

铜绿假单胞菌制剂在恶性肿瘤中的辅助治疗作用

王浦华, 沈通一, 葛海燕

王浦华, 沈通一, 葛海燕, 同济大学附属第十人民医院胃肠外科 上海市 200072

葛海燕, 教授, 主要从事胃肠道肿瘤外科综合治疗的研究.

作者贡献分布: 本文综述由王浦华完成; 沈通一与葛海燕审核.

通讯作者: 葛海燕, 教授, 主任医师, 博士生导师, 200072, 上海市, 同济大学附属第十人民医院胃肠外科. gesurgery@163.com

收稿日期: 2010-08-30 修回日期: 2010-10-08

接受日期: 2010-10-18 在线出版日期: 2010-10-28

Role of PA-MSHA vaccine in adjuvant therapy for malignant tumors

Pu-Hua Wang, Tong-Yi Shen, Hai-Yan Ge

Pu-Hua Wang, Tong-Yi Shen, Hai-Yan Ge, Department of Gastrointestinal Surgery, the 10th People's Hospital of Tongji University, Shanghai 200072, China

Correspondence to: Professor Hai-Yan Ge, Department of Gastrointestinal Surgery, the 10th People's Hospital of Tongji University, Shanghai 200072, China. gesurgery@163.com

Received: 2010-08-30 Revised: 2010-10-08

Accepted: 2010-10-18 Published online: 2010-10-28

Abstract

Nowadays, malignant tumors have increasingly tended to be treated in a comprehensive manner. *Pseudomonas aeruginosa*-mannose sensitive hemagglutinin (PA-MSHA) vaccine is a class of immunotherapeutic agents that are being trialed for tumor treatment. This paper focuses on the research on the effect of PA-MSHA vaccine in adjuvant therapy for malignant tumors.

Key Words: *Pseudomonas aeruginosa*-mannose sensitive hemagglutinin vaccine; Malignant tumor; Immunotherapy

Wang PH, Shen TY, Ge HY. Role of PA-MSHA vaccine in adjuvant therapy for malignant tumors. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(30): 3171-3174

摘要

当前, 恶性肿瘤已越来越趋向于多方面的综合治疗. 带有甘露糖敏感性血凝菌毛的铜绿假单胞菌(*pseudomonas aeruginosa*-mannose sensitive hemagglutinin, PA-MSHA)制剂是一类用于免疫治疗的生物制剂, 正被应用于恶性

肿瘤的治疗过程中. 本文重点介绍PA-MSHA制剂对恶性肿瘤辅助治疗作用的研究进展.

关键词: 带有甘露糖敏感性血凝菌毛的铜绿假单胞菌; 恶性肿瘤; 免疫治疗

王浦华, 沈通一, 葛海燕. 铜绿假单胞菌制剂在恶性肿瘤中的辅助治疗作用. 世界华人消化杂志 2010; 18(30): 3171-3174

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/3171.asp>

0 引言

随着肿瘤免疫治疗的兴起, 以其为基础的生物治疗(biotherapy)正逐步被接受, 并受到人们的重视. 生物治疗是指调节和增强机体固有的抗癌能力, 抑制和杀伤肿瘤细胞, 或使其转化为良性组织细胞, 已成为恶性肿瘤综合治疗中重要的一部分. 带有甘露糖敏感性血凝菌毛的铜绿假单胞菌(*pseudomonas aeruginosa*-mannose sensitive hemagglutinin, PA-MSHA)制剂是一种通过基因工程开发和制备的生物制剂^[1], 目前已广泛应用于多种恶性肿瘤的免疫辅助治疗. 我们就PA-MSHA在常见恶性肿瘤综合治疗中的辅助作用作一综述.

1 PA-MSHA简介及其免疫作用机制

早在几个世纪前, 人们从感染可以使肿瘤消退的临床病例中意识到, 微生物及其产物可以用来治疗肿瘤. 其中最典型的代表是“Coley疗法”, 美国外科医生Coley应用杀死的化脓性链球菌及灵杆菌滤液治疗癌症患者, 成为第1代肿瘤生物疗法. 但由于不良反应大, 限制了他的临床应用. 20世纪50年代以来, 卡介苗、短小棒状杆菌、免疫核糖核酸等相继应用于临床, 并取得了一定的疗效^[2].

PA-MSHA由我国著名的微生物学者牟希亚教授所创建, 是以铜绿假单胞菌为载体, 通过诱导隐性的甘露糖敏感性血凝(mannose sensitive hemagglutination, MSHA)菌毛基因的表达, 使铜绿假单胞菌表面表达丰富的MSHA菌毛, 经过灭活和传代后制成. PA-MSHA菌苗是普通 I 型菌

■背景资料

PA-MSHA由我国著名的微生物学者牟希亚教授所创建, 是以铜绿假单胞菌为载体, 通过诱导隐性的甘露糖敏感性血凝(MSHA)菌毛基因的表达, 使铜绿假单胞菌表面表达丰富的MSHA菌毛, 经过灭活和传代后制成. 目前已广泛应用于多种恶性肿瘤的免疫辅助治疗.

■同行评议者

邹小明, 教授, 哈尔滨医科大学附属第二医院普外科

■研发前沿

恶性肿瘤的免疫治疗是当前研究的热点,以手术、放化疗、免疫治疗等为主的综合治疗是肿瘤的主要治疗手段。铜绿假单胞菌制剂作为目前广泛应用的生物制剂之一,越来越受到人们的重视。

毛与铜绿假单胞菌自身菌毛及菌体结合在一起的综合性抗原物质,高效和广谱免疫原性是其特征,因而有诱导产生多种抗体的作用^[3]。实验证明,该菌苗能激活小鼠自然杀伤(nature killer, NK)细胞和巨噬细胞,提高获得性免疫系统的细胞毒性T淋巴细胞(cytotoxic T lymphocytes, CTL)细胞活性,诱导小鼠脾细胞产生干扰素,诱导巨噬细胞产生IL-1,激发小鼠多克隆B淋巴细胞产生能与多种细菌如大肠杆菌、肺炎克雷白氏杆菌、变形杆菌、绿脓杆菌发生反应的高效价交叉抗体,从而有效地防治细菌感染^[4]。PA-MSHA对于移植S180肉瘤小鼠,较对照组明显延长了其生存时间,与通过提高机体对病原体的免疫防御能力有关^[5]。

CTL和固有免疫系统的NK细胞是负责机体肿瘤免疫监视职能的最重要的两种效应细胞,CTL和NK细胞的有效活化是肿瘤免疫治疗成败的关键^[6]。相关实验表明,PA-MSHA可以在体外刺激淋巴细胞活化,促使外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cells, PBMC)细胞群表达CD2+、CD69+和CD25+细胞明显增加,CD69+和CD25+都是活化T淋巴细胞的标志,表明PA-MSHA具有活化T淋巴细胞的功能^[7]。而另一项实验发现,随着PA-MSHA浓度梯度的上升,小鼠NK细胞的靶细胞杀伤率显著提高,说明该菌苗可以刺激增强小鼠NK细胞杀伤活性^[8]。

2 PA-MSHA在恶性肿瘤治疗中的作用

2.1 乳腺癌 乳腺癌全身治疗的主要手段是化疗,但化疗在非特异性杀死肿瘤细胞的同时,对机体免疫功能产生了抑制作用。因此具有特异性杀伤作用,同时增强机体免疫功能的生物治疗逐步受到重视。

Liu等^[9]发现PA-MSHA在体外可以显著抑制乳腺癌细胞的增殖,促进其凋亡,经PA-MSHA作用后能显著提高G₀-G₁期细胞比例;通过电镜可以观察到肿瘤细胞表面吸附着铜绿假单胞菌样的棒状物,并使得肿瘤细胞的生物学行为发生改变,包括细胞增殖减慢、细胞体积缩小、细胞膜结构破坏、细胞器破坏、细胞内出现大量空泡、微绒毛减少等一系列改变,表明PA-MSHA可以特异地与肿瘤细胞结合并且引起细胞凋亡。他们认为,引起肿瘤细胞凋亡主要是通过表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)通路和死亡受体信号转导通路,使得肿瘤细胞内高表达caspase3, 8, 9和Fas蛋白。王

浩等^[10]也通过体外实验发现了PA-MSHA对人乳腺癌细胞(MCF-7)有着抑制增殖、诱发细胞凋亡的作用。

新辅助化疗是乳腺癌进行手术及局部放疗前的一种全身化疗手段,可以明显降低分期,提高手术切除率,还可以使潜在的微小转移得以控制,减少远处播散的可能。陈卫东等^[11]和徐峰等^[12]在临床试验中发现,接受新辅助化疗的患者同时使用PA-MSHA,可以增加乳腺癌患者的化疗疗效,并且试验组对于化疗的不良反应呈现良好的耐受。乳腺癌术后发生的常见并发症,如皮下积液、皮瓣坏死等,发生率较对照组明显降低,可能与术前使用新辅助化疗和PA-MSHA后肿块缩小,从而使手术切除范围变小,组织损伤减小有关。也可能PA-MSHA具有广谱、较强的免疫原性,不仅调节体内的体液免疫功能,使机体获得了不同菌属的高效价广谱抗体,同时调整机体的细胞免疫功能,诱导辅助性T淋巴细胞1型(helper T cells type 1, Th1)和NK细胞的活化,使机体抗感染能力增强。王浩等^[13]通过给予乳腺癌癌性溃疡的患者联合使用化疗和PA-MSHA,有效率明显高于单纯化疗组,其能防止乳腺癌溃疡面感染的发生,同时杀伤溃疡面浸润的肿瘤细胞,诱导创伤修复过程中的炎症反应,从而促进溃疡创面的愈合。

2.2 胃肠道恶性肿瘤 胃肠道恶性肿瘤的治疗已趋向于手术、化疗、放疗、靶向治疗、免疫治疗等联合的综合治疗为主。PA-MSHA作为免疫治疗的一种生物制剂,已经应用于胃肠道恶性肿瘤的临床治疗过程中。

在一项关于PA-MSHA对胃癌细胞体外杀伤作用的实验中^[14],PA-MSHA作用下的胃癌细胞株MKN45,其反映活细胞增殖程度的MTT值显著下降,且随着用药浓度的增加,细胞存活数下降更为明显。由于PA-MSHA表面表达丰富的MSHA菌毛,不仅与胃癌细胞发生特异性结合,还可以穿透细胞膜进入到肿瘤细胞内,使肿瘤细胞的生物学行为发生改变,包括细胞增殖减慢、细胞数量减少、细胞体积缩小、细胞膜结构破坏、微绒毛明显减少。透射电镜观察和TUNEL法检测也证实了上述细胞凋亡的一系列表现。这一体外杀伤胃癌细胞的实验,为PA-MSHA的临床作用提供了依据。NK细胞作为细胞免疫的非特异性成分,不依赖于抗原和补体,可直接发挥其在抗肿瘤细胞和调节机体免疫功能上的作用。胃癌动物模型实验证实,NK细胞降

■相关报道

凌伟等发现,与常规腹腔内化疗相比,PA-MSHA作为腹腔内化疗的手段之一,用药组的腹膜复发和腹水脱落癌细胞阳性率方面显著低于对照组。

低术后发生肝癌转移及腹膜转移率明显升高^[15]. PA-MSHA可诱导NK细胞活化, 临床试验证实, PA-MSHA可以帮助改善患者的细胞免疫和NK细胞状况. 胃癌患者使用PA-MSHA进行创面及腹腔喷洒, 术后继续给予皮下注射, 外周血检测CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺和NK细胞的数量较术前明显上升, 与对照组相比也均显著上升. 研究认为, 胃癌的发生发展等与其对免疫系统的抑制和逃避有着十分密切的关系. PA-MSHA不仅可以提高胃癌患者术后的T淋巴细胞和NK细胞的数量, 改善免疫功能, 而且PA-MSHA特异性的与胃癌细胞结合后, 放大肿瘤细胞的抗原信号以刺激抗原提呈细胞(树突状细胞、单核巨噬细胞等), 重新建立免疫监视和免疫应答^[16]. PA-MSHA更能刺激T淋巴细胞向Th1转化, 并诱导IL-2、INF- γ 等细胞因子的产生, 进一步增强NK细胞活性^[17,18].

胃癌侵及或突出于浆膜就有可能发生肿瘤细胞脱落于腹腔, 手术本身也可促使肿瘤细胞脱落, 形成亚临床病灶或微转移灶, 是胃癌术后腹腔复发和转移的重要原因. 腹腔内化疗是一种局部化疗措施, 可以有效地预防肿瘤在腹腔脏器和腹膜上种植, 杀灭微转移灶、控制癌性腹水. 但腹腔化疗也有其明显不足之处: 化疗药物分子量大, 难以渗入腹膜; 此外还可能造成一定的组织损伤, 比如粘连性肠梗阻、肠麻痹、一过性肝肾功能损伤、化学性腹膜炎等. 凌伟等^[16]发现, 与常规腹腔内化疗相比, PA-MSHA作为腹腔内化疗的手段之一, 用药组的腹膜复发和腹水脱落癌细胞阳性率方面显著低于对照组. 表明了PA-MSHA可以有效控制和预防腹腔复发和转移. PA-MSHA通过对胃癌患者免疫功能的调节, 在特异性结合并诱导肿瘤细胞凋亡的基础上, 帮助发挥机体自身的免疫功能, 加强对胃癌细胞的杀伤作用和免疫监视作用, 对胃癌的复发和转移起到了一定的抑制效果. 比传统的腹腔内化疗, PA-MSHA更好地与肿瘤细胞发生反应, 不良反应小这一优点, 更能被医生和患者所接受.

PA-MSHA在结直肠癌方面的研究尚不及胃癌, 仅有一项临床试验表明, 晚期结直肠癌患者术中使用PA-MSHA, 具有提高1年生存率和延长中位生存期的倾向^[19]. 该制剂在结直肠癌中的应用还有待人们进一步试验.

2.3 肺癌 杨彦卓等^[20]在肺癌患者手术结束前胸腔内注射PA-MSHA, 并在术后第4天开始连续

皮下注射10 d, 观察到试验组患者的T淋巴细胞和NK细胞数量显著高于对照组, 提示患者的肿瘤免疫功能在术后得到了有效的重建. 而且试验组的患者均无术后感染发生, 对于肺癌患者术后的预后具有重要的意义. 在一项关于化疗联合PA-MSHA的临床试验中, 实验组的CD3⁺、CD4⁺、CD4⁺/CD8⁺、NK细胞活性和IL-2水平均高于对照组, 试验组治疗的有效率与对照组的差异显著, 进一步说明了PA-MSHA对于肺癌患者的免疫功能有着正向调节作用, 并且依靠其产生的多价菌苗抗体滴度, 使得肺癌合并感染的感染率和感染程度下降^[21].

恶性胸腔积液是晚期肺癌严重的并发症之一, 预后很差. 但如采用积极的局部治疗和全身治疗可提高患者的生活质量和延长生存期. 局部治疗的关键是尽量引净胸腔积液, 这对中等量或大量恶性胸腔积液显得尤为重要, 然后注入化疗药物或生物反应调节剂等. 顾洪兵等^[22]应用了微管引流胸腔积液, 引净后灌注PA-MSHA和顺铂进行治疗, 其有效率为78%, 中位生存期248 d, 长于恶性胸腔积液的自然生存期4-6 mo. 他们认为PA-MSHA和顺铂在治疗上有协同作用或相加作用, 并且由于PA-MSHA特异性与肿瘤细胞结合并诱导其凋亡, 可以起到控制恶性胸腔积液的作用. 通过单独使用PA-MSHA胸膜腔注射后, 也可达到令人满意的治疗效果^[23].

3 结论

PA-MSHA是一种新兴的免疫调节制剂, 具有特异性高、调节和重建机体免疫功能、安全性好、不良反应低等优点. 大量实验和临床研究表明, PA-MSHA与手术、化疗、放疗等联合应用, 对于多种恶性肿瘤均有积极的作用, 其作用机制也逐渐地被人们揭示.

对于一些难以手术切除、或者行姑息性切除的晚期肿瘤患者, 我们在手术中直接将PA-MSHA注射入残余肿瘤内部, 以及喷洒在转移灶和血管淋巴丰富的区域, 可以起到有效地抗肿瘤作用和刺激免疫应答. PA-MSHA已得到了良好的效果, 但是仍然有一些问题需要进一步探讨和解决: (1)就目前而言, PA-MSHA使用的剂量仍不确定, 大多为经验用药, 是否有可能采取统一的剂量以达到更好的效果, 推出规范化的使用剂量、方法? (2)PA-MSHA一般在术中及术后短期使用, 作为一种免疫治疗的生物制剂, 是否可以在手术前就给肿瘤患者使用, 改善其内

■创新盘点

本文紧扣铜绿假单胞菌制剂作为恶性肿瘤治疗中的新兴方法, 分别介绍了该制剂在几种常见恶性肿瘤综合治疗中的应用.

■同行评价

本文内容全面,可读性及科学性较好。

在的免疫环境,对于抑制肿瘤进一步生长和转移是否更有帮助?(3)对于恶性肿瘤的治疗,规范的放化疗是手术以外的一种常规且重要的治疗措施,但是由于放化疗所引起的免疫抑制等不良反应一直困扰着我们,是否可以将PA-MSHA联合放化疗进行按疗程使用,从而改善因放化疗而引起的一系列不良反应?我们相信,通过更多的基础实验以及临床研究,PA-MSHA在不久的将来可以更多地应用于恶性肿瘤的临床治疗中。

4 参考文献

- 1 牟希亚. 绿脓杆菌甘露糖敏感血凝菌毛株的建立. 微生物学报 1986; 26: 176-179
- 2 曹广文, 杜平. 现代癌症生物治疗学. 第1版. 北京: 北京人民军医出版社, 1995: 3-4
- 3 牟希亚, 郭雁群, 付宏文. PA菌毛株疫苗的应用研究. 大连医学院学报 1990; 12: 63-68
- 4 李志平, 郝德治, 任莉, 杨玉琼, 李丽云, 周喜荣. PA-MSHA菌苗辅助治疗肺癌临床研究. 四川医学 2000; 21: 193-195
- 5 张明策, 潘兴瑜, 李宏伟. PA-MSHA、BCG分别联合S-180瘤苗对荷瘤小鼠治疗作用的比较. 锦州医学院学报 1997; 18: 27-30
- 6 Chan CW, Housseau F. The 'kiss of death' by dendritic cells to cancer cells. *Cell Death Differ* 2008; 15: 58-69
- 7 廖伟娇, 朱彤, 郑曲波, 贡玉川. 绿脓杆菌菌毛制剂对人PBMC表达CD2、CD25、CD69抗原的促进作用. 广州医学院学报 2003; 31: 46-48
- 8 张明策, 金艳书. PA-MSHA菌苗对小鼠淋巴细胞增殖和NK细胞活性的影响. 锦州医学院学报 1994; 15: 1-3
- 9 Liu ZB, Hou YF, Di GH, Wu J, Shen ZZ, Shao ZM. PA-MSHA inhibits proliferation and induces apoptosis through the up-regulation and activation of caspases in the human breast cancer cell lines. *J Cell Biochem* 2009; 108: 195-206
- 10 王浩, 唐利立. 铜绿假单胞菌注射液对人乳腺癌细胞的体外杀伤及促凋亡作用研究. 中南药学 2010; 8:

307-310

- 11 陈卫东, 唐中华, 徐峰. TAC方案联合使用绿脓杆菌制剂在乳腺癌新辅助化疗中的应用研究. 南方医科大学学报 2009; 29: 1204-1207
- 12 徐峰, 唐中华, 李允山, 陈干农, 周恩相, 陈显玉, 易文君. 铜绿假单胞菌制剂在乳腺癌新辅助化疗中的应用. 中南药学 2009; 7: 626-629
- 13 王浩, 罗以, 唐利立. 铜绿假单胞菌注射液治疗乳腺癌癌性溃疡的临床研究. 中南药学 2010; 8: 64-66
- 14 凌伟, 刘骅, 曹晖, 郁丰荣, 徐佳. 铜绿假单胞菌注射液对胃癌细胞体外杀伤作用的观察. 中华肿瘤防治杂志 2008; 15: 1381-1385
- 15 Furukawa T, Kubota T, Watanabe M, Kuo TH, Kitajima M, Hoffman RM. Differential chemosensitivity of local and metastatic human gastric cancer after orthotopic transplantation of histologically intact tumor tissue in nude mice. *Int J Cancer* 1993; 54: 397-401
- 16 凌伟, 刘骅, 曹晖, 郁丰荣, 徐佳. 铜绿假单胞菌注射液预防胃癌术后腹腔复发与转移的研究. 中国实用外科杂志 2009; 29: 933-936
- 17 Jia L, Wang C, Kong H, Yang J, Li F, Lv S, Xu G. Effect of PA-MSHA vaccine on plasma phospholipids metabolic profiling and the ratio of Th2/Th1 cells within immune organ of mouse IgA nephropathy. *J Pharm Biomed Anal* 2007; 43: 646-654
- 18 刘昀, 范艳莹, 李丽, 尹凌凡, 杨滨燕, 张宜俊, 吴长有. 绿脓杆菌制剂与IL-12在诱导人NK细胞IFN- γ 产生中的协同作用. 现代免疫学 2007; 27: 488-492
- 19 林涛, 宋纯, 王辉. 晚期结直肠癌术中使用铜绿假单胞菌制剂的生存期观察. 中国肺癌杂志 2009; 12: 639-641
- 20 杨彦卓, 齐大亮, 张帆, 尤健, 张振, 黄崇标, 岳杰. 铜绿假单胞菌注射液对非小细胞肺癌患者术后免疫功能的影响. 中华肿瘤防治杂志 2010; 17: 464-466
- 21 郑琴, 孙依萍, 蔡蓉, 王春燕, 俞静. 绿脓杆菌制剂辅助治疗肺癌临床研究. 实用医学杂志 2007; 23: 2487-2489
- 22 顾洪兵, 朱亚芳, 姚卫东, 宋诸臣, 陆俊国, 谭清和, 吉志固, 李明. 微管引流灌注绿脓杆菌制剂联合顺铂治疗恶性胸腔积液临床观察. 肿瘤防治研究 2008; 35: 823-824
- 23 徐虹, 杨雨田, 卢慧宇. 铜绿假单胞菌制剂治疗肺癌伴恶性胸水40例. 军医进修学院学报 2009; 30: 841, 843

编辑 李薇 电编 何基才

ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) CN 14-1260/R 2010年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

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

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

胰岛素抵抗在非酒精性脂肪肝发病中的作用

王炳芳, 田培营, 冯堃, 吴福荣, 陆永高, 杨英

王炳芳, 冯堃, 吴福荣, 陆永高, 杨英, 江苏大学附属昆山医院消化科 江苏省昆山市 215300

田培营, 复旦大学附属金山医院消化科 上海市 200540

王炳芳, 主任医师, 教授, 主要从事消化系统疾病的临床及实验方面的研究。

作者贡献分布: 本课题由王炳芳与冯堃合作设计; 整个实验及操作由田培营完成; 数据整理统计由田培营、吴福荣、陆永高及杨英完成; 论文撰写由王炳芳与田培营完成。

通讯作者: 王炳芳, 主任医师, 教授, 215300, 江苏省昆山市前进路91号, 江苏大学附属昆山医院消化科. shbingfang@163.com
电话: 0512-57576025

收稿日期: 2010-07-08 修回日期: 2010-09-18

接受日期: 2010-09-27 在线出版日期: 2010-10-28

Role of insulin resistance in the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease

Bing-Fang Wang, Pei-Ying Tian, Kun Feng, Fu-Rong Wu, Yong-Gao Lu, Ying Yang

Bing-Fang Wang, Kun Feng, Fu-Rong Wu, Yong-Gao Lu, Ying Yang, Department of Gastroenterology, Kunshan Hospital of Jiangsu University, Kunshan 215300, Jiangsu Province, China

Pei-Ying Tian, Department of Gastroenterology, Jinshan Hospital of Fudan University, Shanghai 200540, China

Correspondence to: Professor Bing-Fang Wang, Department of Gastroenterology, Kunshan Hospital of Jiangsu University, Kunshan 215300, Jiangsu Province, China. shbingfang@163.com

Received: 2010-07-08 Revised: 2010-09-18

Accepted: 2010-09-27 Published online: 2010-10-28

Abstract

AIM: To investigate the role of insulin resistance (IR) in the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease in rats.

METHODS: Sprague-Dawley rats were randomly divided into normal control group and model group. The model group was fed a high-fat cholesterol-rich diet for 8 wk to induce nonalcoholic fatty liver disease and insulin resistance. The model group was further divided randomly into two equal subgroups: model control subgroup and therapeutic subgroup. Physiological saline and rosiglitazone maleate were given to the model control subgroup and therapeutic subgroup for 4 wk, respectively. Hepatic histological changes were then observed. Fasting plasma glucose, fasting insulin, plasma ApoC II

and ApoC III were determined to calculate insulin resistance index. The activity of lipoprotein lipase and hepatic lipase was measured, and the expression of ApoB-100 mRNA was detected.

RESULTS: Compared with the normal control group, the body mass, fasting plasma glucose, fasting insulin and insulin resistance index were significantly higher in the model control subgroup and therapeutic subgroup (fasting plasma glucose: $6.46 \text{ mmol/L} \pm 0.75 \text{ mmol/L}$, $6.61 \text{ mmol/L} \pm 0.45 \text{ mmol/L}$ vs $5.48 \text{ mmol/L} \pm 0.47 \text{ mmol/L}$; fasting insulin: $78.82 \text{ mU/L} \pm 11.13 \text{ mU/L}$, $78.48 \text{ mU/L} \pm 12.94 \text{ mU/L}$ vs $40.90 \text{ mU/L} \pm 7.76 \text{ mU/L}$; insulin resistance index: 22.48 ± 2.81 , 22.98 ± 3.47 vs 9.85 ± 1.15 ; all $P < 0.05$). Histological analysis revealed that the rats of the model control subgroup and therapeutic subgroup met the diagnostic criteria for fatty liver. Compared with the model control subgroup, hepatic histological changes were milder in the therapeutic subgroup. Treatment with rosiglitazone maleate significantly lowered the fasting plasma glucose ($6.01 \text{ mmol/L} \pm 0.56 \text{ mmol/L}$ vs $6.43 \text{ mmol/L} \pm 0.47 \text{ mmol/L}$), fasting insulin ($68.11 \text{ mU/L} \pm 10.52 \text{ mU/L}$ vs $82.48 \text{ mU/L} \pm 15.20 \text{ mU/L}$), insulin resistance index (18.49 ± 2.44 vs 23.39 ± 3.16) and plasma ApoC III level, but increased plasma ApoC II level and the activity of lipoprotein lipase.

CONCLUSION: Improvement of insulin resistance in fatty liver rats can improve the activity of lipoprotein lipase and hepatic lipase by altering plasma ApoC II and ApoC III levels, promote the degradation of peripheral very low-density lipoprotein and triglycerides, up-regulate hepatic expression of ApoB-100 mRNA, facilitate the synthesis of very low-density lipoprotein in the liver and the transport of endogenous triglycerides, and lessen fatty infiltration of the liver.

Key Words: Rosiglitazone maleate; Insulin resistance; Nonalcoholic fatty liver; Triglyceride; Very low density lipoprotein; Lipoprotein lipase; Apolipoprotein C II

Wang BF, Tian PY, Feng K, Wu FR, Lu YG, Yang Y. Role

■背景资料

脂肪肝的主要发病机制是脂质代谢紊乱, 极低密度脂蛋白(VLDL)的分解代谢较为关键。VLDL在分解转化过程中, 其关键酶脂蛋白脂肪酶(LPL)和肝脂肪酶(HL)的分泌受胰岛素的调控, 这两种酶的活化, 必须由ApoC II激活, 而ApoC III则抑制其活化。

■同行评议者

范建高, 教授, 上海交通大学医学院附属新华医院消化内科

■研究前沿

非酒精性脂肪肝(NAFL)是一种代谢综合征性疾病,脂质代谢紊乱,致使三酰甘油(TG)在肝细胞内沉积,其发病率逐年增高,是目前研究的热点。近年来,胰岛素抵抗(IR)在NAFL发病中的作用备受关注。

of insulin resistance in the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(30): 3175-3180

摘要

目的: 探讨胰岛素抵抗(IR)在非酒精性脂肪肝(NAFL)大鼠脂肪肝模型中的作用机制。

方法: 大鼠随机分为空白对照组、脂肪肝模型对照组(模型+生理盐水组)和脂肪肝实验组(模型+罗格列酮组)。其中脂肪肝模型对照组和脂肪肝实验组分别予生理盐水和马来酸罗格列酮干预治疗4 wk。观察各组大鼠肝脏大体形态和组织学改变;检测空腹血糖(FPG),空腹血胰岛素水平(FINS),计算胰岛素抵抗指数(IRI);检测血浆ApoC II、ApoC III水平及血浆脂蛋白脂肪酶(LPL)、肝脂肪酶(HL)活性和大鼠肝组织ApoB-100 mRNA的表达量。

结果: 治疗前,脂肪肝组大鼠(包括脂肪肝模型组和脂肪肝实验组)与空白对照组大鼠比较,肝脏组织学改变达到脂肪肝诊断标准, FPG、FINS明显升高($6.46 \text{ mmol/L} \pm 0.75 \text{ mmol/L}$, $6.61 \text{ mmol/L} \pm 0.45 \text{ mmol/L}$ vs $5.48 \text{ mmol/L} \pm 0.47 \text{ mmol/L}$; $78.82 \text{ mU/L} \pm 11.13 \text{ mU/L}$, $78.48 \text{ mU/L} \pm 12.94 \text{ mU/L}$ vs $40.90 \text{ mU/L} \pm 7.76 \text{ mU/L}$), IR也明显升高(22.48 ± 2.81 , 22.98 ± 3.47 vs 9.85 ± 1.15), 血浆ApoC II水平降低、ApoC III水平升高, LPL和HL酶活性均降低, 肝组织ApoB-100 mRNA的表达量降低。马来酸罗格列酮干预治疗4 wk后, 与脂肪肝模型对照组比较, 脂肪肝实验组大鼠肝脏大体标本和组织学脂肪变性情况明显减轻, FPG, FINS降低($6.01 \text{ mmol/L} \pm 0.56 \text{ mmol/L}$ vs $6.43 \text{ mmol/L} \pm 0.47 \text{ mmol/L}$, $68.11 \text{ mU/L} \pm 10.52 \text{ mU/L}$ vs $82.48 \text{ mU/L} \pm 15.20 \text{ mU/L}$), IR降低(18.49 ± 2.44 vs 23.39 ± 3.16), 血浆ApoC II水平升高, ApoC III水平降低, LPL和HL酶活性均增加, 肝组织ApoB-100 mRNA的表达量上升。

结论: 高脂肪高胆固醇饮食可以成功造成SD大鼠有IR的NAFL模型。通过改善脂肪肝大鼠的IR, 可以改变血浆ApoC II、ApoC III水平来提高LPL和HL的酶活性, 加速外周VLDL和TG的降解, 促使肝组织ApoB-100 mRNA的表达量上升, VLDL在肝脏合成加快, 从而加快内源性TG的转运, 减轻肝细胞脂肪浸润。

关键词: 马来酸罗格列酮; 胰岛素抵抗; 非酒精性脂肪肝; 三酰甘油; 极低密度脂蛋白; 脂蛋白脂肪酶; 载脂蛋白C II

王炳芳, 田培营, 冯堃, 吴福荣, 陆永高, 杨英. 胰岛素抵抗在非

酒精性脂肪肝发病中的作用. *世界华人消化杂志* 2010; 18(30): 3175-3180

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/3175.asp>

0 引言

非酒精性脂肪肝(nonalcoholic fatty liver, NAFL)是一种代谢综合征性疾病,脂质代谢紊乱,致使三酰甘油(triglyceride, TG)在肝细胞内沉积,其发病率逐年增高,是目前研究的热点。近年来,胰岛素抵抗(insulin resistance, IR)在NAFL发病中的作用备受关注^[1], 新近的研究表明^[2], 在极低密度脂蛋白(very low density lipoprotein, VLDL)的分解转化过程中, 其关键酶脂蛋白脂肪酶(lipoprotein lipase, LPL)和肝脂肪酶(hepatic lipase, HL)的分泌受胰岛素的调控, 这两种酶的活化, 必须由载脂蛋白C II(apolipoprotein C II, Apo C II)激活, 而ApoC III则抑制其活化^[3,4]。据文献^[5]报道, ApoC II和ApoC III的合成亦受胰岛素的调控, 并且ApoB-100与脂肪分解代谢间有重要关联^[6]。本研究以此为思路, 旨在探讨IR在NAFL大鼠模型中的作用机制。

1 材料和方法

1.1 材料 健康清洁级SD大鼠, 24只, ♂, 体质量190-250 g, 由中国科学院上海实验动物中心提供。许可证号: SCXX(沪)2002-0010。TRIzol: Invitrogen公司; PCR扩增试剂盒: Fermentas公司; 逆转录试剂盒: Fermentas公司; 引物: 上海生工生物工程公司; DNA Marker: 100 bp DNA Ladder, TaKaRa公司; DEPC: Sigma公司; 大鼠胰岛素检测ELISA试剂盒、大鼠ApoC II检测ELISA试剂盒、大鼠ApoC III检测ELISA试剂盒: 上海元象医疗器械有限公司。罗氏便捷血糖仪: 德国罗氏乐康全活力型血糖仪; PCR反应仪: 德国Eppendorf公司; 凝胶电泳仪(水平): BIO-RAD公司; GENE®凝胶图像处理系统: 美国GENE公司。

1.2 方法

1.2.1 分组与处理: 将24只健康SD大鼠进行标记编号并称重, 随机分为正常对照组(N组)和脂肪肝模型组(M组)。N组6只, 正常喂养。M组18只, 高脂肪高胆固醇饮食8 wk^[7]。进行8 wk的高脂肪高胆固醇喂养后, 对所有的大鼠进行肝页部分切除术, 肉眼及光镜下观察肝脏形态学改变。实验过程中2只大鼠因肝页部分切除死亡, 死亡的2只大鼠均为M组大鼠。实验结束时共存活大鼠22只, M组16只, N组6只, 将16只有IR的NAFL大

鼠随机等分为2组, 每组8只, 分别称为脂肪肝模型对照组(D组)和脂肪肝实验组(S组), 仍予高脂肪高胆固醇饮食. 胰岛素增敏剂马来酸罗格列酮3 mg/(kg·d)^[8]对S组大鼠每天定时进行灌胃干预治疗, D组每天与S组同时进行安慰剂(生理盐水)的灌胃干预治疗, 历时4 wk. N组不予处理.

