挑战。

■相关报道

Mattison等运用跨种属策略比较基因组杂交, 研究共同表达于人、小鼠、大鼠肝癌组织中的基因, 以期找到新颖的候选基因。

■创新盘点

本研究在跨种属策略指导下采用GSEA和Meta分析方法对标准化以后的5套HCC全基因组表达芯片数据进行分析,发现可能影响肝癌发生发展的信号传导通路是细胞周期通路。

表 1 5套全基因组数据集的基本情况

类别	作者	芯片平台	实验设计	探针数	来源	样本(n)	对照(n)
GSE19665	Deng等 ^[6]	u133Plus2.0	paired, tissues	54 000	homo sapiens	10	10
GSE9809	Liao等 ^[7]	mouse430_2	unpaired+paired, tissues	45 000	mus musculus	3	7
GSE9012	Khetchoumian等 ^[8]	mouse430_2	unpaired, tissues	45 000	mus musculus	5	5
GSE19004	Viatour等 ^[9]	mouse430_2	unpaired, tissues	45 000	mus musculus	5	4
GSE2127	Sheth等 ^[10]	mouse430a	paired, tissues	22 000	mus musculus	9	6

Paried: 对hcc组的对照来自hcc本体; unpaired: 对hcc组的对照来自其他正常群体。

表 2 对5套数据集Meta分析差显基因分布

基因	P值	基因	P值	基因	P值	基因	P值
ABI3BP	3.23E-06	UBE2C	3.18E-05	FOXMI	6.58E-05	rrm2	2.74E-05
CCNB1	5.37E-06	mcm2	4.07E-05	BIRC5	7.18E-05	Ttc36	3.06E-05
NEK2	7.66E-06	ASPM	4.29E-05	STMN1	7.74E-05	Hist1h2ad	5.71E-05
MKI67	1.35E-05	NCAPH	5.23E-05	racgap1	7.84E-05	TOP2A	5.91E-05
cdc20	2.46E-05	TUBA1B	5.23E-05	Hist1h2ag	7.94E-05	Hist1h2ai	7.94E-05
angptl6	2.47E-05	CCNB2	5.45E-05	Hist1h2ah	7.94E-05	CDCA5	9.89E-05

针的检验采用成组 t 检验。我们只选取在KEGG库^[14]中存在的基因进行GSEA分析。剔除变异四分位距 <0.5 的基因。如果一个基因对应几个探针,我们只保留变异IQR最高的探针。GSEA通过Bioconductor的category包进行。只有超过10个基因的类保留,通过 t 检验对每一个通路中的基因进行检验。通过1 000次循环的排列组合(permutation)获得每个显著通路的 P 值。将得到的5套数据各自上调下调的通路进行总和比较,发现细胞周期(cell cycle)这个通路在5套数据中都表现为上调。我们将每套数据里这条通路的所含基因进行Meta分析。运用SAS9.13软件,通过 t 检验把每套数据里Cell cycle通路里的每个探针算出 P 值,再通过公式^[15]

$$LS = \frac{\sum_{i=1}^N (-\log(P_i))}{N} \quad (\text{自由度为数据集K的2倍})$$

算出每个基因的卡方值,最后保留 $P<0.05$ 的基因。对这些基因通路的分析通过DAVID(<http://david.abcc.ncifcrf.gov>)中的KEGG库进行分析。

2 结果

2.1 GSEA分析 通过GSEA方法对5套数据集进行功能基因富集,分别找出影响这几个数据集的主要上调通路和下调通路。GSE19665富集出27条上调通路,71条下调通路。GSE9809数据集富集出上调通路56条,下调通路4条。GSE9012数据集富集出上调通路66条,下调通路34条。GSE19004

数据集富集出上调通路73条,下调通路51条。GSE2127数据集富集出上调通路69条,下调通路50条。其中数据集GSE19665和数据集GSE19004通路重叠性比较高。5组数据中所得通路对比,下调中皆有的通路为亚油酸代谢(linoleic acid metabolism),花生四烯酸代谢(arachidonic acid metabolism);上调中皆有的通路为氨基糖核苷酸糖代谢(amino sugar and nucleotide sugar metabolism),细胞周期(cell cycle),甲状腺癌(thyroid cancer)。

2.2 Meta分析 用一般的成组 t 检验对5套数据集单独分析,其中GSE19665数据集中共筛出阳性基因220个,其余数据集筛出阳性基因均为213个。对5套数据单独进行 t 检验得出每个基因的 P 值后,通过软件SAS13.0运用选择的Meta公式进行整合分析,共筛出1 708个基因的 $P<0.05$ 。 $P<10^{-4}$ 有24个基因,具体每个基因名称及 P 值(表2)。

这1 708个基因通过DAVID的KEGG库进行通路富集,其中有720个基因能够在KEGG库中筛出,主要分布在cell cycle、卵母细胞减数分裂(oocyte meiosis)、DNA复制(DNA replication)、缬氨酸(valine)、亮氨酸(leucine)和异亮氨酸(isoleucine degradation)降解孕激素介导的卵母细胞成熟(progesterone-mediated oocyte maturation)、致病性大肠埃希氏菌感染(pathogenic escherichia coli infection)、甘氨酸(glycine)、丝氨酸(serine)和苏氨酸(threonine metabolism)

表 3 对5套数据集Meta分析存在于细胞周期通路里的差异基因分布

基因	χ^2 值	P值	基因	χ^2 值	P值	基因	χ^2 值	P值
CCNB2	46.94	9.67E-07	MCM4	46.94	0.0030	CDC25A	29.98	0.0009
mcm2	36.51	6.89E-05	cdc20	36.51	0.0065	Mad2l1	29.43	0.0011
YWHAB	35.63	9.74E-05	smc3	35.63	0.0067	MCM7	28.57	0.0015
CCNA2	33.83	0.0002	pcnA	33.83	0.0079	CCNE1	28.21	0.0017
CDKN2C	32.60	0.0003	RAD21	32.60	0.0090	TGFB1	30.15	0.0127
Cdk1	32.24	0.0004	CDKN1A	32.24	0.0096	YWHAZ	29.98	0.0206
MCM6	32.07	0.0004	CCND1	32.07	0.0108	YWHAG	29.43	0.0208
cdkn2b	30.15	0.0008	SMAD3	30.15	0.0116	YWHAH	28.57	0.0252
CCNB1	30.15	0.0008						

的代谢, 错配修复(mismatch repair)、丙酸代谢(propanoate metabolism)、原发性胆汁酸的生物合成(primary bile acid biosynthesis)、脂肪酸代谢(fatty acid metabolism)、前列腺癌(prostate cancer)、黏着(focal adhesion)、嘧啶代谢(pyrimidine metabolism)、p53信号通路(p53 signaling pathway)、神经胶质瘤(glioma)、核苷酸切除修复(nucleotide excision repair)、赖氨酸降解(lysine degradation)、小细胞肺癌(small cell lung cancer)、剪接(spliceosome)、癌症通路(pathways in cancer)、TGF- β 信号通路(TGF- β signaling pathway)、Fc γ R-介导的细胞的吞噬功能(Fc γ R-mediated phagocytosis)、同源重组(homologous recombination)、色氨酸代谢(tryptophan metabolism)、慢性粒细胞白血病(chronic myeloid leukemia)、泛酸和辅酶A合成(pantothenate and CoA biosynthesis)、泛素介导的蛋白水解(ubiquitin mediated proteolysis)、柠檬酸循环(TCA cycle)、叶酸碳库(one carbon pool by folate)、神经营养因子信号通路(neurotrophin signaling pathway)、butanoate代谢(butanoate metabolism)、甲状腺癌(thyroid cancer)、黑色素瘤(melanoma)、肌动蛋白骨架的调节(regulation of actin cytoskeleton)、胰腺癌(pancreatic cancer)等通路中。

2.3 两种方法所得结果分析 用GSEA和Meta两种方法, 我们得到重叠性较高的通路: 细胞周期。通过R命令语言, 得到5组数据集里cell cycle通路各自所含基因探针号。将探针号传至<http://david.abcc.ncifcrf.gov/conversion.jsp>网站上进行官方名称转换, 得到5组数据里该通路所含的基因名称。GSE19665里在细胞周期通路所含差异基因99个, GSE9809含96个, GSE9012含90个, GSE19004含106个, GSE2127含113个。通过上步

Meta运行结果可得细胞周期通路里差异性有统计学意义($P < 0.05$)的基因25个, 他们的名称、卡方值及P值(表3)。

3 讨论

目前, 对基因芯片数据的分析是研究基因芯片的重要部分。单独对某次实验结果进行分析, 而且只是单个基因分析, 由于样本问题, 可能会漏掉很多有用的信息; 而且对基因芯片单套的 t 检验有一定的局限性, 受到样本量的限制, 导致不可信的变异估计, 可产生较高的假阳性, 忽略了不同样本中表达水平的差异^[16]。基因富集方法通过分析一组处于2种不同生物状态(如正常和癌变)的芯片数据, 推断出现的基因是否有共同的表达趋势, 以此可以找出与疾病关联的基因或者通路^[17]。

本文结合GSEA和Meta两种方法对这5套数据进行分析, 对2种结果进行重叠对比, 希望能找到影响HCC相关的基因和通路。GSEA方法通过分析2组以上的样本之间差异表达基因, 对样本进行聚类以获得明显基因表达差异的样本分类。用R语言来处理数据, 进行统计分析, 得到5组数据共同改变的通路。Meta方法对单套数据集进行 t 检验, 将结果就行Meta分析, 得到差异表达的基因, 放入DAVID网站得到这些基因可能所在的通路。最终将重叠性较高的细胞周期通路进行分析, 得出差异性显著的基因。

在我们筛选出的细胞周期通路25个差异基因中, CCNB2(cyclinB2)、CCNB1(cyclinB1)、CCND1(cyclin D1)、CDC25A、Cdk1等5个基因与肝癌发生发展有密切联系。其中CDK是细胞周期调控网络的核心蛋白, 其表达活性的改变直接影响到细胞周期的长短, 决定着细胞的进程, 与机体细胞的生长、分化、运动、凋亡以

■名词解释

基因组富集分析(Gene Set Enrichment Analysis, GSEA): 根据已有的对基因的定位、性质、功能、生物学意义等知识的基础上, 首先构建了一个分子标签数据库, 分析一组处于两个生物学状态的基因表达谱杂交数据, 他们在特定的功能基因集中的表达状况, 以及这种表达状况是否存在某种统计学显著性。

■同行评价

本文选题新颖, 具有很好的学术价值。

及肿瘤的发生、发展、转移关系密切^[18]. CDK在肝癌细胞增殖及凋亡的调控中起着重要的作用. cyclinB、cyclinD同属cyclin家族, 决定CDK何时何处将何种底物磷酸化. 研究表明^[19], cyclinD1在正常肝组织中正常表达, 而在肝细胞癌中过度表达, 与HCC的组织学分级相关, 提示参与了肝癌的演进发展, 在肝细胞癌发病机制中可能促进细胞分裂增殖, 形成肿瘤. 同家族中高表达的cyclinB1在肝细胞癌变过程中发挥重要作用. CDC25A为双重特异性磷酸酶, 能激活细胞周期素依赖性激酶(CDK), 推动细胞周期的进行. 目前国内未见CDC25A与肝癌关系的相关研究, 但是国外已有报道, 认为CDC25A在肝癌转移方面有重要作用^[20]. 后续我们将对这些差异显著基因进行验证.

4 参考文献

- Beroukhi R, Mermel CH, Porter D, Wei G, Raychaudhuri S, Donovan J, Barretina J, Boehm JS, Dobson J, Urashima M, Mc Henry KT, Pinchback RM, Ligon AH, Cho YJ, Haery L, Greulich H, Reich M, Winckler W, Lawrence MS, Weir BA, Tanaka KE, Chiang DY, Bass AJ, Loo A, Hoffman C, Prensner J, Liefeld T, Gao Q, Yecies D, Signoretti S, Maher E, Kaye FJ, Sasaki H, Tepper JE, Fletcher JA, Tabernero J, Baselga J, Tsao MS, Demichelis F, Rubin MA, Janne PA, Daly MJ, Nucera C, Levine RL, Ebert BL, Gabriel S, Rustgi AK, Antonescu CR, Ladanyi M, Letai A, Garraway LA, Loda M, Beer DG, True LD, Okamoto A, Pomeroy SL, Singer S, Golub TR, Lander ES, Getz G, Sellers WR, Meyerson M. The landscape of somatic copy-number alteration across human cancers. *Nature* 2010; 463: 899-905
- 史俊林, 李媛. 应用跨种属肿瘤基因筛选策略探寻肿瘤关键分子. *世界华人消化杂志* 2010; 18: 1255-1260
- Mattison J, Kool J, Uren AG, de Ridder J, Wessels L, Jonkers J, Bignell GR, Butler A, Rust AG, Brosch M, Wilson CH, van der Weyden L, Largaespada DA, Stratton MR, Futreal PA, van Lohuizen M, Berns A, Collier LS, Hubbard T, Adams DJ. Novel candidate cancer genes identified by a large-scale cross-species comparative oncogenomics approach. *Cancer Res* 2010; 70: 883-895
- Mootha VK, Lindgren CM, Eriksson KF, Subramanian A, Sihag S, Lehar J, Puigserver P, Carlsson E, Ridderstråle M, Laurila E, Houstis N, Daly MJ, Patterson N, Mesirov JP, Golub TR, Tamayo P, Spiegelman B, Lander ES, Hirschhorn JN, Altshuler D, Groop LC. PGC-1alpha-responsive genes involved in oxidative phosphorylation are coordinately downregulated in human diabetes. *Nat Genet* 2003; 34: 267-273
- Greenbaum D, Jansen R, Gerstein M. Analysis of mRNA expression and protein abundance data: an approach for the comparison of the enrichment of features in the cellular population of proteins and transcripts. *Bioinformatics* 2002; 18: 585-596
- Deng YB, Nagae G, Midorikawa Y, Yagi K, Tsutsumi S, Yamamoto S, Hasegawa K, Kokudo N, Aburatani H, Kaneda A. Identification of genes preferentially methylated in hepatitis C virus-related hepatocellular carcinoma. *Cancer Sci* 2010; 101: 1501-1510
- Liao YJ, Liu SP, Lee CM, Yen CH, Chuang PC, Chen CY, Tsai TF, Huang SF, Lee YH, Chen YM. Characterization of a glycine N-methyltransferase gene knockout mouse model for hepatocellular carcinoma: Implications of the gender disparity in liver cancer susceptibility. *Int J Cancer* 2009; 124: 816-826
- Khetchoumian K, Teletin M, Tisserand J, Mark M, Herquel B, Ignat M, Zucman-Rossi J, Cammas F, Lerouge T, Thibault C, Metzger D, Chambon P, Losson R. Loss of Trim24 (Tif1alpha) gene function confers oncogenic activity to retinoic acid receptor alpha. *Nat Genet* 2007; 39: 1500-1506
- Viatour P, Sage J. Mouse HCC model. Available from: URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE19004>
- Sheth SS, Bodnar JS, Ghazalpour A, Thippavong CK, Tsutsumi S, Tward AD, Demant P, Kodama T, Aburatani H, Lusis AJ. Hepatocellular carcinoma in Txnip-deficient mice. *Oncogene* 2006; 25: 3528-3536
- Gentleman RC, Carey VJ, Bates DM, Bolstad B, Dettling M, Dudoit S, Ellis B, Gautier L, Ge Y, Gentry J, Hornik K, Hothorn T, Huber W, Iacus S, Irizarry R, Leisch F, Li C, Maechler M, Rossini AJ, Sawitzki G, Smyth G, Tierney L, Yang JY, Zhang J. Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics. *Genome Biol* 2004; 5: R80. Epub 2004 Sep 15
- Irizarry RA, Hobbs B, Collin F, Beazer-Barclay YD, Antonellis KJ, Scherf U, Speed TP. Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data. *Biostatistics* 2003; 4: 249-264
- Gautier L, Cope L, Bolstad BM, Irizarry RA. Affy-analysis of Affymetrix GeneChip data at the probe level. *Bioinformatics* 2004; 20: 307-315
- Kanehisa M, Goto S. KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic Acids Res* 2000; 28: 27-30
- Daves MH, Hilsenbeck SG, Lau CC, Man TK. Meta-analysis of multiple microarray datasets reveals a common gene signature of metastasis in solid tumors. *BMC Med Genomics* 2011; 4: 56
- MacDonald JW, Ghosh D. COPA--cancer outlier profile analysis. *Bioinformatics* 2006; 22: 2950-2951
- Subramanian A, Kuehn H, Gould J, Tamayo P, Mesirov JP. GSEA-P: a desktop application for Gene Set Enrichment Analysis. *Bioinformatics* 2007; 23: 3251-3253
- Liu L, Schwartz B, Tsubota Y, Raines E, Kiyokawa H, Yonekawa K, Harlan JM, Schnapp LM. Cyclin-dependent kinase inhibitors block leukocyte adhesion and migration. *J Immunol* 2008; 180: 1808-1817
- Greenbaum LE. Cell cycle regulation and hepatocarcinogenesis. *Cancer Biol Ther* 2004; 3: 1200-1207
- Wang XQ, Zhu YQ, Lui KS, Cai Q, Lu P, Poon RT. Aberrant Polo-like kinase 1-Cdc25A pathway in metastatic hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res* 2008; 14: 6813-6820

编辑 张姗姗 电编 闫晋利

小鼠急性酒精性肝损伤模型的建立

齐慧慧, 宋佳, 陈岳祥

齐慧慧, 宋佳, 陈岳祥, 中国人民解放军第二军医大学附属长征医院消化内科 上海市 200003

齐慧慧, 在读硕士, 主要从事消化系统疾病的研究。

作者贡献分布: 齐慧慧与宋佳对此文所作贡献均等; 此课题由齐慧慧与陈岳祥设计; 研究过程由齐慧慧与宋佳操作完成; 研究所用新试剂及分析工具由陈岳祥提供; 数据分析由齐慧慧完成; 本论文写作由齐慧慧完成。

通讯作者: 陈岳祥, 教授, 主任医师, 200003, 上海市, 中国人民解放军第二军医大学附属长征医院消化内科。

chenyuex@sohu.com

电话: 021-81885343

收稿日期: 2011-11-27 修回日期: 2012-02-08

接受日期: 2012-02-27 在线出版日期: 2012-03-28

Development of a mouse model of alcohol-induced acute liver injury

Hui-Hui Qi, Jia Song, Yue-Xiang Chen

Hui-Hui Qi, Jia Song, Yue-Xiang Chen, Department of Gastroenterology, Changzheng Hospital, the Second Military Medical University of Chinese PLA, Shanghai 200003, China

Correspondence to: Yue-Xiang Chen, Professor, Department of Gastroenterology, Changzheng Hospital, the Second Military Medical University of Chinese PLA, Shanghai 200003, China. chenyuex@sohu.com

Received: 2011-11-27 Revised: 2012-02-08

Accepted: 2012-02-27 Published online: 2012-03-28

Abstract

AIM: To create a mouse model of alcohol-induced acute liver injury and to dynamically monitor the changes in histological structure, oxidative stress and inflammation in this model.

METHODS: Forty-eight ICR mice were randomly divided into two groups and were intragastrically given 50% ethanol (model group) or isocaloric/isovolumetric maltose-dextrin solution (control group). At 1.5, 3, 6 and 12 h after administration, all mice were sacrificed to take serum samples for biochemical measurements and liver samples for HE staining and Sultan III staining to grade the degree of fatty changes and inflammation.

RESULTS: The dose we used caused no mortality. Serum levels of ALT (U/L) and TG (mmol/L) gradually increased with time, reaching the

peak at 6 h and then slightly decreasing at 12 h. Hepatic GSH content reached the lowest level at 6 h. Hepatic SOD content decreased most significantly at 1.5 h (by about 24%), whereas hepatic MDA content increased most significantly at his time point (up to 2.2 times the normal group). Hepatic levels of IL-1 β and TNF- α gradually increased with time, reaching the peak at 12 h. At 12 h after administration, liver cell swelling, hydropic degeneration and other pathological changes were visible around the central vein and interlobular veins. With the prolongation of modeling time, the degree of liver steatosis was aggravated.

CONCLUSION: A mouse model of alcohol-induced acute liver injury has been successfully developed and can be used for studying the pathogenesis of acute liver injury. The method used for the development of this animal model is simple and has a short cycle and good stability.

Key Words: Alcohol; Alcohol-induced acute liver injury; Dynamic monitoring

Qi HH, Song J, Chen YX. Development of a mouse model of alcohol-induced acute liver injury. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2012; 20(9): 759-763

摘要

目的: 建立一次性暴饮小鼠急性酒精性肝损伤模型, 并动态研究肝脏病理形态学、氧化应激因子、炎症因子的变化。

方法: 将48只ICR小鼠随机分成2组, 空白对照组一次性给予等热量、等体积的糖水6 g/kg灌胃, 模型组一次性给予50%乙醇(6 g/kg)体质量灌胃, 分别于灌胃后1.5、3、6、12 h动态监测小鼠血清谷丙转氨酶(alanine aminotransferase, ALT)、甘油三酯(triglyceride, TG), 肝组织匀浆丙二醛(malondialdehyde, MDA)、还原型谷胱甘肽(reduced glutathione hormone (GSH)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD), 及肝组织白介素-1 β (interleukin 1 β , IL-1 β)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)表达; 肝组织HE染色、苏丹Ⅲ染色观察肝组

■背景资料

在欧美国家的嗜酒人群中, 酒精性肝病(alcoholic liver disease, ALD)的患病率高达84%, 其中20%-30%可进展为肝硬化。随着我国生活水平的提高、饮食结构的改变和酒精消费量的日益增长, ALD的发病率也呈现逐年升高的趋势。

■同行评议者

迟宝荣, 教授, 吉林大学第一医院消化内科

■研究前沿

目前除戒酒和支持性治疗外,尚无令人满意的治疗药物。而建立理想的动物模型是研究ALD发病机制和防治方法的前提;但目前国内外急性酒精性动物模型参差不齐,在一定程度上限制了实验研究。

织形态学、脂肪变性程度。

结果:成功复制了一次性暴饮50%乙醇(6 g/kg)的小鼠急性肝损伤模型,小鼠无死亡,出现翻正反射消失、嗜睡等醉酒状态。模型组小鼠血清ALT、TG水平随时间逐渐升高,6 h达峰值,12 h略下降;肝匀浆GSH含量6 h降至最低;造模后1.5 h肝脏SOD含量下降最为显著,下降约24%;1.5 h肝脏MDA含量上升最为显著,上升至正常组的2.2倍;肝脏IL-1 β 、TNF- α 水平升高,12 h达峰值;HE染色结果示,造模后12 h可见中央静脉及小叶间经脉周围出现肝细胞肿胀、水样变性等病理改变;苏丹Ⅲ染色结果显示随着造模时间延长肝脂肪变性程度加重。

结论:此模型造模周期短、易复制、稳定性好,是研究急性酒精性肝损伤发病机制和筛选药物的理想模型。

关键词:酒精;急性酒精性肝损伤;动态监测

齐慧慧, 宋佳, 陈岳祥. 小鼠急性酒精性肝损伤模型的建立. 世界华人消化杂志 2012; 20(9): 759-763
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/759.asp>

0 引言

酒精性肝病(alcoholic liver disease, ALD)是欧美国家常见的肝脏疾病。随着我国生活水平的提高、饮食结构的改变和酒精消费量的日益增长,ALD的发病率也呈现逐年升高的趋势。ALD也日益引起了人们的重视。而建立理想的动物模型是研究酒精性肝损伤发病机制和防治方法的前提;但目前国内外急性酒精性动物模型参差不齐,在一定程度上限制了实验研究。一次性暴饮建立的急性酒精性肝损伤模型目前比较成熟,由于造模周期短,易复制,且与人类豪饮造成的肝损害一致,是研究急性酒精性肝损伤发病机制和筛选药物的理想模型;但目前尚缺少对造模过程中动物血清学及病理学改变的动态观察数据。本文旨在通过一次性暴饮建立急性酒精性肝损伤模型,并动态监测小鼠血清生化指标、氧化应激指标及肝组织病理的变化。

1 材料和方法

1.1 材料 48只SPF级♂ICR小鼠,体质量20 g \pm 2 g,购自上海斯莱克实验动物有限公司;实验动物饲养于中国人民解放军第二军医大学清洁级动物房,12 h光照和黑夜循环,温度22 $^{\circ}$ C \pm 2 $^{\circ}$ C,湿

度50%-60%,标准饲料,自由饮水;56 $^{\circ}$ C白酒购自北京红星酒业有限公司;ALT、TG检测试剂盒购于南京建成公司;SOD、MDA、GSH试剂盒购自南京建成公司;小鼠IL-1 β 、TNF- α 酶联免疫吸附测定试剂盒购自eBioscience公司;油红O及HE染色相关试剂购自美国Sigma公司。

1.2 方法

1.2.1 分组及处置:ICR小鼠适应性饲喂1 wk后随机分成2组:模型组和空白对照组。模型组给予50%乙醇(6 g/kg)灌胃,空白组给予等热量、等体积的糖水6 g/kg体质量灌胃,灌胃后2组均禁食。于灌胃后1.5、3、6、12 h分别将每组6只小鼠称重后麻醉、摘眼球取血;肝脏称重后部分液氮冻存,部分4%多聚甲醛固定,进行生化、病理形态学等测定。

1.2.2 血清ALT、TG含量:取血后静置30 min,离心3 000 r/min \times 10 min,常规分离血清,按试剂盒说明测定血清ALT、TG含量。

1.2.3 肝脏氧化应激因子、炎症因子:将冻存组织取出后匀浆,用TBA法检测肝组织匀浆中MDA和GSH的含量,用黄嘌呤氧化酶法检测肝组织匀浆中SOD含量,按试剂盒说明测定肝脏IL-1 β 、TNF- α 含量。

1.2.4 肝组织病理形态学:小鼠肝组织冰冻切片行苏丹Ⅲ染色;肝组织石蜡切片行常规HE染色。苏丹Ⅲ及HE切片使用Olympus摄像系统进行观察和摄片。

统计学处理 统计软件采用SPSS18.0统计软件包分析,统计结果用mean \pm SD表示。2组间比较先采用方差分析F检验进行方差齐性检验,方差齐的采用非配对t检验,不齐的采用非参方差分析。 $P<0.05$ 有统计学意义。

2 结果

2.1 一般情况 各组小鼠均无死亡,模型组小鼠出现翻正反射消失、嗜睡等醉酒状态,灌酒后6 h后小鼠逐渐苏醒。

2.2 血清ALT、TG 与空白组相比,模型组小鼠血清ALT、TG水平随着时间的推移逐渐上升,均于6 h达峰值,12 h略下降(表1);与空白对照组相比,模型组血清ALT、TG在1.5、3、6、12 h,两组间差异均有统计学意义($P<0.01$)。

2.3 肝脏IL-1 β 、TNF- α 含量 与空白组相比,模型组肝匀浆IL-1 β 、TNF- α 含量均上升(表2)。肝匀浆IL-1 β 含量灌酒后即上升,于造模12 h时达峰值。模型组肝脏TNF- α 水平随着时间的推移逐渐

表 1 两组不同时间点血清ALT、TG比较 ($n = 6$, U/L, mean \pm SD)

造模时间	空白组		模型组	
	ALT	TG	ALT	TG
1.5 h	6.16 \pm 0.75	1.57 \pm 0.20	10.00 \pm 0.89 ^b	2.58 \pm 0.05 ^b
3 h	7.00 \pm 0.89	1.55 \pm 0.12	12.16 \pm 1.17 ^b	3.67 \pm 0.16 ^b
6 h	6.25 \pm 1.26	1.26 \pm 0.24	20.00 \pm 1.14 ^b	5.62 \pm 0.22 ^b
12 h	6.55 \pm 1.02	0.97 \pm 0.15	15.50 \pm 1.04 ^b	4.25 \pm 0.33 ^b

^b $P < 0.01$ vs 空白组.表 2 两组不同时间点肝脏IL-1 β 、TNF- α 比较 ($n = 6$, pg/mg protein, mean \pm SD)

造模时间	空白组		模型组	
	IL-1 β	TNF- α	IL-1 β	TNF- α
1.5 h	5.85 \pm 0.19	70.10 \pm 5.25	7.22 \pm 0.57 ^b	85.82 \pm 5.70 ^a
3 h	5.76 \pm 0.43	74.62 \pm 5.50	6.33 \pm 0.46 ^a	86.02 \pm 6.03 ^a
6 h	5.92 \pm 0.34	68.82 \pm 4.54	6.19 \pm 0.42	92.53 \pm 2.17 ^b
12 h	5.63 \pm 0.25	72.32 \pm 4.80	10.43 \pm 0.59 ^b	130.33 \pm 3.65 ^b

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs 空白组.表 3 两组不同时间点GSH比较 ($n = 6$, nmol/mg protein, mean \pm SD)

造模时间	空白组GSH	模型组GSH
1.5 h	1.79 \pm 0.11	1.53 \pm 0.14
3 h	1.89 \pm 0.22	1.25 \pm 0.09 ^b
6 h	1.72 \pm 0.21	0.76 \pm 0.09 ^b
12 h	1.68 \pm 0.16	1.12 \pm 0.12 ^a

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs 空白组.

上升, 于12 h达峰值. 其中12 h两组肝脏IL-1 β 、TNF- α 含量比较均有显著统计学意义($P < 0.01$).

2.4 肝脏GSH含量 模型组小鼠于灌酒后肝脏GSH含量下降, 于6 h降至最低, 12 h时略上升(表3). 6 h两组肝脏GSH含量有显著统计学意义($P < 0.01$).

2.5 肝脏SOD、MDA含量 与空白对照组相比, 1.5 h肝脏SOD含量下降最为显著, 下降约24%(237.56 \pm 4.12 vs 181.69 \pm 13.01); 1.5 h肝脏MDA含量上升最为显著, 上升至正常组的2.2倍(2.63 \pm 0.32 vs 5.76 \pm 0.21). 1.5 h两组肝脏SOD含量有显著统计学意义($P < 0.01$).

2.6 肝组织病理形态学检测 HE染色结果显示: 空白组小鼠各检测点肝组织形态结构均正常; 模型组小鼠1.5、3、6 h HE染色切片未见明显变化, 12 h可见中央静脉及小叶间经脉周围出现肝细胞肿胀、水样变性等病理改变(图1).

应用要点

本研究紧密联系临床, 通过一次性豪饮建立小鼠急性酒精性肝损伤模型, 并探讨急性酒精性肝损伤的表现及发病机制, 为动物实验研究和药物开发提供良好的实验平台.

苏丹III染色结果显示, 空白组小鼠各检测点肝组织未见红色脂滴; 模型组小鼠, 随着造模时间的延长, 肝组织红色脂滴数逐渐增多, 12 h见大量红色脂滴, 表现为脂滴弥漫浸润入肝细胞中, 肝小叶内含脂滴细胞数/总细胞数约为25%-35%(图2).

3 讨论

在西方国家, ALD及其并发症是导致死亡的重要病因之一^[1]. 在欧美国家的嗜酒人群中, ALD的患病率高达84%, 其中20%-30%可进展为肝硬化^[2]. ALD早期损伤多为可逆的, 如能及时有针对性地治疗可防止疾病向肝硬化、肝癌等不可逆病变发展^[3]. 目前除戒酒和支持性治疗外, 尚无令人满意的治疗药物. 因此需要通过大量的动物实验开展深入的研究, 而理想的动物模型则是实验的前提. 目前国内外关于急性酒精性肝损伤模型的造模方法主要有酒精灌胃和腹腔注射, 但腹腔注射死亡率高, 且不符合人类饮酒习惯. 而酒精灌胃法造模周期短、易复制、稳定性好, 无死亡, 且符合人类豪饮所致肝损伤的特点, 对研究酒精性肝损伤发病机制和筛选药物起关键作用, 但目前尚缺少急性酒精性肝损伤模型的动态监测数据.

ALD的发生、发展涉及遗传、营养和环境因素等多因素, 其早期发病机制与氧化应激、

■同行评价

本文结构较清晰, 结果、结论明确, 且文章的科学性、创新性和可读性能较好地反映我国该领域研究的先进水平.