1.2.2 指标检测: (1)肝组织学检查: HE染色观察肝组织脂肪变性程度; (2)采用罗氏便捷血糖仪检测空腹血糖(fasting plasma glucose, FPG), ELISA法测定空腹血胰岛素(fasting insulin, FINS)水平, 利用HOMA-IR公式计算IR值, $IR = FPG(\text{mmol/L}) \times FINS(\text{mIU/L}) / 22.5^{[7]}$; (3) ELISA法检测血浆ApoC II、ApoCIII水平; (4)酶法检测血浆LPL、HL活性; (5)RT-PCR法检测大鼠肝组织ApoB-100 mRNA的表达量. 引物序列与PCR反应条件分别为: $\beta\text{-actin}$: 引物序列上游5'-TTC TTT GCA GCT CCT TCG TTG CCG-3', 下游5'-TGG ATG GCT ACG TAC ATG GCT GGG-3', 反应条件: 退火温度59 °C, 共25个循环. 合成目的片段长度: 457 bp; ApoB: 引物序列上游5'-CAG TAG TAG TGG TGC GTC TT-3', 下游5'-CCT GGA TTT GTC GGT CT-3', 反应条件: 退火温度56.2 °C, 共25个循环. 合成目的片段长度为343 bp.

统计学处理 实验数据用mean±SD表示, 同一组大鼠不同时间之间比较用配对 t 检验; 不同组大鼠之间比较用独立样本 t 检验; 所有数据均在SPSS15.0统计软件进行分析处理, $P < 0.05$ 被认为有统计学意义.

2 结果

2.1 肝脏病理组织学观察 M组大鼠(高脂饮食8 wk后)肝脏HE染色显示: 肝小叶界限不清, 肝细胞索排列紊乱, 多数肝细胞出现严重的脂肪变性, 以小叶周边部最为严重, 肝细胞肿胀成圆形, 胞质内可见大小不一, 数量不等的脂滴空泡, 说明造模成功(图1A). S组大鼠在经过4 wk的罗格列酮干预治疗之后, 大鼠肝脏HE染色发生了一定的改变: 肝细胞脂肪变性有所减轻, 并且出现脂肪变性的细胞数量较治疗前减少(图1B). D组在经过4 wk的安慰剂(生理盐水)治疗之后未见明显变化, 仍存在较严重的脂肪变性(图1C).

2.2 各组大鼠FPG, FINS及IR在干预治疗前后的变化 在经过4 wk的干预治疗后, S组FPG、FINS和IR都较治疗前降低($P < 0.01$), D组FPG、FINS和IR较治疗前无明显变化($P > 0.05$). 说明胰岛素

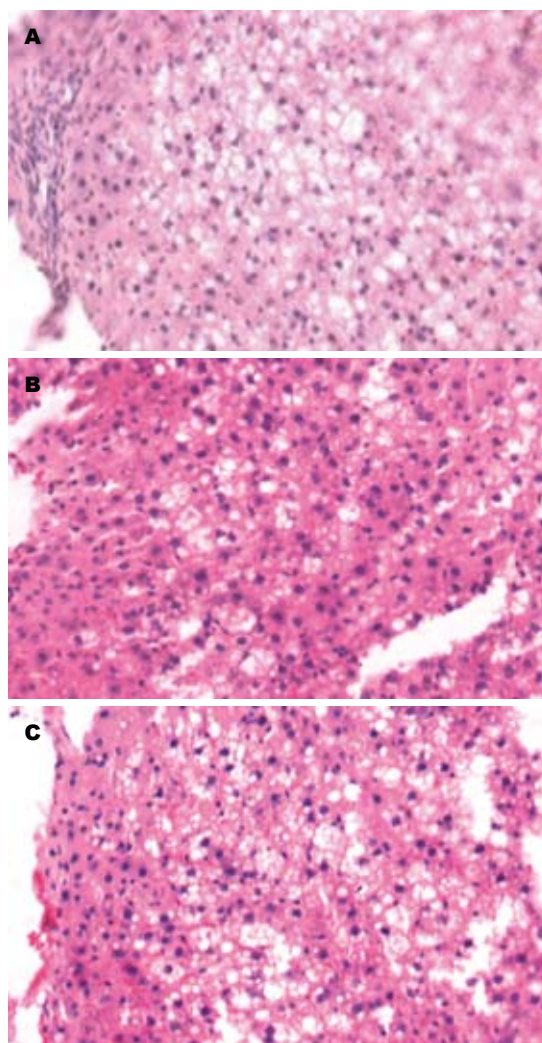


图1 大鼠肝组织病理组织改变(×200). A: M组大鼠8 wk; B: S组4 wk; C: D组4 wk.

增敏剂马来酸罗格列酮可以通过降低NAFL大鼠的FPG和FINS来改善IR(表1).

2.3 各组大鼠血浆ApoC II和ApoC III含量在干预治疗前后的变化 造模成功后(干预治疗前), D组和S组的ApoC II含量较N组降低($P < 0.05$), ApoC III含量较N组升高($P < 0.05$), 在经过4 wk的干预治疗后, S组大鼠的ApoC II含量较治疗前升高($P < 0.05$), ApoC III含量较治疗前降低($P < 0.05$); 而D组的ApoC II、ApoC III含量较治疗前无明显变化($P > 0.05$). N组大鼠的ApoC II和ApoC III含量较8 wk时无明显变化($P > 0.05$, 表2).

2.4 各组大鼠LPL和HL酶活性在干预治疗前后的变化 造模8 wk后, D组和S组的LPL和HL的酶活性均较N组降低($P < 0.01$). 在经过4 wk的干预治疗后, S组大鼠的LPL和HL的酶活性较治疗前升高($P < 0.05$); D组大鼠的LPL、HL的酶活性与治疗前相比无明显变化($P > 0.05$). N组大鼠的LPL和HL酶

■ 相关报道

Cho等报道极低密度脂蛋白(VLDL)的分解转化过程中, 其关键酶脂蛋白脂肪酶(LPL)和肝脂肪酶(HL)的分泌受胰岛素的调控, 这两种酶的活化, 必须由载脂蛋白C II (ApoC II) 激活, 而载脂蛋白C III (ApoC III) 则抑制其活化, ApoC II和ApoC III的合成亦受胰岛素的调控.

■创新盘点

本实验应用高脂饮食喂养法制造具有胰岛素抵抗的脂肪肝大鼠模型,并检测胰岛素增敏药罗格列酮干预前后,大鼠模型组及对照组血浆ApoC II、ApoC III含量和LPL及HL的含量和活性,并分析其与Apo B-100 mRNA在肝细胞表达的关系,研究胰岛素抵抗在非酒精性脂肪肝发病中的作用。

表 1 各组大鼠FPG、FINS及IR在干预治疗前后的变化 (mean ± SD)

分组		FPG(mmol/L)	FINS(mU/L)	IR
N组(n = 6)	8 wk	5.48 ± 0.47	40.90 ± 7.76	9.85 ± 1.15
	12 wk	5.43 ± 0.54	44.69 ± 6.80	10.68 ± 0.99
D组(n = 8)	干预治疗前	6.46 ± 0.75	78.82 ± 11.13	22.48 ± 2.81
	干预治疗后	6.43 ± 0.47	82.48 ± 15.20	23.39 ± 3.16
S组(n = 8)	干预治疗前	6.61 ± 0.45	78.48 ± 12.94	22.98 ± 3.47
	干预治疗后	6.01 ± 0.56 ^a	68.11 ± 10.52 ^a	18.49 ± 2.44 ^b

^aP<0.05, ^bP<0.01 vs S组治疗前。

表 2 各组大鼠血浆ApoC II和ApoC III含量在干预治疗前后的变化 (mean ± SD, g/L)

分组	ApoC II		ApoC III	
	干预治疗前	干预治疗后	干预治疗前	干预治疗后
N组(n = 6)	1.28 ± 0.2554	1.38 ± 0.2827	0.29 ± 0.0537	0.29 ± 0.0463
D组(n = 8)	0.80 ± 0.5149 ^a	1.01 ± 0.4462	0.36 ± 0.0649 ^a	0.33 ± 0.0556
S组(n = 8)	0.70 ± 0.3457 ^a	1.10 ± 0.4085 ^a	0.43 ± 0.1072 ^a	0.34 ± 0.0621 ^a

^aP<0.05 vs N组治疗前。

表 3 各组大鼠LPL和HL酶活性在干预治疗前后的变化 (mean ± SD)

分组	LPL		HL	
	干预治疗前	干预治疗后	干预治疗前	干预治疗后
N组(n = 6)	1.452 ± 0.2761	1.435 ± 0.3372	1.308 ± 0.3377	1.263 ± 0.2201
D组(n = 8)	0.910 ± 0.1364 ^b	0.922 ± 0.1614	0.832 ± 0.1853 ^b	0.842 ± 0.1628
S组(n = 8)	0.913 ± 0.1760 ^b	1.184 ± 0.1748 ^c	0.790 ± 0.0999 ^b	1.194 ± 0.1737 ^d

^bP<0.01 vs N组治疗前; ^cP<0.05, ^dP<0.01 vs S组治疗前。

活性在治疗前后无明显变化($P>0.05$)。说明造模成功后D组和S组大鼠的LPL和HL的酶活性较N组大鼠降低, S组大鼠在经罗格列酮干预治疗后升高, D组大鼠在安慰剂治疗后无明显变化(表3)。

2.5 各组大鼠ApoB-100 mRNA表达量在干预治疗前后的变化 高脂喂养大鼠8 wk后, D组和S组大鼠分别与N组大鼠比较目的基因ApoB-100与管家基因 β -actin的RT-PCR产物灰度值比值, D组和S组大鼠的比值较N组明显降低($P<0.01$)。在经过4 wk的干预治疗后, S组大鼠的RT-PCR产物灰度值比值较治疗前明显升高($P<0.01$, 图2), D组大鼠的RT-PCR产物灰度值比值较治疗前无明显变化($P>0.05$)。N组大鼠的RT-PCR产物灰度值比值在治疗前后无明显变化($P>0.05$, 表4)。

3 讨论

近年来国内外进行了大量的动物实验和临床

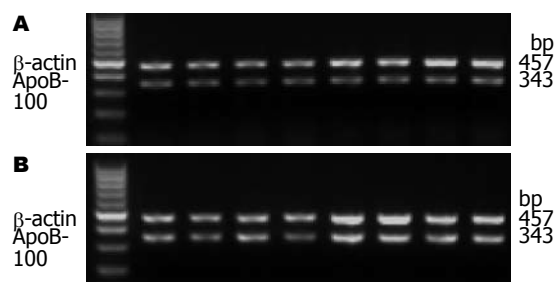


图 2 S组大鼠治疗前后 β -actin和ApoB-100 mRNA的表达。A: 治疗前; B: 治疗后。

研究, 研究证明IR在脂肪肝的发生发展中起重要作用^[9-11]。肝脏摄取组织中游离脂肪酸后使之转变成TG, TG再与特异的载脂蛋白结合生成VLDL, VLDL分泌入血后在LPL和HL的作用下逐步水解, 在此过程中, ApoC II是LPL和HL的激活剂, 在ApoC II存在的情况下, LPL的活性

表 4 各组大鼠ApoB-100 mRNA表达量在干预治疗前后的变化 (mean \pm SD)

分组	ApoB-100灰度值/ β -actin灰度值	
	干预治疗前	干预治疗后
N组($n=6$)	0.68 \pm 0.0743	0.70 \pm 0.0523
D组($n=8$)	0.44 \pm 0.0389 ^b	0.43 \pm 0.0644
S组($n=8$)	0.43 \pm 0.0484 ^b	0.66 \pm 0.0943 ^d

^b $P<0.01$ vs N组治疗前; ^d $P<0.01$ vs S组治疗前。

可以提高10-50倍, 而ApoCIII则有抑制LPL的作用。TG被逐步水解后, ApoB-100及ApoE含量相对增加, 转变为中间密度脂蛋白, 被LPL及HL进一步水解, 最后仅剩下ApoB-100, 中间密度脂蛋白即转变为低密度脂蛋白, 低密度脂蛋白被肝细胞膜表面低密度脂蛋白受体摄取代谢, 形成VLDL。ApoB-100在VLDL的合成中起重要作用, ApoB-100为VLDL合成所必需^[12], 如果ApoB-100合成减少, 就会减少VLDL的合成, 肝脏合成的内源性TG向肝外的转运减少, 导致TG在肝细胞中沉积。且ApoB-100在肝细胞的脂质排泄过程中起限速作用, 因此, ApoB-100合成减少在NAFL的发生发展过程中可能也有重要作用^[6,13]。IR状态下, 胰岛素抑制TG水解, 而脂肪组织过度分解释放大游离脂肪酸被肝细胞摄取, 加速TG及VLDL合成^[14], 同时减弱胰岛素刺激LPL的作用, 使LPL酶活性下降, TG分解减慢, 导致VLDL降解减少, 加重高TG血症。TG水平增加会加重IR, 产生恶性循环^[14,15]。IR发生时肝细胞内出现氧应激反应, 由于TG在肝细胞内蓄积, 大量的游离脂肪酸在线粒体内氧化, 肝细胞对脂肪酸的高摄入导致肝细胞线粒体氧化超载, 反过来影响游离脂肪酸代谢, 进一步加重肝脏的脂质蓄积, 造成肝细胞内脂肪堆积及肝细胞变性、肿大, 形成脂肪肝^[16,17]。

我们的研究是健康SD大鼠在经过8 wk的高脂饮食喂养后, 从肝脏病理切片发现不同程度的肝细胞脂肪浸润, 达到了脂肪肝的组织学诊断标准^[8]; 通过对大鼠FPG和FINS的测定, 根据HOMA-IR公式, 发现脂肪肝大鼠的FPG、FINS、IR都明显高于N组, 说明脂肪肝大鼠发生了明显的IR, 同时都存在高胰岛素血症和血糖升高。从VLDL的代谢途径入手, 分别检测血浆ApoC II和ApoCIII, 血浆中LPL和HL的酶活性, 以及肝组织中ApoB-100 mRNA的表达量, 结果显示, 脂肪肝大鼠血浆中LPL和HL的酶活性较

正常大鼠降低, 导致VLDL在外周降解减少, 同时, 脂肪肝大鼠血浆ApoC II含量降低, ApoCIII含量升高, 可以认为ApoC II含量降低和ApoC III含量升高会使大鼠的LPL和HL的酶活性降低; 而且脂肪肝大鼠肝组织的ApoB-100 mRNA表达量较正常大鼠明显降低。这说明发生了胰岛素抵抗的脂肪肝大鼠由于外周LPL和HL的酶活性下降, 以致VLDL的外周降解减少, 反馈性抑制了VLDL在大鼠肝组织中的合成, 进而抑制了ApoB-100 mRNA在肝组织中的表达, 使ApoB-100在肝脏的合成减少, 抑制了运输内源性TG的VLDL的合成, 造成内源性TG运输受阻, 加重TG在肝脏的沉积。我们通过酶法检测大鼠血浆LPL的活性变化发现, 脂肪肝组大鼠的LPL活性较空白对照组下降。脂肪肝组大鼠LPL活性下降, 会减少血液中VLDL的降解, 加重大鼠的高TG血症, 促进大鼠脂肪肝的形成。

罗格列酮为噻唑烷二酮类胰岛素增敏药, 可通过提高胰岛素的敏感性而有效的控制血糖, 其机制包括可以改善IR^[18-20]。在我们的研究中, 采用安慰剂(生理盐水)作为对照的方法, 发现进行过8 wk高脂饮食饲养的S组大鼠在经过4 wk、3 mg/(kg·d)的马来酸罗格列酮(文迪雅)干预治疗后, FPG、FINS和IR较脂肪肝对照组明显减低; 血浆ApoC II含量较脂肪肝对照组降低, 血浆ApoCIII含量较脂肪肝对照组升高; 血浆LPL和HL的酶活性较脂肪肝对照组降低; 肝组织ApoB-100 mRNA表达量也较脂肪肝对照组明显升高。N组各指标较治疗前(饲养8 wk时)无明显变化。说明马来酸罗格列酮能明显减轻脂肪肝实验组大鼠的FPG、FINS, 改善脂肪肝大鼠的IR, 并且能通过提高血浆ApoC II水平和降低血浆ApoCIII水平来提高LPL和HL的酶活性, 增加外周VLDL的降解, 增加肝组织ApoB-100 mRNA的表达, 减轻肝细胞内TG沉积和肝细胞脂肪浸润, 改善肝细胞脂肪变性, 对脂肪肝起到一定的治疗作用。

NAFL人群发病率约为5%左右, 将成为21世纪最常见的疾病之一^[21-24]。通过本研究结果, 我们可以尝试将针对胰岛素增敏治疗, 调控ApoC II、ApoCIII的表达等治疗手段作为治疗脂肪肝的方法, 将对脂肪肝的临床治疗研究起到一定的启示作用。

4 参考文献

- 1 Raszeja-Wyszomirska J, Lawniczak M, Marlicz W, Miezyńska-Kurtycz J, Milkiewicz P. [Non-alcoholic

■应用要点

采用针对胰岛素增敏治疗、调控ApoC II、ApoC III的表达等, 可作为治疗脂肪肝的手段之一, 对脂肪肝的临床治疗研究起到较大的作用, 将产生较好的社会效益和经济效益。

■同行评价

本文选题新颖, 设计合理, 数据详实, 结论可靠, 可读性好。

- fatty liver disease--new view] *Pol Merkur Lekarski* 2008; 24: 568-571
- 2 Cho YS, Go MJ, Han HR, Cha SH, Kim HT, Min H, Shin HD, Park C, Han BG, Cho NH, Shin C, Kimm K, Oh B. Association of lipoprotein lipase (LPL) single nucleotide polymorphisms with type 2 diabetes mellitus. *Exp Mol Med* 2008; 40: 523-532
- 3 Pulawa LK, Jensen DR, Coates A, Eckel RH. Reduction of plasma triglycerides in apolipoprotein C-II transgenic mice overexpressing lipoprotein lipase in muscle. *J Lipid Res* 2007; 48: 145-151
- 4 Nicolay A, Lombard E, Arlotto E, Saunier V, Lorec-Penet AM, Lairon D, Portugal H. Evaluation of new apolipoprotein C-II and apolipoprotein C-III automated immunoturbidimetric kits. *Clin Biochem* 2006; 39: 935-941
- 5 Blackett PR, Blevins KS, Quintana E, Stoddart M, Wang W, Alaupovic P, Lee ET. ApoC-III bound to apoB-containing lipoproteins increase with insulin resistance in Cherokee Indian youth. *Metabolism* 2005; 54: 180-187
- 6 Skogsberg J, Dicker A, Rydén M, Aström G, Nilsson R, Bhuiyan H, Vitols S, Mairal A, Langin D, Alberts P, Walum E, Tegnér J, Hamsten A, Arner P, Björkegren J. ApoB100-LDL acts as a metabolic signal from liver to peripheral fat causing inhibition of lipolysis in adipocytes. *PLoS One* 2008; 3: e3771
- 7 Feng WQ, Zeng ZH, Zhuo LS. [Influence of electroacupuncture on insulin-resistance in nonalcoholic fatty liver rats] *Zhenci Yanjiu* 2008; 33: 111-115
- 8 Varanasi KK, Potharaju S, Rajak S, Veeraraghavan S, Mallick P, Vakkalanka SK. Effect of pentoxifylline on the pharmacokinetics of rosiglitazone in Wistar rats. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 2008; 30: 537-542
- 9 Zhou WD, Yang YL, Che ZH. [Non-alcoholic fatty liver, high sensitivity C reactive protein and insulin resistance] *Zhongnan Daxue Xuebao Yixueban* 2008; 33: 565-570
- 10 Sakurai M, Takamura T, Ota T, Ando H, Akahori H, Kaji K, Sasaki M, Nakanuma Y, Miura K, Kaneko S. Liver steatosis, but not fibrosis, is associated with insulin resistance in nonalcoholic fatty liver disease. *J Gastroenterol* 2007; 42: 312-317
- 11 Park SH, Kim BI, Kim SH, Kim HJ, Park DI, Cho YK, Sung IK, Sohn CI, Kim H, Keum DK, Kim HD, Park JH, Kang JH, Jeon WK. Body fat distribution and insulin resistance: beyond obesity in nonalcoholic fatty liver disease among overweight men. *J Am Coll Nutr* 2007; 26: 321-326
- 12 Chen Z, Newberry EP, Norris JY, Xie Y, Luo J, Kennedy SM, Davidson NO. ApoB100 is required for increased VLDL-triglyceride secretion by microsomal triglyceride transfer protein in ob/ob mice. *J Lipid Res* 2008; 49: 2013-2022
- 13 Li G, Schonfeld G. [The molecular mechanisms of apolipoprotein B mediating the atherogenic lipoprotein metabolism] *Zhonghua Xinxueguanbing Zazhi* 2006; 34: 571-573
- 14 Duez H, Lamarche B, Valéro R, Pavlic M, Proctor S, Xiao C, Szeto L, Patterson BW, Lewis GF. Both intestinal and hepatic lipoprotein production are stimulated by an acute elevation of plasma free fatty acids in humans. *Circulation* 2008; 117: 2369-2376
- 15 Yan HM, Gao X, Liu M, Gu Q, Zhang B, Li X. [Relationship of liver fat content to insulin resistance and metabolic syndrome] *Zhonghua Yixue Zazhi* 2008; 88: 1255-1258
- 16 Guidorizzi de Siqueira AC, Cotrim HP, Rocha R, Carvalho FM, de Freitas LA, Barreto D, Gouveia L, Landeiro L. Non-alcoholic fatty liver disease and insulin resistance: importance of risk factors and histological spectrum. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2005; 17: 837-841
- 17 Videla LA, Rodrigo R, Araya J, Poniachik J. Insulin resistance and oxidative stress interdependency in non-alcoholic fatty liver disease. *Trends Mol Med* 2006; 12: 555-558
- 18 Fracanzani AL, Valenti L, Bugianesi E, Andreoletti M, Colli A, Vanni E, Bertelli C, Fatta E, Bignamini D, Marchesini G, Fargion S. Risk of severe liver disease in nonalcoholic fatty liver disease with normal aminotransferase levels: a role for insulin resistance and diabetes. *Hepatology* 2008; 48: 792-798
- 19 Xu P, Zhang XG, Li YM, Yu CH, Xu L, Xu GY. Research on the protection effect of pioglitazone for non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) in rats. *J Zhejiang Univ Sci B* 2006; 7: 627-633
- 20 Yang WY. [Insulin resistance as an early marker of non-alcoholic fatty liver] *Zhonghua Neike Zazhi* 2007; 46: 177-178
- 21 Qin S, Li L, Yang GY, Li RZ, Li K, Qi XY, Li SB, Chen WW, Liu H, Tang Y, Boden G. [Effects of visfatin gene overexpression on insulin sensitivity in the insulin-resistant rats induced by high-fat diet] *Zhonghua Yixue Zazhi* 2008; 88: 365-368
- 22 Csont T, Bereczki E, Bencsik P, Fodor G, Görbe A, Zvara A, Csonka C, Puskás LG, Sántha M, Ferdinandy P. Hypercholesterolemia increases myocardial oxidative and nitrosative stress thereby leading to cardiac dysfunction in apoB-100 transgenic mice. *Cardiovasc Res* 2007; 76: 100-109
- 23 Millar JS, Brousseau ME, Diffenderfer MR, Barrett PH, Welty FK, Faruqi A, Wolfe ML, Nartsupha C, Digenio AG, Mancuso JP, Dolnikowski GG, Schaefer EJ, Rader DJ. Effects of the cholesteryl ester transfer protein inhibitor torcetrapib on apolipoprotein B100 metabolism in humans. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006; 26: 1350-1356
- 24 Griffin MD, Mok ML, Wilson LM, Pham CL, Waddington LJ, Perugini MA, Howlett GJ. Phospholipid interaction induces molecular-level polymorphism in apolipoprotein C-II amyloid fibrils via alternative assembly pathways. *J Mol Biol* 2008; 375: 240-256

编辑 李军亮 电编 何基才

姜黄素对CCl₄处理的大鼠PAI-1与u-PA蛋白表达的影响

段雪辉, 汤绍辉, 杨冬华, 黄思敏

段雪辉, 中山大学附属江门医院消化内科 广东省江门市 529030

汤绍辉, 杨冬华, 暨南大学附属第一医院消化内科 广东省广州市 510630

黄思敏, 暨南大学附属第一医院感染科 广东省广州市 510630

作者贡献分布: 此课题由段雪辉、汤绍辉及杨冬华设计; 研究过程由段雪辉与黄思敏完成; 数据分析由段雪辉与黄思敏完成; 本论文写作由段雪辉与汤绍辉完成。

通讯作者: 段雪辉, 主治医师, 529030, 广东省江门市, 中山大学附属江门医院消化内科. psdxxh254@sina.com

电话: 0750-3165792

收稿日期: 2010-07-30 修回日期: 2010-09-29

接受日期: 2010-10-13 在线出版日期: 2010-10-28

Curcumin down-regulates PAI-1 expression but up-regulates u-PA expression in carbon tetrachloride-induced hepatic fibrosis in rats

Xue-Hui Duan, Shao-Hui Tang, Dong-Hua Yang, Si-Min Huang

Xue-Hui Duan, Department of Gastroenterology, Jiangmen Central Hospital, Sun Yat-sen University, Jiangmen 529030, Guangdong Province, China

Shao-Hui Tang, Dong-Hua Yang, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Jinan University, Guangzhou 510630, Guangdong Province, China

Si-Min Huang, Department of Infectious Diseases, the First Affiliated Hospital of Jinan University, Guangzhou 510630, Guangdong Province, China

Correspondence to: Xue-Hui Duan, Department of Gastroenterology, Jiangmen Central Hospital, Sun Yat-sen University, Jiangmen 529030, Guangdong Province, China. psdxxh254@sina.com

Received: 2010-07-30 Revised: 2010-09-29

Accepted: 2010-10-13 Published online: 2010-10-28

Abstract

AIM: To investigate the effects of curcumin on the expression of plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) and urokinase-type plasminogen activator (u-PA) in carbon tetrachloride-induced hepatic fibrosis in rats.

METHODS: One hundred male Sprague-Dawley rats were randomly divided into five groups: normal group, model group, low-, medium- and high-dose curcumin group. Except the normal group, the rats of the other groups were intraperitoneally injected with carbon tetrachloride

for 6 wk to induce liver fibrosis. The rats of the low-, medium- and high-dose curcumin groups were administrated different doses of curcumin. On days 4, 7, 21 and 42 after treatment, five rats randomly selected from each group were sacrificed to take liver specimens for pathological examination (HE). The expression of PAI-1 and u-PA in hepatic fibrosis was detected by immunohistochemistry.

RESULTS: The expression levels of PAI-1 and u-PA were much lower in the normal group than in the model group. Compared to the model group, PAI-1 expression was significantly down-regulated (42 d: 5.60 ± 1.673 , 3.40 ± 1.673 , 2.40 ± 1.140 vs 8.80 ± 2.168 , all $P < 0.05$) and u-PA expression was significantly up-regulated (42 d: 6.00 ± 1.414 , 9.20 ± 1.643 , 9.80 ± 2.049 vs 4.20 ± 1.095 , $P < 0.05$) in the low-, medium- and high-dose curcumin groups. Curcumin treatment altered the expression of PAI-1 and u-PA in a dose- and time-dependent manner.

CONCLUSION: Curcumin exerts anti-fibrotic effects possibly by decreasing the expression of PAI-1 and increasing the expression of u-PA.

Key Words: Curcumin; Hepatic fibrosis; Plasminogen activator inhibitor-1; Urokinase-type plasminogen activator; Immunohistochemistry

Duan XH, Tang SH, Yang DH, Huang SM. Curcumin down-regulates PAI-1 expression but up-regulates u-PA expression in carbon tetrachloride-induced hepatic fibrosis in rats. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(30): 3181-3186

摘要

目的: 探讨姜黄素对CCl₄处理的大鼠肝组织中PAI-1和u-PA蛋白表达的影响。

方法: 100只♂SD大鼠, 随机分为5组: 正常对照组(N), 肝纤维化模型组(M), 姜黄素低剂量组(Cl), 姜黄素中剂量组(Cm), 姜黄素高剂量组(Ch)。M组以CCl₄腹腔注射造模, Cl、Cm、Ch组除腹腔注射CCl₄外, 分别以不同剂量的姜黄素灌胃; 每组分别在实验第4、7、21、

■背景资料

肝纤维化是向肝硬化发展的中间环节, 近年已明确肝星状细胞(HSC)是肝纤维化的中心环节, 是肝纤维化时细胞外基质(ECM)过多产生和沉积的主要细胞来源。正常情况下, ECM的合成与降解处于动态平衡, 肝纤维化时这种平衡被打破, 导致胶原生成增多、ECM过多沉积的肝纤维化病理改变。

■同行评议者

吴俊华, 副主任医师, 南京大学医学院功能评价中心

■ 研究前沿

目前,国内外对细胞外基质方面的研究主要是集中在抑制肝星状细胞活化、阻止胶原生成和促进胶原降解方面;关于肝纤维化过程中纤溶系统所受影响的文献较少,国内外尚未见有关姜黄素对肝纤维化纤溶系统表达影响方面的研究报道。

42天随机取大鼠5只处死,留取同部位肝脏组织行HE染色,用免疫组织化学法检测各组大鼠肝脏组织中PAI-1和u-PA蛋白的表达情况。

结果:在M组,随时间延长,PAI-1和u-PA蛋白表达均不同程度增加,姜黄素低、中、高剂量干预组与M组相比,姜黄素能降低PAI-1蛋白表达(42 d: 5.60 ± 1.673 , 3.40 ± 1.673 , 2.40 ± 1.140 vs 8.80 ± 2.168 , 均 $P < 0.05$),增加u-PA蛋白表达(42 d: 6.00 ± 1.414 , 9.20 ± 1.643 , 9.80 ± 2.049 vs 4.20 ± 1.095 , $P < 0.05$),其作用强度具有剂量和时间依赖性。

结论:姜黄素可通过调节肝纤维化大鼠PAI-1与u-PA蛋白表达,发挥抗肝纤维化作用。

关键词:姜黄素;肝纤维化;1-型纤溶酶原激活抑制物;尿激酶型纤溶酶原激活物;免疫组织化学法

段雪辉, 汤绍辉, 杨冬华, 黄思敏. 姜黄素对CCl₄处理的大鼠PAI-1与u-PA蛋白表达的影响. 世界华人消化杂志 2010; 18(30): 3181-3186

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/3181.asp>

0 引言

肝纤维化是进一步向肝硬化发展的主要中间环节。目前认为,肝脏慢性损伤过程中细胞外基质(extracellular matrix, ECM)累积所形成的肝纤维化是可逆的。随着对肝纤维化发生机制认识地不断深入,特别是对ECM的合成与降解的调控有了更多的了解,近年来的研究认为加快降解比抑制合成更重要^[1]。纤溶系统,特别是尿激酶型纤溶酶原激活物(urokinase-type plasminogen activator, u-PA)及1-型纤溶酶原激活抑制物(plasminogen activator inhibitor-1, PAI-1)与以ECM过多沉积为特征的纤维化疾病关系密切。近年来,大量国内外研究证实姜黄素通过抑制肝星状细胞(hepatic stellate cell, HSC)活化而具有抗肝纤维化作用,但目前尚未见有关姜黄素对纤溶系统表达影响的研究报道。本研究旨在探讨姜黄素通过对大鼠肝纤维化模型纤溶系统成分(PAI-1, u-PA)表达的影响,以进一步明确姜黄素的抗肝纤维化作用机制。

1 材料和方法

1.1 材料 实验动物:SPF(special pathogen free)级SD(Sprague-Dawley)♂大鼠,购自广东省医学实验动物中心,体质量190-220 g。姜黄素为法国Fluka公司产品。兔抗大鼠u-PA多克隆抗体、兔

抗大鼠PAI-1多克隆抗体、即用型SABC免疫组织化学染色试剂盒和DAB显色试剂盒均购自武汉博士德生物工程有限公司。

1.2 方法

1.2.1 分组及用药:100只♂SD大鼠,随机分为5组:正常对照(N)组,腹腔注射生理盐水,生理盐水灌胃;模型(M)组,腹腔注射40% CCl₄溶液1 mL/kg,每周2次,羧甲基纤维素钠(姜黄素配料)灌胃,每天1次,共6 wk;姜黄素低剂量(CI)组,造模同时给低剂量(100 mg/kg)姜黄素灌胃,每天1次;姜黄素中剂量(Cm)组,造模同时给中剂量(200 mg/kg)姜黄素灌胃;姜黄素高剂量(Ch)组,造模同时给高剂量(300 mg/kg)姜黄素灌胃。分别在实验第4、7、21、42天,每组随机处死5只大鼠,切除同一解剖部位的肝脏于3.33 mol/L的甲醛溶液中固定,石蜡包埋,行HE染色。

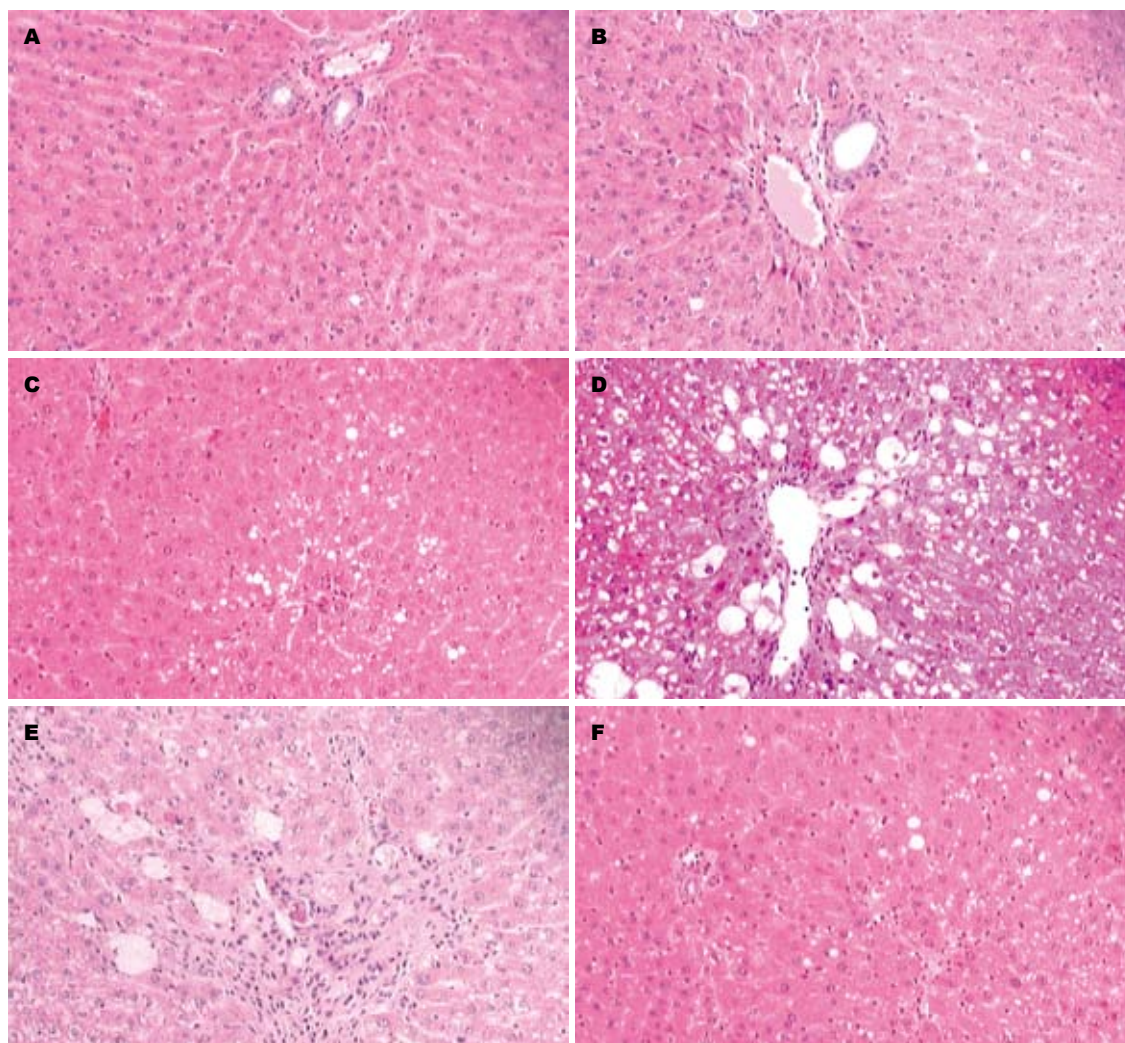
1.2.2 检测方法:按SABC免疫组织化学染色试剂盒说明操作,阳性反应呈棕黄色。结果判断:所有病理切片均由资深病理医师在不知病例资料的前提下阅片。每张免疫组织化学染色切片至少在镜下($\times 100$)观察10个不重复视野,判断细胞显色部位、显色强度和显色范围。结果判断参照免疫组织化学显色标准^[2]:PAI-1及u-PA蛋白阳性表达部位均位于细胞质,显色程度分呈浅棕色、棕色、深棕色,用+、++、+++记录;细胞显色范围占高倍视野 $< 25\%$ 时记录为+、25%-50%为++、50%-75%为+++、 $> 75\%$ 为++++。并将显色程度和范围换算成显色指数:显色指数 = 显色程度 \times 显色范围(+、++、+++、++++分别按1、2、3、4分计算)。

统计学处理 计量资料采用mean \pm SD表示,使用SPSS11.50统计软件进行统计分析。多组数据间比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA),进行方差齐性检验,若各组总体方差齐同,采用Tukey(分组 ≥ 5)检验;若各组总体方差不齐,采用Tamhane's T2检验。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠死亡率 100只SPF级SD♂大鼠中死亡7只,其中,N组第31天死亡1只,M组第3天死亡1只,CI组第11天死亡1只,Cm组第6、11、17、31天各死亡1只,死亡率为7%。

2.2 肝组织HE染色 N组:各时间段无明显区别,肝组织结构清晰,肝细胞大小均匀,无变性、坏死,肝小叶结构清晰,小叶内肝细胞索排列较整



■**相关报道**
沃兴德等研究发现姜黄醇提取物不仅使PAI-1含量显著降低, 而且也能提高u-PA的含量, 故认为姜黄醇提取物具有很好的促纤溶活性。

图1 各组大鼠肝脏组织病理变化(HE × 100). A: N组; B: M组4 d; C: M组7 d; D: M组21 d; E: M组42 d; F: Ch组42 d.

齐; M组: 4 d时与N组无明显区别; 7 d时肝小叶中央区中央静脉周围出现较多坏死细胞, 还有少量细胞气球样变和脂肪变性; 21 d时见大量气球样变性和脂肪变性, 汇管区见纤维组织汇集; 42 d时可见肝细胞明显脂肪变性、气球样变性, 汇管区纤维组织增生明显, 形成小的条索, 但未形成假小叶. C1组: 各时间段肝细胞发生气球样变和脂肪样变较M组少. Cm组: 各时间段肝细胞变性坏死情况介于C1组和Ch组之间, 可见少量肝细胞气球样变性. Ch组: 各时间段肝细胞的脂肪变性和气球样变性明显减轻, 接近N组, 纤维组织增生不明显(图1).

2.3 PAI-1蛋白表达显色指数 N组PAI-1蛋白表达很低; M组随造模时间延长, PAI-1表达逐渐增多, 42 d时于汇管区、纤维间隔、血管和肝窦可见大量PAI-1呈阳性染色, 毗邻的肝细胞质内亦可见阳性染色; 与M组相比, 姜黄素干预组显色指数均降低, 以42 d时明显($P < 0.05$, 表1, 图2)

2.4 u-PA的蛋白表达显色指数 N组u-PA蛋白表达很低; M组随造模时间延长, u-PA蛋白表达先升高后降低, 以7 d时为最大值, 然后下降; 与M组相比, 在姜黄素干预组, Cm、Ch组, 随时间推移, u-PA蛋白表达增加, 但C1组作用不明显(表2, 图3).

3 讨论

肝纤维化的实质是慢性肝损伤的修复反应, 导致以胶原为主的ECM各成分合成增多, 降解相对不足, 致使ECM在肝内过多沉积. 因此, 阻抑ECM增生与沉积, 促进ECM各成分的降解无疑是抗肝纤维化治疗的一条重要途径.

纤溶系统主要包括纤溶酶原、纤溶酶、纤溶酶原激活物(plasminogen activator, PA)、纤溶酶原激活物抑制剂(plasminogen activator inhibitor, PAI). PA分为u-PA和组织纤溶酶原激活物(tissue-type plasminogen activator t-PA). u-PA前

■创新盘点

姜黄素通过抑制HSC增殖达到抗肝纤维化的作用已被证实, 本研究是首次探讨姜黄素对肝纤维化纤溶系统成分表达的影响, 以进一步探讨姜黄素抗肝纤维化的作用机制。

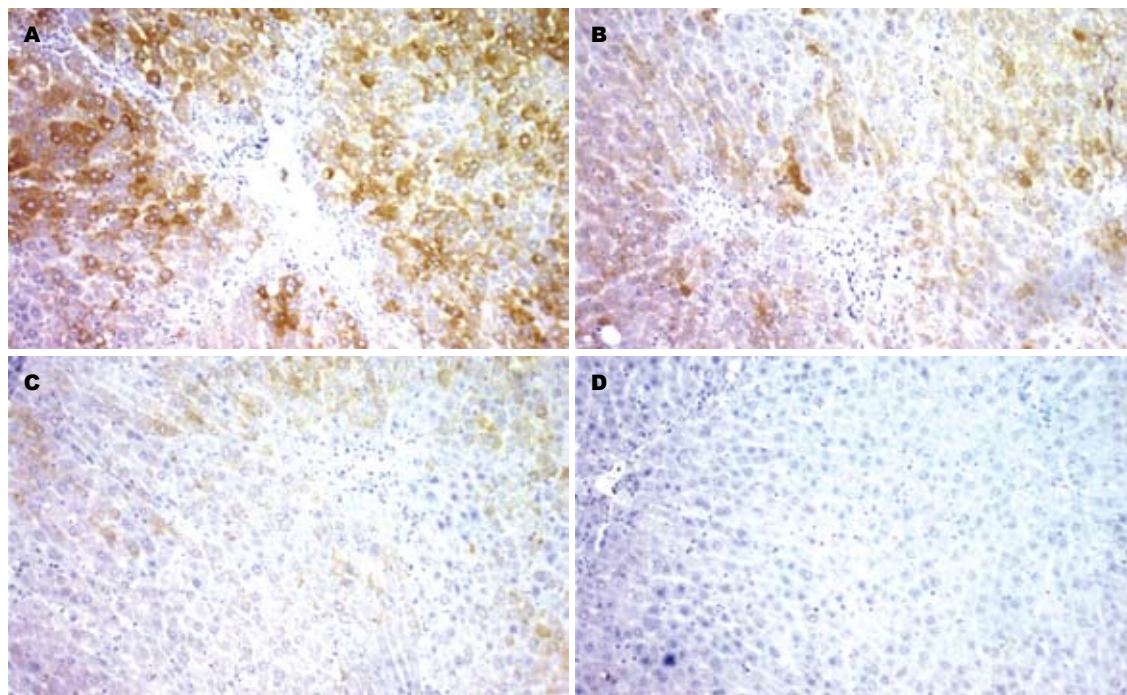


图 2 第42天各组大鼠肝脏组织中PAI-1的蛋白表达(SABC × 100). A: M组; B: Cl组; C: Cm组; D: Ch组.

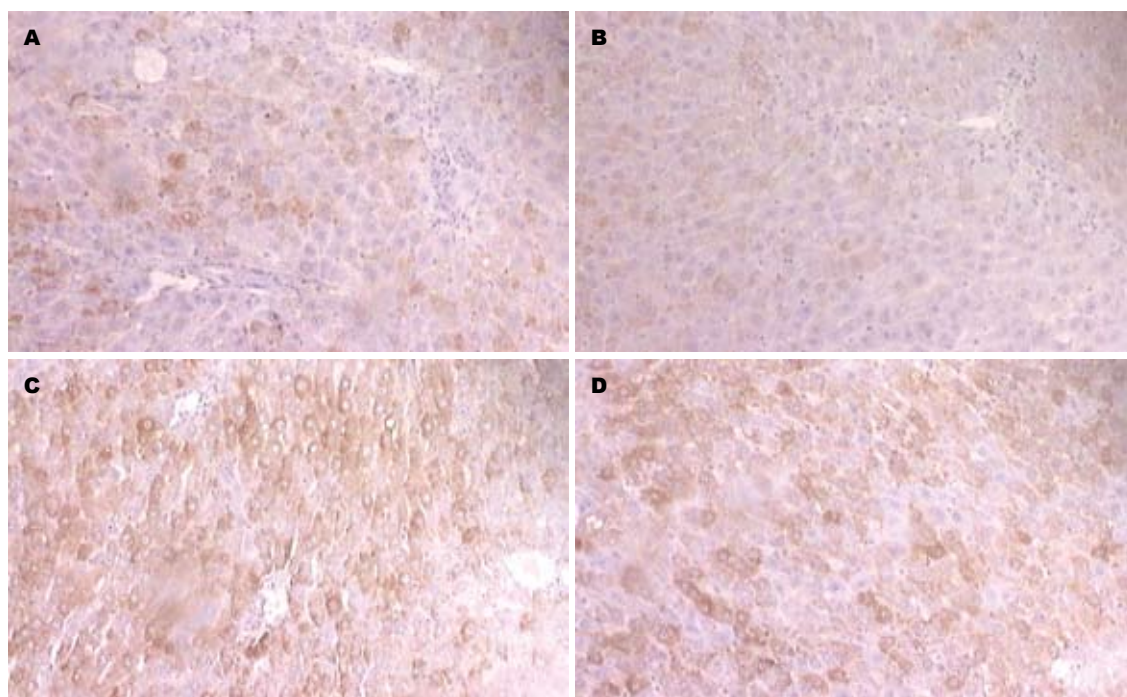


图 3 第42天各组大鼠肝脏组织中u-PA的蛋白表达(SABC × 100). A: M组; B: Cl组; C: Cm组; D: Ch组.

体广泛存在于结缔组织中, 内皮细胞、成纤维细胞和单核细胞均可合成和分泌u-PA, 培养的人肝细胞亦可分泌u-PA. u-PA主要作用于生理和病理条件下细胞迁移、组织重建、肿瘤浸润及转移等过程, 其中包括ECM的降解过程^[3]. PAI有多种, PAI-1和PAI-2是其中最重要的亚型, 正常人血浆中主要是PAI-1, PAI-1是PA高效的抑

制因子, 其组织内水平的升高和活性的增强能有效抑制PA的活化, 从而显著抑制纤维蛋白水解和ECM降解, 促进肝纤维化. 研究表明PAI-1的含量及活性在肝脏中最高^[4], 正常大鼠肝脏中u-PA和PAI-1极少或检测不到其表达量, 而部分肝切除后肝再生时, 纤溶酶、PAI-1表达显著增多^[5]. 研究显示PAI-1表达于病变肝组织肝

表 1 肝纤维化大鼠肝组织中PAI-1的表达水平 (mean ± SD)

分组	4 d	7 d	21 d	42 d
N组	1.60 ± 0.548	1.80 ± 0.837	1.60 ± 1.342 ^{ac}	1.40 ± 0.548 ^{ac}
M组	2.40 ± 1.140 ^{ag}	4.00 ± 1.225 ^g	6.60 ± 1.949	8.80 ± 2.168
Ci组	2.20 ± 0.837 ^{ag}	3.20 ± 1.924	5.20 ± 1.095	5.60 ± 1.673 ^a
Cm组	2.20 ± 1.643	2.40 ± 0.894	3.40 ± 0.894 ^a	3.40 ± 1.673 ^a
Ch组	1.60 ± 0.894	2.40 ± 1.140	2.20 ± 0.837 ^{ac}	2.40 ± 1.140 ^{ac}

^a*P*<0.05 vs M组; ^c*P*<0.05 vs Ci组; ^g*P*<0.05 vs 21 d; ^g*P*<0.05 vs 42 d.

表 2 肝纤维化大鼠肝组织中u-PA的表达水平 (mean ± SD)

分组	4 d	7 d	21 d	42 d
N组	1.60 ± 0.894	2.00 ± 0.707	2.00 ± 1.000	2.20 ± 0.447
M组	4.60 ± 1.342	10.00 ± 1.871 ^{egi}	7.40 ± 1.342 ^{egi}	4.20 ± 1.095
Ci组	5.00 ± 2.000	9.40 ± 1.517 ^{egi}	7.20 ± 2.168 ⁱ	6.00 ± 1.414 ⁱ
Cm组	4.00 ± 1.225	7.40 ± 1.342 ^{ei}	8.00 ± 1.225 ^{ei}	9.20 ± 1.643 ^{acei}
Ch组	3.20 ± 0.837	7.80 ± 1.643 ^{ei}	9.20 ± 1.643 ^{ei}	9.80 ± 2.049 ^{acei}

^a*P*<0.05 vs M组; ^c*P*<0.05 vs Ci组; ^g*P*<0.05 vs 4 d; ^g*P*<0.05 vs 42 d; ⁱ*P*<0.05 vs N组.

■应用要点

姜黄素可通过调节肝纤维化大鼠PAI-1与u-PA蛋白表达, 发挥抗肝纤维化作用.

纤维化活动活跃的部位, 随肝纤维化程度的加重, PAI-1蛋白表达的着色积分明显增加. 血浆中PAI-1的抗原水平随肝纤维化程度的增加而明显增加^[6]. u-PA可激活纤溶酶原使之成为纤溶酶, 两者可以直接或经激活胶原酶降解ECM及基底膜中胶原成分^[7]. u-PA还可激活纤溶酶原并调节基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMPs)活性以降解ECM, 而PAI-1则可特异性抑制u-PA的这种作用. MMPs是参与ECM降解的主要酶家族, 能降解多种胶原性和非胶原性蛋白. 金属蛋白酶组织抑制物(tissue inhibitor of metalloproteinase, TIMPs)可抑制MMPs的活性, MMPs和TIMPs主要由HSC生成, 当HSC被激活后, 最终使MMPs表达减少, TIMPs表达增加, 致ECM降解减少、沉积增加^[8,9]. 而u-PA可通过u-PA-纤溶酶-MMPs级联反应途径上调纤溶酶和MMPs活性, 降解多种ECM成分, 抑制肝纤维化进程^[10]. 在u-PA、纤溶酶及MMPs构成的级联激活途径中, u-PA活性的改变会直接影响纤维化进程. 因此通过调节u-PA和PAI-1表达很有可能成为抗纤维化治疗的有效方法^[11].

本研究用CCl₄制造大鼠肝纤维化模型, 同时使用姜黄素干预, 观察在病理条件下肝组织PAI-1和u-PA蛋白表达变化, 以进一步明确姜黄素的抗肝纤维化作用机制.

经病理组织学证实, 持续恒浓度腹腔注射

CCl₄ 6 wk能成功制造大鼠肝纤维化模型, 同时使用姜黄素干预发现, 各个剂量的姜黄素均能明显减少肝细胞变性、坏死, 纤维组织增生程度较M组明显减轻, 且仅局限于血管周围, 以上作用强度随着剂量增大而增强, Ch组接近N组, 与刘永刚等^[12]的研究报道结果一致, 提示姜黄素能够明显改善实验性大鼠肝纤维化. 在明确姜黄素具有抗肝纤维化情况下, 本研究详细分析了姜黄素对纤溶系统的影响. 我们的结果显示, 在N组, 各时间段大鼠肝组织PAI-1和u-PA蛋白表达极少, 与Thornton等^[5]的研究结果一致. 对M组测定结果显示, PAI-1蛋白表达随肝纤维化程度的增强而明显增加, 结果导致ECM的大量合成; u-PA蛋白表达随肝纤维化程度的增加而先升高后降低, 以7 d时为最大值, 然后下降, 与Leyland等^[10]报道的结果相似, 出现这种情况的可能原因是: 肝纤维化形成早期u-PA大量表达, 随着肝纤维化的逐渐形成, PAI-1蛋白表达逐渐增加, 对u-PA蛋白表达的抑制作用逐渐增强, 继而抑制纤溶酶原的激活, 因而u-PA对ECM的降解作用减弱, 这提示u-PA蛋白表达早期增加可能会导致肝纤维化早期ECM成分的降解, 但是由于随着肝纤维化的进展, PAI-1对u-PA的抑制作用加强, 导致ECM的合成增加, 降解减少, 促进肝纤维化的形成. 在姜黄素干预组, 不同剂量的姜黄素均可不同程度降低肝组织PAI-1蛋白表

■同行评价

本文选题新颖, 具有一定的研究意义。

达, 且降低程度与剂量呈正相关。随时间推移, CI和Ch组中u-PA蛋白表达增加, 表明姜黄素在降低PAI-1蛋白表达, 使PAI-1抑制u-PA作用减弱的同时, 促进u-PA蛋白表达, 但CI组作用不明显, 可能与低剂量姜黄素主要降低PAI-1蛋白表达的作用, 尚未达到促进u-PA蛋白表达增加的有效作用浓度有关。总之, 在ECM合成与降解之间的动态平衡中, 姜黄素一方面能够通过增加u-PA蛋白表达, 而u-PA可通过u-PA-纤溶酶-MMPs级联反应途径上调纤溶酶和MMPs活性, 降解多种ECM成分, 抑制肝纤维化进程; 另一方面能够通过降低PAI-1蛋白表达, 使PAI-1抑制u-PA/u-PAR和纤溶酶的作用减弱, 阻抑ECM增生与沉积, 达到抗肝纤维化的作用。

4 参考文献

- 1 蔡卫民, 陈峰. 近年来肝纤维化主要新进展(上)-发病机理研究. 临床肝胆病杂志 1998; 14: 65-68
- 2 徐列明, 刘平, 吕刚, 刘成, 薛惠明, 朱剑亮. I、IV型胶原及板层素在肝纤维化大鼠肝窦周围的变化. 中华消化杂志 1995; 15: 146-148
- 3 Saksela O, Rifkin DB. Cell-associated plasminogen activation: regulation and physiological functions. *Annu Rev Cell Biol* 1988; 4: 93-126
- 4 Simpson AJ, Booth NA, Moore NR, Bennett B. Distribution of plasminogen activator inhibitor (PAI-1) in tissues. *J Clin Pathol* 1991; 44: 139-143
- 5 Thornton AJ, Bruzdinski CJ, Raper SE, Gelehrter TD. Plasminogen activator inhibitor-1 is an immediate early response gene in regenerating rat liver. *Cancer Res* 1994; 54: 1337-1343
- 6 Inuzuka S, Ueno T, Torimura T, Tamaki S, Sugawara H, Sakata R, Kusaba N, Sata M, Tanikawa K. The significance of colocalization of plasminogen activator inhibitor-1 and vitronectin in hepatic fibrosis. *Scand J Gastroenterol* 1997; 32: 1052-1060
- 7 Fitch P, Bennett B, Booth NA, Croll A, Ewen SW. Distribution of plasminogen activator inhibitor in normal liver, cirrhotic liver, and liver with metastases. *J Clin Pathol* 1994; 47: 218-221
- 8 Takahara T, Furui K, Funaki J, Nakayama Y, Itoh H, Miyabayashi C, Sato H, Seiki M, Ooshima A, Watanabe A. Increased expression of matrix metalloproteinase-II in experimental liver fibrosis in rats. *Hepatology* 1995; 21: 787-795
- 9 Arthur MJ, Mann DA, Iredale JP. Tissue inhibitors of metalloproteinases, hepatic stellate cells and liver fibrosis. *J Gastroenterol Hepatol* 1998; 13 Suppl: S33-S38
- 10 Leyland H, Gentry J, Arthur MJ, Benyon RC. The plasminogen-activating system in hepatic stellate cells. *Hepatology* 1996; 24: 1172-1178
- 11 Salgado S, Garcia J, Vera J, Siller F, Bueno M, Miranda A, Segura A, Grijalva G, Segura J, Orozco H, Hernandez-Pando R, Fafutis M, Aguilar LK, Aguilar-Cordova E, Armendariz-Borunda J. Liver cirrhosis is reverted by urokinase-type plasminogen activator gene therapy. *Mol Ther* 2000; 2: 545-551
- 12 刘永刚, 陈厚昌, 蒋毅萍. 姜黄素抗肝纤维化的实验研究. 时珍国医国药 2002; 13: 273-275

编辑 李薇 电编 何基才

ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) CN 14-1260/R 2010年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

《世界华人消化杂志》参考文献要求

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

人结直肠癌微小核糖核酸的差异表达及其临床意义

陈卫昌, 林茂松, 黄俊星, 叶玉兰, 郜恒骏, 宋振云, 沈晓莹

陈卫昌, 叶玉兰, 苏州大学附属第一医院消化内科 江苏省苏州市 215006

林茂松, 泰州市人民医院消化内科 江苏省泰州市 225300

黄俊星, 泰州市人民医院肿瘤内科 江苏省泰州市 225300

郜恒骏, 同济大学附属同济医院消化病研究所 生物芯片上海国家工程研究中心 上海市 201203

宋振云, 沈晓莹, 生物芯片上海国家工程研究中心 上海市 201203

陈卫昌, 教授, 主要从事消化系统肿瘤的基础和临床研究。

江苏省333工程科研基金资助项目

江苏省卫生厅科技基金资助项目, No. H200959

苏州市科技局基金资助项目, No. YJS0915

作者贡献分布: 陈卫昌与林茂松对此文贡献均等; 此课题由陈卫昌、郜恒骏、黄俊星及林茂松设计; 临床标本收集由林茂松与叶玉兰完成; microRNA芯片、定量PCR检测和分析由宋振云、沈晓莹及林茂松完成; 论文写作由陈卫昌与林茂松完成。

通讯作者: 陈卫昌, 教授, 主任医师, 215006, 江苏省苏州市, 苏州大学附属第一医院消化内科。weichangchen@126.com

电话: 0512-65223637

收稿日期: 2010-07-13 修回日期: 2010-09-21

接受日期: 2010-09-27 在线出版日期: 2010-10-28

Clinical significance of aberrant microRNAs expression in human colorectal cancer

Wei-Chang Chen, Mao-Song Lin, Jun-Xing Huang, Yu-Lan Ye, Heng-Jun Gao, Zhen-Yun Song, Xiao-Ying Shen

Wei-Chang Chen, Yu-Lan Ye, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Soochow University, Suzhou 215006, Jiangsu Province, China

Mao-Song Lin, Department of Gastroenterology, Taizhou People's Hospital, Taizhou 225300, Jiangsu Province, China

Jun-Xing Huang, Department of Oncology, Taizhou People's Hospital, Taizhou 225300, Jiangsu Province, China

Heng-Jun Gao, Institute of Digestive Disease, Tongji Hospital Affiliated to Tongji University; National Engineering Center for Biochip of Shanghai, Shanghai 201203, China

Zhen-Yun Song, Xiao-Ying Shen, National Engineering Center for Biochip of Shanghai, Shanghai 201203, China

Supported by: the 333 Program of Jiangsu Province; the Medical Foundation of Health Department of Jiangsu Province, No. H200959; and the Foundation of Science and Technology Bureau of Suzhou, No. YJS0915

Correspondence to: Professor Wei-Chang Chen, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Soochow University, Suzhou 215006, Jiangsu Province, China. weichangchen@126.com

Received: 2010-07-13 Revised: 2010-09-21
Accepted: 2010-09-27 Published online: 2010-10-28

Abstract

AIM: To investigate the expression profile of microRNAs (miRNAs) in human colorectal cancer and to analyze the clinical significance of aberrant miRNA expression.

rant miRNA expression.

METHODS: The expression of miRNAs in colorectal cancer specimens, matched normal mucosal specimens, and adenoma specimens was detected by miRNA microarray. The differential expression of some miRNAs was verified by real-time RT-PCR. The correlation of aberrant miRNA expression with clinical and biopathologic features in colorectal cancer, such as age, gender, tumor size, lymph node and distance metastasis, clinical stage as well as histological grade, was analyzed.

RESULTS: Microarray analysis revealed many miRNAs that could clearly differentiate colorectal cancer from adenoma and normal tissue. Thirty-five significantly up-regulated miRNAs and 30 down-regulated miRNAs were identified in carcinoma in comparison to normal tissue ($P < 0.001$), whereas 25 aberrantly expressed miRNAs were identified in cancer in comparison to adenoma ($P < 0.01$). In addition, 55 miRNAs could distinguish adenoma from normal colorectal mucosa ($P < 0.001$). Twelve up-regulated miRNAs and 13 down-regulated ones were simultaneously aberrantly expressed in cancer and adenoma. Quantitative RT-PCR analysis showed that miR-552 and miR-142-3p were significantly up-regulated (2.97 ± 2.72 vs 0.98 ± 0.48 , $P < 0.05$; 3.64 ± 3.41 vs 1.31 ± 0.61 , $P < 0.05$) and miR-139-3p and miR-133b were down-regulated in cancer tissue compared with normal mucosa (0.10 ± 0.26 vs 0.82 ± 0.70 , $P < 0.05$; 0.81 ± 0.67 vs 1.71 ± 1.29 , $P < 0.05$), which is consistent with the microarray results. Aberrant miR-552 expression was correlated with TNM stage and lymph node and distance metastasis (all $P < 0.05$), but not with age, gender, tumor size or histological grade. Aberrant miR-139-3p expression was correlated with TNM stage and distance metastasis, while differential expression of miR-142-3p was correlated with histological grade.

CONCLUSION: Differential miRNA expression could help distinguish malignant tissue from adenoma and normal mucosa, suggesting that aberrant miRNA expression might be involved

■背景资料

目前为止对于结直肠癌尚无一个确切的具有早期诊断意义的临床指标以及有明确疗效的治疗靶点。近来研究发现微小核糖核酸(miRNAs)可以结合到靶基因中发挥调控靶基因表达的功能,从而参与肿瘤的发生和发展。

■同行评议者

王晓艳, 副教授, 湖南长沙中南大学湘雅三医院消化内科

■ 研发前沿

目前在miRNAs与肿瘤关系的研究领域中,重点在于寻找与各种肿瘤发生、发展相关的特异miRNAs,期望获得具有早期诊断意义的标志物以及具有治疗干预的新靶点。亟待进一步研究的是建立统一的研究标准。此外,对于特异的miRNAs的功能及其与靶点之间的复杂调控网络有待于进一步明确。

in colorectal tumorigenesis. Differentially expressed miRNAs might be used as early diagnosis markers or therapeutic targets for human colorectal cancer.

Key Words: Colorectal cancer; microRNAs chip; Microarray; Real-time polymerase chain reaction

Chen WC, Lin MS, Huang JX, Ye YL, Gao HJ, Song ZY, Shen XY. Clinical significance of aberrant microRNAs expression in human colorectal cancer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(30): 3187-3194

摘要

目的: 研究人结直肠癌、腺瘤和癌旁正常组织中微小核糖核酸(microRNAs, miRNAs)的差异表达谱,并初步探讨其临床意义。

方法: 选取2008-01/07苏州大学附属第一医院和泰州市人民医院结直肠癌、对应癌旁正常组织以及结直肠腺瘤标本,提取组织总RNA,采用illumina microRNA芯片技术检测3种不同类型组织中miRNAs的表达,采用实时定量PCR技术对芯片检测结果进行验证。将结直肠癌组织中异常表达的miRNAs与结直肠癌患者的临床病理资料进行分析。

结果: 3种不同类型结直肠组织中miRNAs表达有明显差异,结直肠癌与癌旁正常组织相比,有65个miRNAs表达异常($P < 0.001$),其中35个上调,30个下调,而腺瘤与正常结直肠组织相比,有55个miRNAs表达差异($P < 0.001$),其中上调29个,下调26个。有25个miRNAs相对于正常组织同时在结直肠癌和腺瘤中异常表达,其中高表达12个,低表达有13个。与腺瘤相比,结直肠癌中有25个miRNAs表达异常($P < 0.01$),其中13个上调,12个下调。进一步定量PCR验证结果显示与正常结直肠黏膜组织相比,在癌组织中miR-552, miR-142-3p上调(2.97 ± 2.72 vs 0.98 ± 0.48 ; 3.64 ± 3.41 vs 1.31 ± 0.61 , 均 $P < 0.05$), miR-139-3p和miR-133b下调(0.10 ± 0.26 vs 0.82 ± 0.70 , 0.81 ± 0.67 vs 1.71 ± 1.29 , 均 $P < 0.05$),与芯片结果相吻合。miR-552和miR-139-3p与结直肠癌患者年龄、性别、组织学、肿瘤大小和浸润深度无关($P > 0.05$),而miR-552与TNM分期、淋巴结和肝转移相关($P < 0.05$), miR-139-3p与TNM分期和肝转移相关($P < 0.05$), miR-142-3p除与组织学有关外,与其他临床病理参数无关, miR-133b与年龄相关,而与其他临床病理参数无关。

结论: miRNAs参与了结直肠的癌变过程,特异的miRNAs的表达可能成为结直肠癌潜在

的早期诊断和治疗新靶点。

关键词: 结直肠癌; 微小核糖核酸芯片; 微阵列; 实时定量聚合酶链式反应

陈卫昌, 林茂松, 黄俊星, 叶玉兰, 邵恒骏, 宋振云, 沈晓莹. 人结直肠癌微小核糖核酸的差异表达及其临床意义. *世界华人消化杂志* 2010; 18(30): 3187-3194

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/3187.asp>

0 引言

近年来我国的结直肠癌发病率逐渐升高。研究认为结直肠癌的发生是多种基因畸变的结果^[1,2],但是至今尚未发现具有真正早期诊断意义和确切疗效的靶点。微小RNA(microRNAs, miRNAs)是近来在动植物中发现的一个大小约为19-25个核苷酸,非蛋白质编码的小分子RNA家族^[3,4]。研究认为miRNAs可以通过干扰其靶基因mRNAs的翻译或者导致靶mRNAs的降解,下调靶基因的表达^[5,6],从而参与体内许多重要的生命活动,如细胞增殖、分化以及凋亡等,因此认为miRNAs的表达失调可能与肿瘤发生密切相关^[7-12]。

本研究中我们拟先采用illumina microRNA芯片检测人结直肠癌、结直肠腺瘤和良性癌旁组织的miRNAs表达,通过比较他们的表达谱,寻找与结直肠癌发生相关的特异miRNAs,从而为进一步寻找具有早期诊断意义的标志物和治疗靶点提供一定的理论依据,然后我们将在结直肠癌中发现的一些异常表达的miRNAs与结直肠癌患者的临床资料进行比较分析,初步探讨他们异常表达的临床意义。

1 材料和方法

1.1 材料 所有标本来自于苏州大学附属第一医院和泰州市人民医院2008-01/07住院和/或门诊收治的结直肠癌和结肠腺瘤患者,所有患者均签署知情同意书,并获得苏州大学附属第一医院伦理委员会批准。其中,结直肠癌组织标本来自于手术切除标本,而腺瘤标本则来自于内镜下摘除组织,所有组织标本术后立即液氮保存。所有癌症患者术前均未接受放、化疗。在这些标本中,结直肠癌25例,腺瘤3例,癌旁正常结直肠黏膜组织10例。结直肠癌组织参照全国结直肠癌协作组结直肠癌诊治规范以及美国癌症协会/国际抗癌组织(American Joint Committee on Cancer/Union for International Cancer Control, AJCC/UICC). TNM分期标准行诊断、

分级和分期. 结直肠癌患者中男6例, 女19例, 年龄43-83(中位年龄63)岁. 根据组织学分化程度分为: 高分化组1例, 中分化组19例, 低分化组5例(黏液腺癌及印戒细胞癌并入低分化组). 其中淋巴结转移阳性10例, 阴性15例, 远处转移(肝转移)阳性5例, 阴性20例. 根据临床TNM分期分为: I期5例, II期8例, III期7例和IV期5例. 根据肿瘤大小分为: ≥ 5 cm 14例, < 5 cm 11例, 根据肿瘤浸润深度: 肌层以下6例, 全层19例. 肿瘤组织均取自肿瘤中心非坏死部位, 癌旁正常组织取自距肿瘤 ≥ 5 cm的正常组织, 腺瘤组织来自于大肠镜下摘除标本, 所有组织均经病理证实. microRNA芯片(human microRNA assay pool, version 2, 12样本universal Beadchip, 含1 146个最新人类miRNAs, 包括覆盖 $>97\%$ miRbase 12.0版本中收录最新人类miRNAs以及illumina公司通过测序法发现的最新符合miRNAs特征, 但是尚未命名的序列)、miRNAs标志杂交试剂盒购自illumina公司. miScript Reverse Transcription Kit购自Qiagen, SYBR Green Realtime PCR Master Mix购自TaKaRa.

1.2 方法

1.2.1 样本RNA的提取与标记: 取液氮保存组织5 mg, 在液氮下研磨, 采用Invitrogen® TRIzol来提取组织中的总RNA, 然后用QIAGEN RNeasy Kit进一步纯化总RNA, 使用琼脂糖凝胶电泳对样品总RNA质量进行完整性检测分析. 使用Eppendorf Biophotometer系统对样品总RNA进行质量(定量)检测, Nano Drop分光光度仪测定吸光度 A_{260}/A_{280} 值. 取200 ng的总RNA, 按照Illumina® microRNA Expression Profiling Assay kit实验手册操作, 用Polyadenylation Single Reagent将其多聚腺苷酸化. 取多聚腺苷酸化的总RNA, 以带有通用引物扩增位点并用生物素标记的Oligo(dT)为引物进行逆转录合成cDNA一链并纯化, 将含miRNAs特异序列的通用引物退火至cDNA一链上, 延伸引物合成双链cDNA. 洗去多余的引物和错配的产物, 以荧光标记的通用引物进行PCR扩增.

1.2.2 芯片杂交、清洗和扫描: 选取6例结直肠癌、6例癌旁正常组织和3例腺瘤组织进行芯片检测. 将标记好的PCR产物洗涤后加到芯片上60 °C杂交30 min, 45 °C下杂交14 h, 将芯片用XC4和UB2缓冲液进行清洗, 真空干燥器干燥. 用高精度激光共聚焦扫描仪(Illumina scanner: 0.8 μ mol/L)对杂交后的芯片进行扫描及信号提取.