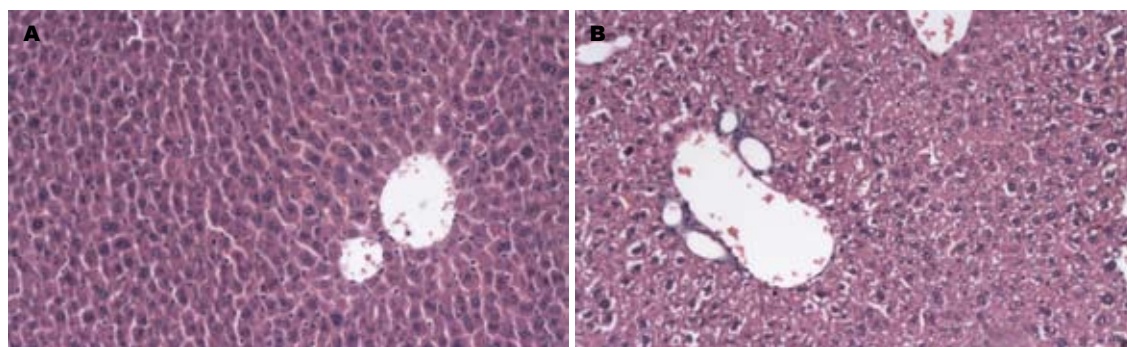


图 1 两组小鼠造模后12 h肝脏HE染色($\times 100$). A: 空白组; B: 模型组12 h.

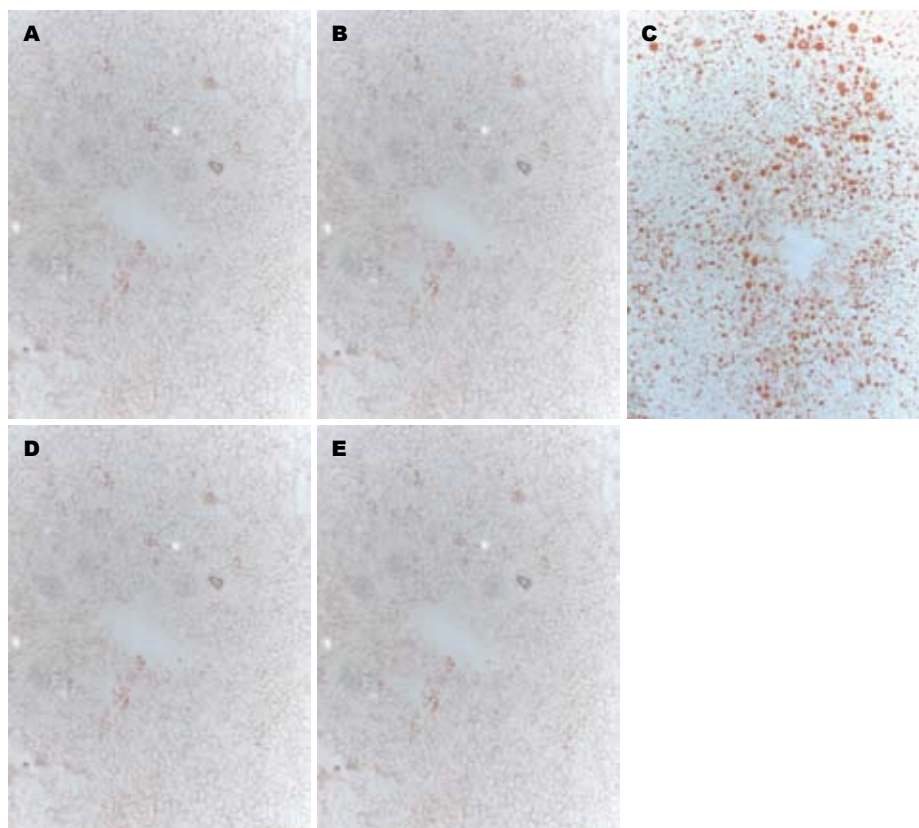


图 2 两组小鼠肝脏苏丹Ⅲ染色($\times 100$). A: 空白组; B-E: 模型组1.5、3、6、12 h.

内毒素介导的细胞因子释放、线粒体损伤、肝细胞凋亡等密切相关. 而氧化应激始终被认为是酒精性肝病的一个重要的致病因素. 乙醇进入体内后主要经肝细胞中的乙醇脱氢酶(alcohol dehydrogenase, ADH)代谢为乙醛, 再经乙醛脱氢酶(aldehyde dehydrogenase, ALDH)代谢为乙酸. 乙醇代谢过程中产生大量的还原型辅酶 I (dihydropyridine-adenine dinucleotide, NADH), 引起NADH/NAD⁺比例升高, 增加了呼吸链中传递的电子流, 导致活性氧(reactive oxygen species, ROS)过度产生, 引起脂质、蛋白质和脱氧核糖核酸(deoxyribonucleic acid, DNA)的降解^[4-7]. 除生成过量的ROS, 酒精还对多种抗氧化酶和非

抗氧化物造成损伤, 导致氧化应激, 促进ALD的发生、发展^[8]. 同时, 酒精可激活细胞色素P450, 尤其细胞色素酶P4502E1(CYP2E1), 使反应性氧中间产物和脂质过氧化终产物形成增多, 从而介导自由基脂质过氧化引起肝脏损伤. 急性期会发生肝细胞水肿, 肝脏体积和重量增大, 肝脏系数增大. 肝脏中蓄积的大量TG以极低密度脂蛋白(very low density lipoprotein, VLDL)的形式运出肝脏, 进入血液, 使血中TG含量也相应增加. 同时, 短时间内大剂量摄入酒精导致脂肪酸氧化障碍, TG以微泡形式在肝细胞中沉积, 苏木素特异性组织脂肪化学染色后, 镜下可见肝细胞呈泡沫状, 肝细胞内脂滴明显增加, 大小不等.

这种小泡状脂变在临床上往往标志着较严重的预后, 可导致肝功能衰竭或死亡. 同时, 乙醇能使肠道通透性增加, 机体内毒素如脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)的水平上升, 从而导致内毒素血症. 氧化应激和内毒素血症可激活核因子 κ B(nuclear factor NF-kappa-B, NF- κ B), NF- κ B的激活再进一步调控多种细胞因子, 如TNF- α , IL-1, IL-6等的释放, 引起肝细胞进一步坏死、凋亡、炎症加重^[9-15].

本实验成功复制了一次性暴饮50%乙醇(6 g/kg)的小鼠急性肝损伤模型. 实验结果显示: (1)模型组小鼠血清ALT、TG水平随着时间的推移逐渐上升, 均于6 h达峰值, 12 h略下降. 有研究发现一次大剂量酒精冲击后ALT、碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, AKP)会逐渐降至正常, 说明小鼠肝脏具有很强的自主修复和代偿能力. 而苏丹III染色结果显示模型组小鼠肝脏见大量红色脂滴, 可见肝细胞脂肪变性程度与血中TG含量变化基本一致; (2)模型组小鼠肝脏炎症因子在造模后逐渐升高, 可能与损伤早期氧化应激和内毒素血症激活NF- κ B, NF- κ B的激活再进一步调控多种细胞因子有关, 如TNF- α , IL-1, IL-6等的释放, 引起肝细胞进一步坏死、凋亡、炎症加重^[16]. 但由于监测时间短, 肝脏HE染色未见明显炎症细胞浸润; (3)在灌酒后小鼠氧化应激因子迅速发生了改变, 氧化应激在酒精性肝损伤早期重发挥着重要作用. 氧化应激指机体在遭受各种有害刺激时, 体内活性高分子如ROS和活性氮自由基产生过多, 氧化系统和抗氧化系统失衡, 通过不同途径引起细胞凋亡或坏死、导致组织损伤^[17]. 而肝细胞含有大量的SOD和过氧化氢酶, 因此当ROS过量产生和或抗氧化机能低下时, 就易发生肝细胞膜脂质过氧化、细胞器功能异常、炎症反应, 甚至核氧化. 而肝库普弗细胞(Kupffer cell)、肝窦内皮细胞、肝星状细胞及Pit细胞(NK细胞)同样对肝细胞的氧化应激有影响. 如Kupffer细胞在氧化应激时可被活化, 释放TNF- α 等炎症介质^[18,19]. 因此损伤早期抗氧化应激具有积极的作用.

总之, 本研究系统监测了小鼠急性酒精性肝损伤肝脏病理及血清学的变化, 为更加深入研究发病机制和临床防治提供理想稳定的动物模型.

4 参考文献

- 1 Tome S, Lucey MR. Review article: current management of alcoholic liver disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2004; 19: 707-714
- 2 Tilg H, Day CP. Management strategies in alcoholic liver disease. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol* 2007; 4: 24-34
- 3 Leung TM, Lu Y, Yan W, Morón-Concepción JA, Ward SC, Ge X, de la Rosa LC, Nieto N. Argininosuccinate synthase conditions the response to acute and chronic ethanol-induced liver injury in mice. *Hepatology* 2011 Dec 24. [Epub ahead of print]
- 4 Day CP. Treatment of alcoholic liver disease. *Liver Transpl* 2007; 13: S69-S75
- 5 Wilfred de Alwis NM, Day CP. Genetics of alcoholic liver disease and nonalcoholic fatty liver disease. *Semin Liver Dis* 2007; 27: 44-54
- 6 Lieber CS, Abittan CS. Pharmacology and metabolism of alcohol, including its metabolic effects and interactions with other drugs. *Clin Dermatol* 1999; 17: 365-379
- 7 Wu D, Cederbaum AI. Alcohol, oxidative stress, and free radical damage. *Alcohol Res Health* 2003; 27: 277-284
- 8 Dey A, Cederbaum AI. Alcohol and oxidative liver injury. *Hepatology* 2006; 43: S63-S74
- 9 Aram G, Potter JJ, Liu X, Wang L, Torbenson MS, Mezey E. Deficiency of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, reduced form oxidase enhances hepatocellular injury but attenuates fibrosis after chronic carbon tetrachloride administration. *Hepatology* 2009; 49: 911-919
- 10 Sakurai T, He G, Matsuzawa A, Yu GY, Maeda S, Hardiman G, Karin M. Hepatocyte necrosis induced by oxidative stress and IL-1 alpha release mediate carcinogen-induced compensatory proliferation and liver tumorigenesis. *Cancer Cell* 2008; 14: 156-165
- 11 Pessayre D, Berson A, Fromenty B, Mansouri A. Mitochondria in steatohepatitis. *Semin Liver Dis* 2001; 21: 57-69
- 12 Kong L, Ren W, Li W, Zhao S, Mi H, Wang R, Zhang Y, Wu W, Nan Y, Yu J. Activation of peroxisome proliferator activated receptor alpha ameliorates ethanol induced steatohepatitis in mice. *Lipids Health Dis* 2011; 10: 246
- 13 Bechmann LP, Hannivoort RA, Gerken G, Hotamisligil GS, Trauner M, Canbay A. The interaction of hepatic lipid and glucose metabolism in liver diseases. *J Hepatol* 2011 Dec 13. [Epub ahead of print]
- 14 Ji C. Mechanisms of alcohol-induced endoplasmic reticulum stress and organ injuries. *Biochem Res Int* 2012; 2012: 216450. Epub 2011 Oct 26
- 15 Li D, Zhao H, Gelemtier J. Strong protective effect of the aldehyde dehydrogenase gene (ALDH2) 504lys (*2) allele against alcoholism and alcohol-induced medical diseases in Asians. *Hum Genet* 2011 Nov 20. [Epub ahead of print]
- 16 Veerman EC, Nazmi K, Van't Hof W, Bolscher JG, Den Hertog AL, Nieuw Amerongen AV. Reactive oxygen species play no role in the candidacidal activity of the salivary antimicrobial peptide histatin 5. *Biochem J* 2004; 381: 447-452
- 17 Betteridge DJ. What is oxidative stress? *Metabolism* 2000; 49: 3-8
- 18 Jaeschke H. Reactive oxygen and mechanisms of inflammatory liver injury. *J Gastroenterol Hepatol* 2000; 15: 718-724
- 19 Song Z, Deaciuc I, Song M, Lee DY, Liu Y, Ji X, McClain C. Silymarin protects against acute ethanol-induced hepatotoxicity in mice. *Alcohol Clin Exp Res* 2006; 30: 407-413

XPD对SMMC-7721肝癌细胞中DNp73和GADD45 β 的调控及意义

王芬芬, 张吉翔

■背景资料

哺乳动物基本转录因子II H(TF II H)复合物的第2大亚基XPD, 在TF II H介导的核苷酸剪切修复(NER)和转录调控过程中发挥重要作用。对XPD基因抑制肝癌细胞生长的分子机制的研究将为诊断和治疗肝癌提供一条新的靶向途径。

王芬芬, 张吉翔, 南昌大学第二附属医院 江西省分子医学重点实验室 江西省南昌市 330006

王芬芬, 在读硕士, 主要从事肝癌基因诊断和治疗的研究。

国家自然科学基金资助项目, No. 30360037

作者贡献分布: 王芬芬与张吉翔对此文所作贡献均等; 此课题由张吉翔与王芬芬设计; 研究过程由张吉翔与王芬芬共同操作完成; 研究所用新试剂及分析工具由张吉翔提供; 数据分析由张吉翔与王芬芬完成; 本论文写作由王芬芬完成。

通讯作者: 张吉翔, 教授, 博士生导师, 330006, 江西省南昌市, 南昌大学第二附属医院消化科, jixiangz@tom.com

电话: 0791-86292706

收稿日期: 2011-11-16 修回日期: 2012-01-21

接受日期: 2012-02-27 在线出版日期: 2012-03-28

Overexpression of XPD decreases DNp73 expression and increases GADD45 β expression in SMMC-7721 hepatoma cells

Fen-Fen Wang, Ji-Xiang Zhang

Fen-Fen Wang, Ji-Xiang Zhang, Department of Gastroenterology, the Second Affiliated Hospital of Medical College of Nanchang University, Nanchang 330006, Jiangxi Province, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30360037

Correspondence to: Ji-Xiang Zhang, Professor, Department of Gastroenterology, the Second Affiliated Hospital of Medical College of Nanchang University, Nanchang 330006, Jiangxi Province, China. jixiangz@tom.com

Received: 2011-11-16 Revised: 2012-01-21

Accepted: 2012-02-27 Published online: 2012-03-28

Abstract

AIM: To evaluate the impact of transfection with the XPD gene on the expression of DNp73 and GADD45 β and cell proliferation and apoptosis in human hepatoma cell line SMMC-7721.

METHODS: After SMMC-7721 cells were transfected with SMMC-7721-pEGFP-N2-XPD, the mRNA and protein expression of DNp73 and GADD45 β was detected by RT-PCR and Western blot, respectively; cell proliferation was assessed by MTT assay; and the changes in cell apoptosis were evaluated by flow cytometry.

RESULTS: Compared to control cells, the expres-

sion of DNp73 mRNA decreased significantly and that of XPD and GADD45 β mRNAs was enhanced obviously in cells transfected with XPD (all $P < 0.01$). Similar results were obtained for the expression of XPD, DNp73 and GADD45 β proteins. The proliferation of SMMC-7721 cells was markedly inhibited and the apoptosis of SMMC-7721 cells was increased after transfection with XPD (both $P < 0.01$).

CONCLUSION: The wild-type XPD plays an important inhibitory role in the carcinogenesis of HCC. Overexpression of XPD decreases the expression of DNp73 and increases the expression of GADD45 β , which suggests that both DNp73 and GADD45 β may play a key role in the inhibitory effect of XPD on the carcinogenesis of HCC.

Key Words: Hepatoma; XPD gene; DNp73 gene; GADD45 β gene; Transfection

Wang FF, Zhang JX. Overexpression of XPD decreases DNp73 expression and increases GADD45 β expression in SMMC-7721 hepatoma cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2012; 20(9): 764-770

摘要

目的: 观察人剪切修复基因人类着色性干皮病D组基因(xeroderma pigmentosum group D, XPD)转染至人肝癌细胞株SMMC-7721细胞后XPD、DNp73和GADD45 β 基因的表达变化以及对肝癌细胞生长的影响。

方法: 实验分4组: 重组质粒SMMC-7721-pEGFP-N2-XPD(XPD组)、空载质粒SMMC-7721-pEGFP-N2组(N2组)、脂质体组和SMMC-7721细胞空白对照组。应用Lipofectamine2000脂质体瞬时转染, 逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)和蛋白印迹(Western blot)法检测转XPD基因后, 人肝癌细胞株SMMC-7721细胞中DNp73以及GADD45 β 的mRNA和蛋白质的表达量变化, 并用四甲基偶氮唑盐(MTT)法检测细胞增殖的活力, 流式细

■同行评议者

党双锁, 教授, 西安交通大学医学院第二附属医院感染科

胞仪检测细胞凋亡的变化。

结果: 荧光显微镜下, XPD组和N2组细胞中观察到绿色荧光蛋白表达, 说明转染成功; RT-PCR检测显示: XPD组中DNp73 mRNA相对表达量较其他3组显著下调, XPD和GADD45 β mRNA相对表达量较其他3组明显上调(均 $P<0.01$); Western blot检测显示: XPD、DNp73以及GADD45 β 蛋白相对表达量在各组间的差异与其mRNA各组间差异一致; MTT检测示: SMMC-7721细胞空白对照组、脂质体组、N2组、XPD组的吸光度(A)值分别为 0.633 ± 0.012 , 0.623 ± 0.009 , 0.628 ± 0.016 , 0.384 ± 0.011 , XPD组低于其他3组, 差异均有统计学意义(均 $P<0.01$), 表明转染XPD后SMMC-7721细胞的增殖能力减弱。流式细胞仪检测SMMC-7721肝癌细胞凋亡: 转染XPD的SMMC-7721细胞凋亡显著, 凋亡率达56.53%, 而其他3组均未见明显凋亡。

结论: XPD基因在肝癌的发生发展中起抑制作用, 癌基因DNp73的表达随XPD表达增加而降低, 抑癌基因GADD45 β 则随XPD表达增加而增加, 提示两者可能在XPD抑制肝癌细胞的生长机制中起重要作用。

关键词: 肝癌; XPD基因; DNp73基因; GADD45 β 基因; 转染

王芬芬, 张吉翔. XPD对SMMC-7721肝癌细胞中DNp73和GADD45 β 的调控及意义. 世界华人消化杂志 2012; 20(9): 764-770

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/764.asp>

0 引言

原发性肝癌是伴有癌基因活化和抑癌基因失活的细胞无性繁殖, 其发生机制与DNA修复能力障碍有着密不可分的联系。核苷酸切除修复(nucleotide excision repair, NER)机制是细胞修复损伤DNA的重要途径, 主要修复紫外线诱导和化学物质引起的大片段DNA损伤。哺乳动物基本转录因子IIH(TFIIH)复合物的第2亚基XPD, 在TFIIH介导的核苷酸剪切修复(NER)和转录调控过程中发挥重要作用, 参与了细胞增殖和凋亡过程的调控^[1]; 本实验室以往研究结果显示着色性干皮病D组基因(xeroderma pigmentosum group D, XPD)基因通过上调抑癌基因(如 $p53$, $p21$)和下调癌基因(如 $c-Myc$, CDC25A)的表达, 从而抑制肝癌细胞的生长^[2]。 $p73$ 在肿瘤发生发展机制中的角色扑朔迷离, 相关研究表明:

DNp73是 $p73$ 亚型之一, 在肿瘤组织(如: 肝癌、结肠癌、肺癌、食管癌)中表达异常增高, 在正常组织中不表达。Zaika等^[3]将DNp73基因导入正常小鼠体内, 构建高表达DNp73小鼠模型, 证明DNp73通过2条途径促进正常肝细胞向癌细胞分化, 第一: 抑制 $p53$ 和TAp73的促细胞凋亡作用; 第二: 促进抑癌蛋白Rb蛋白磷酸化, Rb蛋白被磷酸化而与E-2F(转录激活蛋白)解离, 结合状态的E-2F变成游离状态, 细胞立即进入增殖活跃阶段, 导致肿瘤发生。其中, DNp73抑制 $p53$ 及其下游基因的表达为主要途径, 这一发现让笔者联想到DNp73与 $p53$ 在影响正常组织或细胞向恶性转化过程中的竞争关系, 而XPD促进 $p53$ 的表达在本实验室以往研究中已经得到证实, 故猜测XPD利用DNp73与 $p53$ 之间的竞争关系影响DNp73的表达。

GADD45 β 作为P53、BRCA1调控的下游基因, 是一个损伤修复因子, 参与监测细胞周期和诱导凋亡。杨娟等^[4]研究发现在肝癌组织中GADD45 β 阳性表达较正常肝脏组织及肝硬化组织显著降低, 证实GADD45 β 作为抑癌基因在肝癌的发生发展中起到相当重要的作用, 故进一步研究肝癌细胞中GADD45 β 表达下调的分子机制有望为肝癌提供一种潜在的靶向分子治疗途径; 本文推测同为抑癌基因的XPD可能通过影响 $p53$ 的分子水平, 从而与GADD45 β 的表达存在某种联系。因此, 本研究用pEGFP-N2-XPD重组质粒瞬时转染人肝癌细胞SMMC-7721, 检测转染前后细胞内DNp73和GADD45 β 的表达情况, 探讨他们三者之间的相互作用以及对SMMC-7721细胞生长的影响。该研究是本实验室对XPD抑制SMMC-7721肝癌细胞生长研究的延伸, 可望为诊断和治疗肝癌提供一条新的靶向途径。

1 材料和方法

1.1 材料 人肝癌细胞株SMMC-7721细胞购自中国典型培养物保藏中心(China Center for Type Culture Collection, CCTCC), 重组质粒SMMC-7721-pEGFP-N2-XPD(XPD质粒)及空载质粒pEGFP-N2(N2质粒)由本实验室构建^[2], 改良型PRMI-1640培养基(澳大利亚Hy-clone公司), 胎牛血清(美国GIBCO公司), Lipofectamine 2000TM、TRIzol(美国Invitrogen公司), 逆转录试剂盒(加拿大Fermentas公司), 2 \times Taq PCR Master Mix、Markr I (北京全式金生物技术有限公司),

■ 研发前沿

原发性肝癌除手术、局部治疗及放、化疗等治疗手段, 基因治疗和肿瘤疫苗技术近年来也在研究之中。目前尚无绝对有效且统一的治疗标准, 所以, 进一步提高肝癌的基因诊断和发现肝癌基因治疗的靶向途径是目前亟待研究的热点。

■相关报道

Zaika等发现DNp73通过抑制p53和TAp73的促细胞凋亡作用,从而促进正常肝脏细胞向癌细胞分化;杨娟等研究发现在肝癌组织中GADD45 β 阳性表达较正常肝脏组织及肝硬化组织显著降低。

总蛋白提取试剂盒(北京普利莱基因技术有限公司), XPD兔抗人单克隆抗体(美国Abcam公司), DNp73鼠抗人单克隆抗体、GADD45 β 兔抗人单克隆抗体(美国Santa Cruz公司), 鼠抗 β -actin、山羊抗小鼠IgG、山羊抗兔IgG(北京中杉金桥生物技术有限公司), 四甲基偶氮唑盐(MTT, 上海普飞生物技术有限公司), Annexin V-FITC细胞凋亡检测试剂盒(联科生物技术有限公司), PCR引物(上海捷瑞公司): 从NCBI中获得人XPD、DNp73和GADD45 β mRNA序列, 应用Primer Premier5.0软件设计引物。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养及转染: SMMC-7721肝癌细胞在含100 mL/L胎牛血清的改良型PRMI-1640培养基中, 于37℃、95%空气湿度和50 mL/L CO₂孵箱中培养, 0.25%胰蛋白酶消化, 2-4 d传代1次。根据实验需要及处理情况不同将细胞分为4组: (1)SMMC-7721细胞空白对照组; (2)脂质体组; (3)空载质粒SMMC-7721-pEGFP-N2组(N2组); (4)重组质粒SMMC-7721-pEGFP-N2-XPD(XPD组)。以 2×10^5 /孔的密度铺于6孔板内, 待细胞达60%-80%融合时用Lipofectamine2000进行瞬时转染, 转染后4-6 h, 换有血清的PRMI-1640培养基继续培养至48 h, 收集细胞进行RT-PCR或Western blot检测。

1.2.2 RT-PCR: (1)抽提总RNA: TRIzol法分别提取各组细胞总RNA, 合成cDNA; (2)内参基因 β -actin上游引物: GGGCACGAAGGCTCATCATT, 下游引物: AGCGAGCATCCCCAAAGTT; 扩增片段长度285 bp。目的基因XPD上游引物: TCTGCCTCTGCCCTATGAT, 下游引物: CGATTCCCTCGGACACTTT; 扩增片段长度363 bp。目的基因DNp73上游引物: CGAAAATGCCAACAACGG, 下游引物: GGAG-CAGACTGTCCTTCGTTG; 扩增片段长度676 bp。目的基因GADD45 β 上游引物: ACAGTGGGGGTGTACGAGTC, 下游引物: GACCAGGAGACAATGCAGGT; 扩增片段长度258 bp; (3)cDNA合成及PCR扩增: 按RT-PCR试剂盒要求步骤进行反转录聚合酶链反应。先合成cDNA, 再进行PCR, 同一标本扩增 β -actin作为内对照。取10 μ L扩增产物经1.5 g/L琼脂糖凝胶电泳(含5 mg/L溴化乙锭), 紫外灯下观察结果, 用Band Leader3.0图像分析软件读取目的电泳条带, 以各组 β -actin条带的扫描值标准化其相应组的XPD、DNp73及GADD45 β 的密度扫描值, 获得

其mRNA相对表达量。

1.2.3 Western blot检测: 收集4组细胞总蛋白, 采用Bradford法测定蛋白浓度, 制备8%SDS-PAGE, 以每孔40 μ g加样、电泳、转膜、封闭, 一抗4℃孵育过夜、二抗孵育2 h, ECL显色、定影、拍照, 以 β -actin作为内对照。用Quantity One图像分析软件进行灰度分析。

1.2.4 MTT法检测细胞增殖力: 转染前24 h胰酶消化收集各组细胞, 以 5×10^3 /孔密度接种于96孔板, 每组6孔, 并设置一对照孔, 于37℃、50 mL/L CO₂培养箱培养, 转染5-6 h后换液, 分别加入新鲜含50 mL/L血清培养基100 μ L/孔、MTT 10 μ L/孔(5 g/L溶于PBS磷酸盐缓冲液, 过滤器过滤), 培养箱中继续培养4 h, 小心吸弃培养基, 加入DMSO 100 μ L, 避光振荡10 min, 酶标仪测定492 nm波长下各孔吸光度(A)值, 记录结果并计算各组平均值, 以反映各组活细胞数量。

1.2.5 流式细胞仪检测细胞凋亡率: 分别取空白对照组、脂质体组、N2组、XPD组细胞, 经0.25%胰酶消化后采用Annexin V-FITC细胞凋亡检测试剂盒进行流式细胞仪检测, 具体操作严格按照试剂盒说明书进行, 实验重复3次。结果判断: 左下象限代表正常细胞, 右下象限代表早期凋亡细胞, 右上象限代表晚期凋亡细胞和坏死细胞, 左上象限代表细胞收集过程中出现的损伤细胞。

统计学处理 采用SPSS13.0统计软件进行分析, 符合正态分布的计量资料用mean \pm SD表示, 组间比较用单因素方差分析, 进一步两两比较采用SNK-q检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义, $P < 0.01$ 为差异显著。

2 结果

2.1 转染 利用脂质体将pEGFP-N2和pEGFP-N2-XPD重组质粒转染入SMMC-7721细胞48 h后, 荧光显微镜下可见N2组和XPD组细胞中均有绿色荧光蛋白的表达, 无转染空白对照组和脂质体组细胞则未见表达(图1)。

2.2 RT-PCR检测 XPD组中XPD mRNA、GADD45 β mRNA表达量均高于其他3组, 而DNp73 mRNA表达量低于其他3组, 差异均有统计学意义(均 $P < 0.01$), 而XPD、DNp73、GADD45 β mRNAs表达量在对照组、脂质体组、N2组之间差异均无统计学意义(表1, 图2)。

2.3 Western blot检测 XPD组中XPD、GADD45 β 蛋白表达量高于其他3组, 而DNp73低于其他3

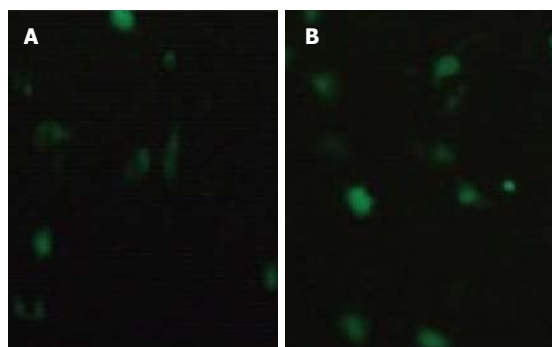


图 1 荧光显微镜下各组细胞中绿色荧光蛋白的表达. A: XPD组; B: N2组.

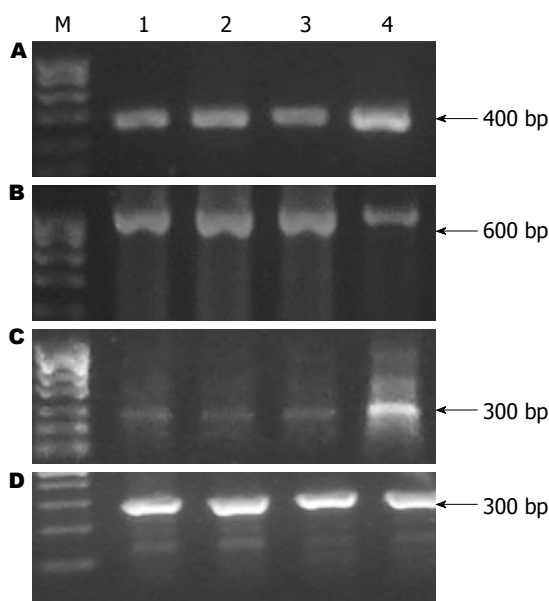


图 2 RT-PCR检测结果. M: Marker; 1: 空白对照组; 2: 脂质体组; 3: N2组; 4: XPD组; A: XPD(363 bp); B: DNp73(676 bp); C: GADD45 β (258 bp); D: β -actin mRNA(285 bp).

组, 差异均有统计学意义(均 $P < 0.01$), 而XPD、DNp73、GADD45 β 蛋白表达量在对照组、脂质体组、N2组之间差异均无统计学意义(表2, 图3).

2.4 MTT细胞增殖活力检测 4组的A值分别为 0.633 ± 0.012 , 0.623 ± 0.009 , 0.628 ± 0.016 , 0.384 ± 0.011 , XPD组与其他3组比较, 差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$), 对照组、脂质体组、N2组之间差异均无统计学意义, 即XPD组细胞增殖活力低于其他3组, 说明XPD基因降低了SMMC-7721细胞代谢, 抑制了SMMC-7721细胞的增殖.

2.5 流式细胞仪检测细胞凋亡率 转染XPD的SMMC-7721肝癌细胞凋亡显著, 凋亡率达56.53%, 而其他3组均未见明显凋亡, 差异均有统计学意义(均 $P < 0.01$, 图4).

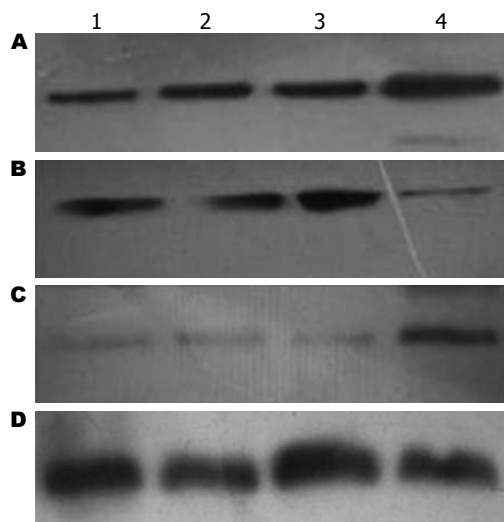


图 3 Western blot检测结果. 1: 空白对照组; 2: 脂质体组; 3: N2组; 4: XPD组; A: XPD蛋白表达(87 kDa); B: DNp73蛋白表达(73 kDa); C: GADD45 β 蛋白表达(18 kDa); D: β -actin蛋白表达(42 kDa).

3 讨论

原发性肝癌是常见的恶性肿瘤之一, 病死率位居第3, 他的发生发展是一个经历多步骤、多阶段、多基因参与的复杂的生物学演变过程^[5]. 近年来研究表明, 肝癌的发生是由多种基因共同参与的结果, 其发生机制与DNA修复能力障碍有着密不可分的联系. DNA修复是保持人类基因组完整性的核心, DNA修复能力的减低常易发生癌变. 为维持基因组稳定性和完整性, 机体可通过多种途径(如核酸切除修复、同源重组修复、非同源重组修复、错配修复和碱基切除修复等)促使各种损伤得到有效修复. 其中核酸切除修复是最多样和最常见DNA修复机制, 而基本转录因子IIH(TFIIH)则在核苷酸切除修复功能中发挥着重要作用^[6]. XPD作为TFIIH复合物的第2大亚基, 在核苷酸切除修复过程中负责从5'→3'方向打开受损位置的DNA双链. XPD基因发生突变时, 核苷酸剪切修复受到影响, 发生肿瘤的概率增加; 有研究证实, XPD基因可以抑制肝癌细胞中某些癌基因(如*c-Myc*, *CDC25A*), 以及促进抑癌基因(如*p53*, *p21*)的表达^[7,8], 从而推测其在抑制肝癌的发生发展过程中发挥重要作用.