表 1 4种miRNAs及U6下游引物序列

基因	引物序列
Has-mir-133b	5'-TTTGGTCCCCCTCAACCAGCTA-3'
Has-mir-139-3p	5'-GGAGACGCGGCCCTGTTGGAGT-3'
Has-mir-142-3p	5'-TGTAAGTGTTCCTACTTTATGGA-3'
Has-mir-552	5'-GCAACAGGTGACTGGTTAGACA-3'
U6	5'-CAAGGATGACACGCAAATTCG-3'

1.2.3 数据处理: 运用Feature Extraction软件对芯片图像进行分析, 把图像信号转化为数字信号.

1.2.4 荧光定量RT-PCR: 挑选差异表达的miRNAs中的4个miRNAs(miR-552、miR-142-3p、miR-133b和miR-139-3p)进行荧光定量RT-PCR的验证, microRNA的RT-PCR方法参照QIAGEN-miScript system中操作步骤进行. 上游引物采用QIAGEN公司miScript SYBR Green PCR Kit中提供的通用引物, 相应的下游引物由上海英俊生物技术有限公司合成, 引物序列见表1, 采用U6 RNA作为内标进行归一化. 结果运用QIAGEN软件数据库分析. 判断标准为癌组织与癌旁组织的表达量比值 >2 为表达上调, <0.5 为表达下调.

统计学处理 利用随机方差模型的 t 检验对结直肠癌、腺瘤相对于癌旁正常组织的两组microRNA芯片数据进行分析, 计算出每个miRNA的显著性水平(P 值)和误判率(false discovery rate, FDR), 根据 P 值筛选出两组样本的差异表达miRNAs, 差异筛选的标准为 $P<0.001$. Illumina BeadStudio Application软件对癌和腺瘤组织microRNA芯片数据进行分析, 计算相比差异分值(Diffscore)和相比差异基因 P 值(Diff Pvalue)(Diffscore值为正值, 代表两组相比基因表达上调; Diffscore值为负值, 代表两组相比基因表达下调; Diffscore绝对值与Diff P 值存在一定的关系: Diffscore >13 , $P<0.05$; Diffscore >20 , $P<0.01$; Diffscore >30 , $P<0.001$), 根据 P 值筛选出两组样本的差异表达miRNAs, 差异筛选的标准为 $P<0.01$. 定量RT-PCR结果相对表达量采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法表示, 不同组别之间miRNAs表达的比较采用One-way ANOVA分析, $P<0.05$ 差异具有统计学意义.

2 结果

2.1 总RNA和miRNAs提取质量的分析 每份样本总RNA的 A_{260}/A_{280} 值在1.75-2.00, 电泳结果显示每份样品总RNA均有清晰的28 s和18 s条带(图1), RNA完好无降解, 其质量符合microRNA芯片的

■ 相关报道

Rosenfeld等发现83例含22种不同肿瘤组织中, 有48个miRNAs的表达可以成功地将他们区分开来, 准确率可达90%, 且由于miRNAs的数量明显少于可编码蛋白的基因, 体现出较检测编码蛋白的基因优越性.

■创新盘点

本研究创新之处在于采用了目前最新的miRNAs芯片技术。此外,同时研究了结直肠3种组织(正常、癌前病变及癌组织)的miRNAs表达,而既往的研究中较少同时研究这3种不同生物学行为的组织。

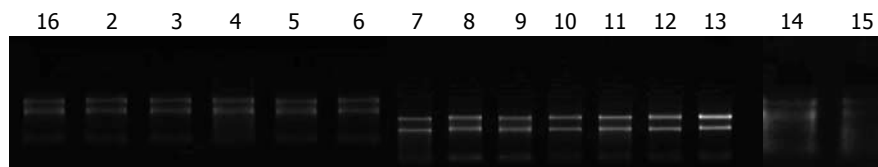


图1 RNA电泳示mi-croRNA芯片检测样本。2, 3, 16: 腺瘤组织; 4, 6, 8, 10, 12, 14: 癌旁组织; 5, 7, 9, 11, 13, 15: 癌组织。

质量要求。

2.2 miRNAs在结直肠癌、腺瘤和癌旁组织中的差异表达 有65种miRNAs在结直肠癌和癌旁正常组织中有异常表达,其中高表达有35个,低表达30个($P<0.001$)。而腺瘤与正常结肠组织相比,有55个miRNAs表达有差异,其中上调29个,下调26个($P<0.001$)。Illumina BeadStudio Application软件分析发现与腺瘤相比,结直肠癌中有25个miRNAs异常表达,其中13个上调,12个下调($P<0.01$)。进一步分析结果显示相对于癌旁正常组织,在肿瘤组织(结直肠癌和腺瘤)中同时异常表达的有25个miRNAs,其中高表达12个,分别为miR-592, miR-96, miR-801:9.1, miR-31, miR-135b, miR-660, miR-452*:9.1, miR-183*, miR-16-1*, miR-21*, miR-182*, miR-17*, 低表达有13个,分别为miR-29b-2*, miR-195*, miR-9*, miR-885-5p, miR-328, miR-766, miR-30a*, miR-139-3p, miR-9, miR-1, miR-490-5p, miR-490-3p, miR-187(图2)。

2.3 荧光定量RT-PCR验证差异表达miRNAs 在结直肠癌和癌旁组织中明显异常表达的4个miRNAs包括miR-133b, miR-139-3p, miR-142-3p, miR-552, 并采用U6进行归一化。miRNAs定量PCR扩增曲线和溶解曲线均为单一峰,说明PCR扩增特异性好。PCR结果显示与癌旁正常组织相比在结直肠癌组织中miR-552和miR-142-3p表达均上调(2.97 ± 2.72 vs 0.98 ± 0.48 ; 3.64 ± 3.41 vs 1.31 ± 0.61 , 均 $P<0.05$, 图3A), 而miR-133b和miR-139-3p下调(0.10 ± 0.26 vs 0.82 ± 0.70 ; 0.81 ± 0.67 vs 1.71 ± 1.29 , 均 $P<0.05$, 图3B), microRNA芯片结果与定量RT-PCR结果一致。

2.4 差异表达的miRNAs的临床意义 进一步将miR-133b, miR-139-3p, miR-142-3p, miR-552的表达与25例结直肠癌患者的临床病理资料进行对比分析,其结果显示:miR-552表达与肿瘤的TNM分期、淋巴结和肝转移有关($P<0.05$),而miR-142-3p表达与肿瘤的组织学分化程度有关($P<0.05$),与其他临床病理参数无关。miR-133b表达与患者年龄有关($P<0.05$),miR-139-3p表达与TNM分期和肝转移有关($P<0.05$),与其他病理

表2 4种miRNAs在结直肠癌中的表达及其与临床病理参数之间的关系

临床病理参数	n	P值			
		miR-552	miR-142-3p	miR-133b	miR-139-3p
年龄(岁)		0.642	0.193	0.028	0.429
>50	21				
<50	4				
性别		0.471	0.391	0.567	0.252
男	6				
女	19				
组织学分化程度		0.755	0.000	0.680	0.303
高	1				
中	19				
低	5				
TNM分期		0.024	0.856	0.476	0.012
I期	5				
II期	8				
III期	7				
IV期	5				
淋巴结转移		0.004	0.728	0.255	0.057
有	12				
无	13				
肝转移		0.016	0.882	0.466	0.001
有	5				
无	20				
肿瘤大小(cm)		0.136	0.239	0.585	0.811
>5	14				
<5	11				
浸润深度		0.268	0.542	0.614	0.178
肌层	6				
全层	19				

参数无关(表2)。

3 讨论

目前miRNAs的异常表达已经在一些血液系统和实体肿瘤中有过报道,国外学者也已在消化系统肿瘤中对于miRNAs的作用作了相关研究^[13-18],他们发现了一些与各个器官肿瘤形成有关的特异表达的miRNAs,认为miRNAs的异常表达可能参与了食管、胃、结直肠、肝以及胰腺等肿瘤的形成过程,由此丰富了这些消化系统肿瘤发病机制,为更全面的认识这些肿瘤的内在分子机制提出了新的思路。

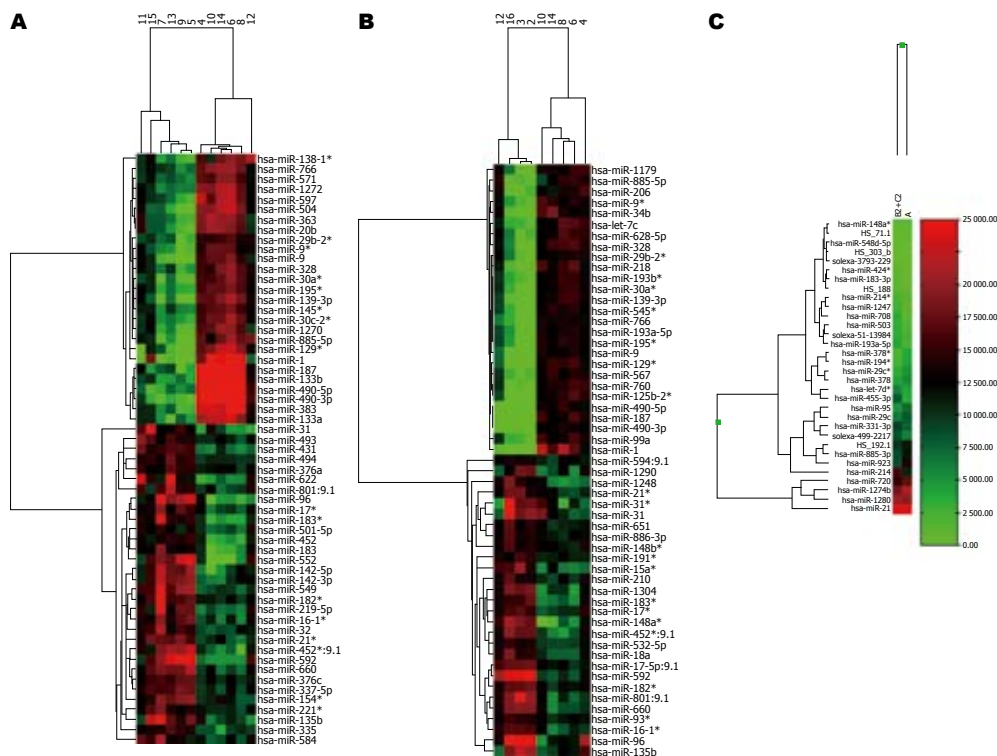


图 2 不同组织之间miRNAs的差异表达. A: 4, 6, 8, 10, 12, 14: 癌旁组织; 5, 7, 9, 11, 13, 15: 腺癌组织($P<0.001$); B: 2, 3, 16: 腺癌组织; 4, 6, 8, 10, 12, 14: 癌旁组织($P<0.001$); C: A: 腺癌组织; B2+C2: 癌组织($P<0.01$).

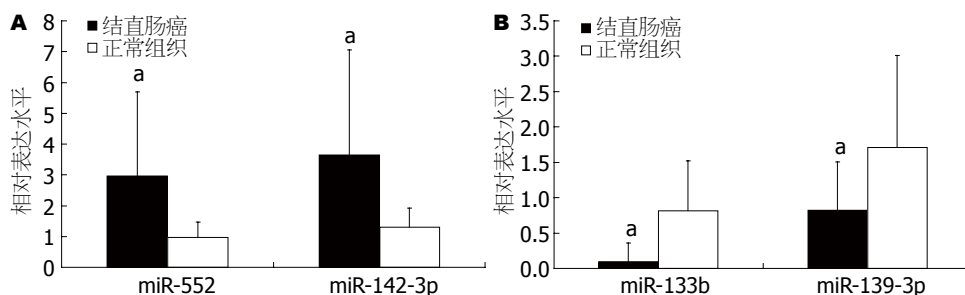


图 3 定量RT-PCR检测miR-133b, miR-139-3p, miR-142-3p及miR-552在结直肠癌和癌旁正常组织中的表达. A: miR-552, miR-142-3p; B: miR-133b, miR-139-3p. $^aP<0.05$ vs 正常组织.

本研究中我们采用了腺癌和结直肠癌来与癌旁正常组织进行对比研究, 以期寻找一些与结直肠癌发生和发展相关的miRNAs, 从而发现具有早期诊断意义的标志物, 甚至可作为治疗靶点的miRNAs. 通过芯片结果分析我们发现65个miRNAs在癌与癌旁正常组织中差异表达, 其中35个miRNAs在结直肠癌中上调, 30个下调, 25个miRNAs在癌与腺瘤中差异表达, 而有55个miRNAs在腺瘤与正常组织中差异表达. 进一步分析我们发现25个miRNAs相对于正常组织同时在结直肠癌和腺瘤中异常表达, 其中高表达的有12个, 分别为miR-592, miR-96, miR-801:9.1, miR-31, miR-135b, miR-660, miR-452*:9.1, miR-183*, miR-16-1*, miR-21*,

miR-182*, miR-17*, 低表达有13个, 分别为miR-29b-2*, miR-195*, miR-9*, miR-885-5p, miR-328, miR-766, miR-30a*, miR-139-3p, miR-9, miR-1, miR-490-5p, miR-490-3p, miR-187. 以上结果表明了这些异常表达的miRNAs不仅参与了结直肠黏膜细胞从正常形态开始转化的早期过程, 导致了结直肠腺瘤的形成, 而且他们的持续异常表达作用下对于结直肠腺瘤的最终恶变也起了关键作用, 因而这25个miRNAs的异常表达可能是结直肠癌发生的早期事件, 均可能具有结直肠癌早期诊断的意义, 通过对这些miRNAs的检测有望尽早发现早期结直肠癌, 从而进行早期干预达到提高生存率的目的. 而另一些相对于结直肠腺瘤在结直肠癌中异常表达的miR-

应用要点

本文发现了一些在结直肠中特异表达的miRNAs, 有助于在将来临床标本中进一步扩大样本验证, 从而获得具有真正临床意义的早期诊断标志物和治疗靶点. 一旦证实后可以通过RT-PCR等方法在临床上检测患者的血液或实体标本来提高结直肠癌的早期诊断率.

■同行评价

本文为在转录后层面揭示结肠癌发生发展的机制奠定了一定的基础,具有一定的科研价值。

NAs(如miR-let-7d*, miR-214, miR-95, miR-29c等)则可能在以上miRNAs异常表达的基础上,进一步使得这些癌前病变组织获得了恶变的潜能,导致了结直肠癌的发生,是结直肠肿瘤形成过程中的重要步骤,在临床上检测腺瘤组织中这些异常表达的miRNAs的表达,有助于早期区分良、恶性组织,从而能够发现相对早期的结直肠癌,早期进行干预如行早期黏膜下切除或手术切除,减少了将来腺瘤的恶变和浸润性肿瘤的发生,对于减少结直肠癌的发生和提高早期诊断率以及总体生存率均具有重要的意义。

实际上既往研究还认为肿瘤组织的miRNAs表达具有组织特异性^[19,20],他表示的含义之一即不同的肿瘤组织来源其miRNAs的表达谱往往不同,这也是miRNAs在肿瘤研究中的优势之一,通过对于肿瘤组织中miRNAs表达谱的研究,我们不仅可以区分良、恶性组织,而且对于一些来源不明的肿瘤组织,通过其miRNAs表达谱的研究可能判断其起源部位。因此,这对于提高临床上一些起源不明的转移性肿瘤的治疗效果和预后有着重要的意义。Rosenfeld等^[21]发现83例含22种不同肿瘤组织中,有48个miRNAs的表达可以成功地将他们区分开来,准确率可达90%,且由于miRNAs的数量明显少于可编码蛋白的基因,体现出较检测编码蛋白的基因的优越性。此外,类似的研究还发现miRNAs的检测在区分组织类型不明的低分化肿瘤时明显优于mRNA表达的检测^[22]。既往研究发现miR-21, miR-191多在胰腺癌中异常表达^[17],乳腺癌中常有miR-125, miR-145异常表达^[23],这就在一定程度上体现了这些miRNAs的相对特异性。本研究中,我们发现相对于正常结肠组织在结直肠癌异常表达的miRNAs中,也具有一些类似特点。其中一部分miRNAs在其他系统肿瘤中少有报道,却在结直肠癌组织中多见异常表达^[24-27],他们包括13个miRNAs,其中上调为miR-96, miR-31, miR-183, miR-135b, miR-142-3p, miR-335, miR-32, 下调的有miR-9, miR-9*, miR-1, miR-133a, miR-133b, miR-187。在这些异常表达的miRNAs中,研究发现miR-96, miR-31, miR-183和miR-135b的同时异常表达在结直肠癌变中较为多见^[24,25],这与本研究结果相似,由此可见检测这些miRNAs的表达有助于对于结直肠癌组织类型的特异判断,体现了他们对于结直肠癌的相对组织特异性。文献报道和本研究发现miR-592与结直肠癌发病相关^[25],但是在

其他肿瘤中未见相关报道,一定程度上也体现了其在结直肠组织的特异性表达。因此,我们有理由认为在结直肠癌中也具有其组织特异性的miRNAs表达谱,在组织中检测一组包括miR-96, miR-31, miR-183, miR-592, miR-135b, miR-133b的表达,不仅对于其早期结直肠癌的诊断有帮助,而且对于其组织来源也提供了一定信息,他们同时异常表达可能提示来源于结直肠组织的恶变。

第1个报道miRNAs在结直肠癌中异常表达的是2003年Michael等^[28],他们发现在结直肠癌组织中有2个miRNAs,即miR-143和miR-145,出现明显下调。随后多个学者相继做了一些研究^[29-31],但是他们的研究结果中miRNAs表达谱不尽相同。本研究结果中我们发现65个miRNAs相对于正常结直肠组织在结直肠癌中异常表达,其中有13个与既往的研究相同,包括:miR-96, miR-31, miR-592, miR-135b, miR-183, miR-142-3p, miR-335, miR-32, miR-1, miR-9, miR-133a, miR-133b和miR-187,而在既往研究中,另外52个miRNAs未见在结直肠癌中有相关报道,说明本研究结果与其他学者的研究也有不同之处,究其原因可能有几个方面。首先,由于种族和地区的差异,所选取的患者其本身也存在遗传学的异质性。其次,由于各个试验所采用方法的不同也会导致结果的差异,例如使用芯片的种类不同,就可以导致芯片筛选的结果不同,我们此次使用的illumina芯片含有1146个miRNAs,涉及的miRNAs是根据目前最新的miRNAs版本进行设计的,不仅有确定的成熟miRNAs,也包括了一些测序具有miRNAs特征但尚未最终确定的小RNAs,所以与一些试验采用的自行设计的芯片或Agilent芯片等结果存在一定的差异。最后,在确定筛选差异基因的统计学方法上可能有不同,也与研究者确定的差异显著性范围有关,如P值的确定(<0.01或0.05)等。解决以上问题的关键在于建立一个芯片检测的全球“金标准”,如统一的数据库和统计方法等。

本研究中,我们进一步发现miR-552与结直肠癌的TNM分期、淋巴结和肝转移有关,miR-139-3p与TNM分期和肝转移有关,表明了他们的异常表达可能与结直肠癌的进一步转移有关,具有潜在的预后意义,提示miR-552和miR-139-3p异常表达的患者可能预后差。此外,miR-142-3p不仅可以区分肿瘤和正常组织,而且我们还发现他在不同的分期中表达也有所不同,提示

他可能不仅参与了结直肠癌的早期发生过程, 而且在肿瘤的进一步进展中也起到了一定的作用. 至于在不同年龄患者中miR-133b的表达, >50岁年龄组表达明显低于<50岁年龄组, 这可能反应了不同年龄段患者肿瘤发生和发展的内在分子变化的不同. 当然由于本试验中的样本数量的限制, 这些异常表达的miRNAs的临床意义尚有待于更大规模的试验去证实, 其他一些异常表达的miRNAs的临床意义也有待于今后的大规模样本去发现.

总之, 通过本研究我们成功地构建了结直肠癌、结直肠腺瘤和癌旁正常组织的miRNAs表达谱, 发现了一些结直肠癌差异表达的miRNAs, 推测他们可能具有结直肠癌的早期诊断意义和成为潜在的靶向治疗靶点, 为miRNAs参与结直肠癌的发生提供了一定的理论依据, 丰富了对结直肠癌的发病机制的阐述. 相信随着越来越多学者进一步地深入研究, 我们对于miRNAs在结直肠癌中作用的认识会越来越清晰, 从而为miRNAs在结直肠癌的早期诊断和开发新的治疗靶点带来更多的证据.

4 参考文献

- Derks S, Postma C, Moerkerk PT, van den Bosch SM, Carvalho B, Hermesen MA, Giaretti W, Herman JG, Weijenberg MP, de Bruijne AP, Meijer GA, van Engeland M. Promoter methylation precedes chromosomal alterations in colorectal cancer development. *Cell Oncol* 2006; 28: 247-257
- Hermesen M, Postma C, Baak J, Weiss M, Rapallo A, Sciotto A, Roemen G, Arends JW, Williams R, Giaretti W, De Goeij A, Meijer G. Colorectal adenoma to carcinoma progression follows multiple pathways of chromosomal instability. *Gastroenterology* 2002; 123: 1109-1119
- Lee Y, Ahn C, Han J, Choi H, Kim J, Yim J, Lee J, Provost P, Rådmark O, Kim S, Kim VN. The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature* 2003; 425: 415-419
- Lund E, Güttinger S, Calado A, Dahlberg JE, Kutay U. Nuclear export of microRNA precursors. *Science* 2004; 303: 95-98
- Lai EC. Micro RNAs are complementary to 3' UTR sequence motifs that mediate negative post-transcriptional regulation. *Nat Genet* 2002; 30: 363-364
- Liu J, Rivas FV, Wohlschlegel J, Yates JR 3rd, Parker R, Hannon GJ. A role for the P-body component GW182 in microRNA function. *Nat Cell Biol* 2005; 7: 1261-1266
- Esquela-Kerscher A, Slack FJ. Oncomirs - microRNAs with a role in cancer. *Nat Rev Cancer* 2006; 6: 259-269
- Calin GA, Sevignani C, Dumitru CD, Hyslop T, Noch E, Yendamuri S, Shimizu M, Rattan S, Bullrich F, Negrini M, Croce CM. Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101: 2999-3004
- Cho WC. OncomiRs: the discovery and progress of microRNAs in cancers. *Mol Cancer* 2007; 6: 60
- Hammond SM. MicroRNAs as oncogenes. *Curr Opin Genet Dev* 2006; 16: 4-9
- Kumar MS, Lu J, Mercer KL, Golub TR, Jacks T. Impaired microRNA processing enhances cellular transformation and tumorigenesis. *Nat Genet* 2007; 39: 673-677
- Wang Y, Lee CG. MicroRNA and cancer--focus on apoptosis. *J Cell Mol Med* 2009; 13: 12-23
- Feber A, Xi L, Luketich JD, Pennathur A, Landreneau RJ, Wu M, Swanson SJ, Godfrey TE, Little VR. MicroRNA expression profiles of esophageal cancer. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2008; 135: 255-260; discussion 260
- Katada T, Ishiguro H, Kuwabara Y, Kimura M, Mitui A, Mori Y, Ogawa R, Harata K, Fujii Y. microRNA expression profile in undifferentiated gastric cancer. *Int J Oncol* 2009; 34: 537-542
- Asangani IA, Rasheed SA, Nikolova DA, Leupold JH, Colburn NH, Post S, Allgayer H. MicroRNA-21 (miR-21) post-transcriptionally downregulates tumor suppressor Pdc4 and stimulates invasion, intravasation and metastasis in colorectal cancer. *Oncogene* 2008; 27: 2128-2136
- Su H, Yang JR, Xu T, Huang J, Xu L, Yuan Y, Zhuang SM. MicroRNA-101, down-regulated in hepatocellular carcinoma, promotes apoptosis and suppresses tumorigenicity. *Cancer Res* 2009; 69: 1135-1142
- Bloomston M, Frankel WL, Petrocca F, Volinia S, Alder H, Hagan JP, Liu CG, Bhatt D, Taccioli C, Croce CM. MicroRNA expression patterns to differentiate pancreatic adenocarcinoma from normal pancreas and chronic pancreatitis. *JAMA* 2007; 297: 1901-1908
- Meng F, Henson R, Lang M, Wehbe H, Maheshwari S, Mendell JT, Jiang J, Schmittgen TD, Patel T. Involvement of human micro-RNA in growth and response to chemotherapy in human cholangiocarcinoma cell lines. *Gastroenterology* 2006; 130: 2113-2129
- Liu CG, Calin GA, Meloon B, Gamliel N, Sevignani C, Ferracin M, Dumitru CD, Shimizu M, Zupo S, Dono M, Alder H, Bullrich F, Negrini M, Croce CM. An oligonucleotide microchip for genome-wide microRNA profiling in human and mouse tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101: 9740-9744
- Barad O, Meiri E, Avniel A, Aharonov R, Barzilai A, Bentwich I, Einav U, Gilad S, Hurban P, Karov Y, Lobenhofer EK, Sharon E, Shibolet Y, Shtutman M, Bentwich Z, Einat P. MicroRNA expression detected by oligonucleotide microarrays: system establishment and expression profiling in human tissues. *Genome Res* 2004; 14: 2486-2494
- Rosenfeld N, Aharonov R, Meiri E, Rosenwald S, Spector Y, Zepeniuk M, Benjamin H, Shabes N, Tabak S, Levy A, Lebanony D, Goren Y, Silberschein E, Targan N, Ben-Ari A, Gilad S, Sion-Vardy N, Tobar A, Feinmesser M, Kharenko O, Nativ O, Nass D, Perelman M, Yosepovich A, Shalmon B, Polak-Charcon S, Fridman E, Avniel A, Bentwich I, Bentwich Z, Cohen D, Chajut A, Barshack I. MicroRNAs accurately identify cancer tissue origin. *Nat Biotechnol* 2008; 26: 462-469
- Lu J, Getz G, Miska EA, Alvarez-Saavedra E, Lamb J, Peck D, Sweet-Cordero A, Ebert BL, Mak RH, Ferrando AA, Downing JR, Jacks T, Horvitz HR, Golub

- TR. MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature* 2005; 435: 834-838
- 23 Iorio MV, Ferracin M, Liu CG, Veronese A, Spizzo R, Sabbioni S, Magri E, Pedriali M, Fabbri M, Campiglio M, Ménard S, Palazzo JP, Rosenberg A, Musiani P, Volinia S, Nenci I, Calin GA, Querzoli P, Negrini M, Croce CM. MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer. *Cancer Res* 2005; 65: 7065-7070
 - 24 Bandrés E, Cubedo E, Agirre X, Malumbres R, Zárate R, Ramirez N, Abajo A, Navarro A, Moreno I, Monzó M, García-Foncillas J. Identification by Real-time PCR of 13 mature microRNAs differentially expressed in colorectal cancer and non-tumoral tissues. *Mol Cancer* 2006; 5: 29
 - 25 Sarver AL, French AJ, Borralho PM, Thayanithy V, Oberg AL, Silverstein KA, Morlan BW, Riska SM, Boardman LA, Cunningham JM, Subramanian S, Wang L, Smyrk TC, Rodrigues CM, Thibodeau SN, Steer CJ. Human colon cancer profiles show differential microRNA expression depending on mismatch repair status and are characteristic of undifferentiated proliferative states. *BMC Cancer* 2009; 9: 401
 - 26 Bandrés E, Agirre X, Bitarte N, Ramirez N, Zarate R, Roman-Gomez J, Prosper F, Garcia-Foncillas J. Epigenetic regulation of microRNA expression in colorectal cancer. *Int J Cancer* 2009; 125: 2737-2743
 - 27 Schepeler T, Reinert JT, Ostensfeld MS, Christensen LL, Silahtaroglu AN, Dyrskjot L, Wiuf C, Sørensen FJ, Kruhøffer M, Laurberg S, Kauppinen S, Ørntoft TF, Andersen CL. Diagnostic and prognostic microRNAs in stage II colon cancer. *Cancer Res* 2008; 68: 6416-6424
 - 28 Michael MZ, O' Connor SM, van Holst Pellekaan NG, Young GP, James RJ. Reduced accumulation of specific microRNAs in colorectal neoplasia. *Mol Cancer Res* 2003; 1: 882-891
 - 29 Cummins JM, He Y, Leary RJ, Pagliarini R, Diaz LA Jr, Sjoblom T, Barad O, Bentwich Z, Szafranska AE, Labourier E, Raymond CK, Roberts BS, Juhl H, Kinzler KW, Vogelstein B, Velculescu VE. The colorectal microRNAome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103: 3687-3692
 - 30 Akao Y, Nakagawa Y, Naoe T. MicroRNA-143 and -145 in colon cancer. *DNA Cell Biol* 2007; 26: 311-320
 - 31 Schetter AJ, Leung SY, Sohn JJ, Zanetti KA, Bowman ED, Yanaihara N, Yuen ST, Chan TL, Kwong DL, Au GK, Liu CG, Calin GA, Croce CM, Harris CC. MicroRNA expression profiles associated with prognosis and therapeutic outcome in colon adenocarcinoma. *JAMA* 2008; 299: 425-436

编辑 李薇 电编 何基才

ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) CN 14-1260/R 2010年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

《2009年版中国科技期刊引证报告》(核心版)发布 《世界华人消化杂志》2008年影响因子 0.547

本刊讯 中国科学技术信息研究所发布2008年《世界华人消化杂志》的总被引频次为2 480, 位居1 868种中国科技论文统计源期刊的第100位, 41种内科学类期刊的第6位. 2008年《世界华人消化杂志》的影响因子为0.547, 41种内科学类期刊的第17位. 大家最为关注的是《2009年版中国科技期刊引证报告》(核心版)中新增一个综合评价指标, 即综合评价总分, 该指标根据科学计量学原理, 系统性地综合考虑被评价期刊的各影响力指标(总被引频次、影响因子、他引率、基金论文比、引文率等)在其所在学科中的相对位置, 并按照一定的权重系数将这些指标进行综合集成, 对期刊进行综合评价. 《世界华人消化杂志》总分为49.5, 在41种内科学类期刊中排名第8位, 在1 868种中国科技期刊排名第341位. (编辑部主任: 李军亮 2010-01-08)

组蛋白去乙酰化酶1、2在大肠癌及腺瘤组织中的表达及其与临床病理的关系

刘铁权, 孙明军, 魏敏杰

刘铁权, 孙明军, 中国医科大学附属第一医院内镜诊治科 辽宁省沈阳市 110001

魏敏杰, 中国医科大学药理教研室 辽宁省沈阳市 110001

刘铁权, 中国医科大学附属第一医院内镜诊治科在读硕士, 主要从事大肠癌发病机制的研究。

辽宁省科技厅基金资助项目, No. 200922511-2; No. 2007225017

作者贡献分布: 本课题由刘铁权、孙明军及魏敏杰共同设计; 实验部分及数据整理分析由刘铁权完成; 论文写作由刘铁权与孙明军完成。

通讯作者: 孙明军, 教授, 110001, 辽宁省沈阳市, 中国医科大学附属第一医院内镜诊治科。smjmw@sina.com

电话: 024-83282108

收稿日期: 2010-07-15 修回日期: 2010-08-22

接受日期: 2010-08-31 在线出版日期: 2010-10-28

Clinical pathological significance of expression of histone deacetylase 1 and 2 in colorectal adenoma and carcinoma

Tie-Quan Liu, Ming-Jun Sun, Min-Jie Wei

Tie-Quan Liu, Ming-Jun Sun, Department of Endoscopy, the First Hospital of China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China

Min-Jie Wei, Department of Pharmacology, China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China

Supported by: the Foundation of Science and Technology Department in Liaoning, Nos. 200922511-2; 2007225017

Correspondence to: Professor Ming-Jun Sun, Department of Endoscopy, the First Hospital of China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China. smjmw@sina.com

Received: 2010-07-15 Revised: 2010-08-22

Accepted: 2010-08-31 Published online: 2010-10-28

Abstract

AIM: To investigate the clinicopathological significance of expression of histone deacetylase 1 (HDAC1) and HDAC2 in colorectal adenoma and carcinoma.

METHODS: The expression of HDAC1 and HDAC2 in normal colorectal tissue, colorectal adenoma and carcinoma was determined by immunohistochemistry. Immunoreactivity was evaluated semiquantitatively using a staining index (SI). The correlation of the expression of the two epigenetic biomarkers with various clinical-

pathological parameters in colorectal adenoma and carcinoma, such as age, tumor size and stage, was analyzed, and survival curves were calculated by the Kaplan-Meier method and the Log-rank test.

RESULTS: The expression of HDAC1 and HDAC2 was significantly lower in normal colorectal tissue than in colorectal adenoma and carcinoma (14.3 ± 9.3 vs 22.4 ± 12.4 and 22.8 ± 8.5 ; 5.6 ± 3.3 vs 12.3 ± 4.2 and 16.2 ± 9.7 , all $P < 0.05$). The expression of HDAC2 increased in the following order: normal colorectal tissue, colorectal adenoma and carcinoma. The expression of HDAC1 was significantly higher in tumors ≥ 5 cm than in those < 5 cm (25.1 ± 8.2 vs 20.4 ± 8.5 , $P < 0.05$).

CONCLUSION: Up-regulation of HDAC1 and HDAC2 expression plays a significant role in the development and progression of colorectal carcinoma.