*p73*基因作为第一个*p53*类似物, 于1997年在COS细胞中被偶然发现. 与*p53*有所不同, *p73*表达产物可因羧基或氨基端的选择性剪接而产生不同的亚型, 分为TAp73和DNp73(dominant negative p73)^[9]. DNp73又分为: 由启动子p1产生N末端截短的异构体(DEX2p73, DEX2/3p73和

■应用要点

XPD基因在肝癌的发生发展中起到相当重要的作用, 对抑制肝癌细胞生长的整个分子调控网络进行更深入而全面的研究, 将为肝癌的诊断和基因治疗提供分子水平的实验依据以及靶向途径.

■名词解释

核苷酸切除修复: DNA修复的一种, 他主要修复那些影响区域性的染色体结构的DNA损害, 包括紫外线诱导和化学物质引起的大片段DNA损伤等。

表 1 各组细胞XPD、DNp73、GADD45 β PCR结果 ($n = 6$, mean \pm SD)

分组	XPD	DNp73	GADD45 β
空白对照组	0.349 \pm 0.009	0.689 \pm 0.009	0.122 \pm 0.011
脂质体组	0.362 \pm 0.010	0.701 \pm 0.012	0.109 \pm 0.011
N2组	0.352 \pm 0.012	0.693 \pm 0.011	0.111 \pm 0.012
XPD组	0.703 \pm 0.009 ^b	0.252 \pm 0.007 ^b	0.398 \pm 0.008 ^b

^b $P < 0.01$.

表 2 各组细胞XPD、DNp73、GADD45 β Western blot结果 ($n = 6$, mean \pm SD)

分组	XPD	DNp73	GADD45 β
空白对照组	0.296 \pm 0.011	0.312 \pm 0.012	0.081 \pm 0.005
脂质体组	0.311 \pm 0.007	0.304 \pm 0.008	0.091 \pm 0.009
N2组	0.304 \pm 0.011	0.316 \pm 0.012	0.080 \pm 0.007
XPD组	0.932 \pm 0.012 ^b	0.084 \pm 0.007 ^b	0.305 \pm 0.009 ^b

^b $P < 0.01$.

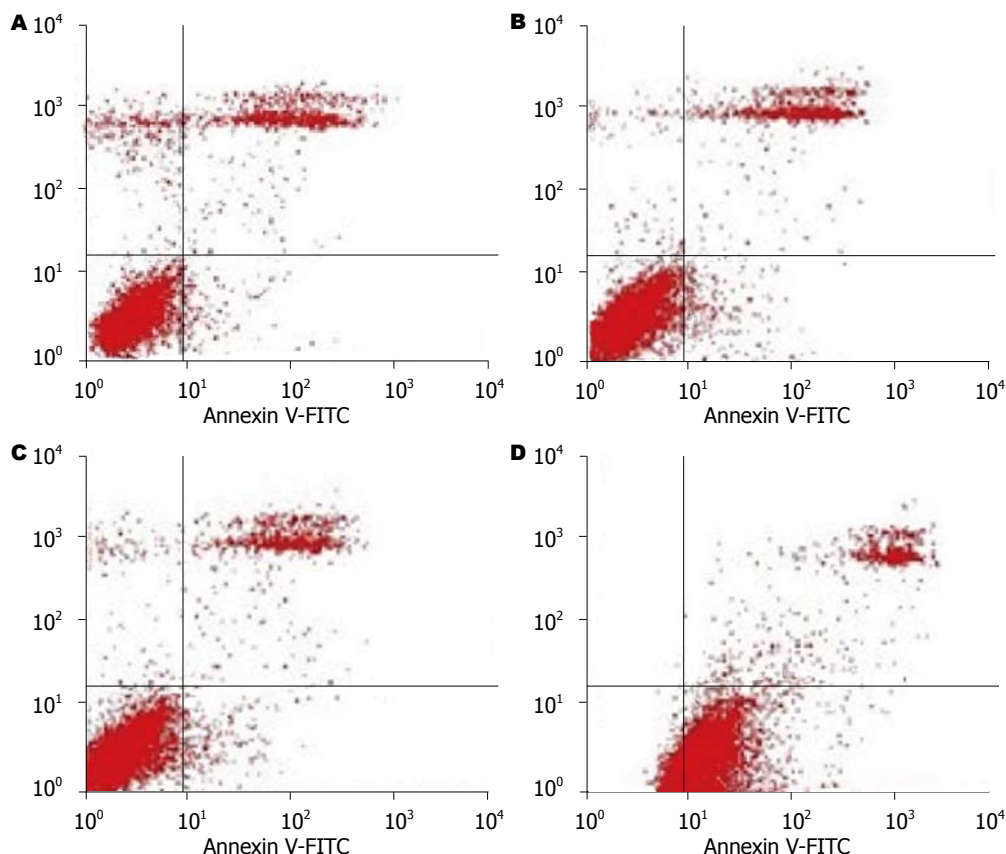


图 4 流式细胞技术结果. A: 空白对照组; B: 脂质体组; C: N2组; D: XPD组.

DNp73), 由启动子p2产生的异构体 (P2p73)^[10]. DNp73因其N末端转录活化区缺失导致转录活化功能完全丧失, 对p53和全长型p73依赖的转录活性有抑制作用. 同时, 他还有抗细胞凋亡和促细胞增殖的作用, 扮演着癌基因的角色; 研究发现DNp73是肿瘤组织中p73基因表达的主要形式, 在大部分肿瘤细胞中的表达均明显高于癌旁细胞, 其中包括人肝癌细胞^[11]. 大多数表达TAp73的肝癌细胞中出现TAp73表达的缺失或错义突变, p53失去了作用, p73基因编码仅为DNp73蛋白; 研究表明, 异常表达的P73蛋白(包括突变的TAp73和高表达的DNp73蛋白)很可能是正常P53蛋白的一个模拟突变体, 在肝癌细胞

内可模拟P53蛋白分子而封闭其作用底物, 使P53蛋白失活, 从而促使细胞的恶性转化. 目前对XPD基因与DNp73基因间的关系研究报道尚少. 本研究结果显示, 将XPD转染入SMMC-7721肝癌细胞后, DNp73在mRNA和蛋白水平的表达量均有明显下降; 其机制之一可能是XPD基因促进P53的表达, P53与DNp73在结构上高度同源, 因此高表达P53竞争性结合DNp73特异性的靶点, 最终抑制DNp73的表达, 成为XPD抑制肝癌细胞生长的机制之一; 由此可推测正常肝脏细胞中P53与DNp73之间的相对表达量是肝脏细胞恶变的一个决定因素; 除此之外, XPD基因通过促进P53的表达而选择性下调Bcl-3蛋白水

平, 抑制cyclin D1启动子活性, 降低cyclin D1蛋白和mRNA的表达水平, 导致细胞在G₁期阻滞, 抑制SMMC-7721肝癌细胞增殖。

GADD45 β 是生长抑制及DNA损伤诱导蛋白质基因家族的成员, 是P53、BRCA1调控的下游基因, 他在细胞周期控制、DNA损伤修复及信号转导过程中发挥重要作用^[12,13]。研究发现GADD45 β 在肝癌组织中是一个明显低表达基因, 呈特异性缺失, 提示其在肝癌的发生发展中可能发挥抑癌基因的作用^[4]。他编码的核蛋白能与其他蛋白如PCNA、P21、核组蛋白、MTK1/MEKK4激酶以及Cdk1等相互作用^[14,15], 并参与多种信号通路的调节, 在NF- κ B^[16]、p38/JNK^[17]等的通路中发挥作用, 通过信号通路间的交叉对话(cross talk)行使生物学功能, 参与DNA的损伤修复, 实现对肿瘤细胞的负性生长调节; 此外, GADD45 β 可在不同水平抑制细胞的增殖, 其中包括G₁/S和G₂/M细胞周期检测点。所以, GADD45 β 低表达意味着损伤修复功能的缺陷和细胞周期检测点的异常, 以及随之而来的对细胞生长不利的异常转录调节, 最终将导致肝细胞增殖恶变。本研究显示转染XPD后, GADD45 β 的表达量增加, 肝癌细胞生长受到明显抑制, 从而证实了GADD45 β 基因发挥的抑制肝癌细胞增殖的作用。

GADD45 β 是p53的下游激活产物, 其功能需要完整的p53基因的辅助和/或调控。XPD可以通过激活p53间接上调GADD45 β 的表达。DNp73虽与p53高度同源, 但却无法像p53一样激活p53靶基因GADD45 β 的转录, 不仅如此, DNp73还通过竞争性结合p53和TAp73特异性的靶点从而抑制p53和TAp73依赖的转录激活, 对GADD45 β 的表达具有负性调控作用。本实验将XPD基因转染入SMMC-7721肝癌细胞, 使DNp73的表达减少, 减弱了DNp73对GADD45 β 的负性调控作用, 进一步使GADD45 β 的表达增加。

总之, XPD可与抑癌基因GADD45 β 协同作用抑制肝癌细胞的生长, 同时, 还可减少癌基因DNp73的表达, 从而降低SMMC-7721肝癌细胞的增殖能力, 值得注意的是, 抑癌基因p53的激活是XPD调控GADD45 β 和DNp73表达过程中的关键。本实验对XPD基因抑制肝癌细胞生长的分子机制进行了初步的探讨, 为肝癌的基因治疗提供了分子水平的实验依据。随着研究的不断深入, XPD在TF IIH复合物中起关键调节作用的角色得到不少研究者的认同, 但其具体调节

作用机制还有待于进一步研究探索。

4 参考文献

- 1 曾小云, 仇小强, 纪龙, 余红平. DNA修复基因XPD单核苷酸多态性和环境因素的交互作用与肝细胞癌的关联研究. 中华流行病学杂志 2009; 30: 702-705
- 2 汤蕾, 张吉翔, 熊瑛. 人着色性干皮病D组基因的克隆及其真核表达. 生物医学工程学杂志 2008; 25: 668-672
- 3 Zaika AI, Slade N, Erster SH, Sansome C, Joseph TW, Pearl M, Chalas E, Moll UM. DeltaNp73, a dominant-negative inhibitor of wild-type p53 and TA p73, is up-regulated in human tumors. *J Exp Med* 2002; 196: 765-780
- 4 杨娟, 杨秀玉, 韩双印, 白阳秋, 张立达. GADD45 β 在肝癌中的异常表达. 世界华人消化杂志 2008; 16: 2417-2424
- 5 El-Serag HB, Rudolph KL. Hepatocellular carcinoma: epidemiology and molecular carcinogenesis. *Gastroenterology* 2007; 132: 2557-2576
- 6 Giglia-Mari G, Coin F, Ranish JA, Hoogstraten D, Theil A, Wijgers N, Jaspers NG, Raams A, Argentin M, van der Spek PJ, Botta E, Stefanini M, Egly JM, Aebersold R, Hoeijmakers JH, Vermeulen W. A new, tenth subunit of TFIIH is responsible for the DNA repair syndrome trichothiodystrophy group A. *Nat Genet* 2004; 36: 714-719
- 7 Wang HY, Xiong GF, Zhang JX, Xu H, Guo WH, Xu JJ, Xiong XY. The role of XPD in cell apoptosis and viability and its relationship with p53 and cdk2 in hepatoma cells. *Med Oncol* 2012; 29: 161-167
- 8 Chang-Claude J, Ambrosone CB, Lilla C, Kropp S, Helmbold I, von Fournier D, Haase W, Sautter-Bihl ML, Wenz F, Schmezer P, Popanda O. Genetic polymorphisms in DNA repair and damage response genes and late normal tissue complications of radiotherapy for breast cancer. *Br J Cancer* 2009; 100: 1680-1686
- 9 Stiewe T. The p53 family in differentiation and tumorigenesis. *Nat Rev Cancer* 2007; 7: 165-168
- 10 Testoni B, Schinzari V, Guerrieri F, Gerbal-Chaloin S, Blandino G, Levrero M. p53-paralog DNp73 oncogene is repressed by IFN α /STAT2 through the recruitment of the Ezh2 polycomb group transcriptional repressor. *Oncogene* 2011; 30: 2670-2678
- 11 Ruffini A, Agostini M, Grespi F, Tomasini R, Sayan BS, Niklison-Chirou MV, Conforti F, Velletri T, Mastino A, Mak TW, Melino G, Knight RA. p73 in Cancer. *Genes Cancer* 2011; 2: 491-502
- 12 Bringold F, Serrano M. Tumor suppressors and oncogenes in cellular senescence. *Exp Gerontol* 2000; 35: 317-329
- 13 Maeda T, Hanna AN, Sim AB, Chua PP, Chong MT, Tron VA. GADD45 regulates G2/M arrest, DNA repair, and cell death in keratinocytes following ultraviolet exposure. *J Invest Dermatol* 2002; 119: 22-26
- 14 Takekawa M, Saito H. A family of stress-inducible GADD45-like proteins mediate activation of the stress-responsive MTK1/MEKK4 MAPKKK. *Cell* 1998; 95: 521-530
- 15 Smith ML, Ford JM, Hollander MC, Bortnick RA, Amundson SA, Seo YR, Deng CX, Hanawalt PC, Fornace AJ. p53-mediated DNA repair responses to UV radiation: studies of mouse cells lacking p53, p21, and/or gadd45 genes. *Mol Cell Biol* 2000; 20:

■同行评价

本研究立题有临床实用价值, 实验方法可行, 结果可靠, 实验结果对于揭示人剪切修复基因XPD在肝癌发生中作用机制有意义。

- 3705-3714
- 16 Qiu W, Zhou B, Chu PG, Luh F, Yen Y. The induction of growth arrest DNA damage-inducible gene 45 beta in human hepatoma cell lines by S-adenosylmethionine. *Am J Pathol* 2007; 171: 287-296
- 17 Papa S, Zazzaroni F, Fu YX, Bubici C, Alvarez K, Dean K, Christiansen PA, Anders RA, Franzoso G. Gadd45beta promotes hepatocyte survival during liver regeneration in mice by modulating JNK signaling. *J Clin Invest* 2008; 118: 1911-1923

编辑 张姗姗 电编 闫晋利

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》修回稿须知

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

1 修回稿信件

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

2 稿件修改

来稿经同行专家审查后,认为内容需要修改、补充或删除时,本刊编辑部将把原稿连同审稿意见、编辑意见寄回给作者修改,而作者必须于15 d内将单位介绍信、作者符合要点承诺书、版权转让信等书面材料寄回编辑部,同时将修改后的电子稿件上传至在线办公系统;逾期寄回的,作重新投稿处理。

3 版权

本论文发表后作者享有非专有权,文责由作者自负。作者可在本单位或本人著作集中汇编出版以及用于宣讲和交流,但应注明发表于《世界华人消化杂志》××年;卷(期);起止页码。如有国内外其他单位和个人复制、翻译出版等商业活动,须征得《世界华人消化杂志》编辑部书面同意,其编辑版权属本刊所有。编辑部可将文章在《中国学术期刊光盘版》等媒体上长期发布;作者允许该文章被美国《化学文摘》、《荷兰医学文摘库/医学文摘》、俄罗斯《文摘杂志》、《中国生物学文摘》等国内外相关文摘与检索系统收录。

大黄素对脱氧胆酸诱导的AR42J细胞损伤的调节

张桂信, 陈海龙, 纪军, 吴圆圆, 尚东, 张利

张桂信, 陈海龙, 尚东, 大连医科大学附属第一医院普外科
辽宁省大连市 116011

纪军, 吴圆圆, 张利, 大连市中心医院中心实验室 辽宁省大连市 116033

张桂信, 主治医师, 主要从事胆源性急性胰腺炎的发病机制与中西医结合治疗研究。

国家自然科学基金资助项目, No. 30973851

作者贡献分布: 此课题由张桂信与陈海龙设计; 研究过程由张桂信、纪军及吴圆圆操作完成, 研究所用试剂及分析工具部分由陈海龙与张利提供; 数据分析由尚东与张桂信完成; 论文写作由张桂信完成。

通讯作者: 陈海龙, 教授, 116011, 辽宁省大连市中山路222号, 大连医科大学附属第一医院普外科。hailongchen2007@hotmail.com

电话: 0411-83600680 传真: 0411-83631284

收稿日期: 2011-12-11 修回日期: 2012-02-12

接受日期: 2012-03-06 在线出版日期: 2012-03-28

Emodin protects from deoxycholic acid-induced AR42J cell damage

Gui-Xin Zhang, Hai-Long Chen, Jun Ji, Yuan-Yuan Wu, Dong Shang, Li Zhang

Gui-Xin Zhang, Hai-Long Chen, Dong Shang, Department of Surgery, the First Affiliated Hospital of Dalian Medical University, Dalian 116011, Liaoning Province, China

Jun Ji, Yuan-Yuan Wu, Li Zhang, Central Laboratory, Dalian Municipal Central Hospital, Dalian 116033, Liaoning Province, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 90709005

Correspondence to: Hai-Long Chen, Professor, Department of Surgery, the First Affiliated Hospital of Dalian Medical University, Dalian 116011, Liaoning Province, China. hailongchen2007@hotmail.com

Received: 2011-12-11 Revised: 2012-02-12

Accepted: 2012-03-06 Published online: 2012-03-28

Abstract

AIM: To investigate whether emodin exerts a protect effect against deoxycholic acid (DCA)-induced cell damage in rat pancreatic acinar cell line AR42J.

METHODS: AR42J cells were divided into five groups: normal control cells, cells treated with 0.4 or 0.8 mmol/L DCA, and those treated with 0.4 or 0.8 mmol/L DCA plus emodin (20 mg/L). The rates of apoptosis and necrosis were detected by flow cytometry and AV/PI double staining. The activity of amylase in the medium and cytoplasm was determined.

RESULTS: DCA at a dose of 0.4 mmol/L mainly induced the apoptosis of AR42J cells, while 0.8 mmol/L of DCA induced the necrosis of AR42J cells. Emodin significantly reduced DCA-induced late apoptosis (27.9% vs 34.1%) and necrosis (38.1% vs 45.4%), but did not significantly change the activity of amylase in the medium and cytoplasm of AR42J cells.

CONCLUSION: Emodin has some protective effects against DCA-induced AR42J cell damage, but does not influence amylase synthesis and secretion by acinar cells.

Key Words: AR42J; Emodin; Acute biliary pancreatitis; Deoxycholic acid; Apoptosis; Necrosis

Zhang GX, Chen HL, Ji J, Wu YY, Shang D, Zhang L. Emodin protects from deoxycholic acid-induced AR42J cell damage. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2012; 20(9): 771-775

摘要

目的: 研究大黄素(Emodin)对脱氧胆酸(deoxycholic acid, DCA)诱导的胰腺腺泡细胞损伤的调节作用。

方法: 以大鼠AR42J胰腺腺泡系为研究对象, 分为5组, 分别为CON组、0.4 mmol/L DCA刺激组、0.4 mmol/L DCA刺激+Emodin(20 mg/L)干预组、0.8 mmol/L DCA刺激组、0.8 mmol/L DCA刺激+Emodin(20 mg/L)干预组。利用流式细胞术AV/PI双染法检测各组细胞凋亡/坏死率, 提取细胞浆蛋白, 并分别检测各组细胞培养液上清与细胞浆淀粉酶的活性。

结果: 0.4 mmol/L DCA诱导AR42J胰腺腺泡细胞损伤以凋亡为主, 0.8 mmol/L DCA诱导AR42J细胞损伤则以坏死为主。20 μmol/L Emodin可以明显减少0.4 mmol/L DCA诱导的AR42J胰腺腺泡细胞的晚期凋亡(27.9% vs 34.1%), 并明显降低0.8 mmol/L DCA诱导的AR42J细胞坏死(38.1% vs 45.4%)。大黄素对DCA诱导下AR42J胰腺腺泡细胞培养液上清及细胞浆淀粉酶活性均没有明显变化。

■背景资料

胰腺腺泡细胞损伤是胆源性急性胰腺炎发病过程中的重要病理机制, 研究腺泡细胞损伤的分子机制, 特别是关于凋亡—坏死“转换开关”是当前研究的热点。

■同行评议者

白雪巍, 副主任医师, 哈尔滨医科大学

■研究前沿

大黄素是治疗急性胰腺炎(acute pancreatitis, AP)的有效中药成分,AP时大黄素可通过抑制肠黏膜细胞凋亡、保护肠道屏障功能损伤、诱导延迟凋亡的中性粒细胞凋亡减轻炎症反应等发挥治疗作用。

结论: Emodin对胆汁酸诱导的胰腺腺泡细胞损伤有一定的保护性作用,对细胞淀粉酶的合成与分泌功能没有明显影响。

关键词: AR42J; 大黄素; 急性胆源性胰腺炎; 脱氧胆酸; 凋亡; 坏死

张桂信, 陈海龙, 纪军, 吴圆圆, 尚东, 张利. 大黄素对脱氧胆酸诱导的AR42J细胞损伤的调节. 世界华人消化杂志 2012; 20(9): 771-775

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/771.asp>

0 引言

近十几年来对于急性胰腺炎(acute pancreatitis, AP)发病机制的研究大多围绕胰腺腺泡细胞展开,胰腺腺泡细胞的损伤方式和机制成为研究的热点。随胆汁异常反流入胰管的胆汁酸,造成胰腺腺泡细胞功能与结构损害是大多数急性胆源性胰腺炎发病的一个关键性因素。我们先前的研究已证实人胆汁中7种主要胆汁酸成分对胰腺腺泡细胞的损伤作用不同,其中脱氧胆酸(deoxycholic acid, DCA)的作用较强,主要表现为凋亡和坏死^[1]。近年有研究认为大黄素具有抗炎作用^[2,3],并对由酒精和CCl₄诱导的肝细胞损害具有保护功效^[4,5]。动物实验研究表明大黄素对重症急性胰腺炎(severe acute pancreatitis, SAP)多脏器功能衰竭具有保护作用,可减轻过度炎症反应,保护肠道屏障功能^[6,7]。本研究通过体外实验,探讨大黄素对DCA诱导的胰腺腺泡细胞损伤的调节作用。

1 材料和方法

1.1 材料 AR42J大鼠胰腺腺泡细胞系购自中科院上海细胞库; Ham's F12K培养基购自美国Sigma-Aldrich公司; FBS购自美国Gibco公司; DCA购自美国Alfa Aesar公司; MTT购自美国Sigma-Aldrich公司; 碘-淀粉法淀粉酶活性检测试剂盒购自南京建成生物工程研究所; Annexin V-FITC/PI细胞凋亡检测试剂盒购自北京创根胜泰科技有限公司; Procarta TF Nuclear Extraction Kit购自美国Fremont公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养: 大鼠胰腺腺泡细胞系AR42J细胞于含200 mL/L的胎牛血清、100 kU/L青霉素、100 mg/L链霉素的Ham's F12K培养液中,在37 °C、50 mL/L CO₂及饱和湿度的培养箱中培养。细胞每3-4 d换液1次,用0.125%胰酶+0.02%EDTA消化,以1:3-1:5传代1次。

1.2.2 流式细胞术检测细胞凋亡/坏死率: 取对数生长期的1×10⁶/mL AR42J细胞,分为5组,分别为对照组(CON)、0.4 mmol/L DCA处理组、0.4 mmol/L DCA+20 mg/L Emodin处理组、0.8 mmol/L DCA处理组和0.8 mmol/L DCA+20 mg/L Emodin处理组。消化收集细胞成单细胞悬液,通过流式细胞仪采用Annexin-V/PI双染法对其进行凋亡率和坏死率检测,按照试剂盒说明书进行操作。

1.2.3 细胞浆蛋白的提取: 取对数生长期的AR42J细胞,使其浓度为1×10⁶/mL接种12个6 cm皿,分为CON组、0.4 mmol/L DCA处理组和0.4 mmol/L DCA+20 mg/L Emodin处理组,每组按照不同的培养时间分为4组,即15 min、30 min、1 h和4 h。于相应时间点收集细胞培养液上清,-20 °C保存待测淀粉酶活性;应用Procarta TF Nuclear Extraction Kit提取细胞核蛋白和细胞浆蛋白,参照文献[8]方法执行操作。弃掉细胞培养液上清,用预冷的PBS洗2次;加入1 mL工作液A(1 mL缓冲液A, 10 μL二硫苏糖醇, 10 μL蛋白酶抑制剂, 10 μL磷酸酶抑制剂 I, 10 μL磷酸酶抑制剂 II);放入冰盒中,200 r/min摇床上放置10 min;将细胞收集到1.5 mL离心管中,14 000 g,4 °C离心3 min;收集上清至新的EP管中,即为细胞浆蛋白。测定蛋白浓度,-80 °C保存,待测淀粉酶活性。

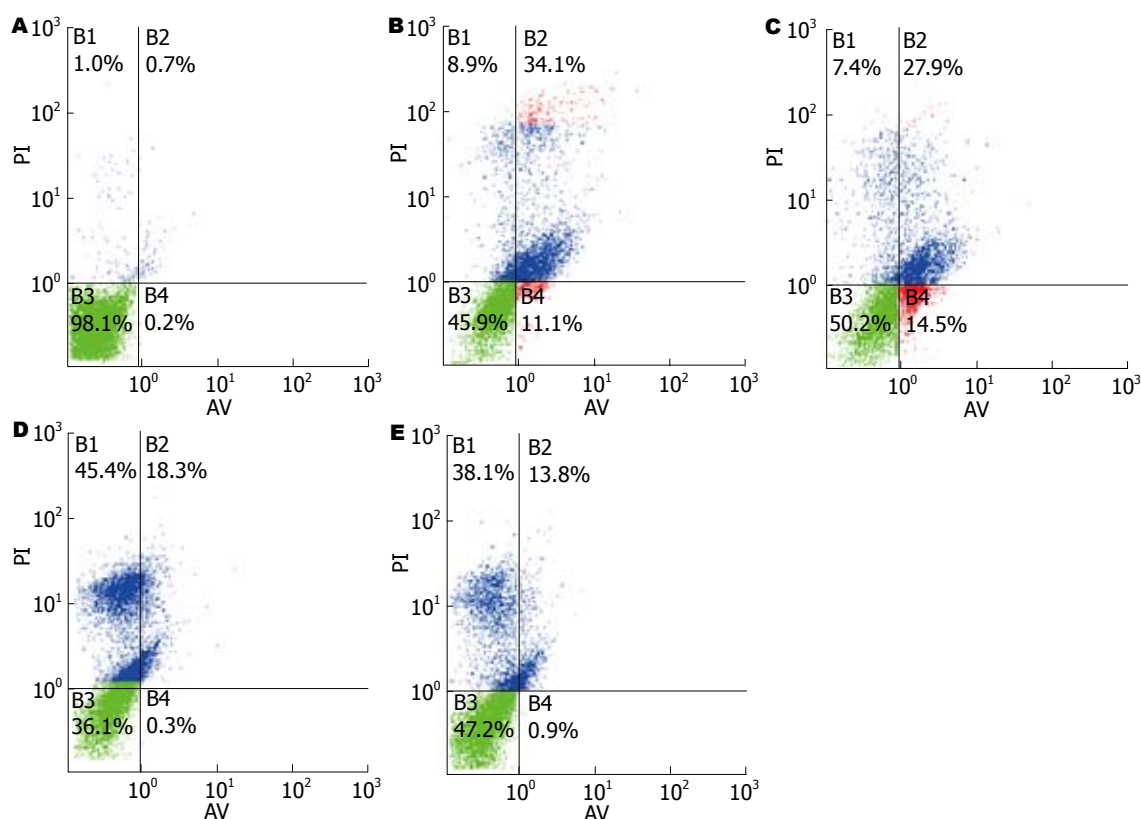
1.2.4 淀粉酶活性测定: 采用南京建成生物工程研究所的碘-淀粉比色法试剂盒,按照说明书操作步骤进行测定。计算公式为:培养液上清淀粉酶AMS(U/dl) = (空白管吸光度-测定管吸光度)/空白管吸光度×800;细胞提取蛋白淀粉酶AMS(U/mgprot) = (空白管吸光度-测定管吸光度)/空白管吸光度×50。

统计学处理 采用SPSS12.0统计软件进行单因素方差分析,组间比较采用LSD法。

2 结果

2.1 AR42J细胞凋亡和坏死率的改变 同0.4 mmol/L DCA组相比,0.4 mmol/L DCA+Emodin处理组细胞早期凋亡率有所升高(14.5% vs 11.1%),凋亡晚期及死细胞百分率则明显下降(27.9% vs 34.1%),坏死率有所下降(7.4% vs 8.9%);同0.8 mmol/L DCA组相比,0.8 mmol/L DCA+Emodin处理组细胞早期凋亡率无明显变化(0.9% vs 0.3%),凋亡晚期及死细胞百分率有所下降(13.8% vs 18.3%),坏死率下降较明显(38.1% vs 45.4%,图1)。

2.2 细胞培养液与细胞浆淀粉酶活性的变化 随



应用要点

随胰胆管反流的胆汁酸造成胰腺腺泡细胞损伤是胆源性AP发病机制的始动因素和关键因子。大黄素可通过减轻腺泡细胞损伤而发挥治疗作用, 为临床应用提供了进一步的理论指导。

图1 AV/PI双染流式细胞图。B1: 左上象限为坏死细胞; B2: 右上象限为凋亡晚期和死细胞; B3: 左下象限为正常细胞; B4: 右下象限为凋亡早期细胞。A: CON组; B: 0.4 mmol/L DCA组; C: 0.4 mmol/L DCA+Emodin组; D: 0.8 mmol/L DCA组; E: 0.8 mmol/L DCA+Emodin组。

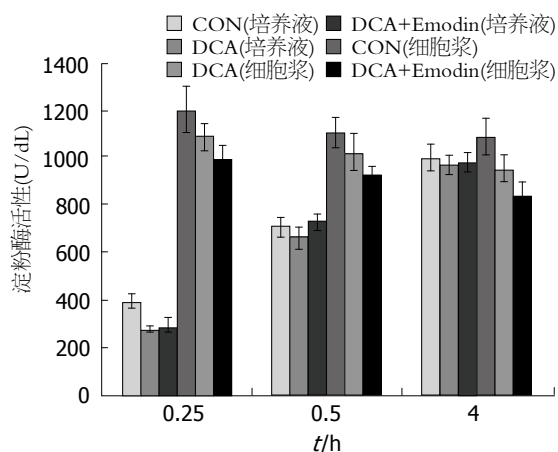


图2 0.4 mmol/L DCA结合Emodin作用AR42J细胞后的不同时间段培养液上清和细胞浆淀粉酶活性的变化。

随着培养时间的延长, 培养液内淀粉酶活性逐渐增高, 至4 h时接近细胞浆内淀粉酶活性。同CON组比较, 0.4 mmol/L DCA和0.4 mmol/L DCA+20 mg/L Emodin处理组的培养液和胞浆淀粉酶水平无明显改变(图2)。

3 讨论

胰腺腺泡细胞损伤是AP的一个重要特征, 而且

在AP发病机制中处于关键性角色。普遍认为, AP时最早期改变发生在腺泡细胞内并导致了腺泡细胞的损害, 其后才发生了炎症细胞的聚集及炎症介质的释放等反应, 进一步影响了疾病的严重程度。最近的研究表明, 腺泡细胞对损害的反应本身是影响疾病严重性的重要决定因素。在这些研究中发现, 轻度AP时腺泡细胞损伤主要表现为凋亡, SAP则发生广泛的腺泡细胞坏死而凋亡很少^[9,10]。我们在之前的研究中, 通过体外实验, 证实了胆汁酸对胰腺腺泡细胞损伤的作用特点符合以上动物实验的结论^[1]。

掌叶大黄是祖国医学中一种常用的中草药^[11], 已经被广泛地应用于临床胰腺炎、胆囊炎、急腹症及其他炎症性疾病的救治过程中^[12]。Emodin化学名为1, 3, 8-三羟基-6-甲基蒽醌(1, 3, 8-trihydroxy-6-methylanthraquinone), 分子量为270.23 Da, 其化学结构属于羟基蒽醌类。大黄素是中药大黄的主要有效成分, 并且在正品大黄中的游离蒽醌中占的比例较大^[13]。其药理作用与大黄有许多相似之处, 国内外文献有关大黄素的报道很多, 作用极其广泛。具有抗炎作用, 能显著抑制角叉菜胶致小鼠足趾肿胀^[14], 调节机体

■同行评价

该课题立意尚可,设计科学合理,结果可靠,为临床应用提供了理论指导。

免疫功能^[15,16],增强肠道蠕动而具有泻下作用^[17],并具有诱导癌细胞凋亡,抑制肿瘤转移等功能而发挥抗癌功效^[18-22];此外,他还具有肝肾保护功能,对CCl₄损伤的原代培养大鼠肝细胞有显著保护作用^[23]。有研究表明,大黄素对胰腺激肽释放酶、胰蛋白酶、胰脂肪酶均有很强的抑制作用,IC₅₀分别为31.5 mg/L、40.5 mg/L、46.5 mg/L。用大黄素治疗胰腺炎后,胰腺组织转化生长因子表达明显增强,高峰前移,且胰腺总蛋白质、DNA合成物明显增加,参与胰腺组织的再生和修复^[24,25]。在AP大鼠模型中,大黄素还可通过保护肠道屏障损伤、诱导中性粒细胞凋亡起到治疗作用^[26-28]。

大黄素在AP时对胰腺腺泡细胞损伤的保护性意义尚不明确。大鼠AR42J胰腺腺泡细胞系具有胰腺腺泡细胞的绝大多数功能,而成为进行AP体外实验研究的标准胰腺腺泡细胞系^[1,29]。本实验通过脱氧胆酸刺激大鼠AR42J胰腺腺泡细胞损伤为体外模型,研究大黄素对AP时胰腺腺泡细胞损伤的调节作用。发现大黄素对胆汁酸诱导的胰腺腺泡细胞损伤具有一定的保护性作用,可减少晚期凋亡和坏死,而对细胞淀粉酶的合成与分泌功能均无明显影响,其分子机制有待于进一步深入研究。

4 参考文献

- 张桂信,陈海龙,纪军,张利,吴圆圆,王永鹏,尚东. 不同胆汁酸诱导AR42J细胞凋亡与坏死的作用. 世界华人消化杂志 2010; 18: 284-289
- Gao Q, Wang F, Guo S, Li J, Zhu B, Cheng J, Jin Y, Li B, Wang H, Shi S, Gao Q, Zhang Z, Cao W, Tian Y. Sonodynamic effect of an anti-inflammatory agent-emodin on macrophages. *Ultrasound Med Biol* 2011; 37: 1478-1485
- Ha MK, Song YH, Jeong SJ, Lee HJ, Jung JH, Kim B, Song HS, Huh JE, Kim SH. Emodin inhibits pro-inflammatory responses and inactivates histone deacetylase 1 in hypoxic rheumatoid synovocytes. *Biol Pharm Bull* 2011; 34: 1432-1437
- Qian ZJ, Zhang C, Li YX, Je JY, Kim SK, Jung WK. Protective Effects of Emodin and Chrysophanol Isolated from Marine Fungus *Aspergillus* sp. on Ethanol-Induced Toxicity in HepG2/CYP2E1 Cells. *Evid Based Complement Alternat Med* 2011; 2011: 452621. Epub 2011 Sep 6
- Lee BH, Huang YY, Duh PD, Wu SC. Hepatoprotection of emodin and Polygonum multiflorum against CCl₄(4)-induced liver injury. *Pharm Biol* 2012; 50: 351-359
- Wan L, Wang Z, Zhou L. Protecting effects of emodin on multiorgan failure of rats with severe acute pancreatitis. *Pancreas* 2009; 38: 835-836
- Wang G, Sun B, Zhu H, Gao Y, Li X, Xue D, Jiang H. Protective effects of emodin combined with danshensu on experimental severe acute pancreatitis. *Inflamm Res* 2010; 59: 479-488
- Brahmachary M, Schönbach C, Yang L, Huang E, Tan SL, Chowdhary R, Krishnan SP, Lin CY, Hume DA, Kai C, Kawai J, Carninci P, Hayashizaki Y, Bajic VB. Computational promoter analysis of mouse, rat and human antimicrobial peptide-coding genes. *BMC Bioinformatics* 2006; 7 Suppl 5: S8
- 陈海龙,张桂信,宫爱霞,张利. 大鼠急性胰腺炎时胰腺腺泡细胞凋亡及Bax, Caspase-8的表达. 世界华人消化杂志 2007; 15: 1067-1072
- Laukkanen JM, Van Acker GJ, Weiss ER, Steer ML, Perides G. A mouse model of acute biliary pancreatitis induced by retrograde pancreatic duct infusion of Na-taurocholate. *Gut* 2007; 56: 1590-1598
- Yang DY, Fushimi H, Cai SQ, Komatsu K. Molecular analysis of Rheum species used as Rhei Rhizoma based on the chloroplast matK gene sequence and its application for identification. *Biol Pharm Bull* 2004; 27: 375-383
- Cuellar MJ, Giner RM, Recio MC, Mániz S, Ríos JL. Topical anti-inflammatory activity of some Asian medicinal plants used in dermatological disorders. *Fitoterapia* 2001; 72: 221-229
- 罗文毓,江萍. 大黄中五种蒽醌衍生物的HPLC测定. 药物分析杂志 1989; 9: 259-262
- Wang CC, Lai JE, Chen LG, Yen KY, Yang LL. Inducible nitric oxide synthase inhibitors of Chinese herbs. Part 2: naturally occurring furanocoumarins. *Bioorg Med Chem* 2000; 8: 2701-2707
- 张骏,翁福海. 大黄素对内毒素刺激下的大鼠腹腔巨噬细胞分泌TNF- α 及NO的影响. 天津医科大学学报 2001; 7: 189-191
- 祁红. 大黄素的抗炎作用. 中草药 1999; 30: 522-524
- 黎明,徐志立. 大黄素对大鼠离体胃平滑肌条收缩性的影响. 医学信息 2009; 22: 790-791
- Wang W, Sun YP, Huang XZ, He M, Chen YY, Shi GY, Li H, Yi J, Wang J. Emodin enhances sensitivity of gallbladder cancer cells to platinum drugs via glutathione depletion and MRP1 downregulation. *Biochem Pharmacol* 2010; 79: 1134-1140
- Su YJ, Tsai MS, Kuo YH, Chiu YF, Cheng CM, Lin ST, Lin YW. Role of Rad51 down-regulation and extracellular signal-regulated kinases 1 and 2 inactivation in emodin and mitomycin C-induced synergistic cytotoxicity in human non-small-cell lung cancer cells. *Mol Pharmacol* 2010; 77: 633-643
- Lin ML, Lu YC, Su HL, Lin HT, Lee CC, Kang SE, Lai TC, Chung JG, Chen SS. Destabilization of CARP mRNAs by aloe-emodin contributes to caspase-8-mediated p53-independent apoptosis of human carcinoma cells. *J Cell Biochem* 2011; 112: 1176-1191
- 刘岸,邓姿峰,胡金喜,韩邵伟,黄莉莉,柯品好,林胜璋. 大黄素对人胰腺癌Panc-1细胞增殖和凋亡的影响. 中草药 2011; 42: 756-759
- 徐贤绸,刘岸,王兆洪,林胜璋. 大黄素抑制胰腺癌裸鼠原位移植瘤的实验研究. 中华中医药学刊 2011; 29: 770-772
- 焦河玲,黄兆胜. 大黄素对四氯化碳损伤原代培养大鼠肝细胞的保护作用. 河南中医 2000; 20: 20-22
- 楼恺嫻,龚自华,袁耀宗,涂水平,翟祖康,徐家裕. 大黄素对急性胰腺炎胰腺组织TGF- β (β 1)表达的影响. 中国中西医结合杂志 2001; 21: 433-436
- 陈德昌,景炳文,杨兴易,宋志芳,严鸣,赵良,单红卫,余康龙,张翔宇,马钧. 大黄对危重患者胃肠道的保护作用. 中国危重病急救医学 2000; 12: 87-90
- 李永红,何馥倩,黄宗文,薛平,夏庆. 大黄素对急性坏死性胰腺炎大鼠肠道损伤的保护作用. 四川大学学报(医学版) 2010; 41: 1012-1015
- 宁建文,李峰,骆丹东,杨春燕,王丽君. 大黄素对重症急性胰腺炎大鼠肠黏膜细胞凋亡和血清瘦素表达的影响.

- 影响. 中西医结合学报 2009; 7: 1167-1173
- 28 曹勇, 周新泽, 章文毅, 柯靖. 大黄素对急性胰腺炎大鼠中性粒细胞凋亡的影响. 中国现代医学杂志 2008; 18: 2925-2927
- 29 Twait E, Williard DE, Samuel I. Dominant negative p38 mitogen-activated protein kinase expression inhibits NF-kappaB activation in AR42J cells. *Pancreatology* 2010; 10: 119-128

编辑 张姗姗 电编 闫晋利

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》出版流程

本刊讯 《世界华人消化杂志》[ISSN 1009-3079 (print), ISSN 2219-2859 (online), CN 14-1260/R]是一份同行评议性和开放获取(open access, OA)的旬刊, 每月8、18、28号按时出版. 具体出版流程介绍如下:

第一步 作者提交稿件: 作者在线提交稿件(<http://www.baishideng.com/wcjd/ch/index.aspx>), 提交稿件中出现问题可以发送E-mail至submission@wjgnet.com咨询, 编务将在1个工作日内回复.

第二步 审稿: 送审编辑对所有来稿进行课题查新, 并进行学术不端检测, 对不能通过预审的稿件直接退稿, 通过预审的稿件送交同行评议专家进行评议. 编辑部主任每周组织定稿会, 评估审稿人意见, 对评审意见较高, 文章达到本刊发表要求的稿件送交总编辑签发拟接受, 对不能达到本刊发表要求的稿件退稿.

第三步 编辑、修改稿件: 科学编辑严格根据编辑规范要求编辑文章, 包括全文格式、题目、摘要、图表科学性和参考文献; 同时给出退修意见送作者修改. 作者修改稿件中遇到问题可以发送E-mail至责任科学编辑, 责任科学编辑在1个工作日内回复. 为保证文章审稿意见公平公正, 本刊对每一篇文章均增加该篇文章的同行评议者和同行评论, 同时配有背景资料、研发前沿、相关报道、创新盘点、应用要点和名词解释, 供非专业人士阅读了解该领域的最新科研成果.

第四步 录用稿件: 作者将稿件修回后, 编辑部主任组织第2次定稿会, 评估作者修回稿件质量. 对修改不合格的稿件通知作者重修或退稿, 对修改合格的稿件送总编辑终审, 合格后发正式录用通知. 稿件正式录用后, 编务通知作者缴纳出版费, 出版费缴纳后编辑部安排生产, 并挂号将缴费发票寄出.

第五步 排版制作: 电子编辑对稿件基本情况进行审核, 核对无误后, 进行稿件排版及校对、图片制作及参考文献核对. 彩色图片保证放大400%依然清晰; 中文参考文献查找全文, 核对作者、题目、期刊名、卷期及页码, 英文参考文献根据本杂志社自主研发的“参考文献检测系统”进行检测, 确保作者、题目、期刊名、卷期及页码准确无误. 排版完成后, 电子编辑进行黑马校对, 消灭错别字及语句错误.

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

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

第八步 入库: 责任电子编辑入库, 责任科学编辑审核, 包括原创文章、原始清样、制作文件等.

《世界华人消化杂志》从收稿到发行每一步都经过严格审查, 保证每篇文章高质量出版, 是消化病学专业人士发表学术论文首选的学术期刊之一. 为保证作者研究成果及时公布, 《世界华人消化杂志》保证每篇文章四月内完成. (编辑部主任: 李军亮 2010-01-18)

食管炎性纤维性息肉的临床病理特征

谢飞来, 姚丽青, 余英豪

■背景资料

炎性纤维性息肉(inflammatory fibroid polyp, IFP)是胃肠道中一种非常罕见的良性间叶性肿瘤,可发生于消化系任何部位,最常发生于胃,其次为小肠,发生于食管的极为罕见。

谢飞来, 姚丽青, 余英豪, 中国人民解放军南京军区福州总医院病理科 福建省福州市 350025

谢飞来, 医师, 主要研究方向是临床病理。

作者贡献分布: 此课题由谢飞来设计; 研究过程由谢飞来、姚丽青及余英豪操作完成; 本论文写作由谢飞来完成。

通讯作者: 余英豪, 主任医师, 硕士生导师, 350025, 福建省福州市西二环北路156号, 中国人民解放军南京军区福州总医院病理科. yuyinghao0808@126.com

电话: 0591-24937095 传真: 0591-83717703

收稿日期: 2011-12-30 修回日期: 2012-02-03

接受日期: 2012-02-27 在线出版日期: 2012-03-28

Clinicopathologic features of inflammatory fibroid polyp of the esophagus

Fei-Lai Xie, Li-Qing Yao, Ying-Hao Yu

Fei-Lai Xie, Li-Qing Yao, Ying-Hao Yu, Department of Pathology, Fuzhou General Hospital of Nanjing Military Command of Chinese PLA, Fuzhou 350025, Fujian Province, China

Correspondence to: Ying-Hao Yu, Chief Physician, Department of Pathology, Fuzhou General Hospital of Nanjing Military Command of Chinese PLA, 156 Xi'erhuan North Road, Fuzhou 350025, Fujian Province, China. yuyinghao0808@126.com

Received: 2011-12-30 Revised: 2012-02-03

Accepted: 2012-02-27 Published online: 2012-03-28

Abstract

AIM: To explore the clinical and pathological features of inflammatory fibroid polyp (IFP) of the esophagus and to discuss its diagnosis, differential diagnosis, treatment and prognosis.

METHODS: A case of IFP of the esophagus was investigated by light microscopy and immunohistochemistry. A literature review was then performed to summarize the clinical and pathological features of the disease.

RESULTS: A 71-year-old man presented with epigastric/retrosternal pain and dysphagia for 3 months. Endoscopy revealed a hemispheric lesion, 2.5 cm in size, in the esophageal mucosa about 35 cm from incisors. On EUS, the lesion (13.2 mm × 11 mm) was hypoechogenic and inhomogeneous, and was located under the mucosa of the esophagus, with a clear boundary. Surgical resection of the esophageal mass was performed,

and the final pathologic diagnosis was IFP of the esophagus.

CONCLUSION: IFP of the esophagus is an extremely rare mesenchymal tumor with benign behavior and good prognosis. A correct preoperative diagnosis is difficult and relies on post-operative pathological examination. Surgical excision is the preferred treatment for IFP.

Key Words: Esophageal neoplasm; Inflammatory fibroid polyp; Clinicopathology; Diagnosis; Differential diagnosis

Xie FL, Yao LQ, Yu YH. Clinicopathologic features of inflammatory fibroid polyp of the esophagus. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2012; 20(9): 776-780

摘要

目的: 探讨食管炎性纤维性息肉(inflammatory fibroid polyp, IFP)的临床病理学特征、诊断、鉴别诊断、治疗方法和预后。

方法: 报道1例罕见的食管IFP, 对其进行光镜观察、免疫组织化学染色, 并结合文献探讨该病的临床病理学特征。

结果: 患者为71岁的男性, 因进行性吞咽困难3月余入院, 内镜检查发现食管黏膜距门齿约35 cm处可见一大小约2.5 cm半球状黏膜隆起, 超声内镜见一起源于黏膜层大小约13.2 mm × 11 mm低回声团块, 回声欠均匀, 其间可见无回声影, 边界尚清晰。入院完善相关检查后在全麻下行食管占位切除术, 术后病理显示肿瘤位于黏膜下层, 向食管管腔内隆起生长, 肿瘤主要由3种成分构成: 明显增生的梭形细胞、大量的炎症细胞和血管网, 最后诊断为炎性纤维性息肉。

结论: 食管IFP是一种罕见的间叶源性肿瘤, 术前诊断困难, 确诊依靠术后病理检查。以外科手术或内镜下肿物完整切除为主要治疗方法, 预后良好。

关键词: 食管肿瘤; 炎性纤维性息肉; 临床病理特征; 诊断; 鉴别诊断

■同行评议者

肖恩华, 教授, 中南大学湘雅二医院影像诊断与介入放射学

谢飞来, 姚丽青, 余英豪. 食管炎性纤维性息肉的临床病理特征. 世界华人消化杂志 2012; 20(9): 776-780
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/776.asp>

0 引言

炎性纤维性息肉(inflammatory fibroid polyp, IFP)是胃肠道中一种非常罕见的良性间叶性肿瘤^[1], 可发生于消化系任何部位, 最常发生于胃, 其次为小肠, 发生于食管的极为罕见^[2], 国外仅见少数个案报道^[3-6], 国内尚未见文献报道. 现报道中国人民解放军南京军区福州总医院近期诊治的1例食管IFP, 并复习文献探讨该病的临床病理学特征、诊断、鉴别诊断、治疗方法和预后, 旨在提高对该病的认识.

1 材料和方法

1.1 材料 患者, 男, 71岁, 因“进行性吞咽困难3 mo余”于2011-07-25入院. 缘于3 mo前无明显诱因出现进食梗阻感和吞咽困难, 无恶心、呕吐、腹痛、腹泻, 无咳嗽、胸痛、呼吸困难. 门诊以“食管占位”收入院, 自患病以来, 精神、睡眠尚可, 饮食、二便正常, 体质量略有减轻.

1.2 方法

1.2.1 疾病诊断: (1)入院查体: T: 36.5 °C, P: 76次/min, R: 18次/min, BP: 111/70 mmHg. 发育正常, 营养中等, 神志清楚, 步入病房, 查体合作, 对答切题. 皮肤、黏膜无黄染, 无皮下出血点, 全身浅表淋巴结不肿大. 头颅大小正常, 无畸形及压痛. 双眼睑无水肿, 瞳孔等大等圆, 对光反射灵敏. 外耳廓无畸形, 外耳道未见异常脓血性分泌物, 乳突无压痛. 无鼻塞, 副鼻窦区无压痛. 口腔黏膜正常, 无出血点, 腮腺导管开口未见脓性分泌物, 伸舌居中, 无咽部充血及扁桃体肿大, 咽无红肿. 颈软, 无抵抗, 颈动脉搏动正常, 颈静脉无怒张, 气管居中, 肝颈静脉回流征(-), 甲状腺无肿大, 对称, 无压痛, 无结节. 胸廓无畸形, 呼吸运动对称, 无胸膜摩擦感及皮下捻发感. 叩呈清音. 双肺呼吸清晰, 未闻及干湿性罗音及异常呼吸音, 未闻及胸膜摩擦音. 心前区无隆起, 心尖搏动位于左锁骨中线第5肋间内0.5 cm, 未及心包摩擦感. 相对浊音正常. 心率76次/分, 律齐, 各瓣膜听诊区未闻及心杂音及病理性心音, 未闻及心包摩擦音. 无异常血管征. 腹平软, 腹壁静脉无曲张, 未见胃肠型及蠕动波. 全腹软, 无压痛及反跳痛, 未触及包块, 肝、脾肋下未及, 莫菲氏征(-), 移动性浊音(-). 肠鸣音正常. 肛门

及外生殖器未见异常. 脊柱、四肢无畸形, 脊柱四肢无畸形. 生理反射正常, 病理反射未引出.

(2)辅助检查: 内镜于食管黏膜距门齿约35 cm处可见一大小约2.5 cm半球状黏膜隆起, 上可见裂隙, 表面尚光滑, 贲门通过顺利, 胃底未见异常, 胃体、胃角、胃窦黏膜红白相间, 可见血管网显现及结节状增生, 以胃窦部为明显, 幽门圆, 十二指肠未见异常. 超声内镜: 超声于该病变处可见一起源于黏膜层大小约13.2 mm×11 mm低回声团块, 回声欠均匀, 其间可见无回声影, 边界尚清晰. 入院给予完善相关检查, 排除手术禁忌证后, 于2011-07-31在全麻下行食管占位切除+胃食管吻合术, 术后标本送病理检查.

1.2.2 HE和免疫组织化学染色: 手术标本经40 g/L甲醛溶液固定, 常规石蜡包埋, 4 μm厚切片, HE染色; 采用EliVision法分别进行Vimentin、SMA、Actin、CD34、CD117、Dog-1、Desmin、ALK、Colponin、Ki-67等免疫组织化学染色. 光镜观察. 所用一抗和EliVision试剂盒均购自福州迈新生物技术开发有限公司.

2 结果

辅助检查和超声内镜检查的结果见图1A, B.

2.1 巨检 食管及部分胃切除标本一件, 食管长2.5 cm, 上切缘直径0.8 cm, 下切缘周径6 cm, 紧邻上切缘见一肿物, 大小4 cm×2.5 cm×1.5 cm, 切面灰白灰褐色, 质地中等(图1C).

2.2 镜检 低倍镜下见肿瘤位于黏膜下层, 向食管腔内隆起生长, 表面黏膜糜烂; 高倍镜下见肿瘤主要由3种成分构成: 明显增生的梭形细胞、大量的炎症细胞和血管网, 梭形细胞为卵圆形至梭形, 类似纤维母样的细胞, 胞浆嗜酸性, 细胞核呈空泡状, 圆形或梭形, 无异型性, 核分裂象罕见; 炎症细胞含有大量的嗜酸性粒细胞、少量的淋巴细胞及浆细胞; 局部区域见梭形细胞排列成同心圆状, 类似洋葱皮样结构(图2A, B).

2.3 免疫组织化学染色 肿瘤细胞CD34(图3A)、Vimentin(图3B)、SMA弥漫强阳性, Actin呈弱阳性表达, CD117、Dog-1、Desmin、ALK、Calponin均阴性, Ki-67约10%阳性.

2.4 病理诊断 食管炎性纤维性息肉. 术后随访5 mo无瘤生存.

3 讨论

IFP最早由HELWIG等^[7]于1953年提出, 但VANEK等^[8]更早于1949年首次对其进行了描述, 他们在报道6例胃息肉样肉芽肿病变时将其命名为

■研究前沿

分子生物学研究发现, IFP存在PDGFRA基因突变, 这一成果提示IFP是由PDGFRA基因激活突变引起的肿瘤.

■创新盘点

本文主要对1例食管IFP的临床诊疗经过、病理形态学特征及免疫表型进行总结分析,并复习相关文献,探讨食管IFP的临床及病理形态学特征。



图1 食管炎性纤维性息肉的大体表现. A: 内镜所见; B: 超声内镜所见; C: 术后标本.

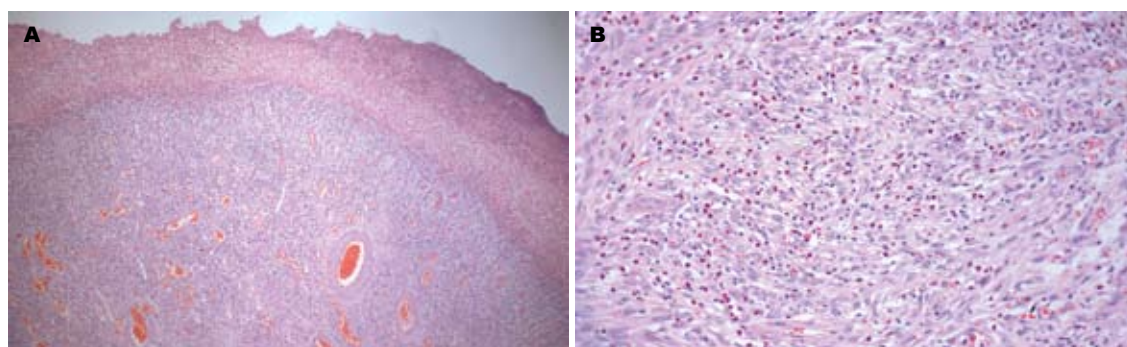


图2 食管炎性纤维性息肉的组织学表现. A: 低倍镜所见; B: 高倍镜所见.

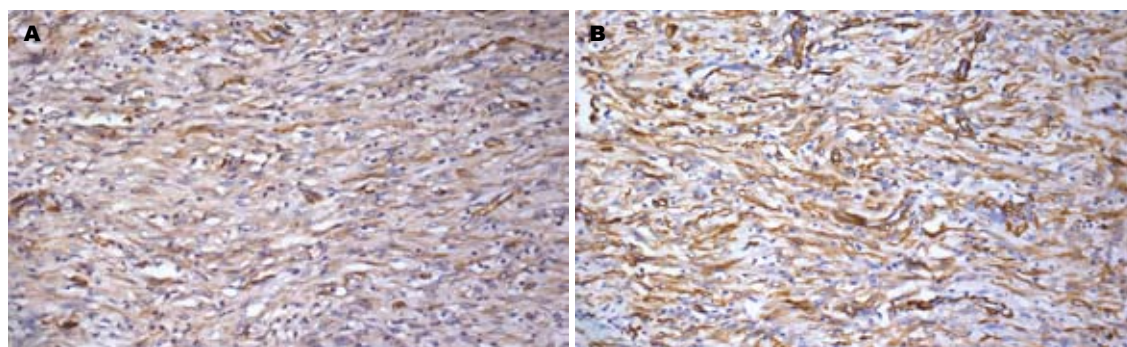


图3 食管炎性纤维性息肉的免疫表型. A: 肿瘤细胞CD34阳性; B: 肿瘤细胞Vimentin阳性.

“胃黏膜下层肉芽肿伴有嗜酸性粒细胞浸润”。在随后的文献中出现了多种不同的命名,如嗜酸性肉芽肿、炎性假瘤、神经纤维瘤、血管外皮瘤、纤维性息肉、伴有嗜酸性粒细胞浸润的胃纤维瘤等^[9]。最新的2010年《WHO消化系统肿瘤病理学和遗传学》第4版分类中采用了IFP的命名,并将其归为肠道间叶源性肿瘤^[1]。

IFP好发于50-70岁的老年人,儿童罕见,男女发病率均等。可发生于消化系任何部位,最常发生于胃(70%),其次为小肠(23%)、结肠和直肠(4%)、胆囊(1%)、十二指肠(1%)、食管(1%)、阑尾(<1%)。临床症状取决于发病部位,可表现为非特异的腹痛、消化系出血或者梗阻

症状,有的偶然发现。大部分文献报道肿瘤直径<2 cm,常有黏膜溃疡,可有蒂并突向腔内。肿瘤灰白色,切面有光泽^[2]。

关于IFP的组织起源及发病机制迄今尚不十分清楚。Pantanowitz等^[10]研究显示肿瘤细胞表达CD35、CD34、Calponin、SMA和CyclinD1,据此提出IFP可能起源于树突细胞并向肌纤维母细胞分化。最近一项研究发现IFP的发生与血小板衍生生长因子受体A (platelet-derived growth factor receptor, PDGFRA)基因激活突变有关,免疫组织化学染色显示IFP表达PDGFRA,分子生物学检测证实IFP存在PDGFRA基因突变,这一成果提示IFP是由PDGFRA基因激活突变引起的

肿瘤^[11].

IFP的诊断需临床病史、内镜检查、影像学检查和病理检查相结合, 术前诊断较困难, 确诊需依靠术后病理组织学和免疫组织化学检查, 但也有文献报道通过内镜、超声内镜和CT扫描检查可在术前取得明确诊断^[12]. 上消化系IFP通过内镜检查可发现, 常形成一突向管腔、表面光滑的肿块, 并伴表面黏膜糜烂, 结肠IFP可在结肠镜下观察到, 小肠IFP常因肠梗阻而在手术时发现, 大体上IFP需与胃肠道间质瘤和黏膜下脂肪瘤相鉴别^[13]. 内镜检查对IFP的明确诊断没有帮助, 仅有10%的胃IFP可在术前取得明确诊断^[14]. 超声内镜检查作为一项有希望的诊断工具已用于胃IFP的诊断. IFP在超声内镜下显示为低回声的、均质状、边界不清的肿物, 常位于胃壁的第2到第3层之间, 内部回声可能与IFP富含血管有关, 这些特征可与GIST和脂肪瘤鉴别^[15,16].

IFP组织学上主要由明显增生的梭形细胞、大量的炎症细胞和弥漫的大小不等的血管网组成, 其中炎症细胞含大量嗜酸性粒细胞. 少数IFP可见梭形细胞排列成同心圆状, 类似洋葱皮样结构. 肿物位于黏膜固有层下, 表面溃疡常见, 可有蒂, 在平滑肌间穿插生长, 可致正常平滑肌萎缩^[17-19]. 应该注意的是嗜酸性粒细胞浸润并不是IFP所特有的特征, 在其他病变中也可以出现^[20]. 电子显微镜观察发现胃肠的IFP有4个重要特征: (1)间充质细胞、纤维母样的细胞、星状细胞和梭形细胞均含有多量的粗面内质网; (2)毛细血管腔内和间质均含炎症细胞(嗜酸性粒细胞、浆细胞、淋巴细胞); (3)富含分枝状的血管网和闭塞的毛细血管; (4)细胞外间质由疏松的颗粒状纤维丝状物组成^[21]. 免疫组织化学染色显示IFP中的梭形细胞几乎100%表达Vimentin和CD34, 不同程度表达平滑肌标记, 如HHF-35、SMA等, 但NSE、S-100、FVIII、Dog-1和CD117均阴性^[22,23].

本例的诊断依据有: (1)患者为老年男性, 临床表现为无明显诱因的进食梗阻感和吞咽困难3 mo余; (2)内镜于食管黏膜距门齿约35 cm处可见一大约2.5 cm半球状黏膜隆起, 上可见裂隙, 表面尚光滑. 超声内镜: 超声于该病变处可见一起源于黏膜层大小约13.2 mm×11 mm低回声团块, 回声欠均匀, 其间可见无回声影, 边界尚清晰; (3)组织学形态: 肿瘤位于黏膜下层, 由疏松的或透明变性的纤维结缔组织构成, 其内有嗜酸性粒细胞及浆细胞浸润. 溃疡表面由肉芽组

织覆盖. 特征性的改变是, 病变内的星状或梭形纤维母细胞围绕着小动脉呈同心圆性排列; (4)免疫组织化学染色肿瘤细胞SMA、Vimentin、CD34弥漫强阳性, Actin呈弱阳性表达, CD117、Dog-1、Desmin、ALK、Calponin均阴性.

食管IFP需与以下肿瘤和瘤样病变鉴别: (1)平滑肌瘤: 是最常见的食管间叶性肿瘤, 由交杂排列的平滑肌细胞束构成, 其间混有多少不等的胶原, 细胞具有两端圆钝雪茄形的细胞核和含有肌原纤维的嗜酸性胞浆, 组织学易与IFP鉴别^[24,25]; (2)胃肠道间质瘤(GIST): 发生于食管的GISTs并不常见, 组织学表现范围较宽, 免疫组织化学显示CD117、CD34和Dog-1阳性可与IFP鉴别^[26-28]; (3)梭形细胞癌: 又称息肉样癌、癌肉瘤和假肉瘤样癌, 常为息肉状向管腔内生长, 肿瘤由2种成分构成, 一种是恶性梭形细胞肉瘤样成分, 另一种是原位或浸润性癌成分, 这种特征性组织学表现容易与IFP鉴别^[29]; (4)纤维血管性息肉: 最常见于食管上1/3, 在环状软骨水平, 常有一长蒂, 由水肿的黏膜、黏膜下层纤维或纤维脂肪组织和血管轴心构成, 而IFP更常见于中段或下段食管, 不常有蒂, 由疏松水肿的肉芽样组织构成, 含有数量不等的单核细胞、浆细胞、中性粒细胞、嗜酸性粒细胞、肥大细胞以及肥胖的梭形纤维母细胞, 两者鉴别不难^[30,31]. 此外, 食管IFP还需与炎症性息肉、增生性息肉等鉴别.

总之, IFP的治疗首选手术, 将肿物完整切除, 既能有效缓解症状, 又能取得明确诊断. 内镜下息肉摘除术是一种理想的方式, 但有并发穿孔和切除不完整、术后局部复发的可能. IFP为良性的间叶性肿瘤, 完整切除后不复发不转移, 预后良好^[2,32].

4 参考文献

- 1 周晓军, 樊祥山. 解读2010年消化系统肿瘤WHO分类(I). 临床与实验病理学杂志 2011; 27: 341-346
- 2 Wysocki AP, Taylor G, Windsor JA. Inflammatory fibroid polyps of the duodenum: a review of the literature. *Dig Surg* 2007; 24: 162-168
- 3 LiVolsi VA, Perzin KH. Inflammatory pseudotumors (inflammatory fibrous polyps) of the esophagus. A clinicopathologic study. *Am J Dig Dis* 1975; 20: 475-481
- 4 Simmons MZ, Cho KC, Houghton JM, Levine CD, Javors BR. Inflammatory fibroid polyp of the esophagus in an HIV-infected individual: case study. *Dysphagia* 1995; 10: 59-61
- 5 Costa PM, Marques A, Távora E, Diaz M. Inflammatory fibroid polyp of the esophagus. *Dis Esophagus* 2000; 13: 75-79
- 6 Godey SK, Diggory RT. Inflammatory fibroid polyp

■同行评价

食管炎性纤维性息肉少见, 本病例报道有助于医师提高对其认识, 有临床意义.