Key Words: Colorectal carcinoma; Histone deacetylase; Histone deacetylase 1; Histone deacetylase 2; Immunohistochemistry

Liu TQ, Sun MJ, Wei MJ. Clinical pathological significance of expression of histone deacetylase 1 and 2 in colorectal adenoma and carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(30): 3195-3199

摘要

目的: 研究组蛋白去乙酰化酶1(HDAC1)和组蛋白去乙酰化酶2(HDAC2)在大肠正常组织、腺瘤、腺癌组织中的表达, 探讨其可能的临床病理及预后的关系。

方法: 以免疫组织化学SP法检测HDAC1和HDAC2在正常大肠组织、腺瘤、腺癌组织中的表达。通过计算染色指数(SI), 评估两者的表达水平与年龄、肿瘤大小、分期、分化等临床病理特征之间的关系。采用Kaplan-Meier法进行生存分析。

结果: HDAC1和HDAC2在正常组织表达明显

■背景资料

表观遗传改变是大肠癌重要发病机制之一, 其中组蛋白乙酰化和去乙酰化是其中的一个研究热点。已有资料表明肿瘤组织中组蛋白去乙酰化酶表达增加, 而组蛋白去乙酰化酶是肿瘤治疗的新靶点。目前国内对于组蛋白去乙酰化酶在大肠癌及腺瘤中的表达还未见系统研究。

■同行评议者

颜宏利, 教授, 中国人民解放军第二军医大学遗传学教研室

■相关报道

Stephan等研究了HDAC2变异小鼠的身体发育和肿瘤发展。这些I类HDAC变异的小鼠能够生长发育,但是比正常小鼠小约25%,并且结肠黏膜细胞数和厚度较正常小鼠少。与野生型HDAC2相比,由于HDAC2变异的胚胎成纤维细胞失去了对IGF的反应,IGF失去了诱导细胞增加的能力。

低于腺瘤及癌组织(14.3 ± 9.3 vs 22.4 ± 12.4 , 22.8 ± 8.5 ; 5.6 ± 3.3 , 12.3 ± 4.2 vs 16.2 ± 9.7 , 均 $P < 0.05$)。HDAC2在三者中的表达呈递增趋势。直径 ≥ 5 cm的癌组织HDAC1的表达高于 < 5 cm的癌组织(25.1 ± 8.2 vs 20.4 ± 8.5),差异均有统计学意义。

结论: HDAC1和HDAC2是大肠癌发生的早期事件,两者共同促进大肠癌的发生发展,可能成为大肠癌治疗的新靶点。

关键词: 大肠癌; 组蛋白去乙酰化酶; 组蛋白去乙酰化酶1; 组蛋白去乙酰化酶2; 免疫组织化学

刘铁权, 孙明军, 魏敏杰. 组蛋白去乙酰化酶1、2在大肠癌及腺瘤组织中的表达及其与临床病理的关系. 世界华人消化杂志 2010; 18(30): 3195-3199

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/3195.asp>

0 引言

大肠癌是常见的胃肠道恶性肿瘤,近20年大肠癌发病呈现上升趋势^[1]。基因与环境因素在其发病中发挥重要作用。普遍认为大肠癌的发病呈散发性。然而,散发的大肠癌中存在着遗传因素。例如有大肠癌家族史的人发病率增高。目前多数研究认为80%以上的大肠癌由大肠腺瘤演变而来,内镜下摘除息肉可以降低大肠癌的发病率76%-90%^[2]。正常的肠上皮细胞经过多因素、多阶段和多种基因改变协同作用,逐渐经由腺瘤发展成为癌。所以癌基因的激活与抑癌基因的失活是大肠癌发生的分子基础^[3]。近年研究认为表观遗传修饰通过调控肿瘤相关基因的表达,在大肠癌的发生和发展过程中起重要作用^[4]。表观遗传修饰主要包括组蛋白的乙酰化和去乙酰化修饰、DNA甲基化修饰、染色质重塑、非编码RNA调控等。其中组蛋白去乙酰化酶(histone deacetylase, HDAC)是研究的热点之一。本研究采用免疫组织化学的方法,研究HDAC1和HDAC2在大肠腺瘤及癌组织中的表达,并探索其可能的临床病理联系,为大肠癌的诊治提供新的线索。

1 材料和方法

1.1 材料 收集中国医科大学附属第一医院2003-2005年的大肠癌手术标本共94例,同时选取大肠癌远端经病理证实的正常黏膜50例,以及经内镜电切的大肠腺瘤36例。所有大肠癌患者均为第1次手术,且术前未经放疗、化疗,术后病

表1 正常组织、腺瘤、癌组织中HDAC1和HDAC2的表达(mean \pm SD)

分组	n	HDAC1	HDAC2
正常组	50	14.3 ± 9.3	5.6 ± 3.3
腺瘤组	36	22.4 ± 12.4^a	12.3 ± 4.2^a
腺癌组	94	22.8 ± 8.5^a	16.2 ± 9.7^{ad}

^a $P < 0.05$ vs 正常组; ^d $P < 0.01$ vs 腺瘤组。

理均为腺癌。其中男54例,女40例。年龄36-76岁。组织分化程度:高分化35例、中分化30例、低分化29例。伴淋巴结转移39例,无淋巴结转移55例。所有患者随访均满5年,其中5例失访。

1.2 方法

1.2.1 免疫组织化学染色: HDAC1、HDAC2均购自Santa Cruz生物技术有限公司,通用型二抗及DAB显色液购自福州迈新生物技术公司。进行常规免疫组织化学SP法染色。采用微波修复10 min, HDAC1按照1:100稀释, HDAC2按1:50稀释,二抗1:200稀释。以PBS代替一抗作为阴性对照。

1.2.2 结果判定: HDAC1与HDAC2均为细胞核阳性表达,染色为棕黄色颗粒状,胞质、胞膜均不着色或着色很少。根据多数细胞的染色状况判定染色结果。根据细胞核染色强度,分别记为0, 1, 2, 4, 6分。根据阳性染色细胞比例评分,记为1-6分。以染色强度评分与细胞比例评分的乘积作为染色指数(staining index, SI)^[5-8]。

统计学处理 采用SPSS13.0统计软件,所得数据以mean \pm SD表示,各组之间的HDAC SI采用t检验或ANOVA方差分析,采用Kaplan-Meier法分析HDAC1和HDAC2表达与生存率的关系,Log-rank检验, $P < 0.05$ 有统计学意义。

2 结果

2.1 正常组织、腺瘤、癌组织中HDAC1和HDAC2的表达 HDAC1表达可见于正常组织,腺瘤及腺癌组织中,主要定位于细胞核中,细胞质中着色很少(图1)。在正常组织中的表达较少(图1A);而在腺瘤、癌组织中的表达明显增加(图1B, C),三者的SI分别为 14.3 ± 9.3 , 22.8 ± 8.52 , 24.1 ± 2.4 (表1)。癌组织及腺瘤中的表达明显高于正常组织($P < 0.01$),但腺瘤和癌组织中的表达没有统计学意义($P > 0.05$)。HDAC2表达与HDAC1类似,可见于正常组织,腺瘤及癌组织中,主要定位于细胞核中,细胞质中着色很少(图1)。在正常组织中表达很少(图1D);而在腺瘤、癌组织中的

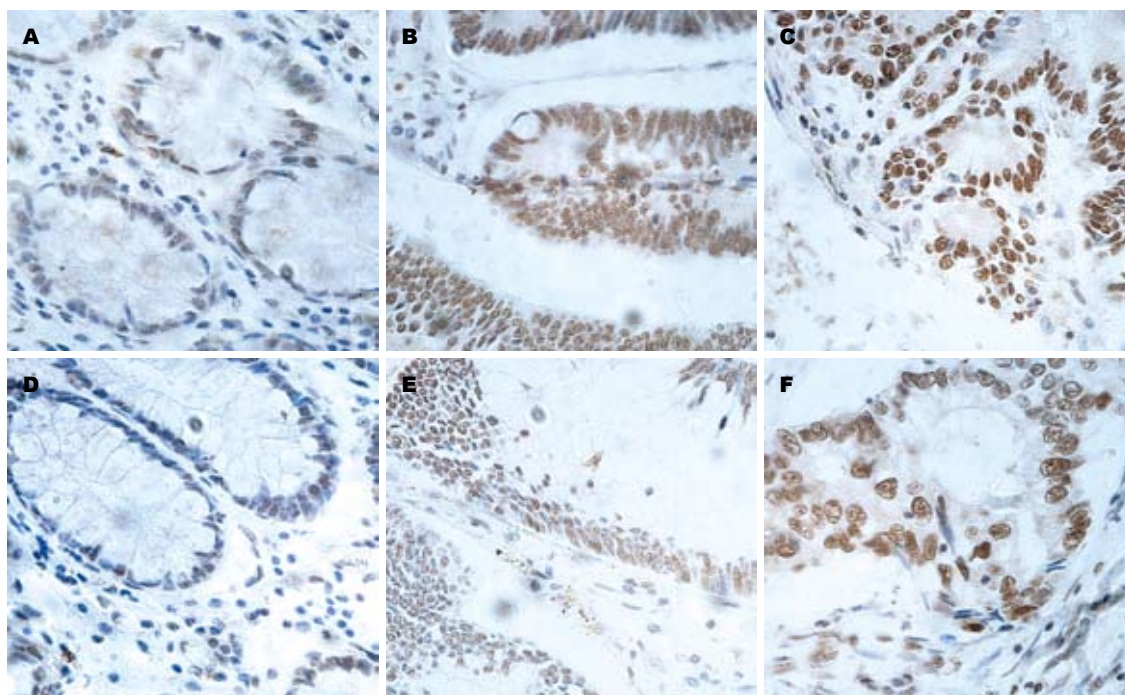


图1 正常组织、腺瘤、癌组织中HDAC1和HDAC2的表达($\times 400$)。A-C: HDAC1; D-F: HDAC2; A, D: 正常组织; B, E: 腺瘤组织; C, F: 腺癌组织。

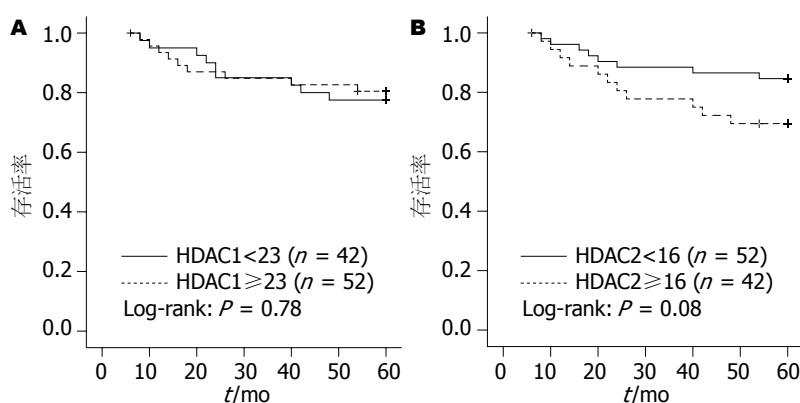


图2 大肠癌患者的Kaplan-Meier生存曲线。A: HDAC1表达与生存率的关系, Log-rank: $P = 0.78$; B: HDAC2表达与生存率的关系, Log-rank: $P = 0.08$ 。

表达逐渐增加(图1E, F)。三者的SI分别为 5.6 ± 3.3 , 12.3 ± 4.2 , 16.2 ± 9.7 , 呈现逐渐递增的趋势(表1)。经ANOVA方差分析, 可以认为三者间差异有统计学意义($P < 0.01$)。

2.2 大肠癌中HDAC1和HDAC2表达与临床病理特征的关系 在不同大小肿瘤中, 直径 ≥ 5 cm病变组的HDAC1表达高于直径 < 5 cm病变组, 两组SI分别为 20.4 ± 8.5 , 25.1 ± 8.2 (表2), 差异有统计学意义($P < 0.05$)。而HDAC2在不同大小肿瘤中的表达没有明显差异。HDAC1和HDAC2的表达与大肠癌的其他临床病理特征间, 包括性别、年龄、肿瘤的分化程度、浸润深度以及临床分期间差别均没有统计学意义。淋巴结转移阳性组的HDAC2表达强度高于淋巴结转移阴性组, 但差异无统计学意义。

2.3 HDAC1和HDAC2表达与远期生存率间的关系 通过对患者手术后5年的随访, 我们进行了Kaplan-Meier法生存分析。分别以HDAC1和HDAC2的SI平均值为界限, 将患者分为两组。分析结果显示, HDAC2低表达组生存率高于HDAC2高表达组, 但差异无统计学意义($P = 0.08$)。HDAC1高表达组与低表达组生存率几乎相同(图2)。

3 讨论

组蛋白修饰, 最主要的是组蛋白的乙酰化与去乙酰化, 受到组蛋白乙酰化酶(histone acetylase, HAT)和HDAC的调控, 两者是可逆的。在肿瘤发生中, 组蛋白修饰主要是抑癌基因的低乙酰基化。组蛋白去乙酰化后染色体处于关闭状态而

■创新盘点

本试验在国内首先采用免疫组织化学法, 系统地研究了正常大肠组织、腺瘤及大肠癌组织中组蛋白去乙酰化酶的表达。

■应用要点

本试验证实了大肠癌中组蛋白去乙酰化酶的过度表达,进一步为大肠癌的靶向治疗提供了理论依据。

表 2 大肠癌中HDAC1和HDAC2表达与临床病理特征的关系 (mean ± SD)

临床病理参数	n	HDAC1	HDAC2
性别			
男	54	22.7 ± 8.1	17.1 ± 10.1
女	40	22.9 ± 9.2	15.4 ± 9.4
年龄(岁)			
≤60	46	24.6 ± 8.9	16.6 ± 9.6
>60	48	21.3 ± 8.0	15.8 ± 10.1
肿瘤大小(cm)			
<5	43	20.4 ± 8.5	15.1 ± 9.8
≥5	51	25.1 ± 8.2	17.4 ± 9.6
肿瘤分化程度			
高分化	35	18.8 ± 7.1	14.0 ± 10.1
中分化	30	23.1 ± 9.8	16.1 ± 8.8
低分化	29	25.6 ± 7.5	10.4 ± 2.0
淋巴结转移			
阴性	55	22.6 ± 8.3	14.6 ± 8.4
阳性	39	22.5 ± 8.7	18.3 ± 11.0
浸润深度			
M, SM, MP	16	21.8 ± 9.3	15.8 ± 10.7
SS, SE, SI	78	23.1 ± 8.4	16.3 ± 9.6
TNM分期			
I	18	21.8 ± 10.4	13.0 ± 9.0
II	28	23.3 ± 8.0	15.1 ± 8.2
III	44	23.0 ± 8.8	18.7 ± 11.0
IV	4	17.0 ± 6.0	26.0 ± 7.0

M: 癌仅侵及黏膜层; SM: 侵及黏膜下层; MP: 侵及肌层; SS: 侵及浆膜下层; SE: 侵及浆膜; SI: 侵及临近脏器。

不利于转录,因此发生在抑癌基因的组蛋白低乙酰基化将抑制该基因的表达。

HDAC不仅对维持正常结直肠黏膜细胞的功能起着很重要的作用,而且对于生长发育也发挥重要作用。HDAC1、2的主要作用是促进结肠细胞的增殖,阻碍其异常分化^[9]。HDAC2突变小鼠的上皮细胞数和黏膜厚度明显减少^[10]。敲除HDAC1的小鼠胚胎由于增殖缺陷和发育障碍会导致死亡率增加^[11]。在HDAC2敲除的小鼠中,发现广泛的HDAC2缺失会导致小鼠围产期死于一系列心脏缺陷^[11]。但HDAC的过表达或结构的异常能够通过使组蛋白、非组蛋白去除乙酰基,从而减少基因转录子接近的途径,导致参与细胞分化的蛋白表达减少,细胞周期阻滞和受损细胞凋亡消失。HDAC的过度表达通过至少两种途径促进肿瘤的进展:第一,HDAC的过表达通过诱导启动子核心区组蛋白去乙酰化而有助于基因的转录阻遏,从而影响细胞的生长抑制、转化、凋亡;第二,HDAC的过表达可以诱导去

乙酰化,调控多种非组蛋白功能,包括转录因子和关键的胞质蛋白^[12]。

腺瘤是一种重要的癌前病变,随着大肠镜技术的广泛开展,其检出率逐渐上升。我们研究了正常组织、腺瘤及癌组织中HDAC的表达,显示HDAC1在正常组织中表达要明显低于腺瘤及癌组织,腺瘤与癌组织中的表达差异不明显。HDAC2的表达在正常组织、腺瘤、癌组织中呈现逐渐递增趋势,差异有统计学意义。这种呈递增趋势的表达结果预示腺瘤的恶变可能与HDAC2的表达水平相关,高水平的HDAC2表达可能预示着腺瘤的恶变率升高。Kim等^[13]研究证实,HDAC1的过度表达抑制肿瘤抑制基因P53的表达,促进内皮细胞血管生成,促进肿瘤发生。本试验结果显示,大肠腺瘤中与大肠癌同样存在着明显的表观遗传改变。腺瘤是发生大肠癌的一个独立的危险因素,预防或治疗腺瘤对于预防大肠癌具有重要意义。已有研究证实高纤维素饮食能降低大肠癌发病率,其机制是纤维素能间接引起细胞核中高度乙酰化组蛋白的聚集,从而抑制细胞的增殖^[14]。因此良好的饮食习惯也可以降低腺瘤的发病率,从而降低大肠癌发生的风险。

本实验中,HDAC1和HDAC2的表达与年龄、性别、肿瘤的浸润深度、淋巴结转移、分化程度、分期等临床病理特征之间没有明显关系($P>0.05$),与Ashktorab等^[7]和Ishihama等^[8]的研究结果一致。不同大小肿瘤的HDAC1表达不同,HDAC1在≥5 cm的肿瘤中的表达明显高于<5 cm的肿瘤,而HDAC2在两者中的表达没有明显差异。以上结果提示过度的HDAC1表达会刺激肿瘤细胞的生长,缩短肿瘤细胞的倍增时间。I型HDAC的过度表达会促进大肠癌细胞的生长,基因敲除I型HDAC的1, 2, 3会较少,例如HCT-116^[15], HT-29^[16]和SW480^[17]细胞株的生长。张孟贤等^[18]通过转染HDAC1 shRNA体外作用于大肠癌细胞SW480,发现HDAC1基因沉默可以诱导细胞凋亡的发生,从而抑制细胞的增殖。同样,HDAC抑制剂MS-275能够抑制大肠癌细胞株的生长、激活抑癌基因P21的表达^[18]。Wilson等^[15]和Saito等^[19]证实,HDAC的促增殖作用与P21的抑制相关。制霉菌素A可使细胞阻滞在G₁和G₂期,其中G₁期阻滞表型是由于HDAC对P21等关键的细胞周期调控基因的转录阻滞作用被解除所致。基因敲除HDAC的1、2、3会产生与HDAC抑制剂类似的P21诱导作用^[20]。这些

数据均证实HDAC1使抑癌基因发生沉默, 促进肿瘤细胞生长。

通过我们对手术后患者5年的随访, 分析了HDAC1和HDAC2的表达与生存率的关系。结果显示二者表达的差异不影响患者的远期生存率。这与Ashktorab等^[7]和Ishihama等^[8]的研究结果一致。提示HDAC的过度表达与疾病的进展不相关。然而和以往试验一样, 由于早期进行大肠癌根治手术生存率较晚期明显升高, 且本试验TNM I期和II期患者占总数的50%, 中晚期患者例数较少, 因此进行生存率比较可能存在偏倚。HDAC的表达与肿瘤患者的预后是否相关, 还需要进一步地随访研究。

以往有实验检测大肠中HDAC1和HDAC2的表达, 但对于正常组织、腺瘤、癌组织三者的联合检测还未见报道。本试验结果证实HDAC1和HDAC2在大肠癌的发生进展中发挥不同作用。虽然作用机制尚不十分明确, 但HDAC的过度表达会影响一系列抑癌基因的表达, 从而引起上皮细胞的异型增生。基因突变是不可逆的, 而表观遗传的改变是可以逆转的, 在散发的大肠癌在表观遗传可能起更主要的作用。目前正在进行的HDAC抑制剂基础实验表现出了多种机制的抗肿瘤作用, 因此抗HDAC是未来肿瘤治疗的一个新靶点。本试验研究结果进一步对HDAC抑制剂治疗大肠癌提供了理论依据。

4 参考文献

- 1 Jemal A, Siegel R, Ward E, Murray T, Xu J, Thun MJ. Cancer statistics, 2007. *CA Cancer J Clin* 2007; 57: 43-66
- 2 Winawer SJ, Zauber AG, Ho MN, O'Brien MJ, Gottlieb LS, Sternberg SS, Wayne JD, Schapiro M, Bond JH, Panish JF. Prevention of colorectal cancer by colonoscopic polypectomy. The National Polyp Study Workgroup. *N Engl J Med* 1993; 329: 1977-1981
- 3 Vogelstein B, Kinzler KW. The multistep nature of cancer. *Trends Genet* 1993; 9: 138-141
- 4 Kanwal R, Gupta S. Epigenetics and cancer. *J Appl Physiol* 2010; 109: 598-605
- 5 Handa K, Yamakawa M, Takeda H, Kimura S, Takahashi T. Expression of cell cycle markers in colorectal carcinoma: superiority of cyclin A as an indicator of poor prognosis. *Int J Cancer* 1999; 84: 225-233
- 6 King RJ, Coffey AI, Gilbert J, Lewis K, Nash R, Millis R, Raju S, Taylor RW. Histochemical studies with a monoclonal antibody raised against a partially purified soluble estradiol receptor preparation from

- human myometrium. *Cancer Res* 1985; 45: 5728-5733
- 7 Ashktorab H, Belgrave K, Hosseinkhah F, Brim H, Nouraie M, Takkikto M, Hewitt S, Lee EL, Dashwood RH, Smoot D. Global histone H4 acetylation and HDAC2 expression in colon adenoma and carcinoma. *Dig Dis Sci* 2009; 54: 2109-2117
- 8 Ishihama K, Yamakawa M, Semba S, Takeda H, Kawata S, Kimura S, Kimura W. Expression of HDAC1 and CBP/p300 in human colorectal carcinomas. *J Clin Pathol* 2007; 60: 1205-1210
- 9 Tou L, Liu Q, Shivdasani RA. Regulation of mammalian epithelial differentiation and intestine development by class I histone deacetylases. *Mol Cell Biol* 2004; 24: 3132-3139
- 10 Zimmermann S, Kiefer F, Prudenziati M, Spiller C, Hansen J, Floss T, Wurst W, Minucci S, Göttlicher M. Reduced body size and decreased intestinal tumor rates in HDAC2-mutant mice. *Cancer Res* 2007; 67: 9047-9054
- 11 Montgomery RL, Davis CA, Potthoff MJ, Haberland M, Fielitz J, Qi X, Hill JA, Richardson JA, Olson EN. Histone deacetylases 1 and 2 redundantly regulate cardiac morphogenesis, growth, and contractility. *Genes Dev* 2007; 21: 1790-1802
- 12 Mariadason JM. HDACs and HDAC inhibitors in colon cancer. *Epigenetics* 2008; 3: 28-37
- 13 Kim MS, Kwon HJ, Lee YM, Baek JH, Jang JE, Lee SW, Moon EJ, Kim HS, Lee SK, Chung HY, Kim CW, Kim KW. Histone deacetylases induce angiogenesis by negative regulation of tumor suppressor genes. *Nat Med* 2001; 7: 437-443
- 14 Archer SY, Meng S, Shei A, Hodin RA. p21(WAF1) is required for butyrate-mediated growth inhibition of human colon cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95: 6791-6796
- 15 Wilson AJ, Byun DS, Popova N, Murray LB, L'Italien K, Sowa Y, Arango D, Velcich A, Augenthaler LH, Mariadason JM. Histone deacetylase 3 (HDAC3) and other class I HDACs regulate colon cell maturation and p21 expression and are deregulated in human colon cancer. *J Biol Chem* 2006; 281: 13548-13558
- 16 Zhu P, Martin E, Mengwasser J, Schlag P, Janssen KP, Göttlicher M. Induction of HDAC2 expression upon loss of APC in colorectal tumorigenesis. *Cancer Cell* 2004; 5: 455-463
- 17 Spurling CC, Godman CA, Noonan EJ, Rasmussen TP, Rosenberg DW, Giardina C. HDAC3 overexpression and colon cancer cell proliferation and differentiation. *Mol Carcinog* 2008; 47: 137-147
- 18 张孟贤, 韩娜, 于世英. RNA干扰沉默HDAC1基因对大肠癌细胞增殖和凋亡的影响. *世界华人消化杂志* 2008; 16: 1173-1178
- 19 Saito A, Yamashita T, Mariko Y, Nosaka Y, Tsuchiya K, Ando T, Suzuki T, Tsuruo T, Nakanishi O. A synthetic inhibitor of histone deacetylase, MS-27-275, with marked in vivo antitumor activity against human tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96: 4592-4597
- 20 Habold C, Poehlmann A, Bajbouj K, Hartig R, Korkmaz KS, Roessner A, Schneider-Stock R. Trichostatin A causes p53 to switch oxidative-damaged colorectal cancer cells from cell cycle arrest into apoptosis. *J Cell Mol Med* 2008; 12: 607-621

■同行评价

本文选题恰当, 设计合理, 对于了解HDAC的作用机制和有针对性的选择治疗药物具有很重要的意义。

编辑 李军亮 电编 何基才

幽门螺旋杆菌与残胃癌发生的研究进展

钟晓刚, 殷舞, 黄顺荣

■背景资料

残胃癌发病呈上升趋势, 其发病机制目前受到关注. 幽门螺旋杆菌感染被认为是残胃癌发生的重要因素之一, 研究较多, 但尚无肯定的结论.

钟晓刚, 殷舞, 黄顺荣, 广西壮族自治区人民医院胃肠外科
广西壮族自治区南宁市 530021

广西卫生厅重点基金资助项目, No. 重200960

作者贡献分布: 钟晓刚与殷舞综述; 黄顺荣审校.

通讯作者: 黄顺荣, 主任医师, 530021, 广西壮族自治区南宁市, 广西壮族自治区人民医院. gxwcsszx@163.com

电话: 0771-2186306

收稿日期: 2010-08-04 修回日期: 2010-09-16

接受日期: 2010-09-20 在线出版日期: 2010-10-28

Advances in understanding the relationship between *Helicobacter pylori* infection and pathogenesis of gastric stump cancer

Xiao-Gang Zhong, Wu Yin, Shun-Rong Huang

Xiao-Gang Zhong, Wu Yin, Shun-Rong Huang, Department of Gastrointestinal Surgery, the People's Hospital of Guangxi Zhuang Autonomous Region, Nanning 530021, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China

Supported by: the Key Medical Research Project of Health Department of Guangxi Zhuang Autonomous Region, No. Chong 200960

Correspondence to: Shun-Rong Huang, Department of Gastrointestinal Surgery, the People's Hospital of Guangxi Zhuang Autonomous Region, Nanning 530021, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China. gxwcsszx@163.com

Received: 2010-08-04 Revised: 2010-09-16

Accepted: 2010-09-20 Published online: 2010-10-28

Abstract

The incidence rate of gastric stump cancer has increased in recent years. The pathogenesis of gastric stump cancer is sophisticated and involves many factors, of which *Helicobacter pylori* infection is regarded as an important one. This article reviews the recent advances in understanding the relationship between *Helicobacter pylori* infection and pathogenesis of gastric stump cancer.

Key Words: Gastric stump cancer; *Helicobacter pylori*; Pathogenesis

Zhong XG, Yin W, Huang SR. Advances in understanding the relationship between *Helicobacter pylori* infection and pathogenesis of gastric stump cancer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(30): 3200-3203

■同行评议者

陈其奎, 教授, 中山大学附属第二医院消化内科

摘要

残胃癌发病率呈上升趋势, 其发生机制与多种因素有关, 其中幽门螺旋杆菌感染被认为是重要因素, 但尚无肯定的结论. 本文就残胃幽门螺旋杆菌感染与残胃癌发生及相关机制作一综述.

关键词: 残胃癌; 幽门螺旋杆菌; 发病机制

钟晓刚, 殷舞, 黄顺荣. 幽门螺旋杆菌与残胃癌发生的研究进展. 世界华人消化杂志 2010; 18(30): 3200-3203

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/3200.asp>

0 引言

残胃癌亦称胃手术后胃癌, 1922年由Balfour首次提出, 是指因胃或十二指肠良性病变而行胃大部切除术5年以上由残胃发生的原发肿瘤, 有人把胃癌手术后10年以上残胃再度发生的癌亦算入其中^[1], 称为广义的残胃癌. 残胃癌的发病率有逐年上升的趋势^[2,3], 国内报道残胃癌约占同期胃癌的0.3%-13.3%, 国外报道为3%-10%^[4]. 文献报道多种因素与残胃癌发生有关, 幽门螺旋杆菌(*Helicobacter pylori*, *H.pylori*)感染被认为是其中的重要因素. 近年, 随着残胃癌等残胃恶性病变发病率逐年上升, *H.pylori*与残胃疾病关系越来越受到关注, 本文旨在对有关*H.pylori*与残胃癌的发生以及可能的发病机制等研究加以综述.

1 手术因素与残胃*H.pylori*感染及残胃癌的发生

手术与残胃癌发生密切相关, 同时也影响着术后残胃*H.pylori*感染状态: (1)术前疾病可影响残胃癌的发生: 文献[5]报道, 远端胃癌根治术后, 残胃发生癌变的风险比正常人群高4-7倍; 而良性胃十二指肠溃疡行远端胃切除术后20年, 胃癌风险也明显增加. Takeno等^[6]报道良性胃切除术后平均癌变时间为360 mo±33.04 mo, 恶性胃疾患行胃切除术后残胃癌发生平均时间为63 mo±19.16 mo, 明显短于良性病变术后. Seoane等^[7]分析73例良性胃溃疡部分切除术后, 残胃癌

变情况, 15例诊断残胃癌, 癌变率20.5%, 诊断残胃癌平均为术后32(14-48)年, 残胃癌中*H.pylori*感染100%, 明显高于未癌变组, 表明*H.pylori*感染和残胃癌变相关。(2)手术方式影响残胃癌发生: Takeno等^[6]报道胃行B I 术后平均癌变时间为84 mo \pm 26.67 mo, B II 术后残胃癌发生平均时间为276 mo \pm 44.26 mo, 但由于该组病例含有第1次手术为胃癌患者, 因此对癌变时间影响大, 不能准确判断术式对癌变的影响。但不同的手术方式后, 残胃*H.pylori*感染状态不同, Nakagawara等^[8]研究认为, 胃部分切除术后, 间置空肠、Roux-en-Y、B I、B II 术后, 胆汁反流发生率分别为7%、28%、59%、88%, 而*H.pylori*感染阳性率为28%、29%、60%、73%, 残胃炎在B I、B II 术后明显与*H.pylori*感染有关, 认为术后反流有利于*H.pylori*在残胃的存活。Osugi等^[9]研究发现, Roux-en-Y、B I、B II 术后, 胆汁反流发生率分别为23.9%、40.4%、73.4%, 残胃炎发生率为33%、76%、100%, 但残胃炎发生与*H.pylori*感染无关, 而与胆汁反流相关。部分研究认为, 胃远端切除术后残胃*H.pylori*感染率随着年龄和术后时间逐渐下降, 因此残胃中*H.pylori*感染与残胃癌发生是否密切相关, 尚无完全一致的结论。

2 残胃*H.pylori*感染与残胃癌相关致病机制

2.1 *H.pylori*感染对胃黏膜细胞增殖的影响 Scotiniotis等^[10]研究认为从正常胃黏膜到萎缩性胃炎、肠上皮化生、不典型增生, 以致最终发展成胃癌, 胃黏膜细胞增殖动力学表现为依次递增。慢性胃炎中*H.pylori*感染导致增殖和凋亡均增加, 在肠上皮化生中以增殖增加为主, 细胞凋亡无明显改变, 这是*H.pylori*感染相关的重要癌变机制之一。而研究证实, 细胞增殖加速, 增加DNA受损机会, 这是人类细胞癌变的基本机制。残胃中由于胆汁反流和*H.pylori*感染, 加重残胃炎炎症和组织学改变, *H.pylori*感染者慢性炎症评分、炎症活性、胃黏膜的萎缩和肠化明显比未感染者严重^[11]。Giuliani等^[12]认为*H.pylori*感染者胃黏膜肠化是阴性者4倍, *H.pylori*感染与残胃病变的发展存在因果关系。Leivonen等^[13]检测残胃中Ki-67增殖指数, 认为*H.pylori*感染与残胃增殖指数明确相关, 胆汁反流有协同作用, 增加了致癌风险。

2.2 *H.pylori*感染与胃黏膜的氧化损伤 *H.pylori*感染后其蛋白酶、脂酶产物能降解胃黏液屏障, 尿素酶水解尿素产生的NH₃破坏细胞间紧密连

接从而破坏胃黏膜屏障, 产生OH⁻可直接对胃黏膜上皮细胞产生毒性作用, 而摄入的细菌抗原能促进炎症反应产生, 内源性致癌物质也不断增加。*H.pylori*感染后胃内抗坏血酸浓度显著降低, 使之对自由基的清除能力下降^[14]。*H.pylori*阳性者胃黏膜NO合成酶显著升高, 导致降解产生大量氮氧化物, 具有亚硝基化作用, 另外产生过氧亚硝酸根离子, 能降解产生OH⁻; 并且活性氧代谢产物有致癌作用, 氧化损伤可以导致DNA突变, 是自由基作用的结果。上述作用导致胃液中自由基浓度及活性在*H.pylori*感染阳性者比阴性者显著升高, 导致黏膜损伤引起DNA突变^[15]。同时Mashimo等^[16]研究认为, *H.pylori*感染者外周血中活性氧分子明显增加, 根除*H.pylori*感染则下降。Fukuhara等^[17]对残胃中胃炎及氧化应激研究中发现, 远端胃切除术后*H.pylori*感染者胃炎活动度悉尼评分及8-羟基脱氧鸟嘌呤(8-hydroxy-desoxyguanosine, 8-OHdG)均明显高于无*H.pylori*感染者, 认为*H.pylori*导致胃炎及氧化应激, 从而与残胃致癌密切相关。

2.3 *H.pylori*感染与胃液中亚硝基化合物的产生 已知亚硝酸盐和亚硝基化合物能诱导胃癌的发生。研究证实胃内高抗坏血酸能阻止胃癌的产生, 可能与其灭活自由基、清除亚硝酸盐及亚硝基化合物及其抑制肿瘤DNA、RNA、蛋白质的合成有关。研究证实*H.pylori*感染后胃液中抗坏血酸浓度显著低于对照组, 平均下降83.3%, 胃液中抗坏血酸浓度显著下降, 使其对亚硝酸盐及亚硝基化合物的清除减少, 因为胃内抗坏血酸能抑制硝酸盐-亚硝酸盐-亚硝基化合物的形成过程。胃内亚硝酸盐及亚硝基化合物的集聚最终诱导癌变的发生。Guadagni等^[18]研究部分胃切除术后亚硝基化合物(*N*-nitroso compounds, NOC)和pH值变化, 结果发现胃切除组无论是B I 或B II 术式, 其残胃pH值和NOC浓度高于正常胃, NOC浓度和胃病变严重程度以及*H.pylori*感染具有一致性, 因此认为NOC和*H.pylori*感染协同导致残胃癌变。

2.4 *H.pylori*感染与胃黏膜病变中癌基因蛋白表达的关系 研究证明, *p53*基因突变在胃癌发生中起着重要作用, 应用免疫组织化学方法检测胃癌组织中P53蛋白阳性表达率为49.0%-62.5%^[19]。*H.pylori*阳性胃癌及胃黏膜病变组P53阳性表达率及表达强度亦显著高于*H.pylori*阴性组, 提示*H.pylori*感染亦有使野生型P53转变为突变型P53的作用, 导致*p53*基因丧失抑癌活性; 而最近

■研发前沿

*H.pylori*感染被认为是胃癌的致病因素, 而在残胃癌致病中的作用是目前的研究热点。手术因素与残胃*H.pylori*感染及残胃癌的发生相关, 临床研究进展可指导手术方式的改进, 而明确*H.pylori*感染导致残胃癌变机制, 是今后残胃癌的治疗靶点。

■相关报道

Giuliani等认为*H.pylori*感染者胃黏膜肠化是阴性者4倍, *H.pylori*感染与残胃病变的发展存在因果关系。

■应用要点

残胃癌机制的进一步明确对残胃癌的预防和治疗有积极意义,尤其对*H.pylori*感染导致残胃癌变关系的深入研究可以为临床胃癌术后抗*H.pylori*治疗提供循证医学证据。