- of the oesophagus. *World J Surg Oncol* 2005; 3: 30
- 7 HELWIG EB, RANIER A. Inflammatory fibroid polyps of the stomach. *Surg Gynecol Obstet* 1953; 96: 335-367
- 8 VANEK J. Gastric submucosal granuloma with eosinophilic infiltration. *Am J Pathol* 1949; 25: 397-411
- 9 Lasota J, Wang ZF, Sobin LH, Miettinen M. Gain-of-function PDGFRA mutations, earlier reported in gastrointestinal stromal tumors, are common in small intestinal inflammatory fibroid polyps. A study of 60 cases. *Mod Pathol* 2009; 22: 1049-1056
- 10 Pantanowitz L, Antonioli DA, Pinkus GS, Shahsfaei A, Odze RD. Inflammatory fibroid polyps of the gastrointestinal tract: evidence for a dendritic cell origin. *Am J Surg Pathol* 2004; 28: 107-114
- 11 Schildhaus HU, Cavlar T, Binot E, Büttner R, Wardelmann E, Merkelbach-Bruse S. Inflammatory fibroid polyps harbour mutations in the platelet-derived growth factor receptor alpha (PDGFRA) gene. *J Pathol* 2008; 216: 176-182
- 12 Fuke H, Hashimoto A, Shimizu A, Yoshimura H, Nakano T, Shiraki K. Computed tomographic image of an inflammatory fibroid polyp of the stomach. *Clin Imaging* 2003; 27: 400-402
- 13 Sadamoto Y, Kubo H, Tanaka M, Szumilo J, Cwik G, Wallner G. Gastrointestinal: gastric inflammatory fibroid polyp. *J Gastroenterol Hepatol* 2001; 16: 1069
- 14 Stolte M, Sticht T, Eidt S, Ebert D, Finkenzeller G. Frequency, location, and age and sex distribution of various types of gastric polyp. *Endoscopy* 1994; 26: 659-665
- 15 Matsushita M, Hajiro K, Okazaki K, Takakuwa H. Gastric inflammatory fibroid polyps: endoscopic ultrasonographic analysis in comparison with the histology. *Gastrointest Endosc* 1997; 46: 53-57
- 16 Chan JK. Images in pathology. GIST versus inflammatory fibroid polyp. *Int J Surg Pathol* 2001; 9: 147
- 17 Johnstone JM, Morson BC. Inflammatory fibroid polyp of the gastrointestinal tract. *Histopathology* 1978; 2: 349-361
- 18 Benjamin SP, Hawk WA, Turnbull RB. Fibrous inflammatory polyps of the ileum and cecum: review of five cases with emphasis on differentiation from mesenchymal neoplasm. *Cancer* 1977; 39: 1300-1305
- 19 Trillo AA, Rowden G. The histogenesis of inflammatory fibroid polyps of the gastrointestinal tract. *Histopathology* 1991; 19: 431-436
- 20 Harned RK, Buck JL, Shekitka KM. Inflammatory fibroid polyps of the gastrointestinal tract: radiologic evaluation. *Radiology* 1992; 182: 863-866
- 21 Navas-Palacios JJ, Colina-Ruizdelgado F, Sanchez-Larrea MD, Cortes-Cansino J. Inflammatory fibroid polyps of the gastrointestinal tract. An immunohistochemical and electron microscopic study. *Cancer* 1983; 51: 1682-1690
- 22 Kuestermann SA, Saleeb SF, Teplick SK. General case of the day. Jejunal intussusception caused by an inflammatory fibroid polyp (IFP). *Radiographics* 1999; 19: 539-541
- 23 Wille P, Borchard F. Fibroid polyps of intestinal tract are inflammatory-reactive proliferations of CD34-positive perivascular cells. *Histopathology* 1998; 32: 498-502
- 24 Linde EM, DiMaio DJ. Solitary esophageal leiomyoma with eosinophilic infiltrate: case report and review of the literature. *Dis Esophagus* 2011; 24: E5-E7
- 25 Jaroszewski DE, Lam-Himlin D, Gruden J, Lidner TK, Etxebarria AA, De Petris G. Plexiform leiomyoma of the esophagus: a complex radiographic, pathologic and endoscopic diagnosis. *Ann Diagn Pathol* 2011; 15: 342-346
- 26 Miettinen M, Lasota J. Gastrointestinal stromal tumors: review on morphology, molecular pathology, prognosis, and differential diagnosis. *Arch Pathol Lab Med* 2006; 130: 1466-1478
- 27 Liegl-Atzwanger B, Fletcher JA, Fletcher CD. Gastrointestinal stromal tumors. *Virchows Arch* 2010; 456: 111-127
- 28 Novelli M, Rossi S, Rodriguez-Justo M, Taniere P, Seddon B, Toffolatti L, Sartor C, Hogendoorn PC, Sciot R, Van Glabbeke M, Verweij J, Blay JY, Hohenberger P, Flanagan A, Dei Tos AP. DOG1 and CD117 are the antibodies of choice in the diagnosis of gastrointestinal stromal tumours. *Histopathology* 2010; 57: 259-270
- 29 Battifora H. Spindle cell carcinoma: ultrastructural evidence of squamous origin and collagen production by the tumor cells. *Cancer* 1976; 37: 2275-2282
- 30 McLean JN, DelGaudio JM. Endoscopic resection of a giant esophageal polyp: case report and review of the literature. *Am J Otolaryngol* 2007; 28: 115-117
- 31 王芳, 李兰, 杨红鹰. 食管纤维血管性息肉2例报道. 诊断病理学杂志 2011; 18: 138-139
- 32 Park YB, Chung DY, Kim JI, Park SH, Cho SH, Han JY, Kim JK, Choi KY. A large inflammatory fibroid polyp in the sigmoid colon treated by endoscopic resection. *Intern Med* 2007; 46: 1647-1649

编辑 张姗姗 电编 闫晋利

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.

Ghrelin在食管腺癌、Barrett's食管黏膜中的表达

甄云飞, 曲海霞, 王青

甄云飞, 曲海霞, 王青, 青岛大学医学院附属青岛市立医院消化科(东院) 山东省青岛市 266071

甄云飞, 硕士, 主要从事食管癌方向的研究。

作者贡献分布: 甄云飞与王青对此文所作贡献均等; 此课题由甄云飞、曲海霞及王青设计; 研究过程由甄云飞与王青操作完成; 研究所用试剂及分析工具由王青提供; 数据分析由甄云飞完成; 本论文的写作由甄云飞、曲海霞及王青完成。

通讯作者: 王青, 主任医师, 266071, 山东省青岛市东海中路5号, 青岛大学医学院附属青岛市市立医院东区消化科。

qingwangqingdao@yahoo.com.cn.

电话: 0532-88905630

收稿日期: 2011-11-04 修回日期: 2012-02-08

接受日期: 2012-02-27 在线出版日期: 2012-03-28

Ghrelin expression in esophageal adenocarcinoma and Barrett's esophagus

Yun-Fei Zhen, Hai-Xia Qu, Qing Wang

Yun-Fei Zhen, Hai-Xia Qu, Qing Wang, Department of Gastroenterology, Qingdao Municipal Hospital Affiliated to Qingdao University Medical College, Qingdao 266071, Shandong Province, China

Correspondence to: Qing Wang, Chief Physician, Department of Gastroenterology, Qingdao Municipal Hospital Affiliated to Qingdao University Medical College, 5 Donghai Middle Road, Qingdao 266071, Shandong Province, China. qingwangqingdao@yahoo.com.cn

Received: 2011-11-04 Revised: 2012-02-08

Accepted: 2012-02-27 Published online: 2012-03-28

Abstract

AIM: To investigate the expression of Ghrelin in the esophageal mucosa of patients with esophageal adenocarcinoma and those with Barrett's esophagus (BE).

METHODS: Thirty patients with esophageal adenocarcinoma, 35 patients with BE, and 35 normal controls were enrolled in the study. The expression of Ghrelin in specimens taken from the above subjects was detected by immunohistochemistry.

RESULTS: The expression of Ghrelin in esophageal adenocarcinoma was lower than that in normal controls and patients with BE. The expression of Ghrelin in the BE group was higher than that in the control group (1.34 ± 0.51 vs 4.86 ± 0.82 vs 3.54 ± 0.79 , $F = 27.21$, $P < 0.05$). In the

esophageal adenocarcinoma group, the expression of Ghrelin in moderately and well differentiated specimens were higher than that in poorly differentiated specimens ($Z = 4.60$, $P < 0.05$).

CONCLUSION: The expression of Ghrelin in the esophageal adenocarcinoma is different from that in BE. The level of Ghrelin changes during the evolution of esophageal cancer. Disruption of the esophageal Ghrelin-producing mechanism may occur during esophageal carcinogenesis. There is an association between the degree of esophageal carcinoma differentiation and Ghrelin production.

Key Words: Esophageal adenocarcinoma; Barrett's esophagus; Ghrelin; Immunohistochemistry

Zhen YF, Qu HX, Wang Q. Ghrelin expression in esophageal adenocarcinoma and Barrett's esophagus. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2012; 20(9): 781-783

摘要

目的: 研究Ghrelin在食管腺癌、Barrett's食管(barrett esophagus, BE)和正常食管黏膜中的表达。

方法: 选取30例食管腺癌患者、35例BE患者及35例健康对照, 所有受试者均行胃镜检查, 记录内镜下表现, 在食管部位四象限活检取材, 标本经10%甲醛固定, 石蜡包埋, 连续切片, 分别用于改良HE染色及免疫组织化学, 采用免疫组织化学方法检测Ghrelin在食管黏膜组织中的表达水平。

结果: Ghrelin在食管腺癌组食管黏膜中的表达水平低于健康对照组和BE组, 在BE组食管黏膜中的表达高于健康对照组, 差异有统计学意义(1.34 ± 0.51 vs 4.86 ± 0.82 vs 3.54 ± 0.79 , $F = 27.21$, $P < 0.05$)。食管腺癌组中, Ghrelin在中高分化腺癌患者食管黏膜的表达水平高于低分化腺癌, 差异有统计学意义($Z = 4.60$, $P < 0.05$)。

结论: Ghrelin在BE、食管腺癌黏膜中的表达不同, 提示了Ghrelin在食管癌变前和癌变后的变化。食管腺癌组织恶变过程中其Ghrelin

■背景资料

Ghrelin是生长激素促分泌物受体的内源性配体, 生物作用极为广泛, 他与GHS-R几乎表达于人体所有的正常组织中, 此外多种肿瘤组织中也已检测到Ghrelin及其受体, 大量证据显示Ghrelin/GHS-R轴在细胞增殖及癌症发生中起着重要作用。

■同行评议者

程英升, 教授, 主任医师, 同济大学附属第十人民医院影像临床医学中心

■相关报道

Konturek等报道 Ghrelin可能通过抗炎作用防止BE向食管癌方向发展。

的分泌机制发生了改变, 且与食管腺癌细胞分化程度有关。

关键词: 食管腺癌; Barrett's食管; Ghrelin; 免疫组织化学

甄云飞, 曲海霞, 王青. Ghrelin在食管腺癌、Barrett's食管黏膜中的表达. 世界华人消化杂志 2012; 20(9): 781-783
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/781.asp>

0 引言

Ghrelin是由28个氨基酸组成的多肽, 能够刺激人类及其他哺乳动物的垂体释放生长激素. 他主要由胃黏膜组织分泌^[1], 同时存在于其他多种组织中, 包括正常组织及癌变组织. 食管癌是发生在食管上皮组织的恶性肿瘤, 我国是食管癌的高发区, 约90%为鳞状细胞癌, 少数为腺癌, 来自Barrett's食管(barrett esophagus, BE)或食管异位胃黏膜的柱状上皮^[2]. BE作为一种公认的癌前病变, 其腺癌发生率较正常人高30-50倍. 本实验将通过免疫组织化学染色法检测Ghrelin在食管活检黏膜中的表达, 以探讨Ghrelin在食管腺癌、BE发病过程中所起的生物学作用, 为预防及治疗食管腺癌、BE提供进一步的依据。

1 材料和方法

1.1 材料 病例入选标准: 食管腺癌: 病理诊断为食管腺癌, 且病灶位于胃食管交界(gastroesophageal junction, GEJ)齿状线上方, 未行化疗、放疗等治疗. Barrett's食管: 依据2006年10月三亚《中国胃食管反流病共识意见》^[3], 内镜检查发现食管远端有明显的柱状上皮化生并得到病理学检查证实. 健康对照组: 无反酸、异物感、胸痛等临床表现, 胃镜检查结果食管部分正常, 胃黏膜活检正常或仅有轻度炎症, 无其他系统溃疡或癌症. 选择青岛市市立医院东西两院、青医附院2006-01/2011-02符合入选标准的食管腺癌患者30例, 男16例, 女14例, 年龄为53-87岁, 平均65.8岁±8.3岁; BE患者35例, 男19例, 女16例, 年龄为39-71岁, 平均60.6岁±9.1岁; 选择同期健康对照组35例, 男18例, 女17例, 年龄为32-79岁, 平均59.8岁±9.6岁. 所有患者均知情同意. 各组间的年龄分布及性别构成差异无统计学意义($P>0.05$).

1.2 方法

1.2.1 胃镜检查与病理活检: 所有患者均行胃镜检查, 记录内镜下表现, 食管腺癌组在病变明显

处12、3、6、9点方向每隔2 cm做四象限活检取材, BE组在鳞柱状上皮交界与GEJ之间沿病变的整个长轴四象限活检取材, 对照组在食管近GEJ端四象限活检取材. 共取4块. 标本经10%甲醛固定, 石蜡包埋, 连续切片, 分别用于改良HE染色及免疫组织化学检查。

1.2.2 Ghrelin的检测: 应用SABC免疫组织化学方法检测, DAB染色, 苏木素复染. 用已知阳性片作阳性对照, 以PBS代替一抗作为阴性对照. 胞浆内含棕黄色颗粒沉积为阳性. 根据阳性细胞所占的比率和染色强度进行半定量评分. 在400倍高倍镜下, 随机选择10个视野, 计算10个视野评分的平均值作为细胞阳性染色的最终评分. 按阳性细胞比例将0-25%、26%-50%、51%-75%、76%-100%分别计为1-4分, 按染色强度将阴性着色、浅黄色、浅褐色、深褐色分别计为0-3分, 最后综合两部分得分. 试剂来自于北京博奥森生物技术有限公司。

统计学处理 定量资料应用mean±SD表示, 两组间均数比较采用 t 检验, 多组间均数比较采用方差分析, 部分数据采用秩和检验. 所有数据处理均采用SPSS13.0统计软件包进行。

2 结果

2.1 Ghrelin在食管黏膜组织中的表达 Ghrelin在食管腺癌、BE、健康对照食管黏膜中有不同水平的表达, 食管腺癌组的Ghrelin评分较BE组和健康对照组减少, BE组的Ghrelin评分较健康对照组增加, 差异有统计学意义(1.34 ± 0.51 vs 4.86 ± 0.82 vs 3.54 ± 0.79 , $F=27.21$, $P<0.05$).

2.2 Ghrelin在食管腺癌不同病理分级中的表达 30例食管腺癌患者中有13例中-高分化腺癌, 17例低分化腺癌, Ghrelin在中-高分化腺癌中的表达高于低分化腺癌, 差异有统计学意义($Z=4.60$, $P<0.05$).

3 讨论

Ghrelin是生长激素促分泌物受体(GHS-R)的内源性配体, 首先由Kojima和Kangawa在大鼠体内发现^[4]. 大部分循环Ghrelin(高达60%-70%)由胃产生, 小部分(约30%)由小肠产生. Ghrelin生物作用极为广泛, 与多种激素的分泌有关^[5], 同时还能调控摄食、能量平衡, 促进胃肠动力, 增加胃酸分泌, 调节糖代谢及胰岛素分泌^[6]. Ghrelin与GHS-R几乎表达于人体所有的正常组织中, 此外多种肿瘤组织中也已检测到Ghrelin及其受

体, 大量证据显示Ghrelin/GHS-R轴在细胞增殖及癌症发生中起着重要作用。目前Ghrelin分子及其受体在各种恶性肿瘤中的表达问题一直存在争议, 争议的焦点集中在Ghrelin在肿瘤发展方面是致癌还是预防癌症发生。据报道, Ghrelin在甲状腺癌、肺癌等肿瘤中的表达增加, 而在胃癌^[7]、结直肠癌^[8]等肿瘤中的表达降低, 但在食管肿瘤中的研究却涉及较少。研究者曾报道血清中较高浓度的Ghrelin能够预防食管腺癌的发生, 尤其是超重人群^[9]。本实验通过免疫组织化学方法测定Ghrelin在入选食管腺癌患者食管黏膜中的表达, 发现Ghrelin在食管腺癌中的表达较健康对照组减少($P<0.05$), 且与腺癌细胞的分化程度有关, Ghrelin在中-高分化腺癌中的表达要明显高于低分化腺癌($Z = 4.60, P<0.05$)。据报道, Ghrelin在垂体腺瘤^[10]、乳腺癌^[11]等肿瘤中的表达水平与癌细胞分化程度有关。

BE是指食管远端黏膜的复层鳞状上皮被化生的柱状上皮所替代。目前认为BE是食管腺癌的一种癌前病变, 早期发现早期治疗对降低食管癌的发病率具有重要意义^[12,13]。已有的研究显示, 在肥胖人群中, 与正常食管鳞状上皮相比, BE食管上皮细胞中GHS-R的表达明显上调, 可能与肥胖者Ghrelin分泌减少有关^[14]。本实验BE患者食管黏膜中, Ghrelin的表达较对照组明显增加($P<0.05$), 这种差异可能与本试验未限制样本体质指数范围有关, 下一步研究可考虑将BE分为肥胖组和正常体质量组, 进行对照研究。

BE组的Ghrelin评分较健康对照组增加, 食管腺癌组的Ghrelin评分较BE组减少, 而且中-高分化腺癌的Ghrelin评分高于低分化腺癌, 这说明从正常食管到BE到食管腺癌过程中, Ghrelin的表达经历了从上升到下降的过程, 而且随着细胞恶性程度的增高, 其表达水平进一步下降。目前这一变化的具体机制尚不明确, 有研究表明, 将食管癌细胞系OE-19暴露于TNF α 下培养, COX-2和IL-1 β 表达增多, Ghrelin能够减弱这一过程, 从而推测Ghrelin可能通过抗炎作用防止BE向食管癌方向进展^[14]。当Ghrelin抗炎作用过度或缺乏时, 可能会出现非可控炎症, 非可控炎症对癌症发病机理意义深远^[15]。

总之, 食管腺癌组织恶变过程中其Ghrelin的分泌机制发生了改变, 且与食管腺癌细胞分化程度有关, 具体机制有待进一步研究。

4 参考文献

- 1 Ariyasu H, Takaya K, Tagami T, Ogawa Y, Hosoda K, Akamizu T, Suda M, Koh T, Natsui K, Toyooka S, Shirakami G, Usui T, Shimatsu A, Doi K, Hosoda H, Kojima M, Kangawa K, Nakao K. Stomach is a major source of circulating ghrelin, and feeding state determines plasma ghrelin-like immunoreactivity levels in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86: 4753-4758
- 2 陆再英, 钟南山. 内科学. 第7版. 北京: 北京人民卫生出版社, 2010: 376-377
- 3 中国胃食管反流病共识意见专家组. 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
- 4 Kojima M, Hosoda H, Date Y, Nakazato M, Matsuo H, Kangawa K. Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature* 1999; 402: 656-660
- 5 Hosoda H, Kojima M, Kangawa K. Biological, physiological, and pharmacological aspects of ghrelin. *J Pharmacol Sci* 2006; 100: 398-410
- 6 van der Lely AJ, Tschöp M, Heiman ML, Ghigo E. Biological, physiological, pathophysiological, and pharmacological aspects of ghrelin. *Endocr Rev* 2004; 25: 426-457
- 7 An JY, Choi MG, Noh JH, Sohn TS, Jin DK, Kim S. Clinical significance of ghrelin concentration of plasma and tumor tissue in patients with gastric cancer. *J Surg Res* 2007; 143: 344-349
- 8 D'Onghia V, Leoncini R, Carli R, Santoro A, Giglioni S, Sorbellini F, Marzocca G, Bernini A, Campagna S, Marinello E, Vannoni D. Circulating gastrin and ghrelin levels in patients with colorectal cancer: correlation with tumour stage, Helicobacter pylori infection and BMI. *Biomed Pharmacother* 2007; 61: 137-141
- 9 de Martel C, Haggerty TD, Corley DA, Vogelstein JH, Orentreich N, Parsonnet J. Serum ghrelin levels and risk of subsequent adenocarcinoma of the esophagus. *Am J Gastroenterol* 2007; 102: 1166-1172
- 10 Kim K, Arai K, Sanno N, Osamura RY, Teramoto A, Shibasaki T. Ghrelin and growth hormone (GH) secretagogue receptor (GHSR) mRNA expression in human pituitary adenomas. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2001; 54: 759-768
- 11 Cassoni P, Papotti M, Ghè C, Catapano F, Sapino A, Graziani A, Deghenghi R, Reissmann T, Ghigo E, Muccioli G. Identification, characterization, and biological activity of specific receptors for natural (ghrelin) and synthetic growth hormone secretagogues and analogs in human breast carcinomas and cell lines. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86: 1738-1745
- 12 中华医学会消化病学分会. Barrett食管诊治共识(2011修订版. 重庆). 中华消化内镜杂志 2011; 28: 421-422
- 13 史学森, 王立金, 郝慧菁, 王丽娟, 张永玉, 马春玉. 反流性食管炎、Barrett食管和食管腺癌的研究. 胃肠病学 2010; 15: 233-236
- 14 Konturek PC, Burnat G, Rau T, Hahn EG, Konturek S. Effect of adiponectin and ghrelin on apoptosis of Barrett adenocarcinoma cell line. *Dig Dis Sci* 2008; 53: 597-605
- 15 Nathan C, Ding A. Nonresolving inflammation. *Cell* 2010; 140: 871-882

■同行评价

本研究证明Ghrelin与食管癌的发生存在一定关联, 对临床上这一疾病的诊疗提供了一定的参考价值。

编辑 张姗姗 电编 闫晋利

进展期食管胃交界腺癌临床病理分析319例

杨琳, 朱玥璐, 王斌, 袁燕玲, 郭蕾, 张海峰, 薛新华, 吕宁

■背景资料

食管胃交界腺癌的流行病学特征、临床病理特征、生物遗传学特征以及预后相关因素等多方面的认知有待深入。

杨琳, 朱玥璐, 袁燕玲, 郭蕾, 张海峰, 薛新华, 吕宁, 北京协和医学院中国医学科学院肿瘤医院病理科 北京市 100021
王斌, 中国中医科学院广安门医院 北京市 100034
杨琳, 主治医师, 在职博士研究生, 主要从事肿瘤病理诊断及相关研究。

作者贡献分布: 本课题由杨琳与吕宁共同设计; 研究过程中病例随访及资料整理由杨琳、朱玥璐、郭蕾、袁燕玲及薛新华完成; 数据分析由杨琳、王斌及张海峰共同完成; 写作由杨琳完成, 吕宁指导并修改。

通讯作者: 吕宁, 100021, 北京市朝阳区潘家园南里17号, 北京协和医学院中国医学科学院肿瘤医院病理科. nlu03@126.com

收稿日期: 2011-11-05 修回日期: 2011-12-20

接受日期: 2012-02-27 在线出版日期: 2012-03-28

Clinicopathological and prognostic analysis of 319 cases of advanced esophageal gastric adenocarcinoma

Lin Yang, Yue-Lu Zhu, Bin Wang, Yan-Ling Yuan, Lei Guo, Hai-Feng Zhang, Xin-Hua Xue, Ning Lv

Lin Yang, Yue-Lu Zhu, Yan-Ling Yuan, Lei Guo, Hai-Feng Zhang, Xin-Hua Xue, Ning Lv, Department of Pathology, Cancer Hospital, Chinese Academy of Medical Sciences, Pecking Union Medical College, Beijing 100021, China

Bin Wang, Guang'anmen Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 10034, China

Correspondence to: Ning Lv, Department of Pathology, Cancer Hospital, Chinese Academy of Medical Sciences, Pecking Union Medical College, Beijing 100021, China. nlu03@126.com

Received: 2011-11-05 Revised: 2011-12-20

Accepted: 2012-02-27 Published online: 2012-03-28

Abstract

AIM: To explore the clinicopathological features and prognostic factors in patients with advanced oesophagogastric adenocarcinoma (OGA), and to assess the applicability of the AJCC TNM staging guideline (7th edition) in OGA.

METHODS: The clinical data for 319 cases of surgically removed advanced OGA were retrospectively reviewed, and survival analysis was made by the Kaplan-Meier method.

RESULTS: The 1-, 3-, and 5-year survival rates were 62%, 44% and 35%, respectively. Patients with localized OGA had a higher survival rate

than those with infiltrative disease. Diameter of tumor, grade, infiltration depth and lymph node metastasis were significantly correlated with lower survival rate (all $P < 0.01$). Patients with the Lauren infiltration subtype had a lower survival rate than those with intestinal and mixed subtypes. The survival rate had no difference among patients with stages N1-N3 disease (N staging according to AJCC guideline), but was significantly lower in patients with more than 10 metastatic lymph nodes than in those with less than 10 metastatic lymph nodes.

CONCLUSION: Tumor diameter, infiltration depth, grade and Lauren classification are associated with prognosis in patients with esophago-gastric adenocarcinoma. N staging according to AJCC guideline (7th Ed) can not reveal prognostic significance, which suggests that OGA should have unique staging guidelines instead of referring to gastric or esophageal adenocarcinomas.

Key Words: Esophagogastric adenocarcinoma; Clinicopathological analysis; Prognosis

Yang L, Zhu YL, Wang B, Yuan YL, Guo L, Zhang HF, Xue XH, Lv N. Clinicopathological and prognostic analysis of 319 advanced esophageal gastric adenocarcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2012; 20(9): 784-789

摘要

目的: 探讨进展期食管胃交界腺癌临床病理特征、Siewert分型、Lauren分型与预后的关系, 观察新版AJCC分期指南在食管胃交界腺癌中的适用性。

方法: 回顾性分析319例具有完整随访资料的进展期食管胃交界腺癌的临床病理特征, 采用Kaplan-Meier方法进行生存分析。

结果: 319例进展期食管胃交界腺癌的1年、3年、5年总生存率分别为62%、44%和35%。局限型患者生存率高于浸润型; 肿瘤最大径 <5 cm患者生存率比5 cm以上患者高; 肿瘤分化程度、浸润深度(T分期)和淋巴结转移与低生存率相关($P < 0.01$); 按照AJCC第7版

■同行评议者

曹秀峰, 教授, 南京医科大学附属南京第一医院肿瘤中心

中N分期标准分组, 组间未见生存差异, 而将淋巴结转移数目以10为界, 发现10个以上淋巴结转移的病例生存率显著低于10个以内者($P<0.05$); Lauren 弥漫型病例生存率显著低于肠型和混合型, 而肠型和混合型之间无明显差异; Siewert三型病例之间生存率无明显差异($P>0.05$).

结论: 食管胃交界腺癌肿瘤最大径、浸润深度、分化程度、Lauren分型等临床病理特征与预后相关, 其中AJCC第7版分期指南中所参照的食管癌N分期标准并不能揭示预后意义, 提示食管胃交界腺癌有其独特的临床病理学特征, 有必要研究并建立食管胃交界腺癌适用的分期标准, 而不仅仅是参照食管癌或胃癌现有标准.

关键词: 食管胃交界腺癌; 临床病理分析; 预后

杨琳, 朱玥璐, 王斌, 袁燕玲, 郭蕾, 张海峰, 薛新华, 吕宁. 进展期食管胃交界腺癌临床病理分析319例. 世界华人消化杂志 2012; 20(9): 784-789
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/784.asp>

0 引言

2000年《WHO classification of Tumors of the Digestive System》明确将发生于远端食管鳞状上皮和贲门腺上皮移行区的癌命名为食管胃交界腺癌(adenocarcinoma of the oesophagogastric junction, OGA), 并提出应区别于下段食管癌和近端胃癌; 不主张沿用有误导含义的词“贲门癌”^[1], 2010年新版《WHO classification of Tumors of the Digestive System》重申了上述定义, 并提出其TNM分期标准依据肿瘤主体位置分别沿用食管腺癌和胃腺癌的标准^[2]. 此前, 国内对发生于食管胃交界区域的腺癌统称为“贲门癌”, 并定义为食管胃交界线下2 cm范围之内, 并且由于解剖部位不清而曾分别归类于食管癌和胃癌进行统计^[3]. 然而, 外科手术范围基本共识的是Siewert等依据解剖学提出的3型: I型为远端食管腺癌, 主要来源于Barrett食管; III型为贲门下癌, 而II型肿瘤中心位于食管胃交界(oesophagogastric junction, OGJ)近侧1 cm远侧2 cm之间^[4]. Siewert I型手术方式与食管癌相似, 而II、III型治疗上应采取与胃癌相似的标准^[5]. 目前, 虽然大多数学者承认OGA是一独特的临床类型, 但有不少学者对现行TNM分期对OGA的适用性提出质疑. 由于OG交界位于体内胸腔和腹腔交叉处, 淋巴引流有2个不同方向, 近心

方向向纵隔引流, 而远心方向向腹腔淋巴结引流. Siewert I型OGA除向腹腔转移外, 更易于向纵隔淋巴结转移, 而SiewertIII型更倾向于向腹腔淋巴结转移. 按现行TNM分期系统, Siewert I型可按食管癌进行分期, SiewertIII型可按胃癌进行分期, 但SiewertII型OGA的肿瘤真正处在OGJ位置上, 如何进行N分期还是一个有待进一步探讨的问题^[6]. 2010年国际抗癌联盟(UICC)和美国癌症联合会(AJCC)联合制定的第7版《癌症分期手册》将OGA作为一种相对独立的疾病并将其归类与分期等同于食管腺癌分期标准, 这与原有食管癌分期的不同在于, 将转移淋巴结的数目考虑其中; 而与胃癌分期的不同是, 将膈上淋巴结考虑为区域而非远处转移. 然而, 新版分期系统将OGA作为一个相对独立的疾病来认识的同时而其分期标准仍分别参照食管和胃, 所引用的数据来源于4 000余例食管癌研究数据, 缺乏来自食管胃交界腺癌本身的研究数据来检验这个标准的科学性和实用性^[7]. 因此, AJCC第7版分期指南将食管胃交界腺癌等同于食管腺癌的分期标准究竟能否反映出食管胃交界腺癌独特的临床病理学特征有待深入探讨. 另外, Lauren分型对胃癌的发生发展尤其是环境因素与癌的关系具有重要的揭示意义, 但对于食管胃交界腺癌是否也有同样的流行病学和预后方面的意义尚待研究^[1,2]. 因此有必要按照WHO定义、AJCC/UICC分期指南、Siewert分型以及Lauren分型等回顾性分析食管胃交界腺癌的临床病理学特征, 探索其可能的发生发展及相关预后因素, 为进一步研究其生物学行为、制定合理的防治方案等奠定必要的科学基础.

1 材料和方法

1.1 材料 调阅中国医学科学院肿瘤医院病理科2002-07-01/2004-12-31存档数据库(病理号230532-262922号段)中涵盖进展期食管胃交界腺癌共436例, 其中具有完整病理资料和随访结果的319例纳入本研究中.

1.2 方法 复阅病理存档资料及所有病理切片, 记录大体和镜下所见. 包括肿瘤大小、大体分型、肿瘤中心距离食管胃交界线的距离(Siewert分型的依据); 并由2名高级医师独立复阅全部病理切片, 核实病理诊断, 包括肿瘤组织学类型、分化程度、浸润深度、边界是否清楚、淋巴结转移数等. 如诊断不一致, 则由上述2名医师共

■ 相关报道

2006年, 我国学者白纪纲等首次按照Siewert分型报道了203例中国人食管胃交界腺癌, 发现其Siewert I型比例及癌旁肠上皮化生发病率与西方国家及日韩显著不同.

■创新盘点

本研究严格按照WHO的OGA定义,进行临床病理特征相关预后分析.发现AJCC第7版分期指南中所参照的食管腺癌N分期标准并不能揭示预后,提示食管胃交界腺癌有其独特的临床病理学特征,有必要研究并建立食管胃交界腺癌适用的分期标准,而不仅仅是参照食管癌或胃癌现有标准.