Wei等^[20]研究认为*H.pylori*活化丝氨酸-苏氨酸激酶(serine/threonine protein kinase, AKT)降解胃黏膜细胞野生型P53,从而具有促进胃黏膜细胞恶性转化的功能。Baas等^[21]通过研究比较了原发胃癌和残胃癌中P53肿瘤抑制途径的作用,认为:原发胃癌和残胃中,P53及P21waf1/cip1表达相似。*H.pylori*感染在原发胃癌高于残胃癌,EB病毒感染在残胃癌中高于原发胃癌中,认为P53在原发和残胃癌中均有作用,但原发和残胃癌发生原因可能不同,*H.pylori*和EB病毒可能分别起作用。

当*ras*和*c-myc*基因活化或突变时,产物蛋白表达增强,持续向细胞内传递增殖信号,刺激细胞无限制增生,最终导致细胞恶性转化。研究发现在胃癌或胃黏膜病变组织中*ras*基因12位密码子点突变者*H.pylori*感染率高于无突变者,且P21蛋白过度表达在*H.pylori*感染组显著高于无*H.pylori*感染组($P<0.01$),提示*H.pylori*感染可能具有致*ras*基因突变的作用^[22]。但van Rees等^[23]研究比较原发胃癌和残胃癌中*k-ras*突变,发现*k-ras*突变在两种疾病中一致,均少见12外显子突变。而*H.pylori*和EB病毒感染率不一致,可能与癌变有关。目前研究尚不一致,有待深入探讨。

Xing等^[24]研究则通过检测IL-8、COX-2、TFF-1表达,发现*H.pylori*感染增加了B I手术后残胃黏膜IL-8表达;COX-2表达在接受B II术式者中表达更高,*H.pylori*感染也导致COX-2表达增加,但无统计学意义。认为IL-8、COX-2可作为炎症标记,也是残胃癌变的风险预测因子,因此*H.pylori*感染可能是致癌因素。

3 抗*H.pylori*治疗对残胃癌发生的影响

1994年,世界卫生组织国际癌症研究机构(international agency for research on cancer, IARC)将*H.pylori*定为一级致癌物,并且认为*H.pylori*感染与胃癌有关。残胃癌的发生因素和机制复杂,但越来越多的证据也表明,*H.pylori*感染与残胃癌变密切相关。而是否对残胃*H.pylori*感染进行常规的根除治疗,或残胃*H.pylori*持续感染控制能否减少残胃癌变率,尚缺乏相关的报道。2008年日本一项研究表明,早期胃癌行内镜切除术后,预防性根除*H.pylori*,可降低胃癌复发危险。这项多中心开放标签的随机对照临床试验纳入544例患者,并随机分成*H.pylori*根除组与对照组。经3年随访发现,根除*H.pylori*显著降低了异时性胃癌危险^[25]。但对于胃癌行部分胃切除术后是否抗

*H.pylori*治疗会减少残胃癌的发生尚缺乏循证医学证据。

LokhvitskiĀ等^[26]研究观察到胃切除术后39.7%患者持续*H.pylori*感染状态,与胃炎严重程度一致。Akiyama等^[27]研究表明,B I式胃切除术后5年内发生残胃炎主要由*H.pylori*感染所致。Kato等^[28]认为,残胃抗*H.pylori*治疗通过促进pH值正常化,起到保护残胃黏膜的目的,减少癌变的可能。第2届西班牙会议认为胃癌术后残胃可否作为抗*H.pylori*治疗的适应证缺乏可靠的证据支持,但目前早期胃癌内镜术后抗*H.pylori*治疗已成为部分国家专家共识^[29,30]。但众多的研究更倾向认为,残胃抗*H.pylori*治疗可望阻断残胃癌变过程,减少残胃癌发生。

4 结论

越来越多的证据表明*H.pylori*的感染与残胃癌的关系密切,但还缺乏肯定一致的结论;部分研究^[31]认为残胃癌发生机制中EB病毒感染更为重要,也有研究认为残胃胆汁反流因素才是致癌的主要因素,因此*H.pylori*与残胃癌发生关系尚存争议,特别对于胃切除术后残胃的*H.pylori*感染是否需要抗*H.pylori*治疗尚缺乏循证医学证据。但相信随着对残胃癌的关注和相关研究的深入,对*H.pylori*感染在残胃中的作用将更加清楚,对临床早日制定规范、合理的治疗方案,减少残胃癌发生,改善残胃癌患者的预后具有积极的作用。

5 参考文献

- 1 Tanigawa N, Nomura E, Lee SW, Kaminishi M, Sugiyama M, Aikou T, Kitajima M. Current state of gastric stump carcinoma in Japan: based on the results of a nationwide survey. *World J Surg* 2010; 34: 1540-1547
- 2 许东奎, 赵平, 王成峰, 邵永孚, 蔺宏伟, 田艳涛. 残胃癌的临床病理特征与预后分析. *中华肿瘤杂志* 2006; 28: 852-854
- 3 Nunobe S, Ohyama S, Miyata S, Matsuura M, Hiki N, Fukunaga T, Seto Y, Ushijima M, Yamaguchi T. Incidence of gastric cancer in the remnant stomach after proximal gastrectomy. *Hepatogastroenterology* 2008; 55: 1855-1858
- 4 Ohashi M, Katai H, Fukagawa T, Gotoda T, Sano T, Sasako M. Cancer of the gastric stump following distal gastrectomy for cancer. *Br J Surg* 2007; 94: 92-95
- 5 Sinning C, Schaefer N, Standop J, Hirner A, Wolff M. Gastric stump carcinoma - epidemiology and current concepts in pathogenesis and treatment. *Eur J Surg Oncol* 2007; 33: 133-139
- 6 Takeno S, Noguchi T, Kimura Y, Fujiwara S, Kubo N, Kawahara K. Early and late gastric cancer arising in the remnant stomach after distal gastrectomy. *Eur J*

- Surg Oncol* 2006; 32: 1191-1194
- 7 Seoane A, Bessa X, Alameda F, Munné A, Gallen M, Navarro S, O'Callaghan E, Panadès A, Andreu M, Bory F. Role of *Helicobacter pylori* in stomach cancer after partial gastrectomy for benign ulcer disease. *Rev Esp Enferm Dig* 2005; 97: 778-785
 - 8 Nakagawara H, Miwa K, Nakamura S, Hattori T. Duodenogastric reflux sustains *Helicobacter pylori* infection in the gastric stump. *Scand J Gastroenterol* 2003; 38: 931-937
 - 9 Osugi H, Fukuhara K, Takada N, Takemura M, Kinoshita H. Reconstructive procedure after distal gastrectomy to prevent remnant gastritis. *Hepatogastroenterology* 2004; 51: 1215-1218
 - 10 Scotiniotis IA, Rokkas T, Furth EE, Rigas B, Shiff SJ. Altered gastric epithelial cell kinetics in *Helicobacter pylori*-associated intestinal metaplasia: implications for gastric carcinogenesis. *Int J Cancer* 2000; 85: 192-200
 - 11 Li XB, Lu H, Chen HM, Chen XY, Ge ZZ. Role of bile reflux and *Helicobacter pylori* infection on inflammation of gastric remnant after distal gastrectomy. *J Dig Dis* 2008; 9: 208-212
 - 12 Giuliani A, Caporale A, Demoro M, Benvenuto E, Scarpini M, Spada S, Angelico F. Gastric cancer precursor lesions and *Helicobacter pylori* infection in patients with partial gastrectomy for peptic ulcer. *World J Surg* 2005; 29: 1127-1130
 - 13 Leivonen M, Nordling S, Haglund C. Does *Helicobacter pylori* in the gastric stump increase the cancer risk after certain reconstruction types? *Anticancer Res* 1997; 17: 3893-3896
 - 14 Dovhanj J, Kljaić K, Dodig-Curković K, Curković M, Volarević M, Marjanović K. *Helicobacter pylori*, zinc and iron in oxidative stress-induced injury of gastric mucosa. *Mini Rev Med Chem* 2009; 9: 26-30
 - 15 Hahm KB, Lee KJ, Choi SY, Kim JH, Cho SW, Yim H, Park SJ, Chung MH. Possibility of chemoprevention by the eradication of *Helicobacter pylori*: oxidative DNA damage and apoptosis in *H. pylori* infection. *Am J Gastroenterol* 1997; 92: 1853-1857
 - 16 Mashimo M, Nishikawa M, Higuchi K, Hirose M, Wei Q, Haque A, Sasaki E, Shiba M, Tominaga K, Watanabe T, Fujiwara Y, Arakawa T, Inoue M. Production of reactive oxygen species in peripheral blood is increased in individuals with *Helicobacter pylori* infection and decreased after its eradication. *Helicobacter* 2006; 11: 266-271
 - 17 Fukuhara K, Osugi H, Takemura M, Lee S, Morimura K, Kishida S, Nishizawa S, Iwasaki H, Gyobu K. *Helicobacter pylori* induces gastritis and oxidative stress after distal gastrectomy. *Hepatogastroenterology* 2008; 55: 1484-1486
 - 18 Guadagni S, Pistoia MA, Amicucci G, Leocata P, Ventura L, Ventura T, Chiominto A, Deraco M, Vaglini M. N-nitroso compounds and *Helicobacter pylori* in the gastric remnant. *Tumori* 1999; 85: 108-112
 - 19 Merritt JA, Roth JA, Logothetis CJ. Clinical evaluation of adenoviral-mediated p53 gene transfer: review of INGN 201 studies. *Semin Oncol* 2001; 28: 105-114
 - 20 Wei J, Nagy TA, Vilgelm A, Zaika E, Ogden SR, Romero-Gallo J, Piazzuelo MB, Correa P, Washington MK, El-Rifai W, Peek RM, Zaika A. Regulation of p53 tumor suppressor by *Helicobacter pylori* in gastric epithelial cells. *Gastroenterology* 2010; 139: 1333-1343
 - 21 Baas IO, van Rees BP, Musler A, Craanen ME, Tytgat GN, van den Berg FM, Offerhaus GJ. *Helicobacter pylori* and Epstein-Barr virus infection and the p53 tumour suppressor pathway in gastric stump cancer compared with carcinoma in the non-operated stomach. *J Clin Pathol* 1998; 51: 662-666
 - 22 Wang J, Chi DS, Kalin GB, Sosinski C, Miller LE, Burja I, Thomas E. *Helicobacter pylori* infection and oncogene expressions in gastric carcinoma and its precursor lesions. *Dig Dis Sci* 2002; 47: 107-113
 - 23 van Rees BP, Musler A, Caspers E, Drillenburger P, Craanen ME, Polkowski W, Chibowski D, Offerhaus GJ. K-ras mutations in gastric stump carcinomas and in carcinomas from the non-operated stomach. *Hepatogastroenterology* 1999; 46: 2063-2068
 - 24 Xing C, Kato S, Matsukura N, Matsuda N, Xu H, Takashi E, Yamada N, Naito Z, Tajiri T. Interleukin-8, cyclo-oxygenase-2, and trefoil factor family 1 gene expression and their association with *Helicobacter pylori* infection in the remnant stomach. *Surg Today* 2005; 35: 1026-1032
 - 25 Fukase K, Kato M, Kikuchi S, Inoue K, Uemura N, Okamoto S, Terao S, Amagai K, Hayashi S, Asaka M. Effect of eradication of *Helicobacter pylori* on incidence of metachronous gastric carcinoma after endoscopic resection of early gastric cancer: an open-label, randomised controlled trial. *Lancet* 2008; 372: 392-397
 - 26 LohvitskiĀ SV, Darvin VV, Proshin AV, Bashirova ES, Butorov IL. [Evaluation of results of surgical treatment of peptic ulcer associated with *Helicobacter pylori*] *Vestn Khir Im I I Grek* 1998; 157: 18-20
 - 27 Akiyama H, Akao S, Kojima M, Ishikawa H. [The affect of *Helicobacter pylori* and bile acids as the pathogenesis of gastritis of the remnant stomach after distal partial gastrectomy] *Nippon Shokakibyo Gakkai Zasshi* 1999; 96: 137-141
 - 28 Kato S, Matsukura N, Matsuda N, Tsuchiya S, Naito Z, Tajiri T. Normalization of pH level and gastric mucosa after eradication of *H. pylori* in the remnant stomach. *J Gastroenterol Hepatol* 2008; 23 Suppl 2: S258-S261
 - 29 Onoda N, Katsuragi K, Sawada T, Maeda K, Mino A, Ohira M, Ishikawa T, Wakasa K, Hirakawa K. Efficacy of *Helicobacter pylori* eradication on the chronic mucosal inflammation of the remnant stomach after distal gastrectomy for early gastric cancer. *J Exp Clin Cancer Res* 2005; 24: 515-521
 - 30 Asaka M, Kato M, Takahashi S, Fukuda Y, Sugiyama T, Ota H, Uemura N, Murakami K, Satoh K, Sugano K. Guidelines for the management of *Helicobacter pylori* infection in Japan: 2009 revised edition. *Helicobacter* 2010; 15: 1-20
 - 31 Kaizaki Y, Hosokawa O, Sakurai S, Fukayama M. Epstein-Barr virus-associated gastric carcinoma in the remnant stomach: de novo and metachronous gastric remnant carcinoma. *J Gastroenterol* 2005; 40: 570-577

同行评价

本文科学性较好, 为了解残胃癌的发生机制奠定了基础, 有一定的学术价值。

编辑 李薇 电编 李薇

大鼠肝性脑病模型的研究进展

段志军, 张春乐

■背景资料

肝性脑病(HE)是慢性肝病基础上发生的以脑神经功能障碍为主要表现的代谢紊乱性疾病, 世界消化病学会将肝性脑病分为A、B、C 3种类型, 其发病机制尚未明确, 防治也无特效疗法。HE动物模型的建立对于探知其发病机制、寻求诊断和治疗的手段发挥着十分重要的作用, 其中以大鼠模型应用最为广泛。

段志军, 张春乐, 大连医科大学附属第一医院消化内科 辽宁省大连市 116011

国家自然科学基金资助项目, No. 30970886

大连市科技计划基金资助项目, No. 2008E13SF193

作者贡献分布: 本综述由段志军选题、设计、修改及审校; 张春乐检索文献和写作。

通讯作者: 段志军, 教授, 主任医师, 博士生导师, 116011, 辽宁省大连市, 大连医科大学附属第一医院消化内科。

cathydoctor@yahoo.com

电话: 0411-83635963-7132

收稿日期: 2010-05-29 修回日期: 2010-08-26

接受日期: 2010-09-07 在线出版日期: 2010-10-28

Progress in developing rat models of hepatic encephalopathy

Zhi-Jun Duan, Chun-Le Zhang

Zhi-Jun Duan, Chun-Le Zhang, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Dalian Medical University, Dalian 116011, Liaoning Province, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30970886; and the Foundation of Science and Technology Program of Dalian, No. 2008E13SF193

Correspondence to: Professor Zhi-Jun Duan, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Dalian Medical University, Dalian 116011, Liaoning Province, China. cathydoctor@yahoo.com

Received: 2010-05-29 Revised: 2010-08-26

Accepted: 2010-09-07 Published online: 2010-10-28

Abstract

Hepatic encephalopathy is a serious complication of acute and chronic liver diseases and has a high mortality rate. The pathogenesis of hepatic encephalopathy remains unclear, and there is no means of prevention or effective cure for the disease. Therefore, there is an urgent need for the basic and clinical research of hepatic encephalopathy to elucidate its pathogenesis. The development of animal models is important for elucidating the pathogenesis of hepatic encephalopathy and providing new avenues for diagnosis and therapy of the disease. Among a variety of animal models, rat model is applied most widely for similarity to humans, repeatability, reliability, applicability, controllability, simplicity and economy. In this paper, we briefly review various rat models of hepatic encephalopathy that have different origins.

Key Words: Hepatic encephalopathy; Animal model; Rat

Duan ZJ, Zhang CL. Progress in developing rat models of hepatic encephalopathy. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(30): 3204-3209

摘要

肝性脑病是慢性肝病较严重的并发症, 死亡率很高, 其发病机制尚未明确, 防治也无特效疗法, 因此对肝性脑病的基础和临床研究十分迫切。肝性脑病动物模型的建立对于发病机制、诊断和治疗的研究发挥着非常重要的作用, 目前制备肝性脑病动物模型的动物种类较多, 其中大鼠模型具有与人类相似性, 良好的可重复性、可靠性、适用性、可控性、易行性和经济性等优势, 应用最为广泛。本文就常用不同病因大鼠肝性脑病模型的制备方法和研究进展作简要综述。

关键词: 肝性脑病; 动物模型; 大鼠

段志军, 张春乐. 大鼠肝性脑病模型的研究进展. 世界华人消化杂志 2010; 18(30): 3204-3209

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/3204.asp>

0 引言

肝性脑病(hepatic encephalopathy, HE)是在慢性肝病基础上发生的脑神经功能紊乱。世界消化病学会将HE分为3种类型: A型为与急性肝衰竭相关的HE, 不包括慢性肝病伴发的急性HE; B型为不伴内在肝病的严重门体分流, 并通过肝脏活检提示肝组织学正常, 此型不易被确诊, 且较少见; C型为慢性肝病、肝硬化基础上发生的HE, 无论其临床表现是否为急性^[1]。HE发病机制尚未完全阐明, 也无有效的防治手段, 且严重影响患者的生活质量和生存期, 因此HE长期以来一直是国内外研究的热点。动物模型的建立是HE研究的基础, 随着生物技术的发展, 检测、治疗技术的提高, 动物模型也有了相应的改进和发展, 其中以大鼠模型应用最为广泛, 本文就3种类型HE常用大鼠模型的建立和研究进展作一综述。

■同行评议者

周伟平, 教授, 上海东方肝胆外科医院肝外三科

1 A型HE大鼠模型

A型HE大鼠模型主要通过硫代乙酰胺(thioacetamide, TAA)、四氯化碳(carbon tetrachloride, CCl_4)、*D*-氨基半乳糖(*D*-galactosamine, *D*-GaIN)/脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)、酒精诱导的肝毒性损伤、对乙酰氨基酚(acetaminophen, PAPA)、肝血流阻断及部分或全部肝切除等方法建立^[2]。

1.1 TAA诱导的A型HE大鼠模型 TAA诱导的急性肝衰竭大鼠模型常见的给药方式有350 mg/kg连续3 d腹腔注射、200 mg/kg皮下注射1次、300 mg/kg连续2 d灌胃等^[3-5]。TAA被肝脏摄取后,经肝细胞内的细胞色素P450混合功能氧化酶代谢成为TAA-硫氧化物,进而引起脂质过氧化反应和肝细胞损伤,并可直接作用于肝细胞DNA、RNA和蛋白质合成酶产生毒性作用,以及诱导肝代谢紊乱,而致肝坏死^[6-8]。在此类模型中,血脑屏障是完整的,但作为气体形式的氨仍能渗入血脑屏障,与谷氨酸在谷氨酰胺合成酶的催化下转变为谷氨酰胺,后者具有增加渗透压的作用,并通过氧化应激和线粒体的渗透性改变等方式致星形胶质细胞水肿,进而影响神经调节功能^[9];此外TAA尚通过改变脑组织对精氨酸、鸟氨酸、赖氨酸等氨基酸的摄取指数,引起脑代谢异常^[10]。TAA制备的A型HE具有良好的可重复性,已被国际广泛的接受,而且具有成模时间短,成功率高,其肝损伤与人类肝损伤具有相似性的特点^[11,12]。

1.2 CCl_4 诱导的A型HE大鼠模型 制备 CCl_4 诱导的急性肝损伤大鼠模型常用 CCl_4 溶于橄榄油或精制植物油,配制成40%的浓度,给药方式有2.5 mL/kg灌胃、1 mL/kg腹腔注射、2 mL/kg皮下注射等^[13-15],观察时间点常取6、12、24、48 h及1 wk。对于 CCl_4 肝毒性的作用机制,目前较为公认的是自由基形成及其引发的链式过氧化反应, CCl_4 经肝微粒体细胞色素P450代谢激活,生成活性自由基($\text{CCl}_3\text{O}_2\cdot$ 和 $\text{Cl}\cdot$)及一系列氧化活性物质,与肝细胞质膜或亚细胞膜脂质发生过氧化反应,降解膜磷脂,破坏细胞膜完整性,使其通透性增加,致肝细胞坏死^[16,17]。大脑对三磷酸腺苷有高度的依赖性,大部分细胞能量是通过氧化磷酸化获得的,这一过程需要各种存在于线粒体内膜特殊结构上的呼吸酶复合体的参与, CCl_4 就是通过抑制呼吸酶复合体I、II、IV而影响组织代谢的^[18]。

1.3 *D*-GaIN/LPS诱导的A型HE大鼠模型 将

D-GaIN溶于生理盐水配制成100 g/L的溶液,*D*-GaIN单独制备急性肝损伤模型,常用剂量为500、800或1 000 mg/kg腹腔注射,联合LPS制备急性肝损伤模型常用剂量为*D*-GaIN 250 mg/kg、LPS 100 mg/kg或*D*-GaIN 500 mg/kg、LPS 50 mg/kg等,观察时间一般为24-48 h^[19-23]。*D*-GaIN致肝损伤的机制中比较经典的观点认为*D*-GaIN在肝细胞内代谢,与鸟苷酸结合形成鸟苷二磷酸半乳糖,后者在肝细胞内聚集,此种结合的速度大大超过了鸟苷酸合成的速度,导致鸟苷酸耗竭,进而使依赖其进行合成的核酸、蛋白质、脂质等物质减少,阻碍细胞器和酶的再生,使细胞器受损^[24,25]。*D*-GaIN联合LPS在肝脏使库普弗细胞(Kupffer cells, KCs)过度激活,后者释放细胞因子,介导炎症级联反应,这种机制在急性肝衰竭模型的形成过程中所起的重要作用正在受到特别的关注^[26,27]。在此类模型中发现脑星形胶质细胞足突突起水肿,突起周围轴突和树突水肿。Dixit和Chang发现大脑皮层及小脑的水肿和上述表现同时存在,且有不同程度的脑组织坏死和血脑屏障破坏,脑水肿限于灰质,但上述改变与观测到的人类相应变化不全相符,该类模型常应用于诱发电位的研究^[2,28]。

1.4 乙醇诱导的A型HE大鼠模型 常用50%-60%的乙醇4 g/kg灌胃或6 mL/kg腹腔注射的给药方式建立酒精性肝损伤模型,观察时间为1-2 wk^[29,30]。乙醇对肝组织损害的主要机制为:在脱氢酶的催化下生成乙醛,后者为高反应活性因子,与蛋白结合形成乙醛-蛋白加合物,这种加合物不但直接损伤细胞,而且可作为新抗原诱导免疫反应,致使细胞受到免疫攻击^[31];乙醇在微粒体氧化系统代谢中产生活性氧对损害组织并促使三羧酸循环障碍而影响脂肪代谢;上述各种活动均不同程度地激发了免疫炎症反应,炎症细胞浸润、各种细胞因子释放,进一步加重组织损伤^[32,33]。乙醇除通过损伤肝脏,造成各种毒物未经灭活大量入脑而损伤脑组织,尚有直接的神经毒性,通过降低硫胺(维生素 B_1)利用酶的活性,减少硫胺含量,从而损伤脑组织^[34]。出现情感的认知、执行能力、知觉、判断力和视觉能力下降,反应时间延长,步态和平衡均受到影响等结果^[35]。

1.5 PAPA诱导的A型HE大鼠模型 PAPA又名扑热息痛,为常用的解热镇痛药,造模剂量一般为300-600 mg/kg,一次性腹腔注射,也可为3 g/kg灌胃,观察时间通常为24 h^[36-38]。PAPA经P450代

■ 相关报道

Dixit和Chang发现大脑皮层及小脑的水肿和脑星形胶质细胞足突突起水肿,突起周围轴突和树突水肿同时存在,且有不同程度的脑组织坏死和血脑屏障破坏,脑水肿限于灰质,但上述改变与观测到的人类相应变化不全相符,*D*-GaIN/LPS诱导的A型HE大鼠模型常应用于诱发电位的研究。

■创新盘点

本文首次较为全面地对各种病因的肝性脑病大鼠模型进行综述,并从造模方法及时间、对肝脏和脑组织损伤的机制、适用于何种研究、优缺点等方面进行阐述。

谢成活性产物*N*-乙酰-对-苯醌亚胺(*N*-acetyl-p-benzoquinone imine, NAPQI), 后者的灭活需还原型谷胱甘肽的参与, 当NAPQI生成过多而谷胱甘肽不足时, NAPQI与细胞内大分子共价结合成加合物, 诱发氧化应激反应, 造成过氧化损伤, 并与线粒体结合扰乱细胞内能量代谢, 以及致使生物膜发生脂质过氧化, 终致肝细胞坏死^[39,40]。此外PAPA诱导的急性肝衰竭可产生亚低温, 而后者与脑组织谷胱甘肽的代谢, 血氨浓度、脑水肿程度、促炎症反应细胞活动及脑病进展密切相关^[41]。

1.6 肝血流阻断、部分或全肝切除制备A型HE大鼠模型 肝血流阻断、部分或全肝切除分别通过阻断门静脉、肝动脉和切除部分或全部肝脏来制备急性肝损伤模型^[42-44]。由于24 h死亡率较高, 不利于疗效的观察, 从而限制了这些模型的应用。近来有学者提出先使用药物诱导损伤, 然后采用部分肝叶结扎切除, 保留中毒肝组织的方法, 既避免了创面过大造成大量出血而死亡, 又符合肝细胞大量坏死导致肝衰竭的机制, 其HE症状和病理变化是渐进性的, 适合疗效的观察^[45,46]。此类模型中氨大量聚集于脑内, 使谷氨酰胺合成过多, 导致脑水肿, 从而引起一系列大脑血流和内稳态的变化^[47]。目前此类模型也正被广泛推广和使用。

对于A型HE模型的建立期望达到如下标准: 可复制性, 并易于观察分期; 症状的进展包括脑水肿及其并发症(颅内高压及脑疝); 潜在的可逆转性; 脑内氨、谷氨酰胺增加; 肝脏、脑组织的病理变化具有特征性; 对实验人员具有最小的毒性和感染性^[2]。但几乎没有模型能达到以上标准, 所有的模型均有低体温、低血糖及其他系统并发症, 因此需要强调控制好体温、血糖, 及对其他系统进行检测, 并同时给予一些支持治疗^[2,48]。

2 B型HE大鼠模型

B型HE强调了门体分流的重要地位, 他代表了门体性脑病的纯粹类型。由于其相对于临床并不多见, 有学者甚至质疑单纯门体分流是否足以导致脑病, 直到第11届世界消化病学会正式将此种类型独立划分出来。其模型通过门腔静脉吻合术(portacaval anastomosis, PCA)^[49,50]或胆管结扎(bile duct ligation, BDL)而建立。端-侧PCA术式主要为结扎门静脉近端, 将门静脉和下腔静脉之间进行端-侧吻合^[51]。侧-侧PCA术式为将门静脉和下腔静脉之间进行侧-侧吻合, 其中端-

侧PCA在B型HE中应用较广泛, 肝功能障碍限于肝萎缩, 中央静脉周围肝细胞损伤。PCA普遍应用于研究门腔静脉分流的效果, 考察肝储备能力的下降。门腔分流引起脑组织中氨和谷氨酰胺增高, 改变昼夜生物节律, 使运动功能、记忆和学习能力减退, 反射下降, 降低脑的葡萄糖利用率, 改变多种神经递质功能, 与肝硬化患者出现的轻微型HE相似。此种模型对氨非常敏感, 易造成重度昏迷^[2,52]。

BDL通过结扎胆总管达到肝损伤的目的^[53,54]。其机制可能与结扎胆管后继发胆管上皮细胞增生, 后者作为胆汁性肝损伤的启动因素和中心病理环节, 通过继发一系列脂质过氧化反应, 介导 α -平滑肌肌动蛋白、转化生长因子 β 1、血小板衍生生长因子 β 、I型胶原等的表达而实现^[55,56]。此类模型通过提高海马区肿瘤坏死因子-1、5-羟色胺的表达, 降低脑源性神经营养因子的表达, 从而引起认知和行为能力的异常^[57,58]。

3 C型HE大鼠模型

C型HE即传统意义上的HE, 其临床表现与B型相似, 并具备B型所没有的肝硬化的症状和体征, 通常C型HE已发展到肝硬化期, 并建立了完备的门体侧枝循环。目前大多数学者认为肝功减退可能为脑病发生的主要因素, 循环分流起着次要作用, 两者有协同作用。大鼠模型常见于CCl₄和酒精等药物引起的慢性肝损伤。常用40%的CCl₄酒精1-2 mL/kg以及50%-60%的酒精4-6 mL/kg灌胃8 wk以上^[59-62]。目前国内外广泛应用该类模型进行生理生化指标及药品疗效的测试^[63,64]。

4 结论

B型和C型HE大鼠模型期望达到的标准为: 慢性肝病伴门体分流; 脑病的症状从轻微型HE到重度HE呈现阶段性; 脑病昏迷阶段II型星形胶质细胞增生; 血氨、脑组织氨、谷氨酰胺升高; 存在促发因素; 可作为临床药物效果观察^[2]。目前HE的病理生理研究已达到细胞分子水平, 不断研究得益于模型的制备。对HE模型的研究有选用犬、小型猪及兔^[65-70]。相比之下, 大鼠模型具有价格低廉, 成功率高, 具有良好的可重复性、应用广泛等特点。但目前仍迫切需要稳定的C型HE大鼠模型, 以及肝移植后的神经精神紊乱的模式。

5 参考文献

- 1 Ferenci P, Lockwood A, Mullen K, Tarter R, Weis-

- senborn K, Blei AT. Hepatic encephalopathy--definition, nomenclature, diagnosis, and quantification: final report of the working party at the 11th World Congresses of Gastroenterology, Vienna, 1998. *Hepatology* 2002; 35: 716-721
- 2 Butterworth RF, Norenberg MD, Felipe V, Ferenci P, Albrecht J, Blei AT. Experimental models of hepatic encephalopathy: ISHEN guidelines. *Liver Int* 2009; 29: 783-788
- 3 Chu CJ, Chang CC, Wang TF, Lee FY, Chang FY, Chen YC, Chan CC, Huang HC, Wang SS, Lee SD. Detrimental effects of nitric oxide inhibition on hepatic encephalopathy in rats with thioacetamide-induced fulminant hepatic failure: role of nitric oxide synthase isoforms. *J Gastroenterol Hepatol* 2006; 21: 1194-1199
- 4 Khatri A, Garg A, Agrawal SS. Evaluation of hepatoprotective activity of aerial parts of *Tephrosia purpurea* L. and stem bark of *Tecomella undulata*. *J Ethnopharmacol* 2009; 122: 1-5
- 5 Swapna I, Kumar KV, Reddy PV, Murthy ChR, Reddanna P, Senthilkumar B. Phospholipid and cholesterol alterations accompany structural disarray in myelin membrane of rats with hepatic encephalopathy induced by thioacetamide. *Neurochem Int* 2006; 49: 238-244
- 6 Mehmetçik G, Özdemirler G, Koçak-Toker N, Cevikbaş U, Uysal M. Role of carnosine in preventing thioacetamide-induced liver injury in the rat. *Peptides* 2008; 29: 425-429
- 7 Staňková P, Kučera O, Lotková H, Roušar T, Endlicher R, Cervinková Z. The toxic effect of thioacetamide on rat liver in vitro. *Toxicol In Vitro* 2010 Jun 22. [Epub ahead of print]
- 8 Yogalakshmi B, Viswanathan P, Anuradha CV. Investigation of antioxidant, anti-inflammatory and DNA-protective properties of eugenol in thioacetamide-induced liver injury in rats. *Toxicology* 2010; 268: 204-212
- 9 Rama Rao KV, Reddy PV, Tong X, Norenberg MD. Brain edema in acute liver failure: inhibition by L-histidine. *Am J Pathol* 2010; 176: 1400-1408
- 10 Albrecht J, Hilgier W, Januszewski S, Quack G. Contrasting effects of thioacetamide-induced liver damage on the brain uptake indices of ornithine, arginine and lysine: modulation by treatment with ornithine aspartate. *Metab Brain Dis* 1996; 11: 229-237
- 11 Chu CJ, Lee FY, Wang SS, Chang FY, Lin HC, Wu SL, Chan CC, Tsai YT, Lee SD. Establishment of an animal model of hepatic encephalopathy. *Zhonghua Yixue Zazhi (Taipei)* 2000; 63: 263-269
- 12 Yurdaydin C, Walsh TJ, Engler HD, Ha JH, Li Y, Jones EA, Basile AS. Gut bacteria provide precursors of benzodiazepine receptor ligands in a rat model of hepatic encephalopathy. *Brain Res* 1995; 679: 42-48
- 13 El-Shenawy SM. Evaluation of some pharmacological activities of ethanol extracts of seeds, pericarp and leaves of *Eugenia Jamolana* in rats. *Inflammopharmacology* 2009; 17: 85-92
- 14 Chung H, Hong DP, Jung JY, Kim HJ, Jang KS, Sheen YY, Ahn JI, Lee YS, Kong G. Comprehensive analysis of differential gene expression profiles on carbon tetrachloride-induced rat liver injury and regeneration. *Toxicol Appl Pharmacol* 2005; 206: 27-42
- 15 Tirkey N, Pilkhwai S, Kuhad A, Chopra K. Hesperidin, a citrus bioflavonoid, decreases the oxidative stress produced by carbon tetrachloride in rat liver and kidney. *BMC Pharmacol* 2005; 5: 2
- 16 Sanmugapriya E, Venkataraman S. Studies on hepatoprotective and antioxidant actions of *Strychnos potatorum* Linn. seeds on CCl₄-induced acute hepatic injury in experimental rats. *J Ethnopharmacol* 2006; 105: 154-160
- 17 Achudume AC, Ogunyemi KE. Effects of the extracts of *Pycanthus angolensis* against chemically induced acute hepatotoxicity. *Pak J Biol Sci* 2007; 10: 3231-3233
- 18 Boer LA, Panatto JP, Fagundes DA, Bassani C, Jeremias IC, Daufenbach JF, Rezin GT, Constantino L, Dal-Pizzol F, Streck EL. Inhibition of mitochondrial respiratory chain in the brain of rats after hepatic failure induced by carbon tetrachloride is reversed by antioxidants. *Brain Res Bull* 2009; 80: 75-78
- 19 Shanmugarajan TS, Sivaraman D, Somasundaram I, Arunsundar M, Krishnakumar E, Balaji R, Ravichandiran V. Influence of alpha lipoic acid on antioxidant status in D-galactosamine-induced hepatic injury. *Toxicol Ind Health* 2008; 24: 635-642
- 20 Taye A, El-Moselhy MA, Hassan MK, Ibrahim HM, Mohammed AF. Hepatoprotective effect of pentoxifylline against D-galactosamine-induced hepatotoxicity in rats. *Ann Hepatol* 2009; 8: 364-370
- 21 Kitazawa T, Tsujimoto T, Kawaratani H, Fukui H. Therapeutic approach to regulate innate immune response by Toll-like receptor 4 antagonist E5564 in rats with D-galactosamine-induced acute severe liver injury. *J Gastroenterol Hepatol* 2009; 24: 1089-1094
- 22 Akashi I, Kagami K, Hirano T, Oka K. Protective effects of coffee-derived compounds on lipopolysaccharide/D-galactosamine induced acute liver injury in rats. *J Pharm Pharmacol* 2009; 61: 473-478
- 23 Wilhelm EA, Jesse CR, Roman SS, Nogueira CW, Savegnago L. Hepatoprotective effect of 3-alkynyl selenophene on acute liver injury induced by D-galactosamine and lipopolysaccharide. *Exp Mol Pathol* 2009; 87: 20-26
- 24 Omar H el-D, Sanders RA, Watkins JB 3rd. Minimal effect of acute experimental hepatitis induced by lipopolysaccharide/D-galactosamine on biotransformation in rats. *Biochem Pharmacol* 1996; 52: 1921-1924
- 25 Tsui TY, Obed A, Siu YT, Yet SF, Prantl L, Schlitt HJ, Fan ST. Carbon monoxide inhalation rescues mice from fulminant hepatitis through improving hepatic energy metabolism. *Shock* 2007; 27: 165-171
- 26 Kitazawa T, Tsujimoto T, Kawaratani H, Fujimoto M, Fukui H. Expression of Toll-like receptor 4 in various organs in rats with D-galactosamine-induced acute hepatic failure. *J Gastroenterol Hepatol* 2008; 23: e494-e498
- 27 Kitazawa T, Tsujimoto T, Kawaratani H, Fukui H. Salvage effect of E5564, Toll-like receptor 4 antagonist on d-galactosamine and lipopolysaccharide-induced acute liver failure in rats. *J Gastroenterol Hepatol* 2010; 25: 1009-1012
- 28 Dixit V, Chang TM. Brain edema and the blood brain barrier in galactosamine-induced fulminant hepatic failure rats. An animal model for evaluation of liver support systems. *ASAIO Trans* 1990; 36: 21-27
- 29 Pramyothin P, Ngamtin C, Pongshompoo S, Chaichantipyuth C. Hepatoprotective activity of *Phyllanthus amarus* Schum. et. Thonn. extract in ethanol treated rats: in vitro and in vivo studies. *J*