同讨论达成一致诊断意见.将所有入选进展期食管胃交界腺癌根据肿瘤大体边界是否清楚分为局限型和浸润型;根据瘤体中心距离食管胃交界线的距离分为Siewert I型(瘤体中心位于食管胃交界线上方2 cm之外)、II型(瘤体中心位于食管胃交界线上1 cm至线下2 cm之间)、III型(瘤体中心位于食管胃交界线下2 cm以外);Lauren分型依据于肿瘤镜下腺管状结构的比例,简言之,Lauren肠型包括高、中分化腺癌为主要成分;Lauren弥漫型指的是镜下细胞黏附力差,无或少有腺管结构形成,以印戒细胞癌和部分低分化腺癌为主要成分;Lauren混合型指肠型和弥漫型形态比例相当.按照AJCC/UICC TNM分期指南第7版将所有进展期食管胃交界腺癌分为T2(浸润肌层)、T3(浸润浆膜及浆膜下脂肪)、T4(浸透管壁全层并侵犯邻近组织和器官);N0(无淋巴结转移), N1(1-2个淋巴结转移), N2(3-6个淋巴结转移), N3(7个或7个以上淋巴结转移)4组^[8].

统计学处理 通过门诊随诊记录及电话随访的方式,随诊时间2-81 mo;记录随访结果(生存、死亡、截止),用例数和百分比来描述临床资料.采用Kaplan-Meier方法进行生存分析,Log-rank检验统计量, $P<0.05$ 有统计学意义.

2 结果

2.1 临床病理特征 319例食管胃交界腺的临床病理特征见表1. 319例进展期食管胃交界腺癌中,男性270例,女性49例(男女比例5.5:1);年龄31-105岁,平均年龄69岁,中位年龄65岁.按照10岁年龄分段,其中40岁以下2例(0.6%),40-49岁5例(1.6%),50-59岁44例(13.8%),60-69岁109例(34.1%),70-79岁115例(35.9%),80-89岁41例(12.8%),90岁以上3例(0.9%).可见,本组病例中60-80岁为高发年龄段,占总病例数的70%.

2.2 随访结果及生存分析(Kaplan-Meier法) 将436例进展期食管胃交界腺癌中具有完整随诊记录的319例进行生存分析.结果显示其1年、3年、5年总生存率分别为62%、44%和35%.按照大体分型、Siewert分型、Lauren分型、浸润深度以及肿瘤分化程度分组,分别进行Kaplan-Meier分析比较生存曲线.作者发现局限型患者生存率高于浸润型;肿瘤最大径 <5 cm患者生存率比5 cm以上患者高;肿瘤分化程度、浸润深度(T分期)和淋巴结转移与低生存率相关($P<0.01$). Siewert III型病例之间生存率无明显差异,Lauren

表 1 食管胃交界腺癌临床病理特征 ($n = 319$)

分组	病理特征	<i>n</i>	%
大体分型	局限型	173	54.2
	浸润型	146	45.8
Siewert分型	I型	7	2.2
	II型	215	67.4
	III型	97	30.4
Lauren分型	肠型	134	42.1
	混合型	48	15.0
	弥漫型	137	42.9
肿瘤最大径	≤ 5 cm	123	38.6
	> 5 cm	196	61.4
浸润深度(T分期)	肌层(T2)	18	5.6
	浆膜(T3)	288	90.3
	浆膜外(T4)	13	4.1
分化程度	高分化	13	3.7
	中分化	138	38.9
	低分化	204	57.5
受累淋巴结数目	0	59	18.5
	1-10	199	62.4
	> 10	61	19.1

弥漫型病例生存率显著低于肠型和混合型,而肠型和混合型之间无明显差异($P>0.05$),生存函数如图1A-F所示.

所有病例中,无淋巴结转移组(59例)和淋巴结转移组(260例)生存率有差异趋势,但差异不显著($P = 0.316$)(图2A).按照AJCC-TNM分期指南第7版“食管胃交界腺癌淋巴结分期标准”分为N0(无淋巴结转移),N1(1-2个淋巴结转移),N2(3-6个淋巴结转移),N3(7个或7个以上淋巴结转移)4组,各组之间生存率未见明显差异(图2B).作者将淋巴结转移个数以10为界,分为2组,发现10个以上淋巴结转移的病例生存率显著低于10个以内者($P<0.05$,图2C).

3 讨论

2000年《WHO消化系统肿瘤病理学和遗传学》提出“食管胃交界(oesophagogastric, OG)”概念,OG交界是食管并入胃的解剖学区域.横跨食管和胃交界处的腺癌称为食管胃交界腺癌.然而,由于存在不同的分类系统,所以对OGA的病

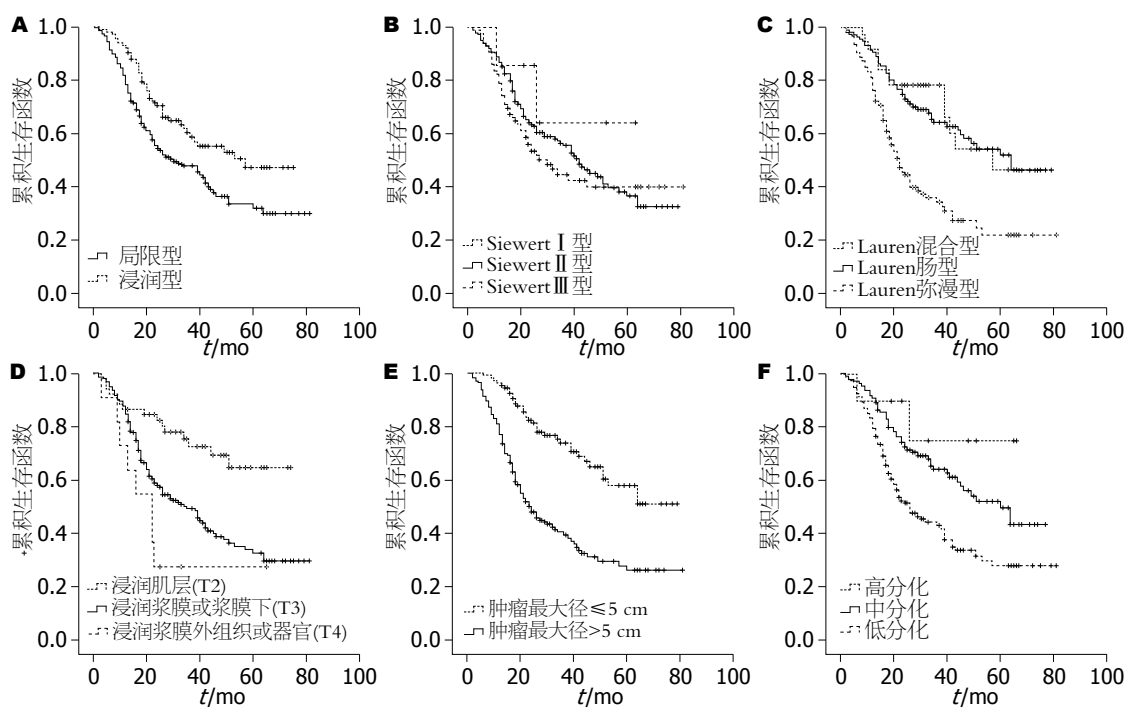


图1 食管胃交界腺癌临床病理学特征与预后的关系(Kaplan-Meier分析)。A: 肿瘤大体局限型和浸润型的生存曲线; B: 按Siewert分型分层的生存曲线; C: 按Lauren分型分层的生存曲线; D: 按肿瘤浸润深度(T分期)分层的生存曲线; E: 按肿瘤最大径分层的生存曲线; F: 按肿瘤分化程度分层的生存曲线。

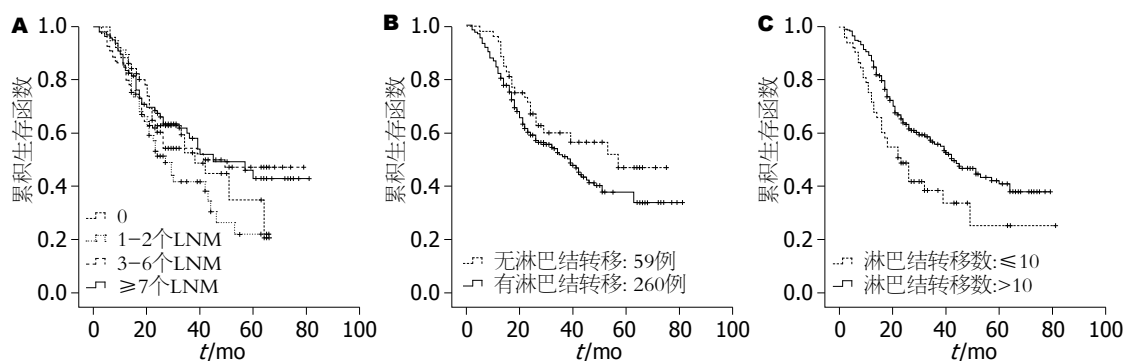


图2 淋巴结转移对预后的影响(Kaplan-Meier分析, Log-Rank检验)。A: 按照7th AJCC-TNM分期指南“食管胃交界腺癌的淋巴结分期标准同食管癌”, N0-N3四组间生存函数无明显差异($P>0.05$); B: 按有无淋巴结转移, 2组间具有差别趋势($P=0.149$); C: 淋巴结转移组中, 转移数目>10的病例组预后显著低于10个以内转移者($P<0.05$)。

应用要点

本研究取自单一中心样本数据分析表明, 食管胃交界腺癌相关临床病理特征(包括Lauren型别, 分化程度, 浸润深度, 淋巴结转移数目等)与其预后有一定相关性, 部分特征尤其是N分期与食管癌和胃癌有所不同。AJCC第7版食管胃交界腺癌的TNM分期标准中N分期标准并不能准确反映食管胃交界腺癌的预后。有待更大样本研究证实并建立新的TNM分期标准。

群研究就显得很不一致, 10年后的新版《WHO消化系统肿瘤病理学和遗传学》仍然缺乏OGA的可靠流行病学资料^[2]。2009年AJCC/UICC肿瘤TNM分期指南中主要基于一项多中心的食管癌研究数据而提出OGA的分期标准等同于食管腺癌。然而, 由于缺乏食管胃交界腺癌本身的临床病理数据分析, 上述这类源于食管癌研究所得依据显然不够充分。基于此, 本研究回顾性分析食管胃交界腺癌的临床病理学特征并进行预后分析, 以探索其可能发生发展及相关预后因素, 为进一步研究其生物学行为、制定合理的防治方案等奠定必要的科学基础。

流行病学研究发现东西方国家食管胃交

界腺癌的发病率及Siewert型别比例有差异。德国、美国、意大利等西方国家食管胃交界腺癌呈逐年递增趋势并且Siewert分类3型比例相当; 而日本、韩国、中国台湾等近20年食管胃交界腺癌发病率增加不明显且Siewert I型比例显著低于西方国家^[9]; 2006年, 我国学者白纪纲等首次按照Siewert分型报道了203例中国人食管胃交界腺癌, 发现其Siewert I型比例及癌旁肠上皮化生发病率与西方国家及日韩显著不同^[10]。我们的研究发现Siewert I型显著低于德国等西方国家比例, 这与来自日本人群的研究^[9]以及白纪纲等^[10]一致; 提示食管胃交界腺癌的发病可能具有种群或地域特征, 值得深入研究, 以更好地

■名词解释

食管胃交界腺癌: 横跨食管胃交界线(EGJ)的腺癌, 完全位于EGJ上方的腺癌界定为食管腺癌; 完全位于EGJ下方的腺癌界定为“胃近端癌”或“胃体癌”。

指导其防治问题。

Lauren分类对评估胃癌的自然病史非常有用, 尤其是关于他与环境因素、癌前病变的关系。根据肿瘤镜下腺管成分的多少, 被分为2种主要类型: 肠型和弥漫型, 那些肠型和弥漫型比例大致相当的称为混合型。Lauren肠型胃癌的发生发展及预后与弥漫型胃癌不同^[1,2]。那么, 他对于食管胃交界腺癌的预后有无影响? 我们的数据表明, Lauren弥漫型病例预后明显低于肠型和/或混合型, 这与胃癌的研究一致^[1,2], 仅有少数文献涉及食管胃交界腺癌的Lauren分型与预后的关系, 我们的结果与文献一致^[11]。这提示Lauren分型一定程度上能揭示食管胃交界腺癌的预后, 那么他与食管胃交界腺癌中的发病即肠上皮化生和/或不典型增生等是否也有揭示作用呢? 需要进一步深入研究, 这将有助于建立食管胃交界腺癌的早期防治措施。

AJCC第7版^[8]提出食管胃交界腺癌的分期标准同食管腺癌, 并将肿瘤的镜下分级整合到TNM分期中。T1肿瘤侵及黏膜下层; T2肿瘤侵及固有肌层; T3肿瘤侵及纤维膜; T4肿瘤侵及邻近器官。N代表区域淋巴结转移情况, 采用四分法: Nx无法确定淋巴结转移情况, N0无淋巴结转移, N1 1-2个淋巴结转移, N2 3-6个淋巴结转移, N3 ≥ 7 个淋巴结转移。肿瘤组织的镜下分级包括: Grade X无法评估级别; Grade 1(高分化)-95%以上均为腺管成分; Grade 2(中分化)腺管成分占50%-95%; Grade 3(低分化)腺管成分 $<50\%$ 。按照上述分期标准分析我们的数据发现, 进展期食管胃交界腺癌的浸润深度(T分期)、分化程度与预后相关, 而根据上述淋巴结分期标准分组, 组间并无生存率的差别。为此, 我们在本组数据中探索了淋巴结转移情况对预后的影响, 将所有319例进展期食管胃交界腺癌按照有无淋巴结转移分为2组(分别为59例和260例), 进行生存率的比较, 发现2组间具有差别趋势($P = 0.149$)。进而, 将有淋巴结转移组按照淋巴结转移数目是否 >10 分为2组, 发现2组生存率具有显著差异。

将淋巴结转移数目用于评价食管癌和胃癌的N状态已经得到广泛认可。Hagen及Lerut等的研究表明, 食管癌中淋巴结转移个数的增加与生存率的下降密切相关^[12,13]。但采用多少枚转移淋巴结作为N分期的分界值以及采用多少级划分法仍存在较大争议。Zhang等^[14]对1 146例食管鳞癌患者的病例资料进行回顾性分析, 将患者按淋巴将转移数为0, 1, 2, 3, ≥ 4 分为5组, 结

果后3组间生存率无显著差异, 而当分为0, 1, ≥ 2 分3组后, 他们之间的生存率有显著差异($P < 0.001$)。

由于食管胃交界特殊的解剖部位, 历来食管胃交界腺癌的命名和分期标准均难与食管癌和胃癌分开。AJCC第7版食管胃交界腺癌的分期标准同食管腺癌, 这个标准的建立是依据一项多中心4 627个食管癌病例分析总结而成。这里有2方面需要仔细斟酌: 其一, 上述4 627例来自不同的医学中心, 采用的手术方法并不尽一致, 而不同的手术径路清扫淋巴结范围及数量可能不同, 对预后分析就会产生影响。罗礼嘉等^[15]对482例胸中段食管鳞癌进行预后分析, 采用左胸入路者350例, 右胸入路者132例, 结果发现右胸组平均清扫淋巴结数目显著多于左胸组(16.3枚 vs 11.8枚, $P < 0.001$), 3年无病生存期右胸组与左胸组相比有显著提高(25.09 mo vs 22.92 mo, $P = 0.039$); 其二, AJCC第7版食管胃交界腺癌的TNM分期标准并没有依据于其本身的数据分析, 而是借用了食管腺癌的TNM分期标准, 尤其是N分期采用上述四分法, 可能更多是为了与第7版胃癌分期保持一致。但我们的研究表明, 这种仅为了与食管腺癌和胃癌保持一致而采取的四分法进行N分期, 并不能准确反映食管胃交界腺癌的预后。

2010年第7版AJCC肿瘤TNM分期指南虽有很大进步, 但仍未将食管胃交界腺癌真正独立开来。因此, 有必要从食管胃交界腺癌的现有定义, 进行深入的临床病理特征与预后的分析来揭示其独特的发生发展规律。本研究取自单一中心样本数据分析表明, 食管胃交界腺癌相关临床病理特征(包括Lauren型别、分化程度、浸润深度、淋巴结转移数目等)与其预后有一定相关性, 部分特征尤其是N分期与食管癌和胃癌有所不同。我们认为, 食管胃交界腺癌特殊的解剖部位需要特殊的对待和分析, 应该选取更大样本, 最好是来自同一研究中心、相同术式的病例进行预后相关的回顾性分析, 才能更准确地揭示这一特殊部位腺癌独特的临床病理学特征, 以更科学地指导其防治研究。

4 参考文献

- 1 Stanley RH, Lauri AA. World Health Organization Classification of Tumours. Pathology & Genetics Tumours of the Digestive System. 3th edition. Lyon: IARC Press, 2000: 32-36
- 2 Fred TB, Fatima C, Ralph HH, Neil DT. World Health Organization Classification of Tumours.

- WHO classification of Tumours of the Digestive System. 4th edition. Lyon: IARC Press, 2010: 40-44
- 3 孙秀娣, 牧人, 周有尚, 戴旭东, 张思维, 皇甫小梅, 孙杰, 李连弟, 鲁凤珠, 乔友林. 中国胃癌死亡率20年变化情况分析及其发展趋势预测. 中华肿瘤杂志 2004; 26: 4-9
- 4 Siewert JR, Stein HJ. Classification of adenocarcinoma of the oesophagogastric junction. *Br J Surg* 1998; 85: 1457-1459
- 5 陈克能. 食管胃交界部腺癌新分期的解读及综合治疗新模式. 中华胃肠外科杂志 2010; 13: 640-641
- 6 Pedrazzani C, de Manzoni G, Marrelli D, Roviello F. It is time for a proper staging system for adenocarcinoma of the gastroesophageal junction. *J Clin Oncol* 2007; 25: 907-908; author reply 907-908
- 7 Hasegawa S, Yoshikawa T. Adenocarcinoma of the esophagogastric junction: incidence, characteristics, and treatment strategies. *Gastric Cancer* 2010; 13: 63-73
- 8 Stephen BE, David RB, Carolyn CC, April GF, Frederick, LG, Andrew T. *AJCC Cancer Staging Manual*. 7th Edition. New York: Springer, 2010: 103-111
- 9 Hasegawa S, Yoshikawa T, Cho H, Tsuburaya A, Kobayashi O. Is adenocarcinoma of the esophagogastric junction different between Japan and western countries? The incidence and clinicopathological features at a Japanese high-volume cancer center. *World J Surg* 2009; 33: 95-103
- 10 白纪刚, 党诚学. 食管胃连接部腺癌新的分型标准在中国的应用. 中南大学学报(医学版) 2007; 32: 138-143
- 11 Polkowski W, van Sandick JW, Offerhaus GJ, ten Kate FJ, Mulder J, Obertop H, van Lanschot JJ. Prognostic value of Laurén classification and c-erbB-2 oncogene overexpression in adenocarcinoma of the esophagus and gastroesophageal junction. *Ann Surg Oncol* 1999; 6: 290-297
- 12 Hagen JA, DeMeester SR, Peters JH, Chandrasoma P, DeMeester TR. Curative resection for esophageal adenocarcinoma: analysis of 100 en bloc esophagectomies. *Ann Surg* 2001; 234: 520-530; discussion 530-531
- 13 Lerut T, Nafteux P, Moons J, Coosemans W, Decker G, De Leyn P, Van Raemdonck D, Ectors N. Three-field lymphadenectomy for carcinoma of the esophagus and gastroesophageal junction in 174 R0 resections: impact on staging, disease-free survival, and outcome: a plea for adaptation of TNM classification in upper-half esophageal carcinoma. *Ann Surg* 2004; 240: 962-972; discussion 972-974
- 14 Zhang HL, Chen LQ, Liu RL, Shi YT, He M, Meng XL, Bai SX, Ping YM. The number of lymph node metastases influences survival and International Union Against Cancer tumor-node-metastasis classification for esophageal squamous cell carcinoma. *Dis Esophagus* 2010; 23: 53-58
- 15 罗孔嘉, 傅剑华, 胡祎, 戎铁华, 林鹏, 王欣, 杨弘, 郑斌, 李永锋. 左右胸两种入路治疗胸中段食管鳞癌的手术评价. 癌症 2009; 28: 1260-1264

■同行评价

食管胃结合部癌到底是食管癌还是贲门癌已争论多年, 直至近年才有比较明确的研究方向。本文是一篇该研究的佐证, 文章的科学性、创新性和可读性能较好地反映国际胃肠病学临床和基础研究的先进水平。

编辑 曹丽鸥 电编 闫晋利

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)

肝断面血流阻断器在肝癌切除术中的应用

周松, 薛小军, 李冉冉, 陈达丰, 陈文有, 刘广欣, 柯恩明, 郑硕云

■背景资料

肝血流阻断方法众多, 各有优缺点, 如技术要求高、使用器械昂贵、血流阻断不彻底等。本研究采用自制的肝断面血流阻断器实施局部血流阻断, 目的是尽可能减少对正常肝组织的副损伤, 最大限度地保护肝功能。

周松, 薛小军, 李冉冉, 陈达丰, 陈文有, 刘广欣, 柯恩明, 郑硕云, 中国人民解放军第175医院(厦门大学附属东南医院)普通外科 福建省漳州市 363000

作者贡献分布: 本课题由周松设计, 所有作者均参与手术操作的主要过程; 论文撰写及数据统计分析由周松与薛小军共同完成。

通讯作者: 周松, 副教授, 363000, 福建省漳州市漳华中路269号, 厦门大学附属东南医院普通外科。zscxy@sina.com
电话: 0596-2975541 传真: 0596-2975535
收稿日期: 2011-08-03 修回日期: 2011-12-30
接受日期: 2012-02-27 在线出版日期: 2012-03-28

Application of hepatic blood blocker to control bleeding during hepatectomy

Song Zhou, Xiao-Jun Xue, Ran-Ran Li, Da-Feng Chen, Wen-You Chen, Guang-Xin Liu, En-Ming Ke, Shuo-Yun Zheng

Song Zhou, Xiao-Jun Xue, Ran-Ran Li, Da-Feng Chen, Wen-You Chen, Guang-Xin Liu, En-Ming Ke, Shuo-Yun Zheng, Department of General Surgery, the 175th Hospital of Chinese PLA (the Southeast Affiliated Hospital of Xiamen University), Zhangzhou 363000, Fujian Province, China

Correspondence to: Song Zhou, Associate Professor, Department of General Surgery, the Southeast Affiliated Hospital of Xiamen University, 269 Zhanghua Middle Road, Zhangzhou 363000, Fujian Province, China. zscxy@sina.com

Received: 2011-08-03 Revised: 2011-12-30

Accepted: 2012-02-27 Published online: 2012-03-28

Abstract

AIM: To compare a new tool named hepatic blood blocker versus the Pringle maneuver and hemihepatic vascular exclusion in controlling bleeding during hepatectomy for liver cancer.

METHODS: The clinical data for 117 patients who underwent hepatectomy for liver cancer from 2004 to 2009 were analyzed retrospectively. Of these patients, 42 underwent local hepatic blood occlusion with hepatic blood blocker (group A), 35 underwent hemihepatic vascular exclusion (group B), and 40 underwent the Pringle maneuver (group C). The blood loss, operative time, postoperative hepatic function and complications were compared among each group.

RESULTS: The average blood loss and operative time were significantly less in group A than

in groups B ($P < 0.05$, 0.001) and C (both $P < 0.001$). Significant differences were seen between group A and group C in serum total bilirubin (TB) and alanine transaminase (ALT) on postoperative days 3 and day 7, and group A showed better hepatic function (TB: $P = 0.014$, 0.009 ; ALT: both $P < 0.001$). The Pringle maneuver significantly increased the rate of postoperative abdominal dropsy when compared to group A ($P < 0.001$). In group C, two patients suffered from liver failure, one suffered from alimentary tract hemorrhage and one died.

CONCLUSION: Using hepatic blood blocker during hepatectomy could effectively control bleeding, reduce operative time and preserve hepatic function, representing a safe and feasible technique.

Key Words: Liver cancer; Hepatectomy; Local hepatic blood occlusion; Hemihepatic vascular exclusion; Pringle maneuver

Zhou S, Xue XJ, Li RR, Chen DF, Chen WY, Liu GX, Ke EM, Zheng SY. Application of hepatic blood blocker to control bleeding during hepatectomy. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2012; 20(9): 790-794

摘要

目的: 比较不同的肝血流阻断方法在肝切除术中应用的有效性及安全性。

方法: 回顾性分析我院2004-2009年117例行肝切除术的肝癌患者的相关资料。A组: 自制肝断面血流阻断器局部血流控制($n = 42$); B组: 解剖性半肝血流阻断($n = 35$); C组: 第一肝门阻断(Pringle法, $n = 40$)。比较3组患者术中出血量和手术时间、术后肝功能的恢复以及术后并发症的发生率。

结果: 术中出血量和手术时间A组均明显少于B($P = 0.026$, $P < 0.001$)、C($P < 0.001$, $P < 0.001$)组。A组术后第3、7天肝功能(TB、ALT)的明显好于C组(TB: $P = 0.014$, $= 0.009$; ALT: $P < 0.001$, $P < 0.001$)。C组术后有29例出现不同程度的腹水, 术后腹水发生率显著高于A组($P < 0.001$); 2例发生肝功能衰竭, 1例出现胃肠

■同行评议者

施晓雷, 副主任医师, 南京大学医学院附属鼓楼医院

道出血, 死亡1例。

结论: 肝切除术中采用肝断面血流阻断器能有效控制出血、缩短手术时间, 对肝功能影响小, 是一种简便、安全有效的方法。

关键词: 肝癌; 肝切除术; 局部血流控制; 半肝血流阻断; 第一肝门阻断

周松, 薛小军, 李冉, 陈达丰, 陈文有, 刘广欣, 柯恩明, 郑硕云. 肝断面血流阻断器在肝癌切除术中的应用. 世界华人消化杂志 2012; 20(9): 790-794

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/790.asp>

0 引言

如何控制术中出血一直是肝脏手术中的关键问题, 出血量的多少和血流阻断引起的肝脏缺血再灌注损伤是影响术后肝功能的重要因素^[1], 直接关系到患者的预后. 在以下的研究中, 我们采用自制的肝断面血流阻断器控制术中出血. 该研究回顾性地分析了本院近年收治的117例原发性肝癌患者的病例资料, 其中采用肝断面血流阻断器行局部血流控制实施肝切除术42例、半肝血流阻断法肝切除术35例、Pringle法肝切除术40例, 现分析报道如下。

1 材料和方法

1.1 材料 2004-03/2009-06本院因原发性肝癌行肝切除手术患者117人, 其中用自制肝断面血流阻断器法(A组)42例, 男32例, 女10例, 年龄12-76岁(平均51.3岁); 病灶长径3-20cm(平均8.2 cm); 肝功能Child分级A级32例, B级10例. 半肝血流阻断法(B组)35例, 男28例, 女性7例, 年龄18-74岁(平均52.1岁); 病灶长径4-22 cm(平均7.9 cm); 肝功能Child分级A级30例, B级5例. Pringle法(C组)40例, 男31例, 女性9例, 年龄20-75岁(平均50.8岁); 病灶长径4-20cm(平均7.8 cm); 肝功能Child分级A级30例, B级10例. 3组患者术前外周血白蛋白(albumin, A)、总胆红素(total bilirubin, TB)、谷丙转氨酶(alanine aminotransferase, ALT)、肝功能Child分级、手术范围均无显著差异($P = 0.143, 0.630, 0.068, 0.047$). 术后病理学检查均为原发性肝细胞癌或胆管细胞癌。

1.2 方法

1.2.1 治疗: 自制肝断面血流阻断器组: 根据病灶所在部位, 按“无瘤术”原则距病灶 ≥ 2 cm用电刀在肝表面作切线标记, 于预定切线近侧2-3 cm用自制肝断面血流阻断器(图1, 2)收紧行局部肝



图1 自制肝断面血流阻断器(专利号: ZL 200920318267·X)。



图2 肝断面血流阻断器安放在预定切线近心端约2-3 cm。

血流控制, 随后用钳夹法断肝^[2]. 半肝血流阻断法组: 根据病变部位解剖出供应左半肝或右半肝的肝动脉、门静脉分支, 预置半肝血流阻断带, 游离病侧半肝后收紧半肝血流阻断带, 结合肝面缺血线和肿瘤部位用电刀在肝表面作切线标记, 钳夹法断肝. Pringle法组: 游离肝脏并游离第一肝门预先放置阻断带, 明确癌灶位置及拟切除方式, 进行肝切除的同时进行第一肝门的血流阻断, 切除过程中每15-20 min开放一次, 每次约5 min, 以减少肝脏的热缺血损伤。

1.2.2 肝功能检测: 所有患者在术前、术后3 d和术后7 d分别测定外周A、TB和ALT。

统计学处理 计量资料以mean \pm SD表示, 术前A、TB、ALT水平采用单因素方差分析法检验; 术后A、TB、ALT水平采用Nemenyi检验; 肝功能Child分级差异采用Kruskal-Wallis H检验, 检验水准 $\alpha = 0.05$; 术后并发症发生率采用 χ^2 检验, 检验水准经校正后 $\alpha' = 0.0125$, 用SPSS13.0软件进行统计学分析。

2 结果

所有患者肿瘤均完整切除, 无手术死亡, 手术切除范围组间差异无统计学意义($P = 0.620$, 表1). 术中出血量和手术时间A组均明显少于B组($P = 0.026, P < 0.001$)、C组($P < 0.001, P < 0.001$; 表2), 差异有统计学意义. A、B两组的术后肝功能以

■ 研发前沿

目前对肝脏血流阻断引起的肝脏缺血再灌注损伤、门静脉系统脏器功能改变及预缺血处理对肝功能的保护作用机制研究较多, 如何既能有效控制出血又能最大限度地保护肝功能, 是肝脏血流阻断技术要同时兼顾又相互冲突的两个方面。

■创新盘点

该研究在肝切除术前使用肝血流阻断器行肝脏血流阻断,这是一个自制的手术器械,能对拟切除的肝组织施行全血阻断,效果良好。

表 1 术前肝功能及切除范围比较 ($n = 117$)

分组(n)	mean \pm SD(95%CI)			Value	P值
	A(42)	B(35)	C(40)		
A(g/L)	34.87 \pm 4.15 (33.58, 36.16)	35.96 \pm 4.60 (34.38, 37.54)	36.90 \pm 5.10 (35.26, 38.53)	1.977	0.143
TB(μ mol/L)	14.27 \pm 3.61 (13.14, 15.39)	13.44 \pm 4.22 (11.99, 14.48)	13.80 \pm 3.59 (12.65, 14.95)	0.464	0.630
ALT(U/L)	35.98 \pm 6.00 (34.11, 37.85)	36.53 \pm 7.00 (34.13, 38.93)	33.43 \pm 5.69 (31.61, 35.25)	2.748	0.068
肝功能(Child A/B/C)	32/10/0	30/5/0	30/10/0	1.508	0.470
切除范围(n)				2.671	0.620
肝单段切除	7	5	5		
联合肝段切除	25	20	27		
半肝切除	10	10	8		

表 2 手术效果及术后肝功能分析 ($n = 117$)

分组(n)	mean \pm SD(95%CI)			P值	
	A(42)	B(35)	C(40)	A vs B	A vs C
出血量(mL)	532.86 \pm 77.34 (508.76, 556.96)	638.00 \pm 160.05 (583.02, 692.98)	1121.25 \pm 265.33 (1036.39, 1206.11)	0.026	<0.001
手术时间(min)	175.62 \pm 25.56 (167.65, 183.59)	210.60 \pm 31.73 (190.70, 212.50)	210.82 \pm 31.18 (200.85, 220.80)	<0.001	<0.001
A (g/L)					
术后第3天	31.11 \pm 4.02 (29.83, 32.37)	30.43 \pm 3.43 (29.26, 31.61)	31.75 \pm 3.92 (30.40, 33.10)	0.672	0.069
术后第7天	30.65 \pm 4.03 (29.39, 31.70)	29.45 \pm 3.62 (28.21, 30.60)	29.34 \pm 3.94 (28.08, 30.60)	0.307	0.227
TB(μ mol/L)					
术后第3天	30.91 \pm 6.14 (29.00, 32.83)	32.63 \pm 5.99 (30.58, 34.69)	36.20 \pm 12.45 (32.22, 40.18)	0.605	0.014
术后第7天	20.84 \pm 6.20 (18.96, 22.71)	23.76 \pm 7.23 (21.28, 26.25)	25.00 \pm 6.32 (22.98, 27.03)	0.094	0.009
ALT(U/L)					
术后第3天	159.53 \pm 10.30 (156.32, 162.74)	164.75 \pm 18.11 (158.53, 170.97)	236.88 \pm 44.32 (223.94, 249.82)	0.599	<0.001
术后第7天	50.10 \pm 5.84 (48.28, 51.92)	53.14 \pm 6.90 (50.77, 55.51)	72.91 \pm 11.89 (69.11, 76.71)	0.221	<0.001