■应用要点

肝性脑病动物模型的建立对于发病机制、诊断和治疗的研究发挥着非常重要的作用。通过对不同病因大鼠肝性脑病模型的肝脑损伤机制的阐述,可以更加完善对该病的认识并能指导临床诊断和治疗。本文更为肝性脑病的实验研究提供了重要的参考。

■同行评价

本文全面地分析了各种肝性脑病动物模型的建立方法及现状,为肝性脑病动物实验的开展提供指导。

- Ethnopharmacol 2007; 114: 169-173
- 30 Nencini C, Franchi GG, Cavallo F, Micheli L. Protective effect of *Allium neapolitanum* Cyr. versus *Allium sativum* L. on acute ethanol-induced oxidative stress in rat liver. *J Med Food* 2010; 13: 329-335
- 31 Kharbanda KK, Toder SL, Shubert KA, Sorrell MF, Tuma DJ. Malondialdehyde-acetaldehyde-protein adducts increase secretion of chemokines by rat hepatic stellate cells. *Alcohol* 2001; 25: 123-128
- 32 Shen Z, Ajmo JM, Rogers CQ, Liang X, Le L, Murr MM, Peng Y, You M. Role of SIRT1 in regulation of LPS- or two ethanol metabolites-induced TNF- α production in cultured macrophage cell lines. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2009; 296: G1047-G1053
- 33 Choi JS, Yoon TJ, Kang KR, Lee KH, Kim WH, Suh YH, Song J, Jung MH. Glycoprotein isolated from *Acanthopanax senticosus* protects against hepatotoxicity induced by acute and chronic alcohol treatment. *Biol Pharm Bull* 2006; 29: 306-314
- 34 Harper C, Kril J. An introduction to alcohol-induced brain damage and its causes. *Alcohol Alcohol Suppl* 1994; 2: 237-243
- 35 Cargiulo T. Understanding the health impact of alcohol dependence. *Am J Health Syst Pharm* 2007; 64: S5-S11
- 36 Cover C, Liu J, Farhood A, Malle E, Waalkes MP, Bajt ML, Jaeschke H. Pathophysiological role of the acute inflammatory response during acetaminophen hepatotoxicity. *Toxicol Appl Pharmacol* 2006; 216: 98-107
- 37 Hwang J. Diets with corn oil and/or low protein increase acute acetaminophen hepatotoxicity compared to diets with beef tallow in a rat model. *Nutr Res Pract* 2009; 3: 95-101
- 38 Ajith TA, Hema U, Aswathy MS. Zingiber officinale Roscoe prevents acetaminophen-induced acute hepatotoxicity by enhancing hepatic antioxidant status. *Food Chem Toxicol* 2007; 45: 2267-2272
- 39 Anoush M, Eghbal MA, Fathiazad F, Hamzeiy H, Kouzehkonani NS. The protective effects of garlic extract against acetaminophen-induced oxidative stress and glutathione depletion. *Pak J Biol Sci* 2009; 12: 765-771
- 40 Chen YH, Lin FY, Liu PL, Huang YT, Chiu JH, Chang YC, Man KM, Hong CY, Ho YY, Lai MT. Antioxidative and hepatoprotective effects of magnolol on acetaminophen-induced liver damage in rats. *Arch Pharm Res* 2009; 32: 221-228
- 41 Bémour C, Desjardins P, Butterworth RF. Antioxidant and anti-inflammatory effects of mild hypothermia in the attenuation of liver injury due to azoxymethane toxicity in the mouse. *Metab Brain Dis* 2010; 25: 23-29
- 42 Swain MS, Bergeron M, Audet R, Blei AT, Butterworth RF. Monitoring of neurotransmitter amino acids by means of an indwelling cisterna magna catheter: a comparison of two rodent models of fulminant liver failure. *Hepatology* 1992; 16: 1028-1035
- 43 Zhang B, Inagaki M, Jiang B, Miyakoshi M, Arikura J, Ogawa K, Kasai S. Effects of bone marrow and hepatocyte transplantation on liver injury. *J Surg Res* 2009; 157: 71-80
- 44 Koyama S, Sato Y, Hatakeyama K. The subcutaneous splenic transposition prevents liver injury induced by excessive portal pressure after massive hepatectomy. *Hepatogastroenterology* 2003; 50: 37-42
- 45 Regimbeau JM, Fuks D, Kohnen-Shahri N, Terris B, Soubrane O. Restrictive model of compensated carbon tetrachloride-induced cirrhosis in rats. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 6943-6947
- 46 Grozdanov PN, Yovchev MI, Dabeva MD. The oncofetal protein glypican-3 is a novel marker of hepatic progenitor/oval cells. *Lab Invest* 2006; 86: 1272-1284
- 47 Savilov PN, Iakovlev VN, Maliutin VE. [Glutamine metabolism in the brain and in the liver in critical conditions] *Anesteziol Reanimatol* 2002; 66-70
- 48 Ichikawa K, Gakumazawa M, Inaba A, Shiga K, Takeshita S, Mori M, Kikuchi N. Acute encephalopathy of *Bacillus cereus* mimicking Reye syndrome. *Brain Dev* 2010; 32: 688-690
- 49 Suárez I, Bodega G, Rubio M, Fernández B. Induction of NOS and nitrotyrosine expression in the rat striatum following experimental hepatic encephalopathy. *Metab Brain Dis* 2009; 24: 395-408
- 50 Yang X, Bosoi CR, Jiang W, Tremblay M, Rose CF. Portacaval anastomosis-induced hyperammonemia does not lead to oxidative stress. *Metab Brain Dis* 2010; 25: 11-15
- 51 Dasarathy S, Mullen KD, Dodig M, Donofrio B, McCullough AJ. Inhibition of aromatase improves nutritional status following portacaval anastomosis in male rats. *J Hepatol* 2006; 45: 214-220
- 52 Méndez M, Méndez-López M, López L, Aller MA, Arias J, Arias JL. Associative learning deficit in two experimental models of hepatic encephalopathy. *Behav Brain Res* 2009; 198: 346-351
- 53 Bucher BT, Feng X, Jeyabalan G, Zhang B, Shao L, Guo Z, Geller DA. Glycochenodeoxycholate (GCDC) inhibits cytokine induced iNOS expression in rat hepatocytes. *J Surg Res* 2007; 138: 15-21
- 54 Moazzam FN, Brems JJ, Yong SL, Filkins JP, Fisher SG, Holt DR, Gamelli RL, Ding JW. Endotoxin potentiates hepatocyte apoptosis in cholestasis. *J Am Coll Surg* 2002; 194: 731-739
- 55 Assimakopoulos SF, Konstantinou D, Georgiou C, Chroni E. Metabolism of polyamines and oxidative stress in the brain of cholestatic rats. *Amino Acids* 2010; 38: 973-974
- 56 Otogawa K, Ogawa T, Shiga R, Nakatani K, Ikeda K, Nakajima Y, Kawada N. Attenuation of acute and chronic liver injury in rats by iron-deficient diet. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2008; 294: R311-R320
- 57 Magen I, Avraham Y, Ackerman Z, Vorobiev L, Mechoulam R, Berry EM. Cannabidiol ameliorates cognitive and motor impairments in bile-duct ligated mice via 5-HT1A receptor activation. *Br J Pharmacol* 2010; 159: 950-957
- 58 Cruz A, Túnez I, Martínez R, Muñoz-Castañeda JR, Ramírez LM, Recio M, Ochoa L, Arjona A, Montilla P, Muntané J, Padillo FJ. Melatonin prevents brain oxidative stress induced by obstructive jaundice in rats. *J Neurosci Res* 2007; 85: 3652-3656
- 59 Nie QH, Zhang YF, Xie YM, Luo XD, Shao B, Li J, Zhou YX. Correlation between TIMP-1 expression and liver fibrosis in two rat liver fibrosis models. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 3044-3049
- 60 Lu YY, Wang CP, Zhou L, Chen Y, Su SH, Feng YY, Yang YP. Synthesis of platelet-activating factor and its receptor expression in Kupffer cells in rat carbon tetrachloride-induced cirrhosis. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 764-770
- 61 Peng WH, Tien YC, Huang CY, Huang TH, Liao JC, Kuo CL, Lin YC. *Fraxinus rhynchophylla* ethanol

- extract attenuates carbon tetrachloride-induced liver fibrosis in rats via down-regulating the expressions of uPA, MMP-2, MMP-9 and TIMP-1. *J Ethnopharmacol* 2010; 127: 606-613
- 62 Yeligar SM, Machida K, Tsukamoto H, Kalra VK. Ethanol augments RANTES/CCL5 expression in rat liver sinusoidal endothelial cells and human endothelial cells via activation of NF-kappa B, HIF-1 alpha, and AP-1. *J Immunol* 2009; 183: 5964-5976
- 63 Li TZ, Kim JH, Cho HH, Lee HS, Kim KS, Lee SW, Suh H. Therapeutic potential of bone-marrow-derived mesenchymal stem cells differentiated with growth-factor-free coculture method in liver-injured rats. *Tissue Eng Part A* 2010; 16: 2649-2659
- 64 Assunção M, Santos-Marques MJ, Monteiro R, Azevedo I, Andrade JP, Carvalho F, Martins MJ. Red wine protects against ethanol-induced oxidative stress in rat liver. *J Agric Food Chem* 2009; 57: 6066-6073
- 65 Proot S, Biourge V, Teske E, Rothuizen J. Soy protein isolate versus meat-based low-protein diet for dogs with congenital portosystemic shunts. *J Vet Intern Med* 2009; 23: 794-800
- 66 Windsor RC, Olby NJ. Congenital portosystemic shunts in five mature dogs with neurological signs. *J Am Anim Hosp Assoc* 2007; 43: 322-331
- 67 Kanai H, Marushima H, Kimura N, Iwaki T, Saito M, Maehashi H, Shimizu K, Muto M, Masaki T, Ohkawa K, Yokoyama K, Nakayama M, Harada T, Hano H, Hataba Y, Fukuda T, Nakamura M, Totsuka N, Ishikawa S, Unemura Y, Ishii Y, Yanaga K, Matsuura T. Extracorporeal bioartificial liver using the radial-flow bioreactor in treatment of fatal experimental hepatic encephalopathy. *Artif Organs* 2007; 31: 148-151
- 68 Ytrebø LM, Sen S, Rose C, Ten Have GA, Davies NA, Hodges S, Nedredal GI, Romero-Gomez M, Williams R, Revhaug A, Jalan R, Deutz NE. Interorgan ammonia, glutamate, and glutamine trafficking in pigs with acute liver failure. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2006; 291: G373-G381
- 69 Tuñón MJ, Alvarez M, Culebras JM, González-Gallego J. An overview of animal models for investigating the pathogenesis and therapeutic strategies in acute hepatic failure. *World J Gastroenterol* 2009; 15: 3086-3098
- 70 Ahboucha S, Butterworth RF. Pathophysiology of hepatic encephalopathy: a new look at GABA from the molecular standpoint. *Metab Brain Dis* 2004; 19: 331-343

编辑 曹丽鸥 电编 何基才

ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) CN 14-1260/R 2010年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

WJC, WJGE, WJGO, WJGS, WJH, WJR 6 本期刊 被 PMC 收录

本刊讯 我们于2010-08-17收到PubMed Central(PMC)的通知, 经过美国国立医学图书馆机构咨询委员会The Literature Selection Technical Review Committee评定, 决定*WJC, WJGE, WJGO, WJGS, WJH, WJR* 6本期刊被PMC收录. PMC是一个提供生命科学期刊文献的全文数据库, 他是由隶属美国国立医学图书馆(National Library of Medicine)的国家生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information)所创建与管理的. (常务副总编辑: 张海宁 2010-08-17)

梗阻性黄疸肝再生受损机制的研究进展

曹阳, 戴朝六, 徐锋

■背景资料

近些年来, 肝大部分切除术已经广泛应用于进展期肝细胞癌和胆管细胞癌的治疗过程中。然而, 梗阻性黄疸患者肝大部分切除术后往往出现肝衰竭等并发症, 这表明梗阻性黄疸可以影响肝再生并导致肝大部分切除术后肝衰竭。明确梗阻性黄疸肝再生受损机制有助于改善梗阻性黄疸患者术后肝再生, 对提高手术的安全性及降低术后严重并发症的发生有着重要的意义。

■同行评议者

于聪慧, 教授, 中国人民解放军北京军区总医院肝胆外科

曹阳, 戴朝六, 徐锋, 中国医科大学附属盛京医院肝胆脾外科 辽宁省沈阳市 110004

作者贡献分布: 本文综述由曹阳完成; 戴朝六与徐锋审核。

通讯作者: 戴朝六, 教授, 110004, 辽宁省沈阳市和平区三好街36号, 中国医科大学附属盛京医院肝胆脾外科。daicl-sy@tom.com

收稿日期: 2010-08-08 修回日期: 2010-09-12

接受日期: 2010-09-13 在线出版日期: 2010-10-28

Advances in understanding the mechanisms of impaired hepatic regeneration in patients with obstructive jaundice

Yang Cao, Chao-Liu Dai, Feng Xu

Yang Cao, Chao-Liu Dai, Feng Xu, Department of Hepatobiliary & Splenic Surgery, Shengjing Hospital, China Medical University, Shenyang 110004, Liaoning Province, China

Correspondence to: Professor Chao-Liu Dai, Department of Hepatobiliary & Splenic Surgery, Shengjing Hospital, China Medical University, 36 Sanhao Avenue, Heping District, Shenyang 110004, Liaoning Province, China. daicl-sy@tom.com

Received: 2010-08-08 Revised: 2010-09-12

Accepted: 2010-09-13 Published online: 2010-10-28

Abstract

The regenerative capacity of the liver is extraordinary. However, it has been observed preoperatively in some patients, such as those with hilar cholangiocarcinoma, that obstructive jaundice may affect hepatocyte proliferation and even cause hepatic failure after hepatectomy. The extent of impaired hepatic regeneration caused by biliary obstruction may determine whether surgical treatment should be conducted. Nowadays, the mechanisms of impaired hepatic regeneration in patients with obstructive jaundice have been studied extensively. The possible mechanisms include restricted portal venous flow, increased hepatocyte apoptosis, and altered expression of liver regeneration-associated factors. Thus, regulation of these factors might have beneficial effects on liver regeneration after hepatectomy in patients with obstructive jaundice.

Key Words: Obstructive jaundice; Liver regeneration; Apoptosis

tion; Apoptosis

Cao Y, Dai CL, Xu F. Advances in understanding the mechanisms of impaired hepatic regeneration in patients with obstructive jaundice. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(30): 3210-3214

摘要

肝脏具有惊人的再生能力。然而, 部分肝门胆管癌患者术前所出现的梗阻性黄疸将会影响到术后的肝再生, 甚至引起肝衰竭。从某种意义上而言, 梗阻性黄疸患者肝再生的受损程度将决定着是否可以进行外科手术治疗。目前, 研究者对梗阻性黄疸肝再生受损机制已经进行了大量的研究。研究结果表明, 肝再生受损机制主要包括: (1)门静脉血流量减少; (2)肝细胞凋亡率增加; (3)肝再生相关因子表达的变化。因此, 调节上述因素将有可能改善梗阻性黄疸患者术后的肝再生。

关键词: 梗阻性黄疸; 肝再生; 凋亡

曹阳, 戴朝六, 徐锋. 梗阻性黄疸肝再生受损机制的研究进展. *世界华人消化杂志* 2010; 18(30): 3210-3214

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/3210.asp>

0 引言

近些年来, 肝大部分切除术已经广泛应用于进展期肝细胞癌和胆管细胞癌的治疗过程中。然而, 梗阻性黄疸患者肝大部分切除术后往往出现肝衰竭等并发症, 这表明梗阻性黄疸有可能影响肝再生并导致肝大部分切除术后肝衰竭^[1,2]。Yokoyama等^[3]的研究表明肝外胆汁淤积抑制肝部分切除后的肝再生。目前, 国内外研究者已经对梗阻性黄疸术后肝再生相关因子表达、门静脉血流量及肝细胞凋亡等方面展开了一系列研究, 但梗阻性黄疸肝再生受损的具体作用机制尚不清楚。因此, 本文对最近几年梗阻性黄疸肝再生受损机制的研究进展综述如下。

1 门静脉血流量

梗阻性黄疸时肝脏有效供血不足与肝脏血流动

力学改变有关。胆管发生梗阻时肝内胆管扩张压迫门静脉分支,使门静脉血流减少,同时门静脉下腔静脉侧支分流,使门静脉血流进一步减少,肝组织受压小叶内血流淤滞,导致全肝血流减少,肝组织血流障碍^[4]。Kanda等^[5]用实时超声流量计检测胆总管结扎犬发现,胆道梗阻后肝动脉血流迅速增加,门静脉血流明显减少,而肝总血流量只在胆道梗阻后的最初2 h内增加,此后逐渐减少。在门静脉血流减少的同时,肝脏的微循环亦发生障碍。在内毒素产生的早期,肝脏的循环灌注量显著减少,这可能与血管收缩物质释放致使肝脏血流阻力增加有关。后期,胆道梗阻加重了肝脏微血管对内毒素的炎症反应^[6]。

2 细胞凋亡率

梗阻性黄疸时肝内胆盐蓄积,诱发肝细胞和胆管细胞凋亡,过多的细胞凋亡又造成抗凋亡异常,这种凋亡与抗凋亡的失衡是梗阻性黄疸肝再生受抑制的又一因素。肝内毒性胆盐通过Fas依赖机制诱导肝细胞的凋亡。另外,肝内自然杀伤细胞中的Toll样受体2(Toll-like receptor 2, TLR2)和Fas配体表达增加也与肝细胞凋亡相关^[7]。有研究表明,胆盐中的甘氨酸鹅脱氧胆酸钠(glycochenodeoxycholic acid, GCDC)通过蛋白激酶C介导肝细胞凋亡,随着GCDC浓度增高,细胞凋亡率明显增加^[8,9]。上述结果表明,梗阻性黄疸可以启动肝细胞的凋亡程序。正常肝细胞增殖过程中肝细胞通过核因子 κ B(nuclear factor kappa-B, NF- κ B)、Bcl-2家族、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白介素-6(interleukin-6, IL-6)的抗凋亡效应能有效减少细胞凋亡。胆管梗阻大鼠行肝部分切除术后胆管内和正常肝细胞周围均可观察到凋亡细胞,而这在正常大鼠肝脏很少发生。此外,肝部分切除后出现的DNA片段寡核苷酸酶和caspase3活性的增加在胆管梗阻大鼠也较正常大鼠明显^[10]。Kurosawa等^[11]用胆总管结扎大鼠作为梗阻性黄疸模型,研究了Bcl-2在胆汁酸盐诱导的肝细胞凋亡中的作用,结果在此模型的肝细胞上观察到了正常情况下的肝细胞不表达的Bcl-2受体。提示这可能是抵抗毒性胆汁酸盐诱导的凋亡机制。王剑明等^[12]研究表明,Bcl-2和Bax蛋白均参与了梗阻性黄疸肝细胞凋亡的调节。

3 肝再生相关因子的表达变化

肝再生过程中一些生长因子可以促进或抑制肝

细胞增殖,在肝再生调节机制中起着重要的作用。表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF),转化生长因子 α (transforming growth factor- α , TGF- α),肝细胞生长因子(hepatocyte growth factor, HGF)等生长因子在体内、体外实验中均可以促进肝细胞合成DNA,而其中HGF被公认为最强烈的促肝细胞增殖因子。HGF主要由肝内非实质细胞中的肝星形细胞(hepatic stellate cell, HSC)产生,并通过其受体c-met以旁分泌的方式作用于肝细胞^[13-15]。TGF- β 1是一种强烈的肝细胞增殖抑制因子,正常肝脏中其mRNA表达量很低甚至不能被测出,但在肝部分切除术后其表达量明显增加^[16]。从正常肝再生的肝脏中进行细胞分离培养发现:TGF- β 1 mRNA主要由肝窦内皮细胞、库普弗细胞(kupffer cell, KC)、HSC表达^[17,18]。HSC是分布在肝窦Disse间隙内的非实质细胞,正常条件下处于静止状态,表达为结蛋白(desmin),一旦被活化后转化为肌成纤维样细胞,则表达为 α -平滑肌肌动蛋白(alpha-smooth muscle actin, α -SMA)。而且,活化的HSC会合成大量的TGF- β 1,而新合成的TGF- β 1会进一步促进活化的HSC产生更多的TGF- β 1,形成逐级放大效应,从而导致TGF- β 1大量生成和激活^[19]。虽然HGF主要由处于静止状态下的HSC合成,但HSC一旦被活化后将失去合成HGF的能力^[20]。梗阻性黄疸影响了一些肝再生相关因子的表达,从而抑制肝再生,这在许多研究中已被证实。梗阻性黄疸早期,肝部分切除后IL-6表达水平与正常对照组相比明显减弱^[21]。Bissig等^[22]发现,梗阻性黄疸也抑制了肝内血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)的表达,肝部分切除后其表达水平也未见明显增高。Zhao等^[23]认为,梗阻性黄疸抑制CCAAT增强子结合蛋白 α 和 β 的表达和激活,进而抑制细胞周期蛋白E的表达。Makino等认为,梗阻性黄疸引起HSC的增殖活化,使其通过自分泌及旁分泌作用方式使肝再生抑制因子如TGF- β 1大量表达,而同时也引起促肝再生因子如HGF及VEGF表达量明显降低,从而抑制了肝部分切除术后或肝门静脉分支结扎术后的肝再生^[24,25]。促肝再生因子表达的减弱和肝再生抑制因子表达的增强是梗阻性黄疸肝再生受抑制的直接表现。Deneme等^[26]实验表明:梗阻性黄疸大鼠行肝部分切除术同时给予抗TGF- β 1单克隆抗体可降低血清中TGF- β 1的含量,并从形态上和功能上促进了肝部分切除术后的肝再生。Makino等^[24]研究表明,随着黄疸

■研发前沿

改善梗阻性黄疸肝再生已日益成为肝胆外科研究领域亟待解决的问题之一。目前,国内外研究者对梗阻性黄疸术后肝再生相关因子表达、门静脉血流量及肝细胞凋亡等方面展开了大量的研究。

■相关报道

Deneme等实验表明:梗阻性黄疸引起的TGF- β 1高表达抑制了肝部分切除术后的肝再生,行肝部分切除术的同时给予抗TGF- β 1单克隆抗体可以降低血清中TGF- β 1的含量,并从形态上和功能上促进了肝部分切除术后的肝再生。

■应用要点

本文从梗阻性黄疸术后肝再生相关因子表达、门静脉血流量及肝细胞凋亡等方面,多角度地向读者介绍了梗阻性黄疸肝再生受损机制的研究进展,为改善梗阻性黄疸患者术后肝再生提供了一定的理论基础和临床参考价值。

时间延长TGF- β 1 mRNA的表达量逐渐增加,而且TGF- β 1 mRNA主要由HSC表达。同时,desmin染色阳性的HSC和 α -SMA染色阳性的HSC在门静脉区域表达也随着黄疸时间的延续而逐渐增加。Makino等认为,梗阻性黄疸大鼠肝部分切除术后或门静脉分支结扎术后HSC大量增殖活化,而且活化的HSC在梗阻性黄疸肝再生中TGF- β 1 mRNA的表达量升高和HGF mRNA表达量降低调节机制中起着重要的作用^[24,25]。因此,通过调节HSC的增殖活化或改变肝再生调节因子的表达将会改善梗阻性黄疸肝部分切除术后或门静脉分支结扎术后的肝再生。

4 梗阻性黄疸HSC激活途径及治疗策略

梗阻性黄疸时胆汁的肝肠循环量减少,胆汁对肠内细菌的抑制作用减弱,同时分泌型IgA减少,使得肠内细菌过度繁殖,内毒素释放增多。在肠道内毒素产生增加的同时,肠道黏膜上皮细胞间的紧密连接构成的机械屏障亦受到损害。这些病变进一步造成肠道生物屏障、机械屏障受损,肠道化学、免疫屏障功能下降,导致内毒素吸收增加^[27,28]。此外,肝脏网状内皮系统和全身免疫功能亦受损,不能有效清除血中的细菌和内毒素,从而使内毒素血症(endotoxemia, ETM)持续存在^[29,30]。因此,梗阻性黄疸发生的同时往往并发ETM。ETM发生后脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)通过TLR4/LPS信号途径激活HSC。LPS在TLR4和髓样分化因子88(myeloid differentiation factor 88, Myd88)调节下进行信号传导,使活化的HSC内的NF- κ B激活进而增加趋化因子和黏附分子的表达量^[31,32]。HSC激活过程中NF- κ B表达水平上调,介导大量细胞因子的转录如TGF- β 1、TNF- α 和IL-6等。用阻断剂阻断NF- κ B信号途径可以阻断上述细胞因子的表达,从而减轻肝脏的损伤。上述结果提示NF- κ B激活后各种细胞因子表达分泌的增加是诱导肝脏损伤的关键因子^[33]。HSC活化后细胞表面将会表达CD40受体,一些表达CD40配体的免疫细胞可以激活HSC的CD40信号途径进而激活NF- κ B^[34]。KC条件培养基内的KC可以释放一些细胞因子,刺激HSC活化。而LPS可以进一步刺激KC合成该类细胞因子,进而增强KC条件培养基对HSC活化的作用。同时,也发现抗TGF- β 1单克隆抗体可以减弱但并不能完全消除LPS上述的促进作用。这表明LPS可以促进KC合成TGF- β 1和一些其他的细胞因子进而促进HSC活化^[35]。

而IL-10可以抑制KC诱导的HSC增殖活化,并呈剂量依赖性抑制^[36]。在IL-10对肝纤维化大鼠TGF- β 1及相应受体表达影响的实验中发现:外源性IL-10可以抑制肝组织中TGF- β 1及相应受体的表达^[37]。此外,外源性IL-10还可以抑制体外培养活化的HSC表达TGF- β 1和碱性成纤维生长因子的mRNA及促进HSC的凋亡^[38-41]。上述研究结果表明:IL-10可以通过抑制NF- κ B表达进而减少TGF- β 1等细胞因子的表达。目前研究表明:IL-10至少通过两条途径抑制NF- κ B的活性:(1)通过抑制I κ B激酶的活性,阻断NF- κ B与其抑制蛋白I κ B的解离;(2)抑制NF- κ B与DNA转录调控区的结合,从而抑制相应炎症因子的转录^[42]。

Louis等^[43]利用基因敲除技术证明内源性IL-10的抗炎作用,并发现内源性IL-10的抗炎机制可能在于降低炎症介质TNF- α 的表达,但同时,也发现IL-10具有抑制肝细胞增殖的作用。林美屏等^[44]在IL-10对大鼠原代肝细胞增殖影响的研究中发现:大鼠原代肝细胞表达IL-10/IL-10R mRNA, IL-10抑制大鼠原代肝细胞增殖。然而,Dinant等^[45]从组织学水平上对IL-10进行研究,却发现IL-10可以促进缺血再灌注损伤后大鼠的肝再生。从上述研究结果,我们可以看出:IL-10抑制HSC活化、肝再生抑制因子TGF- β 1的表达的同时也抑制了肝再生重要的启动因子TNF- α 和IL-6的表达。因此,将有待于进一步综合评价IL-10对梗阻性黄疸肝再生的作用。

5 结论

梗阻性黄疸肝再生受抑制影响因素繁多,涉及许多细胞因子,相互作用非常复杂,其精确机制尚未完全认识。梗阻性黄疸肝再生的受损使部分患者失去手术治疗机会。明确梗阻性黄疸肝再生受损机制,有助于寻找纠正这种损伤的对策,对提高手术的安全性及降低术后严重并发症的发生有着重要意义,这将成为今后研究的重点。

6 参考文献

- 1 Chen XP, Lau WY, Huang ZY, Zhang ZW, Chen YF, Zhang WG, Qiu FZ. Extent of liver resection for hilar cholangiocarcinoma. *Br J Surg* 2009; 96: 1167-1175
- 2 Sano T, Shimada K, Sakamoto Y, Esaki M, Kosuge T. Changing trends in surgical outcomes after major hepatobiliary resection for hilar cholangiocarcinoma: a single-center experience over 25 years. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 2007; 14: 455-462
- 3 Yokoyama Y, Nagino M, Nimura Y. Mechanism of

- impaired hepatic regeneration in cholestatic liver. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 2007; 14: 159-166
- 4 Kusaka K, Imamura H, Tomiya T, Makuuchi M. Factors affecting liver regeneration after right portal vein embolization. *Hepatogastroenterology* 2004; 51: 532-535
 - 5 Kanda H, Nimura Y, Yasui A, Uematsu T, Kamiya S, Machiki Y, Kitagawa Y, Shionoya S. Hepatic blood flow after acute biliary obstruction and drainage in conscious dogs. *Hepatogastroenterology* 1996; 43: 235-240
 - 6 Ito Y, Machen NW, Urbaschek R, McCuskey RS. Biliary obstruction exacerbates the hepatic microvascular inflammatory response to endotoxin. *Shock* 2000; 14: 599-604
 - 7 Ogawa A, Tagawa T, Nishimura H, Yajima T, Abe T, Arai T, Taniguchi M, Takeda K, Akira S, Nimura Y, Yoshikai Y. Toll-like receptors 2 and 4 are differentially involved in Fas dependent apoptosis in Peyer's patch and the liver at an early stage after bile duct ligation in mice. *Gut* 2006; 55: 105-113
 - 8 Wang JM, Wang H, Xu LN, Zou SQ. Hepatic injury in rats with obstructive jaundice: roles of the protein kinase C signal pathway and cytoprotection of fructose. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2005; 4: 577-581
 - 9 Gonzalez B, Fisher C, Rosser BG. Glycochenodeoxycholic acid (GCDCA) induced hepatocyte apoptosis is associated with early modulation of intracellular PKC activity. *Mol Cell Biochem* 2000; 207: 19-27
 - 10 Wang DS, Dou KF, Li KZ, Gao ZQ, Song ZS, Liu ZC. Hepatocellular apoptosis after hepatectomy in obstructive jaundice in rats. *World J Gastroenterol* 2003; 9: 2737-2741
 - 11 Kurosawa H, Que FG, Roberts LR, Fesmier PJ, Gores GJ. Hepatocytes in the bile duct-ligated rat express Bcl-2. *Am J Physiol* 1997; 272: G1587-G1593
 - 12 王剑明, 孙宏武, 邹倩, 邹声泉. 阻塞性黄疸大鼠肝组织细胞凋亡及相关基因bcl-2、bax的表达. *中华实验外科杂志* 2000; 17: 32-33
 - 13 Reinehr R, Häussinger D. Epidermal growth factor receptor signaling in liver cell proliferation and apoptosis. *Biol Chem* 2009; 390: 1033-1037
 - 14 Sowa JP, Best J, Benko T, Bockhorn M, Gu Y, Niehues EM, Bucci A, Benedetto-Castro EM, Gerken G, Rauen U, Schlaak JF. Extent of liver resection modulates the activation of transcription factors and the production of cytokines involved in liver regeneration. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 7093-7100
 - 15 Paranjpe S, Bowen WC, Bell AW, Nejak-Bowen K, Luo JH, Michalopoulos GK. Cell cycle effects resulting from inhibition of hepatocyte growth factor and its receptor c-Met in regenerating rat livers by RNA interference. *Hepatology* 2007; 45: 1471-1477
 - 16 Romero-Gallo J, Sozmen EG, Chytil A, Russell WE, Whitehead R, Parks WT, Holdren MS, Her MF, Gautam S, Magnuson M, Moses HL, Grady WM. Inactivation of TGF-beta signaling in hepatocytes results in an increased proliferative response after partial hepatectomy. *Oncogene* 2005; 24: 3028-3041
 - 17 Mohammed FF, Khokha R. Thinking outside the cell: proteases regulate hepatocyte division. *Trends Cell Biol* 2005; 15: 555-563
 - 18 Nguyen LN, Furuya MH, Wolfrain LA, Nguyen AP, Holdren MS, Campbell JS, Knight B, Yeoh GC, Fausto N, Parks WT. Transforming growth factor-beta differentially regulates oval cell and hepatocyte proliferation. *Hepatology* 2007; 45: 31-41
 - 19 De Minicis S, Seki E, Uchinami H, Kluwe J, Zhang Y, Brenner DA, Schwabe RF. Gene expression profiles during hepatic stellate cell activation in culture and in vivo. *Gastroenterology* 2007; 132: 1937-1946
 - 20 Schirmacher P, Geerts A, Pietrangelo A, Dienes HP, Rogler CE. Hepatocyte growth factor/hepatopoi-
etin A is expressed in fat-storing cells from rat liver but not myofibroblast-like cells derived from fat-storing cells. *Hepatology* 1992; 15: 5-11
 - 21 Fujiwara Y, Shimada M, Yamashita Y, Adachi E, Shirabe K, Takenaka K, Sugimachi K. Cytokine characteristics of jaundice in mouse liver. *Cytokine* 2001; 13: 188-191
 - 22 Bissig KD, Marti U, Solioz M, Forestier M, Zimmermann H, Lüthi M, Reichen J. Epidermal growth factor is decreased in liver of rats with biliary cirrhosis but does not act as paracrine growth factor immediately after hepatectomy. *J Hepatol* 2000; 33: 275-281
 - 23 Zhao G, Nakano K, Chijiwa K, Ueda J, Tanaka M. Inhibited activities in CCAAT/enhancer-binding protein, activating protein-1 and cyclins after hepatectomy in rats with thioacetamide-induced liver cirrhosis. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 292: 474-481
 - 24 Makino H, Shimizu H, Ito H, Kimura F, Ambiru S, Togawa A, Ohtsuka M, Yoshidome H, Kato A, Yoshitomi H, Sawada S, Miyazaki M. Changes in growth factor and cytokine expression in biliary obstructed rat liver and their relationship with delayed liver regeneration after partial hepatectomy. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 2053-2059
 - 25 Yamano T, Hirai R, Hato S, Uemura T, Shimizu N. Delayed liver regeneration with negative regulation of hepatocyte growth factor and positive regulation of transforming growth factor-beta1 mRNA after portal branch ligation in biliary obstructed rats. *Surgery* 2002; 131: 163-171
 - 26 Deneme MA, Ok E, Akcan A, Akyildiz H, Soyuer I, Muhtaroglu S. Single dose of anti-transforming growth factor-beta1 monoclonal antibody enhances liver regeneration after partial hepatectomy in biliary-obstructed rats. *J Surg Res* 2006; 136: 280-287
 - 27 Ogata Y, Nishi M, Nakayama H, Kuwahara T, Ohnishi Y, Tashiro S. Role of bile in intestinal barrier function and its inhibitory effect on bacterial translocation in obstructive jaundice in rats. *J Surg Res* 2003; 115: 18-23
 - 28 毛晓光, 杨志伟, 李建国, 丛玉萍, 佟忠山, 孙海英, 李秀荣. 人重组生长激素对梗阻性黄疸大鼠肠源性细菌/内毒素移位的影响. *中华肝胆外科杂志* 2005; 11: 407-410
 - 29 Bleier JI, Katz SC, Chaudhry UI, Pillarisetty VG, Kingham TP 3rd, Shah AB, Raab JR, DeMatteo RP. Biliary obstruction selectively expands and activates liver myeloid dendritic cells. *J Immunol* 2006; 176: 7189-7195
 - 30 胡国潢, 汤恢煥, 吕新生. 梗阻性黄疸病人内毒素血症及其对机体免疫功能的影响. *中华实验外科杂志* 1998; 15: 513
 - 31 Seki E, De Minicis S, Osterreicher CH, Kluwe J, Osawa Y, Brenner DA, Schwabe RF. TLR4 enhances TGF-beta signaling and hepatic fibrosis. *Nat Med* 2007; 13: 1324-1332
 - 32 Paik YH, Schwabe RF, Bataller R, Russo MP, Jobin C, Brenner DA. Toll-like receptor 4 mediates inflammatory signaling by bacterial lipopolysaccharide