■应用要点

肝断面血流阻断器在临床实际应用中有良好的血流阻断效果,并在多家医院的使用中受到一致的好评;由于其使用简便,且可反复使用、价格便宜,对经济状况不佳的患者是良好的选择。

及胸水、腹水、胃肠道出血、肝功能衰竭等并发症的发生率均无显著差异($P > 0.05$; 表2, 3)。C组术后第3、7天血TB、ALT水平与A组相比比较高,差异有统计学意义(TB: $P = 0.014$, $= 0.009$; ALT: $P < 0.001$, < 0.001 ; 表2)。C组术后有29例出现不同程度的腹水,术后腹水发生率显著高于A组(72.5% vs 33.3%, $P = 0.001$; 表3); C组中有2例发生肝功能衰竭,1例出现胃肠道出血,死亡1例。

3 讨论

肝脏是双血供器官,每分钟大约有1 500 mL血液流经肝脏。肝切除术中,如何控制出血是首要问

题。良好的血流阻断,不仅能减少出血,易于手术的操作,更能减少术后并发症,利于患者恢复,降低病死率^[3,4]。一百多年前,Pringle^[5]提出阻断第一肝门处的肝动脉、门静脉血流可以明显减少肝切除术中的出血,采用间断阻断法可以满足长时间手术的要求。但是也存在一些不足,如间歇期出血;只阻断了入肝血流,肝静脉回流出血无法控制;由于抑制了肝脏的血供,对肝功能影响较大^[6,7],增加了肝功能异常特别是肝硬化患者术后肝衰竭的风险;对经门静脉回流血液的腹腔器官功能也有不同程度的影响^[8,9],同时对全身血流动力学也有较明显的影响^[10]。但因其

表 3 术后并发症发生率及近期死亡率比较 ($n = 117$)

分组(n)	$n(\%)$			P 值	
	A(42)	B(35)	C(40)	A vs B	A vs C
胸腔积液	5(11.9)	4(11.4)	5(12.5)	1.000	1.000
腹腔积液	14(33.3)	13(37.1)	29(72.5)	0.913	0.001
消化系出血	0	0	1(2.5)		0.980
肝功能衰竭	0	0	2(5.0)		0.453
死亡	0	0	1(2.5)		0.980

操作简单、实用, 除肝门区肿瘤外, 几乎可用于各种类型的肝切除术, 所以至今仍被临床广泛应用。

我国是肝炎高发区, 肝癌患者大多合并有不同程度的肝硬化, 限制了Pringle法的应用。半肝血流阻断法不仅能达到和Pringle相同的阻断效果, 同时不影响残肝血供, 减轻了肝功能损害, 更适合于合并有肝功能异常的患者^[11,12], 同时由于保证了胃肠道血液的回流, 保护肠屏障功能^[13]。但肝硬化患者肝门部有大量曲张的侧支血管, 肝门部解剖时出血较多, 而且费时, 需要较高的技术水平。

在A组病例中, 我们采用自制的肝断面血流阻断器阻断预切除区的血供, 手术时, 充分游离需切除的肝脏, 自肝脏脏面、下腔静脉旁放置阻断器底座, 然后从肝脏上方及膈面(于预定切线近侧2-3 cm)将软绳固定于底座上的绳卡上, 收紧软绳, 使阻断器与肝包膜完全贴附, 范围从一个肝段到左右半肝都可采用。由于采用了软绳和可滑动的绳卡, 软绳收紧后能与肝脏表面充分接触, 能适应肝脏形态的变化, 不易滑脱, 即使肝实质较厚本法局部血流控制的效果也较确切。

从理论上讲, 局部血流控制是一种最理想的肝血流控制方法, 其优点如下: (1)血流阻断彻底, 采用肝血流阻断器可完全阻断了肝断面来自于肝动脉、门静脉、肝静脉的血流, 术中出血明显减少, 同时可避免因术中挤压导致的肿瘤肝内播散和远处转移, 更加符合无瘤术的原则; (2)由于只对需要切除的组织进行阻断, 可持续阻断, 断肝时不受时间限制, 由于操作简单、术野清晰, 总的手术时间反而缩短, 减轻了手术创伤; (3)选择性高, 能选择性阻断拟被切除的肝叶(段), 对肝功能影响小, 不影响胰腺、胃肠道等器官的血液回流, 患者术后并发症少、恢复快^[14,15]; (4)由于阻断范围相对较小, 对全身血流

动力学无明显影响。

通过对照分析可以看出, 与Pringle法和半肝血流阻断法相比, 采用肝断面血流阻断器进行局部血流阻断具有器械固定牢固、操作简单、血流阻断彻底、最大限度保护肝功能、对全身血流动力学小等优点, 是一种控制出血的有效简便的方法, 除不适合紧邻第二、三肝门的肿瘤及合并肝静脉和下腔静脉癌栓的肝肿瘤等高难度肿瘤的切除外, 可满足绝大多数肝切除术, 对肝功能异常甚至肝硬化患者也适用。然而肝癌的治疗包括严格掌握手术适应证, 充分术前准备, 认真仔细的手术操作, 术后密切观察病情及时有效的支持治疗, 血流阻断只是辅助手术操作的手段, 其具体方法的选择要综合考虑患者肝功能、术前影像学检查结果及术中探查的具体情况。

4 参考文献

- 1 许戈良, 英卫东. 肝切除术中肝脏功能的影响因素及其评估. 世界华人消化杂志 2010; 18: 3721-3723
- 2 周松, 郑硕云, 陈达丰, 刘广欣, 林得志, 叶森明, 邹耀祥. 自制肝钳血流控制在肝切除术中的应用. 腹部外科杂志 2008; 21: 100-101
- 3 Dixon E, Vollmer CM, Bathe OF, Sutherland F. Vascular occlusion to decrease blood loss during hepatic resection. *Am J Surg* 2005; 190: 75-86
- 4 Batignani G, Zuckermann M. Inferior approach for the isolation of the left-middle hepatic veins in liver resections: a safe way. *Arch Surg* 2005; 140: 968-971
- 5 Pringle JH. V. Notes on the Arrest of Hepatic Hemorrhage Due to Trauma. *Ann Surg* 1908; 48: 541-549
- 6 Brooks AJ, Hammond JS, Girling K, Beckingham IJ. The effect of hepatic vascular inflow occlusion on liver tissue pH, carbon dioxide, and oxygen partial pressures: defining the optimal clamp/release regime for intermittent portal clamping. *J Surg Res* 2007; 141: 247-251
- 7 Pietsch UC, Herrmann ML, Uhlmann D, Busch T, Hokema F, Kaisers UX, Schaffranietz L. Blood lactate and pyruvate levels in the perioperative period of liver resection with Pringle maneuver. *Clin Hemorheol Microcirc* 2010; 44: 269-281
- 8 Ypsilantis P, Lambropoulou M, Grapsos A, Tentis I, Tsigalou C, Panopoulou M, Simopoulos C. Pringle maneuver deteriorates gut barrier dysfunction in-

■名词解释

肝断面血流阻断器: 是在“L”形的底座上套装一个绳卡, 绳卡可自由滑动, 与底座对应的弹片上有固定软绳的金属环, 软绳经底座的引导槽自末端引出, 通过金属环固定于绳卡。通过转动摇柄可收紧软绳, 实施血流阻断。

■同行评价

本研究采用自制的肝断面血流阻断器能达到控制局部血流,减少术中出血,缩短手术时间,减少肝脏损伤,减少术后系列并发症,在肝切除应用中具有良好价值。

- duced by extended-liver radiofrequency ablation. *Dig Dis Sci* 2011; 56: 1548-1556
- 9 Unalp OV, Aydin U, Yazici P, Nart D, Yenisey C, Kavak T, Zeytunlu M, Coker A. The effects of the Pringle maneuver on the pancreas: can octreotide be protective? *JOP* 2009; 10: 284-291
- 10 Furka A, Nemeth N, Gulyas A, Brath E, Peto K, Takacs IE, Furka I, Sapy P, Miko I. Hemorheological changes caused by intermittent Pringle (Baron) maneuver in beagle canine model. *Clin Hemorheol Microcirc* 2008; 40: 177-189
- 11 杨甲梅, 童颖, 谢峰, 徐峰, 阙彤, 沈伟峰, 吴孟超. 半肝血流完全阻断无血肝切除的临床研究. *中华外科杂志* 2007; 45: 186-188
- 12 Nakazawa T, Ohara H, Ando T, Hayashi K, Naitoh I, Okumura F, Tanaka H, Sano H, Joh T. Clinical course and indications for steroid therapy of sclerosing cholangitis associated with autoimmune pancreatitis. *Hepatogastroenterology* 2009; 56: 584-588
- 13 乔治, 李荣, 黎洁良, 姚咏明, 李基业, 陆连荣. 半肝与全肝入肝血流阻断下肝切除术后肠道细菌易位影响对比研究. *中国实用外科杂志* 2008; 28: 878-879
- 14 Moug SJ, Smith D, Leen E, Angerson WJ, Horgan PG. Selective continuous vascular occlusion and perioperative fluid restriction in partial hepatectomy. Outcomes in 101 consecutive patients. *Eur J Surg Oncol* 2007; 33: 1036-1041
- 15 Makino I, Chijiwa K, Kondo K, Ohuchida J, Kai M. Prognostic benefit of selective portal vein occlusion during hepatic resection for hepatocellular carcinoma. *Surgery* 2005; 137: 626-631

编辑 李军亮 电编 闫晋利

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者服务, 为他们的患者及基础研究提供进一步的帮助。

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

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

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

Fascin和MMP-9在肝内胆管癌组织中的表达及临床意义

刘俊, 李灼日, 毛先海

刘俊, 李灼日, 海南省人民医院肝胆外科 海南省海口市 570311

毛先海, 湖南省人民医院肝胆外科 湖南省长沙市 410005

刘俊, 医师, 主要从事肝胆胰疾病的基础与临床研究.

作者贡献分布: 此课题由刘俊、李灼日及毛先海共同设计完成.

通讯作者: 李灼日, 主任医师, 570311, 海南省海口市秀华路19号, 海南省人民医院肝胆外科. lzf59@hotmail.com

电话: 0899-68622105

收稿日期: 2012-01-08 修回日期: 2012-02-18

接受日期: 2012-03-06 在线出版日期: 2012-03-28

Clinical significance of expression of fascin and MMP-9 in hilar cholangiocarcinoma

Jun Liu, Zhuo-Ri Li, Xian-Hai Mao

Jun Liu, Zhuo-Ri Li, Department of Hepatobiliary Surgery, Hainan Provincial People's Hospital, Haikou 570311, Hainan Province, China

Xian-Hai Mao, Department of Hepatobiliary Surgery, Hunan Provincial People's Hospital, Changsha 410005, Hunan Province, China

Correspondence to: Zhuo-Ri Li, Chief Physician, Department of Hepatobiliary Surgery, Hainan Provincial People's Hospital, 19 Xiuhua Road, Haikou 570311, Hainan Province, China. lzf59@hotmail.com

Received: 2012-01-08 Revised: 2012-02-18

Accepted: 2012-03-06 Published online: 2012-03-28

Abstract

AIM: To detect the expression of fascin and matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) in hilar cholangiocarcinoma and to analyze their clinical significance.

METHODS: The expression of fascin and MMP-9 was examined by immunohistochemistry in 56 cases of hilar cholangiocarcinoma and 14 cases of normal tissue of the bile duct.

RESULTS: The positive rates of fascin and MMP-9 expression in hilar cholangiocarcinoma were obviously higher than those in normal tissue of the bile duct (58.9% vs 0%, 73.2% vs 14.3%, both $P < 0.05$). Both fascin and MMP-9 expression were associated with histological grade, lymph node metastasis, and portal vein invasion (all $P < 0.05$). In hair cholangiocarcinoma, the expression of fascin was positively correlative with that of MMP-9 ($P < 0.05$).

CONCLUSION: The expression of fascin and MMP-9 in hilar cholangiocarcinoma plays important roles in tumor progression and metastasis.

Key Words: Hilar cholangiocarcinoma; Fascin; Matrix metallo proteinase-9; Immunohistochemistry

Liu J, Li ZR, Mao XH. Clinical significance of expression of fascin and MMP-9 in hilar cholangiocarcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2012; 20(9): 795-799

摘要

目的: 研究Fascin蛋白和基质金属蛋白酶9(matrix metallo proteinase-9, MMP-9)在肝内胆管癌组织中的表达及其与肝内胆管癌的临床生物学行为的关系.

方法: 应用SP法检测56例肝内胆管癌及14例正常胆管上皮组织中Fascin和MMP-9的表达.

结果: Fascin和MMP-9在肝内胆管癌中的表达阳性率都明显高于正常胆管上皮组织(58.9% vs 0%, $P < 0.05$)和(73.2% vs 14.3%, $P < 0.05$); 且Fascin和MMP-9在肝内胆管癌中的表达与肿瘤的组织分化程度、淋巴结转移、门静脉浸润有关($P < 0.05$); Fascin和MMP-9在肝内胆管癌组织中的表达呈正相关($P < 0.05$).

结论: Fascin和MMP-9在肝内胆管癌的进展、转移中起重要作用, 两者之间起相互协同促进作用.

关键词: 肝内胆管癌; Fascin; 基质金属蛋白酶9; 免疫组织化学

刘俊, 李灼日, 毛先海. Fascin和MMP-9在肝内胆管癌组织中的表达及临床意义. *世界华人消化杂志* 2012; 20(9): 795-799

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/795.asp>

0 引言

肝内胆管癌是胆道外科一种常见的恶性肿瘤, 约占肝外胆管癌的58%-75%^[1]. 关于肝内胆管癌的病因至今仍然不清楚, 在我国, 胆管结石、病毒性肝炎、原发性硬化性胆管炎、致癌物质等

■背景资料

肝内胆管癌是胆道外科一种常见的恶性肿瘤, 其恶性程度高、病变进展快. 因而, 临床需要有更多更好的检测手段来评价预后、指导治疗.

■同行评议者

张国梁, 主任医师, 天津市第一中心医院消化内科

■ 研究前沿

近年来,随着分子生物学的发展,人们对肝内外胆管癌浸润转移的分子机制进行了较为深入的研究,但对其发生发展的机制仍然不是很清楚。

肝内胆管癌早期的浸润转移一个多分子参与的过程。近年来,随着分子生物学的发展,人们对肝内外胆管癌浸润转移的分子机制进行了较为深入的研究,但对其发生发展的机制仍然不是很清楚。本研究采用免疫组织化学法检测56例肝内胆管癌组织及14例正常胆管组织中Fascin和基质金属蛋白酶9(matrix metallo proteinase-9, MMP-9)的表达,旨在探讨其在肝内胆管癌形成过程中的变化规律及其与临床病理特征的相互关系。

1 材料和方法

1.1 材料 收集湖南省人民医院2005-01/2009-01行肝内胆管根治术、病理证实为肝门部胆管癌的存档蜡块56例,作为实验组进行研究;另取胆管结石和胆道外伤行内引流术经病理证实的肝门部正常胆管组织14例作为对照组。56例肝内胆管癌患者中男34例,女22例。年龄36-78岁,中位年龄58岁,平均肿瘤直径2 cm。Bismuth-Corlette分型:I型10例,II型12例,IIIa型19例,IIIb型15例,IV型0例。根据Bloom-Richardson分类标准组织分级:低分化10例,中分化26例,高分化20例;切除标本中伴淋巴结转移24例,门静脉浸润26例。所有患者术前均未接受放、化疗及中医中药治疗。实验组与对照组标本均经过体积分数10%的甲醛溶液固定、石蜡包埋,4 μ m厚连续切片。鼠抗人Fascin单克隆抗体、鼠抗人MMP-9单克隆抗体、DAB显示剂、即用型免疫组织化学试剂盒均购自福州迈新生物技术公司。

1.2 方法 SP染色主要步骤参考试剂盒说明进行,高倍镜下观察实验结果。用已知阳性切片作为阳性对照,PBS代替一抗作为阴性对照。

参照文献[3]制定免疫组织化学半定量标准,根据阳性细胞数所占的百分率和染色强度分别计分。染色强度分数标准:棕褐色为3分,棕黄色为2分,淡黄色为1分,无色为0分;物镜下阳性表达的细胞数占切片总细胞数比例分为5级:无表达细胞为0分,表达的细胞数占切片总细胞数<25%为1分,25%-50%为2分,50%-75%为3分,>75%为4分。将染色强度积分与阳性数量积分相乘,所得乘积分为4个级别:0分记“-”为阴性,1-4分记“+”为弱阳性,5-8分记“++”为阳性,9-12分以上记“+++”为强阳性。

统计学处理 应用SPSS17.0统计学软件。 χ^2 检验分析各研究对象间Fascin和MMP-9的表达差异, $P<0.05$ 为差异有统计学意义,Fascin和MMP-9

之间的相关性用spearman等级相关分析。

2 结果

Fascin和MMP-9在肝内胆管癌组织中呈阳性表达的免疫组织化学染色(图1)。

2.1 Fascin在肝内胆管癌组织中及正常胆管组织中的表达 Fascin在肝内胆管癌组织中的表达明显增高(58.9% vs 0%, $P<0.05$),Fascin在肝内胆管癌组织中的表达与患者年龄、性别、肿瘤大小、Bismuth-Corlette分型差异无统计学意义;与肿瘤组织分化程度、有无门静脉浸润、淋巴结转移差异有统计学意义(表1)。

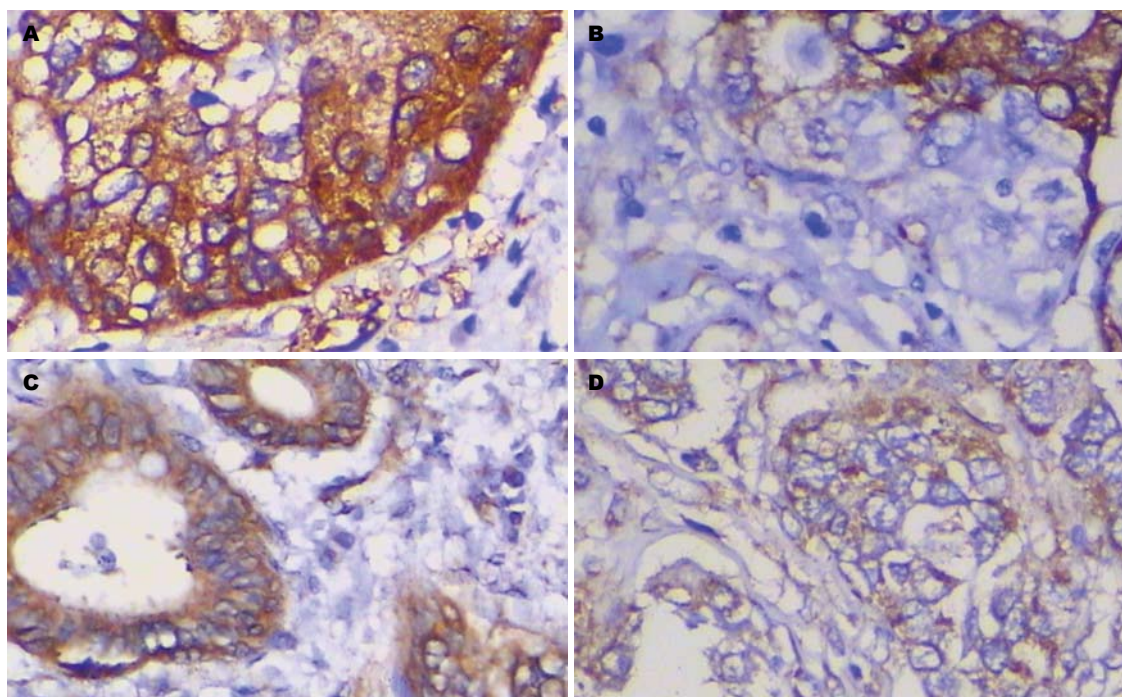
2.2 MMP-9在肝内胆管癌组织中及正常胆管组织中的表达 MMP-9在肝内胆管癌组织中的表达明显增高(73.2% vs 14.3%, $P<0.05$),MMP-9在肝内胆管癌组织中的表达与患者年龄、性别、肿瘤大小、Bismuth-Corlette分型差异无统计学意义;与肿瘤组织分化程度、有无门静脉浸润、淋巴结转移差异有统计学意义(表1)。

2.3 肝内胆管癌组织中Fascin与MMP-9表达的相关性 33例Fascin阳性表达的肝内胆管癌组织中MMP-9阳性表达29例,23例Fascin阴性表达的肝内胆管癌组织中MMP-9阴性表达11例,两者差异表达16例。经Pearson相关性分析,Fascin与MMP-9在肝内胆管癌中的表达呈正相关($r = 0.397$, $P<0.05$,表2)。

3 讨论

Fascin蛋白属于肌动蛋白结合蛋白家族中的一员,自20世纪70年代Opasiri等^[4]从海胆卵母细胞的细胞质中发现并提纯,到目前为止,人类共发现3种不同Fascin编码基因。人类Fascin基因定位于染色体7q22,最早从人类畸胎瘤中克隆,其编码一种进化相对保守的细胞骨架蛋白,定位于细胞质张力纤维和细胞膜皱褶边缘的丝状伪足(Filopodium)、微棘的核心肌动蛋白束中^[5]。研究表明,Fascin在细胞的运动、黏附以及细胞间的信息交流中担任着重要角色^[6]。

Fascin在不同类型的细胞中表达不一致,在一些正常上皮组织来源的细胞中不表达或低表达,而在一些血管内皮细胞、骨骼平滑肌细胞、神经胶质细胞中高表达^[7]。近年来研究发现Fascin蛋白在许多上皮性肿瘤细胞中也表达上调,并与肿瘤侵袭及转移有关。Fascin蛋白的表达上调具有一定的组织特异性,在不同组织来源的肿瘤细胞中,Fascin蛋白的表达率具有较大



■应用要点

本文着重研究Fascin及MMP-9这两个指标在肝内胆管癌中的表达, 结果显示, 两者在肝内胆管癌的进展、转移中起重要作用, 联合检测可用于评价肝内胆管癌的预后、指导治疗。

图 1 Fascin与MMP-9在肝内胆管癌细胞中的阳性表达($\times 400$)。A: Fascin, (+++); B: Fascin, (+); C: MMP-9, (+++); D: MMP-9, (+)。

表 1 Fascin和MMP-9在肝内胆管癌中的表达与其临床病理特征之间的关系

临床资料	n	Fascin表达		P值	MMP-9表达		P值
		阳性数	阴性数		阳性数	阴性数	
年龄(岁)							
≤58	20	11	9	0.656	13	7	0.427
>58	36	22	14		27	9	
性别							
男	34	21	13	0.592	28	6	0.055
女	22	12	10		13	9	
肿瘤大小							
≥2 cm	19	9	10	0.208	12	7	0.223
<2 cm	37	24	13		29	8	
组织学分级							
高分化	20	6	14	0.002	9	11	0.002
中分化	26	18	8		23	3	
低分化	10	9	1		9	1	
Bismuth分型							
I型	10	4	6	0.533	6	4	0.492
II型	12	7	5		9	3	
IIIa型	19	13	6		16	3	
IIIb型	15	9	6		10	5	
门静脉浸润							
有	26	19	7	0.045	24	2	0.003
无	30	14	16		17	13	
淋巴结转移							
有	24	18	6	0.034	21	3	0.037
无	32	15	17		20	12	

■同行评价

本文主要研究Fascin和MMP-9在肝门胆管癌组织中的表达情况,设计合理,层次分明,具有一定创新性。

表 2 Fascin与MMP-9在肝门胆管癌中表达的相关性

Fascin	n	MMP-9	
		阳性	阴性
阳性	33	29	4
阴性	23	12	11
合计	55	41	15

差异性。例如,侵袭性胰腺导管癌中有95%出现Fascin蛋白过表达^[8], I期非小细胞肺癌中Fascin蛋白阳性表达率约89%^[9],而在胃癌组织中,Fascin蛋白阳性表达率仅为29%左右^[10]。

肿瘤细胞浸润、转移是一个动态的、复杂的多阶段过程。通常认为,在这个过程中肿瘤细胞必须先从原始位置脱离下来,穿过细胞外基质和基膜,并浸润周围其他组织、淋巴管和血管。基膜和细胞外基质的降解是组织浸润过程中的关键步骤。MMPs是一组在结构上具有较高的同源性、几乎能够水解绝大多数细胞外基质(extracellular matrix, ECM)的内肽酶的总称,其结构的完整性有赖于锌离子的存在^[11]。到目前为止,人类至少发现MMPs有28种之多,按作用底物的不同主要分为5大类^[12]: 胶原酶类、明胶酶类、基质降解素类、膜型基质金属蛋白酶类和其他酶类,其中MMP-9属于明胶酶类。

MMPs具有广泛的生物学效应,参与许多生理及病理过程,如胚胎发育、创伤修复、血管形成、组织模型再塑及恶性肿瘤浸润转移等。MMP-9分子量为92 kDa,作为基质金属蛋白酶家族成员中重要一员,因其主要生理功能可以降解IV型胶原和明胶,亦称IV型胶原酶或明胶酶B^[13]。而MMP-9通过对细胞外基质的降解促使肿瘤细胞对周围组织浸润,进而向远处浸润转移^[14]。随着对MMPs家族研究的深入,MMP-9被认为是肿瘤侵袭和转移的一个重要分子靶标。如果能降低其表达,有可能会有效地抑制肿瘤的侵袭和转移。

国内外关于Fascin与MMP-9的相关性表达研究较少,Xie等^[15]应用RNA干扰技术使食管癌细胞株EC109中高表达的Fascin基因沉默,发现培养的肿瘤细胞形态发生改变,细胞膜的前突减少,进一步研究发现降低Fascin的表达可以导致MMP-9和MMP-2不易激活,最终导致侵袭降低。虽然具体的作用机制还不清楚,但是可以推测两者之间表达可能存在着某种联系。通过本研究提示,Fascin与MMP-9在肝门胆管癌中的表

达呈正相关,两者共同表达于癌细胞的胞浆中,可能Fascin的表达上调可激活MMP-9,而MMP-9的激活导致细胞基底膜的降解,促使肿瘤细胞的侵袭转移,另外Fascin本身也可以通过增加细胞的运动活性,促使肿瘤细胞的转移。以上假设尚需进一步实验研究证实。本文关于Fascin和MMP-9在肝门胆管癌组织中的研究还不足以解释肿瘤细胞的发生发展机制,且两者在促进肿瘤发生发展的具体机制还有待于进一步研究。

4 参考文献

- 1 黄志强. 黄志强胆道外科. 济南: 山东科学技术出版社, 1998: 795
- 2 Singh P, Patel T. Advances in the diagnosis, evaluation and management of cholangiocarcinoma. *Curr Opin Gastroenterol* 2006; 22: 294-299
- 3 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
- 4 Opassiri R, Pomthong B, Akiyama T, Nakphaichit M, Onkoksoong T, Ketudat Cairns M, Ketudat Cairns JR. A stress-induced rice (*Oryza sativa* L.) beta-glucosidase represents a new subfamily of glycosyl hydrolase family 5 containing a fascin-like domain. *Biochem J* 2007; 408: 241-249
- 5 Hashimoto Y, Skacel M, Adams JC. Roles of fascin in human carcinoma motility and signaling: prospects for a novel biomarker? *Int J Biochem Cell Biol* 2005; 37: 1787-1804
- 6 Vignjevic D, Kojima S, Aratyn Y, Danciu O, Svitkina T, Borisy GG. Role of fascin in filopodial protrusion. *J Cell Biol* 2006; 174: 863-875
- 7 Gunal A, Onguru O, Safali M, Beyzadeoglu M. Fascin expression [corrected] in glial tumors and its prognostic significance in glioblastomas. *Neuropathology* 2008; 28: 382-386
- 8 Grothey A, Hashizume R, Sahin AA, McCrea PD. Fascin, an actin-bundling protein associated with cell motility, is upregulated in hormone receptor negative breast cancer. *Br J Cancer* 2000; 83: 870-873
- 9 Li R, Li G, Deng L, Liu Q, Dai J, Shen J, Zhang J. IL-6 augments the invasiveness of U87MG human glioblastoma multiforme cells via up-regulation of MMP-2 and fascin-1. *Oncol Rep* 2010; 23: 1553-1559
- 10 Hashimoto Y, Shimada Y, Kawamura J, Yamasaki S, Imamura M. The prognostic relevance of fascin expression in human gastric carcinoma. *Oncology* 2004; 67: 262-270
- 11 Mitsiades N, Yu WH, Poulaki V, Tsokos M, Stamenkovic I. Matrix metalloproteinase-7-mediated cleavage of Fas ligand protects tumor cells from chemotherapeutic drug cytotoxicity. *Cancer Res* 2001; 61: 577-581
- 12 Hagemann C, Anacker J, Haas S, Riesner D, Schömig B, Ernestus RI, Vince GH. Comparative expression pattern of Matrix-Metalloproteinases in human glioblastoma cell-lines and primary cultures. *BMC Res Notes* 2010; 3: 293
- 13 Nguyen J, Gogusev J, Knapnougel P, Bauvois B. Protein tyrosine kinase and p38 MAP kinase pathways are involved in stimulation of matrix metalloproteinase-9 by TNF-alpha in human monocytes. *Immunol Lett* 2006; 106: 34-41
- 14 Tummalapalli P, Gondi CS, Dinh DH, Gujrati M, Rao JS. RNA interference-mediated targeting of

urokinase plasminogen activator receptor and matrix metalloproteinase-9 gene expression in the IOMM-lee malignant meningioma cell line inhibits tumor growth, tumor cell invasion and angiogenesis. *Int J Oncol* 2007; 31: 5-17

15 Xie JJ, Xu LY, Zhang HH, Cai WJ, Mai RQ, Xie YM, Yang ZM, Niu YD, Shen ZY, Li EM. Role of fascin in the proliferation and invasiveness of esophageal carcinoma cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 337: 355-362

编辑 张姗姗 电编 闫晋利

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 •

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

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

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

(总编辑: 马连生2011-05-30)

早期连续性血液净化治疗重症急性胰腺炎14例

周俊杰, 罗琼湘, 章雄军, 徐小强

■背景资料

重症急性胰腺炎(severe acute pancreatitis, SAP)的临床表现凶险, 并发症多, 病死率高, 其确切病因和发病机制迄今尚未完全阐明, 治疗效果也不够满意。通过早期连续性血液净化(continuous blood purification, CBP)非选择性清除多种促炎因子, 有可能防止多器官功能障碍综合征的发生从而改善SAP患者的预后。

周俊杰, 罗琼湘, 章雄军, 徐小强, 河源市人民医院重症医学科 广东省河源市 517000

周俊杰, 主治医师, 主要从事围手术期危重症患者的管理。

作者贡献分布: 此课题由周俊杰与罗琼湘设计; 研究过程及统计分析由周俊杰、章雄军及徐小强完成; 论文书写由周俊杰完成。

通讯作者: 周俊杰, 主治医师, 517000, 广东省河源市文祥路1号, 河源市人民医院重症医学科, drjunjie@sina.com

收稿日期: 2012-02-12 修回日期: 2012-02-25

接受日期: 2012-03-06 在线出版日期: 2012-03-28

Early continuous blood purification for treatment of severe acute pancreatitis: an analysis of 14 cases

Jun-Jie Zhou, Qiong-Xiang Luo, Xiong-Jun Zhang, Xiao-Qiang Xu

Jun-Jie Zhou, Qiong-Xiang Luo, Xiong-Jun Zhang, Xiao-Qiang Xu, Division of Critical Care Medicine, Heyuan People's Hospital, Heyuan 517000, Guangdong Province, China

Correspondence to: Jun-Jie Zhou, Division of Critical Care Medicine, Heyuan People's Hospital, 1 Wenxiang Road, Heyuan 517000, Guangdong Province, China. drjunjie@sina.com

Received: 2012-02-12 Revised: 2012-02-25

Accepted: 2012-03-06 Published online: 2012-03-28

Abstract

AIM: To evaluate the clinical efficacy of early continuous blood purification (CBP) in patients with severe acute pancreatitis (SAP).

METHODS: Fourteen patients who were diagnosed with SAP and were willing to undergo early (within 48 h after onset) CBP were included in test group, while 12 SAP patients were included in control group. All patients received mechanical ventilation, parenteral nutrition, antibiotics, vasoactive drugs, somatostatin, or anti-disseminated intravascular coagulation treatment according to indications. The test group began to receive CBP within 8 hours after the diagnosis of SAP. APACHE II score and plasma TNF- α levels were compared before treatment and 1, 3, 5 days after treatment between the two groups.

RESULTS: Early CBP significantly improved the

signs and symptoms of SAP. On days 1, 3 and 5, APACHE II score and plasma TNF- α levels differed significantly between the control group and the test group (APACHE II score: 15.93 ± 4.81 vs 18.50 ± 4.77 , 13.71 ± 4.01 vs 18.08 ± 4.83 , 10.79 ± 2.39 vs 15.17 ± 4.59 ; TNF- α : 60.00 ± 15.27 vs 89.08 ± 25.56 , 42.14 ± 6.94 vs 89.83 ± 23.19 , 39.00 ± 6.04 vs 80.00 ± 23.02 , all $P < 0.05$). APACHE II score and plasma TNF- α levels decreased significantly in the test group on days 1, 3 and 5 compared to before treatment (all $P < 0.05$).

CONCLUSION: Early CBP can significantly improve clinical symptoms, protect organ function, improve prognosis, and reduce mortality in SAP patients.

Key Words: Continuous blood purification; Severe acute pancreatitis; Clinical effect

Zhou JJ, Luo QX, Zhang XJ, Xu XQ. Early continuous blood purification for treatment of severe acute pancreatitis: an analysis of 14 cases. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2012; 20(9): 800-803

摘要

目的: 探讨早期连续性血液净化(continuous blood purification, CBP)治疗重症急性胰腺炎(severe acute pancreatitis, SAP)的临床疗效。

方法: 选取符合SAP诊断且年龄18-65岁的住院患者, 自愿行早期(起病48 h内)CBP治疗的患者纳入试验组, 其余患者纳入对照组。所有患者均按指征接受机械辅助呼吸、肠外营养、抗感染、血管活性药物、生长抑素、抗弥漫性血管内凝血等治疗。试验组病例在确诊SAP后8 h内开始连续性血液净化治疗。比较2组患者在治疗前、治疗后1、3、5 d的APACHE II评分、血浆TNF- α 检测值逐渐变化的差异性。在同一组患者中, 比较相邻2 d的APACHE II评分值的差异性。

结果: 试验组病例在CBP治疗后, 患者症状体征明显改善, 治疗后1、3、5 d APACHE II评分、血浆TNF- α 检测值与对照组比较, 差异有显著性意义(APACHE II评分: 15.93

■同行评议者

汪波, 主任医师, 北京大学第一医院急诊科

± 4.81 vs 18.50 ± 4.77 , 13.71 ± 4.01 vs 18.08 ± 4.83 , 10.79 ± 2.39 vs 15.17 ± 4.59 ; $\text{TNF-}\alpha$: 60.00 ± 15.27 vs 89.08 ± 25.56 , 42.14 ± 6.94 vs 89.83 ± 23.19 , 39.00 ± 6.04 vs 80.00 ± 23.02 , 均 $P < 0.05$); 试验组病例治疗后1、3、5 d APACHE II 评分、血浆 $\text{TNF-}\alpha$ 检测值较治疗前显著下降, 差异有显著性($P < 0.05$).

结论: 早期CBP治疗可显著改善SAP患者的临床症状, 保护器官功能, 改善预后, 降低病死率.

关键词: 早期连续性血液净化; 重症急性胰腺炎; 临床疗效

周俊杰, 罗琼湘, 章雄军, 徐小强. 早期连续性血液净化治疗重症急性胰腺炎14例. 世界华人消化杂志 2012; 20(9): 800–803
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/800.asp>

0 引言

重症急性胰腺炎(severe acute pancreatitis, SAP)是一种死亡率很高的危重疾病, 发病后常伴全身炎性反应, 炎性介质和细胞因子进入血液循环后进一步激活其他炎性细胞, 释放更多的炎性介质, 形成恶性循环, 导致多器官功能障碍综合征(multiple organ dysfunction syndrome, MODS). SAP病情凶险, 预后不良, 治疗棘手, 并发症多, 目前病死率仍高达22.7%, 有关其治疗方法的探索一直是研究的热点. 通过早期连续性血液净化(continuous blood purification, CBP)非选择性清除多种促炎因子, 有可能防止MODS的发生从而改善SAP患者的预后^[1,2]. 本研究在获得河源市医学伦理委员批准并与患者及其家属签署知情同意后, 将2009-11/2011-11河源市人民医院收治的SAP患者, 根据患者本人意愿分为试验组和对照组, 所有患者均按指征接受机械辅助呼吸、肠外营养、抗感染、血管活性药物、生长抑素、抗弥漫性血管内凝血等治疗, 试验组患者在确诊SAP后8 h内开始CBP治疗, 现将研究结果总结报道如下.

1 材料和方法

1.1 材料 选择2009-11/2011-11河源市人民医院收治的SAP患者26例, 全部患者均符合中华医学会外科学会胰腺外科学组SAP临床诊断和分级标准^[1]. 其中试验组14例, 男9例, 女5例, 平均年龄48.2岁, 发病时间1.3-3.6 d, 平均2.5 d; 对照组12例, 男7例, 女5例, 平均年龄49.3岁; 发病时间1.5-3.8 d, 平均2.6 d. SAP发病诱因: 试验组中胆

源性7例、暴饮暴食3例、高脂血症2例、其他原因2例; 对照组中胆源性6例、暴饮暴食2例、高脂血症1例、其他原因3例.

1.2 方法

1.2.1 常规治疗: 给予患者吸氧、镇静、止痛治疗; 禁食并给予持续性胃肠减压, 必要时应用 H_2 受体阻滞剂和生长抑素, 使胰腺获得充分的休息; 加强肠外营养支持, 注意保持水、电解质和酸碱平衡; 选择性应用可透过血膜屏障的敏感抗生素以控制感染; 积极纠正休克、肾功能衰竭、心力衰竭、呼吸衰竭等并发症.

1.2.2 连续性血液净化治疗: 试验组患者在入住ICU后8 h内开始CBP治疗, 应用连续性静脉-静脉血液滤过治疗模式, 维持48-72 h, 颈内静脉或股静脉穿刺置管作为血管通路, 使用Dia-pact床边血滤机和Baxter血滤器, 使用的滤过膜是由德国Fresenius公司生产的AV600S聚酰胺膜, 采用中国人民解放军南京军区总院PORT配方置换液, 以持续泵注方式给予低分子量肝素行全身肝素化, 血泵转速200 mL/min, 置换液35-50 mL/(kg·h), 根据患者病情决定超滤量. 治疗过程中严密监测患者的生命体征, 比较治疗前后患者临床症状和体征、APACHE II 评分、血浆肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor α , $\text{TNF-}\alpha$)的变化.

1.2.3 指标观察: 检查比较2组患者在治疗前、治疗后1、3、5 d患者生命体征、精神神经症状、腹部体征及APACHE II 评分, 测定血浆 $\text{TNF-}\alpha$ 变化情况.

统计学处理 采用SPSS13.0软件进行数据统计处理, 本组数据用 $\text{mean} \pm \text{SD}$ 表示, 对构成情况和分布数据等计数资料采用 χ^2 检验方法, 对治疗前后的数据进行 t 检验, $P < 0.05$ 为有统计学差异.

2 结果

2.1 患者一般情况 本研究共入选SAP患者29例, 试验组14例, 对照组15例, 其中对照组因治疗期间患者要求改行CBP治疗等原因剔除病例3例(不作疗效评价). 试验组、对照组两组的性别组成、平均年龄及起病时间均未见明显差异($P > 0.05$).

2.2 治疗后患者的临床症状 试验组患者经积极治疗后患者腹痛、腹胀、发热症状缓解时间较对照组短, 血压逐渐上升, 呼吸急促明显改善, 烦躁谵妄状态较快消失, 高血钾及酸中毒获得纠正, 动脉血氧分压升高, 各器官功能逐渐恢复

■ 相关报道

黄向阳等的研究表明血液净化治疗SAP疗效明显, 可迅速改善患者病情, 降低死亡率; 对病情特别严重患者, 采用连续性高容量血液滤过、血液灌流及腹膜透析联合治疗效果更佳.

■同行评价

本研究对早期连续性血液净化治疗SAP患者疗效做了探讨,有一定的临床价值。

表 1 两组患者治疗前后APACHE II 评分变化情况 (mean ± SD)

分组	治疗前	治疗后1 d	治疗后3 d	治疗后5 d
试验组	18.79 ± 4.78	15.93 ± 4.81 ^a	13.71 ± 4.01 ^{ac}	10.79 ± 2.39 ^{ac}
对照组	17.58 ± 5.14	18.50 ± 4.77	18.08 ± 4.83	15.17 ± 4.59
t值	0.618	-1.363	-2.52	-3.12

^aP<0.05 vs 同组治疗前; ^cP<0.05 vs 对照组。

表 2 两组患者治疗前后TNF-α的变化 (mean ± SD)

分组	治疗前	治疗后1 d	治疗后3 d	治疗后5 d
试验组	82.50 ± 24.55	60.00 ± 15.27 ^{ac}	42.14 ± 6.94 ^{ac}	39.00 ± 6.04 ^{ac}
对照组	80.42 ± 22.42	89.08 ± 25.56	89.83 ± 23.19	80.00 ± 23.02
t值	0.224	-3.449	-6.864	-5.996

^aP<0.05 vs 同组治疗前; ^cP<0.05 vs 对照组。

正常。

2.3 治疗前后患者APACHE II 的评分变化 试验组病例治疗后1、3、5 d APACHE II 评分呈逐渐下降趋势,较治疗前均显著降低,差异有显著性意义($P<0.05$);试验组病例治疗后3、5 d APACHE II 评分与对照组比较差异有显著性意义($P<0.05$,表1)。

2.4 患者治疗前后TNF-α的变化 试验组患者治疗后1、3、5 d血浆TNF-α检测值呈逐渐下降趋势,较治疗前均显著降低,差异有显著性意义($P<0.05$);试验组病例治疗后1、3、5 d血浆TNF-α检测值与对照组比较差异有显著性意义($P<0.05$,表2)。

3 讨论

SAP是常见的急腹症,其发病急、并发症多、病死率高。SAP的发生发展是多因素多环节共同作用的结果。各种致病因素引起胰腺自身消化,激活炎性细胞,释放大量细胞因子,引起全身炎症反应综合征,并最终引起多器官功能衰竭的发生。TNF-α、L-1β、IL-6、IL-8等早期炎症因子过量产生并释放入血,刺激其他细胞因子的产生,引发了瀑布样连锁放大反应,加速病情进展^[2]。研究表明,血清细胞因子水平与病损程度呈正相关。大量研究已证实了过量炎症介质和细胞因子在SAP发展演变中的重要作用,单纯针对胰腺本身的治疗并不能取得满意疗效^[3]。CBP是近年来重症医学的重要进展之一,该治疗最大限度地模拟肾脏的正常功能,持续、等渗、缓慢的发挥对机体内水和溶质的清除作用,同时通过下调

或清除炎性介质、细胞因子,调节机体免疫,维持机体内环境的稳定,保护重要器官功能,防治多器官功能衰竭的发生,越来越广泛地应用于SAP的治疗^[4]。

黄向阳等^[5]探讨多种血液净化联合治疗SAP的疗效和机制,29例接受内科综合治疗患者为对照组,32例在内科综合治疗基础上增加血液净化(包括连续性高容量血液滤过、血液灌流及腹膜透析)为治疗组,观察2组治疗效果;结果显示治疗组在腹痛缓解、腹水淀粉酶下降、APACHE II 评分及CT严重度指数多项指标均比对照组好转恢复快;预后对照组治愈好转21例(占72.41%),死亡8例(占27.59%),治疗组治愈好转29例(占90.63%),死亡3例(占9.38%)。差异有统计学意义($P<0.05$ 或 0.01)。黄向阳等^[5]的研究表明血液净化治疗SAP疗效明显,可迅速改善患者病情,降低死亡率;对病情特别严重患者,采用连续性高容量血液滤过、血液灌流及腹膜透析联合治疗效果更佳。赵丽梅等^[6]研究指出SAP是一种凶险的急腹症,其进展迅速、病情危重,常常由于并发MODS而造成患者死亡。在治疗上应重视液体复苏与纠正内环境紊乱、纠正低氧血症等基础治疗。首选应用生长抑素制剂,足量使用胰酶抑制剂,应用抗生素预防感染,提倡早期肠内营养。另外,免疫调节疗法、抗氧化剂应用、血液净化疗法以及内镜下介入治疗对改善SAP预后也有较好的疗效。本研究结果表明,试验组患者治疗后1、3、5 d APACHE II 评分呈逐渐下降趋势,较治疗前均显著降低,差异有显著性意义($P<0.05$);试验组病例

治疗后3、5 d APACHE II 评分与对照组比较差异有显著性意义($P<0.05$), 试验组病例治疗后1、3、5 d 血浆TNF- α 检测值呈逐渐下降趋势, 较治疗前均显著降低, 差异有显著性意义($P<0.05$); 试验组病例治疗后1、3、5 d 血浆TNF- α 检测值与对照组比较差异有显著性意义($P<0.05$).

CBP通过对流和吸附作用过滤出血清中低于50 kDa的炎性因子, 减轻全身炎症反应. CBP还可以从转录翻译水平调控TNF- α 、MHC-II、CD14的表达和释放, 稳定白细胞功能, 重建和调控机体的免疫状态^[7,8]. CBP能够维持液体平衡机血液动力学稳定, 维持机体水、电解质、酸碱平衡, 通过调控机体进出水量, 控制分解代谢, 及时彻底清除代谢产物等保证肠外营养支持治疗^[9,10]. 在血滤的时机及方式上, 至今无一个或几个经典的临床试验进行指导. SAP患者何时应该开始CBP治疗, 尚无定论, 目前倾向于早期连续性高容量血滤^[11].

早期CBP在SAP患者的治疗中可发挥重要作用, 能有效地清除炎性介质, 阻断病情的进一步发展, 保护全身脏器功能, 帮助患者较为平稳地度过急性期, 改善疾病预后.

4 参考文献

- 1 张圣道. 重症急性胰腺炎诊治草案. 中国实用外科杂志 2001; 21: 513-514
- 2 阎磊, 邵凤民. 连续性血液净化治疗重症急性胰腺炎疗效观察. 郑州大学学报(医学版) 2008; 43: 735-737
- 3 盛晓华, 汪年松. 连续性血液净化治疗危重症患者的研究进展. 中国中西医结合肾病杂志 2009; 10: 838-839
- 4 姜坤, 陈心足, 夏庆, 唐文富, 王蕾. 早期血液滤过治疗重症急性胰腺炎的系统评价. 中国循证医学杂志 2007; 7: 121-134
- 5 黄向阳, 张敏, 宋雪霞, 王英, 罗春娥, 刘惠. 多种血液净化联合治疗重症急性胰腺炎32例. 世界华人消化杂志 2009; 17: 2752-2755
- 6 赵丽梅, 冯志杰. 重症急性胰腺炎合并多脏器功能障碍综合征的非手术治疗. 世界华人消化杂志 2009; 17: 1061-1068
- 7 Balthazar EJ, Robinson DL, Megibow AJ, Ranson JH. Acute pancreatitis: value of CT in establishing prognosis. *Radiology* 1990; 174: 331-336
- 8 Balthazar EJ, Freeny PC, vanSonnenberg E. Imaging and intervention in acute pancreatitis. *Radiology* 1994; 193: 297-306
- 9 Raraty MG, Connor S, Criddle DN, Sutton R, Neoptolemos JP. Acute pancreatitis and organ failure: pathophysiology, natural history, and management strategies. *Curr Gastroenterol Rep* 2004; 6: 99-103
- 10 许爱平, 李淑德. 重症急性胰腺炎治疗研究进展. 世界华人消化杂志 2010; 18: 213-216
- 11 Gloor B, Schmidtmann AB, Worni M, Ahmed Z, Uhl W, Büchler MW. Pancreatic sepsis: prevention and therapy. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2002; 16: 379-390

编辑 曹丽鸥 电编 闫晋利

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》入选《中国学术期刊评价研究报告—RCCSE 权威、核心期刊排行榜与指南》

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

《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《生理学术名词》、《生物化学名词与生物物理学名词》、《化学名词》、《植物学名词》、《人体解剖学名词》、《细胞生物学名词》及《医学名词》系列为准, 药名以《中华人民共和国药典》和卫生部药典委员会编的《药名词汇》为准, 国家食品药品监督管理局批准的新药, 采用批准的药名; 创新性新药, 请参照我国药典委员会的“命名原则”, 新译名词应附外文。公认习用缩略语可直接应用(建议第一次也写出全称), 如ALT, AST, mAb, WBC, RBC, Hb, T, P, R, BP,

PU, GU, DU, ACTH, DNA, LD50, HBsAg, HCV RNA, AFP, CEA, ECG, IgG, IgA, IgM, TCM, RIA, ELISA, PCR, CT, MRI等. 为减少排印错误, 外文、阿拉伯数字、标点符号必须正确打印在A4纸上. 中医药名词英译要遵循以下原则: (1)有对等词者, 直接采用原有英语词, 如中风stroke, 发热fever; (2)有对应词者应根据上下文合理选用原英语词, 如八法eight principal methods; (3)英语中没有对等词或相应词者, 宜用汉语拼音, 如阴yin, 阳yang, 阴阳学说yinyangology, 人中renzhong, 气功qigong; 汉语拼音要以词为单位分写, 如weixibao nizhuanwan(胃细胞逆转丸), guizhitang(桂枝汤). 通常应小写.

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

2.4 计量单位 采用国际单位制并遵照有关国家

标准, GB3100-3102-93量和单位. 原来的“分子量”应改为物质的相对分子质量. 如30 kD改为 M_r 30 000或30 kDa(M大写斜体, r小写正体, 下角标); “原子量”应改为相对原子质量, 即 A_r (A大写斜体, r小写正体, 下角标); 也可采用原子质量, 其单位是u(小写正体). 计量单位在+、-及后列出. 在±前后均要列出, 如37.6 °C ± 1.2 °C, 45.6岁 ± 24岁, 56.4 d ± 0.5 d. 3.56 ± 0.27 pg/ml应为3.56 ng/L ± 0.27 ng/L. BP用kPa(mmHg), RBC数用 $1 \times 10^{12}/L$, 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、CO₂结合力、乳酸、磷酸、胆固醇、胆固醇酯、三酰甘油、钠、钙、镁、非蛋白氮、氯化物; 胆红素、蛋白结合碘、肌酸、肌酐、铁、铅、抗坏血酸、尿胆元、氨、维生素A、维生素E、维生素B1、维生素B2、维生素B6、尿酸; 氢化可的松(皮质醇)、肾上腺素、汞、孕酮、甲状腺素、睾酮、叶酸用nmol/L; 胰岛素、雌二醇、促肾上腺皮质激素、维生素B12用pmol/L. 年龄的单位有日龄、周龄、月龄和岁. 例如, 1秒, 1 s; 2分钟, 2 min; 3小时, 3 h; 4天, 4 d; 5周, 5 wk; 6月, 6 mo; 雌性♀, 雄性♂, 酶活性国际单位IU = 16.67 nkat, 对数log, 紫外uv, 百分比%, 升L, 尽量把 1×10^{-3} g与 5×10^{-7} g之类改成1 mg与0.5 mg, hr改成h, 重量γ改成mg, 长度m改成mm. 国际代号不用于无数值的文句中, 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% CO₂, 50 mL/L CO₂; 1 : 1 000肾上腺素, 1 g/L肾上腺素; 胃黏膜含促胃液素36.8 pg/mg, 改为胃黏膜蛋白含促胃液素36.8 ng/g; 10%葡萄糖改为560 mmol/L或100 g/L葡萄糖; 45 ppm = 45×10^{-6} ; 离心的旋转频率(原称转速)用r/min, 超速者用g; 药物剂量若按体质量计算, 一律以“/kg”表示.

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: wjcd@wjgnet.com; http://www.wjgnet.com

文大写字 F ; (3)卡方检验用希文小写 χ^2 ; (4)样本的相关系数用英文小写 r ; (5)自由度用希文小写 ν ; (6)样本数用英文小写 n ; (7)概率用英文斜体大写 P . 在统计学处理中在文字叙述时平均数 \pm 标准差表示为 $\text{mean} \pm \text{SD}$, 平均数 \pm 标准误为 $\text{mean} \pm \text{SE}$. 统计学显著性用^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ ($P > 0.05$ 不注). 如同一表中另有一套 P 值, 则^c $P < 0.05$, ^d $P < 0.01$; 第三套为^e $P < 0.05$, ^f $P < 0.01$ 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 \pm 0.5 mmol/L等. 测量的数据不能超过其测量仪器的精密度, 例如6347意指6000分之一的精密度. 任何一个数字, 只允许最后一位有误差, 前面的位数不应有误差. 在一组数字中的 $\text{mean} \pm \text{SD}$ 应考虑到个体的变差, 一般以SD的1/3来定位数, 例如3614.5 g \pm 420.8 g, SD的1/3达一百多g, 平均数波动在百位数, 故应写成3.6 kg \pm 0.4 kg, 过多的位数并无意义. 又如8.4 cm \pm 0.27 cm, 其SD/3 = 0.09 cm, 达小数点后第2位, 故平均数也应补到小数点后第2位. 有效位数以后的数字是无效的, 应该舍. 末尾数字, 小于5则舍, 大于5则进, 如恰等于5, 则前一位数逢奇则进, 逢偶(包括“0”)且5之后全为0则舍. 末尾时只可1次完成, 不得多次完成. 例如23.48, 若不要小数点, 则应成23, 而不应该23.48 \rightarrow 23.5 \rightarrow 24. 年月日采用全数字表达法, 请按国家标准GB/T 7408-94书写. 如1985年4月12日, 可写作1985-04-12; 1985年4月, 写作1985-04; 从1985年4月12日23时20分50秒起至1985年6月25日10时30分止, 写作1985-04-12 T23:20:50/1985-06-25 T10:30:00; 从1985年4月12日起至1985年6月15日止, 写作1985-04-12/06-16, 上午8时写作08:00, 下午4时半写作16:30. 百分数的有效位数根据分母来定: 分母 ≤ 100 , 百分数到个位; $101 \leq \text{分母} \leq 1000$, 百分数到小数点后1位; 余类推. 小数点前后的阿拉伯数字, 每3位间空1/4阿拉伯数字距离, 如1486800.475 65. 完整的阿拉伯数字不移行!

2.7 标点符号 遵照国家标准GB/T 15834-1995标点符号用法的要求, 本刊论文中的句号都采用黑圆点; 数字间的起止号采用“-”字线, 并列的汉语词间用顿号分开, 而并列的外文词、阿拉伯数字、外文缩略词及汉语拼音字母拼写词间改用逗号分开, 参考文献中作者间一律用逗号分开; 表示终了的标点符号, 如句号、逗号、顿

号、分号、括号及书名号的后一半, 通常不用于一行之首; 而表示开头的标点符号, 如括号及书名号的前一半, 不宜用于一行之末. 标点符号通常占一格, 如顿号、逗号、分号、句号等; 破折号应占两格; 英文连字符只占一个英文字符的宽度, 不宜过长, 如5-FU. 外文字符下划一横线表示用斜体, 两横线表示用小写, 三横线表示用大写, 波纹线表示用黑体.

3 稿件格式

3.1 题名 简明确切地反映论文的特定内容, 鲜明而有特色, 阿拉伯数字不宜开头, 不用副题名, 一般20个字. 避免用“的研究”或“的观察”等非特定词.

3.2 作者 论文作者的署名, 按照国际医学杂志编辑委员会(ICMJE, International Committee of Medical Journal Editors)作者资格标准执行. 作者标准为: (1)对研究的理念和设计、数据的获得、分析和解读做出重大贡献; (2)起草文章, 并对文章的重要的知识内容进行批评性修改; (3)接受对准备发表文章的最后一稿. 作者应符合条件1, 2, 3, 对研究工作有贡献的其他人可放入志谢中. 作者署名的次序按贡献大小排列, 多作者时姓名间用逗号, 如是单名, 则在姓与名之间空1格(正文和参考文献中不空格). 《世界华人消化杂志》要求所有署名人写清楚自己对文章的贡献. 世界华人消化杂志不设置共同第一作者和共同通信作者.

3.3 单位 作者后写单位的全称空1格后再写省市及邮政编码. 格式如: 张旭晨, 梅立新, 承德医学院病理教研室 河北省承德市 067000

3.4 第一作者简介 格式如: 张旭晨, 1994年北京中医药大学硕士, 讲师. 主要从事消化系统疾病的病理研究.

3.5 作者贡献分布 格式如: 陈湘川与庞丽娟对此文所作贡献两均等; 此课题由陈湘川、庞丽娟、陈玲、杨兰、张金芳、齐妍及李洪安设计; 研究过程由陈玲、杨兰、张金芳、蒋金芳、杨磊、李锋及曹秀峰操作完成; 研究所用新试剂及分析工具由曹秀峰提供; 数据分析由陈湘川、杨兰及庞丽娟完成; 本论文写作由陈湘川、庞丽娟及李洪安完成.

3.6 同行评议者 为了确保刊出文章的质量, 本刊即将开始实行接受稿件的同行评议公开策略, 将同行评议者姓名, 职称, 机构的名称与文章一同在脚注出版. 格式如: 房静远, 教授, 上海交通大学医学院附属医院仁济医院, 上海市消化疾

病研究所。

3.7 基金资助项目 格式如: 国家自然科学基金资助项目, No. 30224801

3.8 通讯作者 格式如: 通讯作者: 黄缘, 教授, 330006, 江西省南昌市民德路1号, 南昌大学第二附属医院消化内科, 江西省分子医学重点实验室. huang9815@yahoo.com

电话: 0351-4078656 传真: 0351-4086337

收稿日期: 修回日期:

3.9 英文摘要

题名 文章的题名应言简意赅, 方便检索, 英文题名以不超过10个实词为宜, 应与中文题名一致。

作者 作者姓名汉语拼音拼写法规定为: 先名, 后姓; 首字母大写, 双名之间用半字线“-”分开, 多作者时姓名间加逗号。格式如: “潘伯荣”的汉语拼写法为“Bo-Rong Pan”。

单位 先写作者, 后写单位的全称及省市邮政编码。例如: Xu-Chen Zhang, Li-Xin Mei, Department of Pathology, Chengde Medical College, Chengde 067000, Hebei Province, China

基金资助项目 格式如: Supported by National Natural Science Foundation of China, No.30224801

通讯作者 格式如: Correspondence to: Dr. Lian-Sheng Ma, Taiyuan Research and Treatment Center for Digestive Diseases, 77 Shuangta Xijie, Taiyuan 030001, Shanxi Province, China. wcjd@wjgnet.com

收稿及修回日期 格式如: Received: Revised:

摘要 包括目的、方法、结果、结论, 书写要求与中文摘要一致。

3.10 中文摘要 必须在300字左右, 内容应包括目的(应阐明研究的背景和设想、目的), 方法(必须包括材料或对象, 应描述课题的基本设计, 双盲、单盲还是开放性, 使用什么方法, 如何进行分组和对照, 数据的精确程度。研究对象选择条件与标准是否遵循随机化、齐同化的原则, 对照组匹配的特征。如研究对象是患者, 应阐明其临床表现, 诊断标准。如何筛选分组, 有多少例进行过随访, 有多少例因出现不良反应而中途停止研究), 结果(应列出主要结果, 包括主要数据, 有什么新发现, 说明其价值和局限, 叙述要真实、准确、具体, 所列数据经用何种统计学方法处理; 应给出结果的置信区间和统计学显著性检验的确切值; 概率写 P , 后应写出相应显著性检验值), 结论(全文总结, 准确无误的观点及价值)。

3.11 正文标题层次 0 引言; 1 材料和方法, 1.1 材料, 1.2 方法; 2 结果; 3 讨论; 4 参考文献。序号一

律左顶格写, 后空1格写标题; 2级标题后空1格接正文。正文内序号连排用(1), (2), (3)。以下逐条陈述。

0 引言 应包括该研究的目的和该研究与其他相关研究的关系。

1 材料和方法 应尽量简短, 但应让其他有经验的研究者能够重复该实验。对新的方法应该详细描述, 以前发表过的方法引用参考文献即可, 有关文献中或试剂手册中的方法的改进仅描述改进之处即可。

2 结果 实验结果应合理采用图表和文字表示, 在结果中应避免讨论。

3 讨论 要简明, 应集中对所得的结果做出解释而不是重复叙述, 也不应是大量文献的回顾。

图表的数量要精选。表应有表序和表题, 并有足够具有自明性的信息, 使读者不查阅正文即可理解该表的内容。表内每一栏均应有表头, 表内非公知通用缩写应在表注中说明, 表格一律使用三线表(不用竖线), 在正文中该出现的地方应注出。图应有图序、图题和图注, 以使其容易被读者理解, 所有的图应在正文中该出现的地方注出。同一个主题内容的彩色图、黑白图、线条图, 统一用一个注解分别叙述。如: 图1 萎缩性胃炎治疗前后病理变化。A: …; B: …; C: …; D: …; E: …; F: …; G: …。曲线图可按●、○、■、□、▲、△顺序使用标准的符号。统计学显著性用: ^a $P<0.05$, ^b $P<0.01$ ($P>0.05$ 不注)。如同一表中另有一套 P 值, 则^c $P<0.05$, ^d $P<0.01$; 第3套为^e $P<0.05$, ^f $P<0.01$ 。 P 值后注明何种检验及其具体数字, 如 $P<0.01$, $t = 4.56$ vs 对照组等, 注在表的左下方。表内采用阿拉伯数字, 共同的计量单位符号应注在表的右上方, 表内个位数、小数点、±、-应上下对齐。“空白”表示无此项或未测, “-”代表阴性未发现, 不能用同左、同上等。表图勿与正文内容重复。表图的标目尽量用 t/min , $c/(\text{mol/L})$, p/kPa , V/mL , $t/^\circ\text{C}$ 表达。

志谢 后加冒号, 排在讨论后及参考文献前, 左齐。

4 参考文献 本刊采用“顺序编码制”的著录方法, 即以文中出现顺序用阿拉伯数字编号排序。提倡对国内同行近年已发表的相关研究论文给予充分的反映, 并在文内引用处右上角加方括号注明角码。文中如列作者姓名, 则需在“Pang等”的右上角注角码号; 若正文中仅引用某文献中的论述, 则在该论述的句末右上角注码号。如马连生^[1]报告……, 潘伯荣等^[2-5]认为……; PCR方法敏感性高^[6-7]。文献序号作正

《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/lcyj.asp>

4.7 病例报告写作格式实例

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

5 投稿方式

接受在线投稿, 不接受其他方式的投稿, 如E-mail、打印稿。在线投稿网址: <http://www.baishideng.com/wcjd/ch/index.aspx>。无法在线提交的通过submission@wjgnet.com, 电话: 010-8538-1892, 传真: 010-8538-1893寻求帮助。投稿须知下载网址<http://www.wjgnet.com/1009-3079/tgxz.pdf>。审稿过程平均时间需要14-28 d。所有的来

稿均经2-3位同行专家严格评审, 2位或以上通过为录用, 否则将退稿或修改后再审。接受后的稿件作者需缴纳稿件发表费, 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
<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

第三十二期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

陈海龙 教授
大连医科大学附属第一医院院办

陈卫昌 教授
苏州大学附属第一医院消化内科

仇毓东 教授
南京大学医学院附属鼓楼医院

樊晓明 教授
复旦大学附属金山医院消化科

冯志杰 主任医师
河北医科大学第二医院消化内科

傅春彬 主任医师
吉化集团公司总医院一院消化内科

高国全 教授
中山大学中山医学院生物化学教研室

高英堂 研究员
天津市肝胆疾病研究所分子细胞室

高泽立 副教授
上海交通大学医学院附属第九人民医院周浦分院消化科

管世鹤 副教授
安徽医科大学第一附属医院检验科

韩天权 教授
上海交通大学医学院附属瑞金医院外科、上海消化外科研究所

何敏 教授
广西医科大学医学科学实验中心

李健丁 教授
山西医科大学第一医院放射科CT室

李胜 研究员
山东省肿瘤防治研究院肝胆外科

刘丽江 教授
江汉大学肿瘤研究所

刘连新 教授
哈尔滨医科大学第一临床医学院普通外科

刘森 副教授
安徽医科大学病原生物学

邱伟华 主任医师
上海交通大学医学院附属瑞金医院普外科

孙殿兴 主任医师
白求恩国际和平医院肝病科

万军 教授
中国人民解放军总医院南楼老年消化科

王健生 教授
西安交通大学医学院第一附属医院肿瘤外科

王凯 研究员
山东大学齐鲁医院肝病科

王富春 教授
长春中医药大学针灸推拿学院

王娅兰 教授
重庆医科大学基础医学院病理教研室

王正康 教授
中日友好医院普外科

魏睦新 教授
南京医科大学第一附属医院

吴泰璜 教授
山东省立医院肝胆外科

夏时海 副教授
武警后勤学院附属医院肝胆胰脾科(中心)

宣世英 教授
青岛市立医院肝病内科