■同行评价

本文观点新颖, 数据可靠, 结论明确, 有较好的临床和科研的实用价值。

- in human hepatic stellate cells. *Hepatology* 2003; 37: 1043-1055
- 33 Thirunavukkarasu C, Watkins SC, Gandhi CR. Mechanisms of endotoxin-induced NO, IL-6, and TNF- α production in activated rat hepatic stellate cells: role of p38 MAPK. *Hepatology* 2006; 44: 389-398
- 34 Schwabe RF, Schnabl B, Kweon YO, Brenner DA. CD40 activates NF-kappa B and c-Jun N-terminal kinase and enhances chemokine secretion on activated human hepatic stellate cells. *J Immunol* 2001; 166: 6812-6819
- 35 Zhang X, Yu WP, Gao L, Wei KB, Ju JL, Xu JZ. Effects of lipopolysaccharides stimulated Kupffer cells on activation of rat hepatic stellate cells. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 610-613
- 36 翁山耕, 冷希圣, 魏玉华, 彭吉润, 张佑彬, 吕建锋, 杜如昱. 白细胞介素10抑制枯否细胞诱导的肝星状细胞激活的研究. *中华医学杂志* 2002; 82: 104-107
- 37 黄月红, 张莉娟, 郑伟达, 史美娜, 陈治新, 王小众. 白细胞介素10对肝纤维化大鼠转化生长因子 β 1及受体的影响. *福建医科大学学报* 2005; 39: 277-280
- 38 Wang XZ, Zhang SJ, Chen YX, Chen ZX, Huang YH, Zhang LJ. Effects of platelet-derived growth factor and interleukin-10 on Fas/Fas-ligand and Bcl-2/Bax mRNA expression in rat hepatic stellate cells in vitro. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 2706-2710
- 39 Zhang LJ, Yu JP, Li D, Huang YH, Chen ZX, Wang XZ. Effects of cytokines on carbon tetrachloride-induced hepatic fibrogenesis in rats. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 77-81
- 40 陈运新, 王小众, 翁山耕, 陈治新, 黄月红, 张莉娟. 白细胞介素-10血小板衍生生长因子对肝星状细胞表达转化生长因子- β 1的影响. *中西医结合肝病杂志* 2002; 12: 343-345
- 41 黄月红, 王小众, 陈运新, 陈治新, 张莉娟. 白细胞介素-10、血小板衍生生长因子-BB对肝星状细胞表达表皮生长因子和碱性成纤维细胞生长因子的影响. *中华肝脏病杂志* 2004; 12: 562-563
- 42 Schottelius AJ, Mayo MW, Sartor RB, Baldwin AS Jr. Interleukin-10 signaling blocks inhibitor of kappaB kinase activity and nuclear factor kappaB DNA binding. *J Biol Chem* 1999; 274: 31868-31874
- 43 Louis H, Van Laethem JL, Wu W, Quertinmont E, Degraef C, Van den Berg K, Demols A, Goldman M, Le Moine O, Geerts A, Devière J. Interleukin-10 controls neutrophilic infiltration, hepatocyte proliferation, and liver fibrosis induced by carbon tetrachloride in mice. *Hepatology* 1998; 28: 1607-1615
- 44 林羨屏, 黄月红, 郑伟达, 陈运新, 陈治新, 王小众. IL-10对大鼠原代肝细胞增殖的影响. *细胞与分子免疫学杂志* 2008; 24: 1150-1154
- 45 Dinant S, Veteläinen RL, Florquin S, van Vliet AK, van Gulik TM. IL-10 attenuates hepatic I/R injury and promotes hepatocyte proliferation. *J Surg Res* 2007; 141: 176-182

编辑 李薇 电编 何基才

ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) CN 14-1260/R 2010年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

WJG 成功通过评审被 PMC 收录

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

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

DPP-4抑制剂与炎症性肠病

靳迺诗, 董志, 傅洁民, 曾凡新

靳迺诗, 董志, 重庆医科大学药学院药理教研室 重庆市 400016

傅洁民, 曾凡新, 重庆医药工业研究院 重庆市 400061

作者贡献分布: 靳迺诗综述; 傅洁民、曾凡新及董志审校。

通讯作者: 董志, 教授, 400016, 重庆市, 重庆医科大学药理学教研室. zhidong073@hotmail.com

收稿日期: 2010-07-25 修回日期: 2010-09-19

接受日期: 2010-09-27 在线出版日期: 2010-10-28

DPP-4 inhibitors and inflammatory bowel disease

Nai-Shi Jin, Zhi Dong, Jie-Min Fu, Fan-Xin Zeng

Nai-Shi Jin, Zhi Dong, Department of Pharmacology, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China
Jie-Min Fu, Fan-Xin Zeng, Chongqing Pharmaceutical Research Institute, Chongqing 400061, China

Correspondence to: Professor Zhi Dong, Department of Pharmacology, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China. zhidong073@hotmail.com

Received: 2010-07-25 Revised: 2010-09-19

Accepted: 2010-09-27 Published online: 2010-10-28

Abstract

Inflammatory bowel disease (IBD) is a chronic, debilitating disease associated with severe damage to the intestinal mucosa whose etiology is still unknown. The two most common forms of IBD are ulcerative colitis (UC) and Crohn's disease (CD). DPP-4 inhibitors are a new class of agents developed for treatment of diabetes. However, recent studies have indicated that DPP-4 inhibitors have therapeutic effects against IBD in animal models. This may provide a new avenue to cure IBD.

Key Words: dipeptidyl peptidase-4 inhibitor; Inflammatory bowel disease; Glucagon-like peptide-2

Jin NS, Dong Z, Fu JM, Zeng FX. DPP-4 inhibitors and inflammatory bowel disease. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(30): 3215-3219

摘要

炎症性肠病(inflammatory bowel disease, IBD)是一种病因未明的慢性非特异性肠道炎症性疾病, 包括溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)和克罗恩病(Crohn's disease, CD)。DPP-4

抑制剂是近年来发现的一种治疗糖尿病的新靶点药物, 而最近有研究表明, DPP-4抑制剂对动物肠炎模型有一定的治疗作用, 这可能为炎症性肠炎的治疗开辟新的治疗途径。

关键词: 二肽基肽酶-4抑制剂; 炎症性肠病; 胰高血糖素样肽-2

靳迺诗, 董志, 傅洁民, 曾凡新. DPP-4抑制剂与炎症性肠病. 世界华人消化杂志 2010; 18(30): 3215-3219

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/3215.asp>

■背景资料

随着遗传、免疫学、细胞分子生物学方面的重大进展, 生物制剂和各种生长激素等对肠黏膜的修复和益生菌的应用, 使炎症性肠病的治疗发生了重大变化, 但还不很理想。DPP-4有望成为炎症性肠病治疗的潜在选择性药物。

0 引言

炎症性肠病(inflammatory bowel disease, IBD)是一种病因未明的慢性非特异性肠道炎症性疾病, 包括溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)和克罗恩病(Crohn's disease, CD), UC以局限于结肠的弥漫性黏膜炎症为特征, CD以斑片状、透壁性炎症为特征, 并可累及消化系的任何部位。该病的发病率及患病率在全球均报道有继续升高的趋势。近年来研究发现, 胰高血糖素样肽-2(glucagon-like peptide-2, GLP-2)具有促进肠黏膜增长, 抑制炎性介质表达的作用, 而二肽基肽酶-4(dipeptidyl peptidase-4, DPP-4)抑制剂能够通过抑制DPP-4而达到降低GLP-2降解失活的作用, 这为IBD的治疗开辟新的途径。本文就DPP-4抑制剂在IBD治疗中的作用及研究进展作一综述。

1 药物治疗IBD的研究现状

近年来对IBD的研究很多, 在其发病机制及其治疗上也取得了重大的进展。迄今为止, 虽然IBD的特异性致病因素尚不明确, 但大量临床研究和动物实验表明^[1,2], 在遗传易感性的个体中, 免疫系统异常是造成炎症和组织损伤的内在因素。而对IBD的治疗, 目前着眼于控制炎症和调节免疫紊乱, 以有效控制疾病发作和维持缓解。对传统治疗IBD的3大类药物(水杨酸类, 类固醇激素类, 免疫抑制剂)的研究取得了很大的发展, 他们目前仍是治疗IBD最常用的药物。随着IBD发病

■同行评议者

潘秀珍, 教授, 福建省立医院消化内科

■相关报道

Geier等的研究表明, DSS诱导的正常小鼠和DPP-4基因敲除小鼠在肠炎的发生和发展中没有区别, 但DPP-4抑制剂能够减轻DSS诱导的正常小鼠肠炎的症状。

机制的深入研究, 特别是遗传, 免疫学, 细胞分子生物学方面的重大进展, 使IBD的治疗发生了重大的变化, 许多治疗IBD的新型药物如生物制剂开始应用于临床。

在IBD的发病过程中, 对肠道菌群的作用研究中发现了益生菌和益生元这种新的治疗IBD的方法^[3], 益生菌是指在消化过程中对身体有益的活的微生物, 由于其能够恢复肠道健康, 目前已经将其作为治疗IBD的新药物^[3,4]。IBD的生物疗法包括许多以细胞和基因为治疗基础的抗体^[5], 其中就包括目前使用最为广泛的生物疗法: 鼠/人嵌合单克隆抗体的抗肿瘤坏死因子^[6]。最近, 全人化的单克隆抗体抗肿瘤坏死因子已经发展用于英夫利昔单抗的选择^[7]。初步研究表明其对阿达木单抗具有临床作用, 然而, 这个生物制剂对人体长远的影响还有待进一步研究。

重组肽包括生长激素[如人类生长激素(human growth hormone, HGH)], 生长因子[如角质细胞生长因子(keratinocyte growth factor, KGF), 胰岛素样生长因子(insulin-like growth factor, IGF)], 由于其具有促进肠道细胞生长, 对肠黏膜有修复作用, 可能会在IBD的治疗中发挥重要作用^[5,8]。GLP-2对胃肠道细胞具有修复作用, 成为IBD治疗的潜在选择性药物。

2 DPP-4家族

DPP-4与DPP-8, DPP-9和成纤维细胞激活蛋白(fibroblast activation protein, FAP)同属于S9b丝氨酸蛋白酶的家族成员, 此家族成员具有罕见的底物特异性, 能够裂解来自于包括排在倒数第2位置的调节因子脯氨酸或丙氨酸的N端肽, 而DPP-4是这其中研究最为广泛的成员, DPP-4无所不在地表达跨膜糖蛋白, 包括部分神经肽, 趋化因子和生长因子。DPP-4还被称为细胞表面抗原CD26, 能够刺激某些功能的免疫反应^[9]。而近年来, 对DPP-8和DPP-9的生理功能研究越来越得到研究人员的重视。属于S28丝氨酸蛋白酶家族成员的DPP-2虽然与S9b家族成员结构不同, 但却能够与部分DPP抑制剂结合^[10]。

最初, 由于DPP-4作为2型糖尿病的治疗靶点, 能够降低肠促胰岛素GLP-1的水平而受到人们的广泛重视。近年来, 世界各大制药公司纷纷推出新的DPP-4抑制剂用于延长GLP-1的促胰岛素分泌的作用, 如Gliptins等。在最近的体内和体外实验中, 研究者发现DPP抑制剂对炎症性疾病具有治疗作用。

2.1 DPP-4的作用 DPP-4是DPP-4家族最早的成员之一, 1966年由Hopsu-Havu和Glennner^[11]研究发现, DPP-4的结构是一个二聚体, 而其催化活性正是由于此二聚体的作用。这种具有催化活性结构由两部分构成, 一部分是 α/β 水解酶部分, 另一部分是八叶 β -螺旋桨部分。DPP-4在体内是由一种相对分子质量为110 000 Da的II型膜糖蛋白表达。在小鼠、大鼠以及人的肠道、肾脏、肝脏、胸腺、淋巴结、脾、前列腺的上皮细胞中以及脂肪细胞、活化的淋巴细胞和单核细胞中都有DPP-4的表达^[9]。DPP-4作为细胞表面抗原CD26能够与淋巴细胞表面分子CD45和腺苷脱氨酶有免疫反应中的协同刺激作用。DPP-4在抗原刺激后, 上调静止期B淋巴细胞和自然杀伤(natural killer, NK)细胞表面CD26的表达水平^[12]。

2.2 DPP-4与IBD的关系 最近有研究发现, DPP-4可能与IBD的发病机制有一定的关系。DPP-4能够降解肠道内的GLP-1和GLP-2, 其降低GLP-1在肠道的表达, 使人体内血糖水平降低, 从而达到控制糖尿病的作用, 日前DPP-4抑制剂已经作为新一代的降糖药通过FDA批准上市, 而对于DPP-4降解GLP-2, 则能对IBD有一定的治疗作用^[13], 其对于IBD的治疗作用却很少有人注意。

3 GLP-2

GLP-2属于胰高血糖素原衍生肽类(proglucagon-derived peptide, PGDP), 是胰高血糖素原(proglucagon, PG)被激素原转化酶(prohormone convertase, PC)降解的产物之一, 是由33个氨基酸残基组成的单链多肽。在目前的动物实验中, GLP-2显示出惊人的肠道特性, GLP-2刺激肠黏膜生长, 促进修复的功能毋庸置疑, 而且由于GLP-2的受体高度局限性表达, GLP-2的生长功能仅限于胃肠道黏膜上皮。因此GLP-2可能提供一个相比于其他肠道生长因子如EFG/TGF- α , 生长激素, 胰岛素生长因子, 角质细胞生长因子在治疗上的优越性。L'Heureux等^[14]的研究证实, 右旋糖酐硫酸酯钠诱导的小鼠结肠炎中, GLP治疗组可提高生存率, 增加小肠质量, 减轻体质量的丢失和结肠的损伤。韩伟等^[15]研究发现GLP-2明显促进小鼠小肠隐窝细胞增殖, 抑制肠细胞凋亡, 使肠绒毛高度, 肠质量明显增加。Xiao等^[16]的研究发现, GLP-2在治疗CD时与其在体内的浓度有很大的关系, 在测量IBD患者血循环中的GLP-2浓度时发现, 相比正常人, UC和CD患者有生物活

性的GLP-2在血循环中的浓度升高, GLP-2所占GLP-2的比例也较正常人高, 而DPP-4活性则下降. 表明IBD患者在肠道损伤后, 可能通过某些反应来维持GLP-2水平, 以尽可能地修复损伤的肠道上皮. 由此可以看出, 提高GLP-2的浓度对治疗IBD具有重要的意义.

3.1 GLP-2的表达、合成、分泌和调控 胰高血糖素基因通过3个原发部位表达: 胰岛细胞、远端回肠和结肠、整个脑干和丘脑. 胰高血糖素基因的特点是该组织的经翻译后加工成他的组成肽. 在胰腺的 α 细胞中, GLP的主要作用是胰高血糖素的加工, IP-1和激素原转化酶-2形成的胰高血糖素的主要片段. 在肠道L细胞中, GLP能够生成GLP-1, GLP-2以及PC1/3能够生成胰高血糖素、GRPP、胃泌酸调节素和干扰肽-2(intervening peptide-2, IP-2).

具有生物活性的GLP-2是由营养、激素和神经刺激引起回肠和结肠的肠道内L细胞分泌. 在动物体内的研究和人体内的数据表明, 膳食纤维和短链脂肪酸(short chain fatty acids, SCFA), 碳水化合物和脂肪对GLP-2的分泌具有很强的刺激作用^[17,18], 而对蛋白质几乎没有任何作用. GLP-2的分泌可能受到双胍类药物的影响, 包括二甲双胍, 丁基双胍和苯乙双胍^[19]. 一直用于II型糖尿病治疗的双胍类药物能够增加GLP-1的分泌^[20,21]. 由于GLP-1和GLP-2是同时分泌产生的, 在这些研究中推断: 双胍类药物可能同时增加GLP-2的分泌.

3.2 DPP-4和GLP-2 GLP-2半衰期相对较短, 并且由DPP-4迅速水解, 从而失去生物活性. DPP-4对GLP-2的调控在体外, 动物体内模型及人体的组织样本中已经得到了充分的证明. Thulesen等^[22]研究发现, 在代谢过程中, GLP-2同时还可以在一个负反馈机制中充当GLP-2受体较弱的部分受体激动剂. 为了解决DPP-4对GLP-2的降解作用, Jeppesen等^[23]使用没有DPP-4的N端裂解位点的GLP-2类似物用于阐明GLP-2的作用机制. 许多以选择性为目的的DPP-4抑制剂已经被研究和应用, 以探讨GLP-2的生物活性.

GLP-1和GLP-2的体外半衰期已经在Lambeir等^[24]的研究中发现, DPP-4水解GLP-1和GLP-2的过程中存在一个动力学常数. Deacon等^[25]在早期的研究中就发现, DPP-4优先裂解GLP-1, 其裂解GLP-1和GLP-2的动力学常数Kcat分别为7.1s⁻¹和0.87s⁻¹, 而在人体内, 与GLP-2相比, GLP-1的半衰期为1-2 min, 并且在

分泌7 min以后全部降解.

3.3 GLP-2的生理作用及其作用机制 GLP-2对肠黏膜的修复作用及维持肠道功能的作用机制是通过许多不同的途径进行的. 在生理状况下, GLP-2通过抑制胃肠道分泌和胃肠道蠕动来促进肠道营养的运输, 增加肠道血流量以及促进隐窝细胞增殖, 同时也加强肠道的屏障功能, 抑制隐窝细胞的凋亡. GLP-2与大肠与小肠细胞的生长密切相关, 此生理功能已经大量通过动物模型和临床研究证明.

有文献报道, GLP-2是通过G-蛋白偶联受体而发挥作用, 内分泌细胞、小鼠肠道神经元和肠道肌纤维母细胞上都有GLP-2 G-蛋白偶联受体的表达. GLP-2和其受体信号之间的影响尚未得到充分的证实. 近年发现, GLP-2R特异性表达于人类胃肠道的内分泌细胞和大鼠, 小鼠的肠神经系统^[26], Bjerknes等^[27]采用RT-PCR方法在大鼠肠黏膜的神经细胞检测到GLP-2R分布, 进而采用体细胞诱变谱系分析技术证明, GLP-2可特异性作用于肠隐窝的柱状细胞祖细胞, 并且发现这种作用可被河豚毒素阻断, 由此提出, 肠道病理损伤可刺激肠道内分泌细胞分泌GLP-2, GLP-2作用于肠道的黏膜, 黏膜下和肌间神经元, 神经元通过信号转导特异性作用于柱状上皮的祖细胞, 从而促进柱状上皮细胞增生和营养物质吸收, 加速包括内分泌细胞在内的整个肠隐窝部细胞群的分化, 生长和修复. Jasleen等^[28]报道, GLP-2刺激人肠上皮细胞株Caco-2约5 min, 细胞内ERK1, ERK2活化形式明显增加, 肠上皮细胞的增殖反应增加了10倍, 而用丝裂素活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)抑制剂以剂量依赖性方式可阻断GLP-2的促细胞增生作用, 证实GLP-2通过激活MAPK信号转导通路, 诱导肠上皮细胞增生.

3.4 GLP-2和IBD 关于GLP-2的生物学作用的研究, 可以追溯到20世纪70年代. 陆续有文献报道某些伴有胰高血糖素原产生过多的内分泌肿瘤患者, 其小肠黏膜表现为过度增生, 切除肿瘤后, 小肠黏膜的异常增生则逐渐恢复, 提示这类内分泌肿瘤患者的肠黏膜异常增生与过度产生的血小板生长因子(platelet derived growth factor, PDGP)有关, 但究竟是PDGP中的何种成分起作用却不清楚. 真正明确GLP促进肠黏膜增长是在近10年. 1996年, Drucker等^[29]率先提出PDGP中参与肠黏膜生长调控的成分是GLP-2, 且其促生长作用具有器官特异性(仅限于肠黏膜). 他们还

■创新盘点

本文从药物治疗炎症性肠病的研究现状入手, 对DPP-4抑制剂治疗炎症性肠病进行了深入的阐述, 而近年的研究发现, 胰高血糖素样肽-2具有促进肠黏膜增长、抑制炎症介质表达的作用, 而DPP-4抑制剂能够通过抑制DPP-4而达到降低GLP-2降解失活等的作用, 为炎症性肠病的治疗开辟新的途径.

■应用要点

本文不仅为炎症性肠病的治疗药物筛选提供参考,并对今后炎症性肠病治疗药物的实验研究和临床应用有重要的指导意义。

比较了GLP-2、EGF、IGF-1及生长激素对正常鼠肠黏膜的促生长作用,结果GLP-2的作用最明显,尤其是耐受DPP-4的GLP-2^[30]。这一发现揭开了GLP-2研究的序幕。

在硫酸葡聚糖钠(dextran sulphate sodium, DSS)诱导的炎症性肠炎小鼠的实验过程中,给予耐DPP-4降解的GLP-2类似物Teduglutide后,表现出明显的治疗作用。Drucker等^[31]用浓度为5%的DSS替代小鼠饮用水,同是每天两次给予Teduglutide治疗,10 d后观察发现治疗组小鼠的体质量及结肠长度明显好于DSS模型组,并且有组织形态学的改变及隐窝细胞增殖的变化。Teduglutide的治疗与其他几个传统的治疗方法比较, Teduglutide能够有效的治疗疾病,改变疾病引起的组织学病变^[14]。

Teduglutide在人类CD的研究中已经证明有确切的作用^[32],在用高剂量Teduglutide治疗了8 wk以后,55%的患者症状有所缓解,而安慰剂患者仅缓解33%。此次研究结果为我们提供了Teduglutide治疗肠道疾病的有力证据。然而,外源性物质控制肠道内GLP-2的浓度是否会增加肿瘤的患病率还需要进一步研究。

最近有研究发现, DPP-4抑制剂可能作为一种替代Teduglutide的新物质来控制肠道内GLP-2浓度。Geier等^[33]的研究表明, DSS诱导的正常小鼠和DPP-4基因敲除小鼠在肠炎的发生和发展中没有区别,但DPP-4抑制剂能够减轻DSS诱导的正常小鼠肠炎的症状。此外,经过DPP-4抑制剂治疗后处在恢复阶段的小鼠隐窝细胞增殖更加明显,这说明GLP-2的活性增加^[34]。在Yazbeck等^[35]的研究中发现,在正常的DPP-4基因敲除小鼠体内, GLP-2的浓度较普通小鼠高,而且在DSS诱导的正常小鼠肠炎模型中,在给予DPP-4抑制剂治疗后,小鼠体内GLP-2的浓度显著升高。这些研究结果表明DPP-4抑制剂可能是一种治疗IBD安全有效的辅助治疗药物。相对于Teduglutide的静脉给药,口服DPP-4抑制剂治疗IBD这种慢性疾病能够更好地提高患者的依从性。

4 结论

大量动物实验表明, DPP-4抑制剂对IBD具有治疗作用,而人们一直将其的治疗作用机制归结于增加肠道内GLP-2的浓度,但最近有研究发现,将DPP-4抑制剂Val-Pyrrolidide应用于正常大鼠,能够增加GLP-2促进肠道的生长作用,但其研究也同时发现,仅CD对GLP-2浓度具有依

赖性,而IBD动物模型中GLP-2的活性却与正常组无显著性差异,此研究说明, DPP-4抑制剂对IBD的治疗作用并不仅仅是因为其增加了GLP-2在体内的分泌而产生的,而DPP-4抑制剂可能在IBD的炎症反应中具有重要的作用^[16]。

对于IBD的治疗目前的研究很多,但真正应用于临床的有效药物却很少, DPP-4抑制剂作为近年来FDA批准的治疗糖尿病的新药而受到广泛的重视,但对于其治疗IBD的研究却不够深入,各方面的研究都表明DPP-4抑制剂对IBD有一定的治疗作用,但其疗效还需进行更深入的研究, DPP-4抑制剂可能对开发新的IBD治疗药物具有很大帮助,为IBD的治疗提供更广阔的前景。

5 参考文献

- 1 Shih DQ, Targan SR. Immunopathogenesis of inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 390-400
- 2 Yamamoto-Furusho JK. Genetic factors associated with the development of inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 5594-5597
- 3 Geier MS, Butler RN, Howarth GS. Inflammatory bowel disease: current insights into pathogenesis and new therapeutic options; probiotics, prebiotics and synbiotics. *Int J Food Microbiol* 2007; 115: 1-11
- 4 Geier MS, Butler RN, Giffard PM, Howarth GS. Lactobacillus fermentum BR11, a potential new probiotic, alleviates symptoms of colitis induced by dextran sulfate sodium (DSS) in rats. *Int J Food Microbiol* 2007; 114: 267-274
- 5 Ardizzone S, Bianchi Porro G. Biologic therapy for inflammatory bowel disease. *Drugs* 2005; 65: 2253-2286
- 6 Kozuch PL, Hanauer SB. Treatment of inflammatory bowel disease: a review of medical therapy. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 354-377
- 7 van Assche G, Vermeire S, Rutgeerts P. Emerging biological treatments in inflammatory bowel diseases. *Minerva Gastroenterol Dietol* 2007; 53: 249-255
- 8 Sturm A, Dignass AU. Epithelial restitution and wound healing in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 348-353
- 9 Gorrell MD. Dipeptidyl peptidase IV and related enzymes in cell biology and liver disorders. *Clin Sci (Lond)* 2005; 108: 277-292
- 10 Maes MB, Scharpé S, De Meester I. Dipeptidyl peptidase II (DPPII), a review. *Clin Chim Acta* 2007; 380: 31-49
- 11 Hopsu-Havu VK, Glenner GG. A new dipeptide naphthylamidase hydrolyzing glycyl-prolyl-beta-naphthylamide. *Histochemie* 1966; 7: 197-201
- 12 Bauvois B, De Meester I, Dumont J, Rouillard D, Zhao HX, Bosmans E. Constitutive expression of CD26/dipeptidylpeptidase IV on peripheral blood B lymphocytes of patients with B chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Cancer* 1999; 79: 1042-1048
- 13 Yazbeck R, Howarth GS, Abbott CA. Dipeptidyl peptidase inhibitors, an emerging drug class for inflammatory disease? *Trends Pharmacol Sci* 2009; 30: 600-607
- 14 L'Heureux MC, Brubaker PL. Glucagon-like pep-

- tide-2 and common therapeutics in a murine model of ulcerative colitis. *J Pharmacol Exp Ther* 2003; 306: 347-354
- 15 韩伟, 马晓健, 朱亮, 宫德正, 邹原. 胰高血糖素样肽2对小鼠胃结肠黏膜作用及其受体分布的初步研究. *现代医院* 2009; 9: 26-29
- 16 Xiao Q, Boushey RP, Cino M, Drucker DJ, Brubaker PL. Circulating levels of glucagon-like peptide-2 in human subjects with inflammatory bowel disease. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2000; 278: R1057-R1063
- 17 Bartholome AL, Albin DM, Baker DH, Holst JJ, Tappenden KA. Supplementation of total parenteral nutrition with butyrate acutely increases structural aspects of intestinal adaptation after an 80% jejunio-ileal resection in neonatal piglets. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 2004; 28: 210-222; discussion 222-223
- 18 Xiao Q, Boushey RP, Drucker DJ, Brubaker PL. Secretion of the intestinotropic hormone glucagon-like peptide 2 is differentially regulated by nutrients in humans. *Gastroenterology* 1999; 117: 99-105
- 19 Yamazaki K, Yasuda N, Inoue T, Nagakura T, Kira K, Saeki T, Tanaka I. The combination of metformin and a dipeptidyl peptidase IV inhibitor prevents 5-fluorouracil-induced reduction of small intestine weight. *Eur J Pharmacol* 2004; 488: 213-218
- 20 Mannucci E, Tesi F, Bardini G, Ognibene A, Petracca MG, Ciani S, Pezzatini A, Brogi M, Dicembrini I, Cremasco F, Messeri G, Rotella CM. Effects of metformin on glucagon-like peptide-1 levels in obese patients with and without Type 2 diabetes. *Diabetes Nutr Metab* 2004; 17: 336-342
- 21 Yasuda N, Inoue T, Nagakura T, Yamazaki K, Kira K, Saeki T, Tanaka I. Enhanced secretion of glucagon-like peptide 1 by biguanide compounds. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 298: 779-784
- 22 Thulesen J, Knudsen LB, Hartmann B, Hastrup S, Kissow H, Jeppesen PB, Ørskov C, Holst JJ, Poulsen SS. The truncated metabolite GLP-2 (3-33) interacts with the GLP-2 receptor as a partial agonist. *Regul Pept* 2002; 103: 9-15
- 23 Jeppesen PB, Sanguinetti EL, Buchman A, Howard L, Scolapio JS, Ziegler TR, Gregory J, Tappenden KA, Holst J, Mortensen PB. Teduglutide (ALX-0600), a dipeptidyl peptidase IV resistant glucagon-like peptide 2 analogue, improves intestinal function in short bowel syndrome patients. *Gut* 2005; 54: 1224-1231
- 24 Lambeir AM, Proost P, Scharpé S, De Meester I. A kinetic study of glucagon-like peptide-1 and glucagon-like peptide-2 truncation by dipeptidyl peptidase IV, in vitro. *Biochem Pharmacol* 2002; 64: 1753-1756
- 25 Deacon CF, Nauck MA, Toft-Nielsen M, Pridal L, Willms B, Holst JJ. Both subcutaneously and intravenously administered glucagon-like peptide I are rapidly degraded from the NH2-terminus in type II diabetic patients and in healthy subjects. *Diabetes* 1995; 44: 1126-1131
- 26 Yusta B, Huang L, Munroe D, Wolff G, Fantaske R, Sharma S, Demchyshyn L, Asa SL, Drucker DJ. Enteroendocrine localization of GLP-2 receptor expression in humans and rodents. *Gastroenterology* 2000; 119: 744-755
- 27 Bjerknes M, Cheng H. Modulation of specific intestinal epithelial progenitors by enteric neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98: 12497-12502
- 28 Jasleen J, Shimoda N, Shen ER, Tavakkolizadeh A, Whang EE, Jacobs DO, Zinner MJ, Ashley SW. Signaling mechanisms of glucagon-like peptide 2-induced intestinal epithelial cell proliferation. *J Surg Res* 2000; 90: 13-18
- 29 Drucker DJ, Erlich P, Asa SL, Brubaker PL. Induction of intestinal epithelial proliferation by glucagon-like peptide 2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93: 7911-7916
- 30 Drucker DJ, DeForest L, Brubaker PL. Intestinal response to growth factors administered alone or in combination with human [Gly2]glucagon-like peptide 2. *Am J Physiol* 1997; 273: G1252-G1262
- 31 Drucker DJ, Yusta B, Boushey RP, DeForest L, Brubaker PL. Human [Gly2]GLP-2 reduces the severity of colonic injury in a murine model of experimental colitis. *Am J Physiol* 1999; 276: G79-G91
- 32 Buchman AL, Katz S, Shnaidman M, Jacobs D. Effect of teduglutide on patients with moderate-severe Crohn's disease after 8 weeks of therapy: a prospective, double-blind, placebo-controlled trial. *Gastroenterology* 2006; 131: 949-950
- 33 Geier MS, Tenikoff D, Yazbeck R, McCaughan GW, Abbott CA, Howarth GS. Development and resolution of experimental colitis in mice with targeted deletion of dipeptidyl peptidase IV. *J Cell Physiol* 2005; 204: 687-692
- 34 Yazbeck R, Howarth GS, Geier MS, Demuth HU, Abbott CA. Inhibiting dipeptidyl peptidase activity partially ameliorates colitis in mice. *Front Biosci* 2008; 13: 6850-6858
- 35 Yazbeck R, Sulda ML, Howarth GS, Bleich A, Raber K, von Hörsten S, Holst JJ, Abbott CA. Dipeptidyl peptidase expression during experimental colitis in mice. *Inflamm Bowel Dis* 2010; 16: 1340-1351

■同行评价

本文选题新颖, 观点明确, 对炎症性肠病的诊治有参考意义。

编辑 李薇 电编 何基才

核酸适配子在消化系统疾病研究中的应用

徐国峰, 张焜和

■背景资料

1990年, 两个研究组分别在《Science》和《Nature》上发表论文, 首次报道了应用体外筛选技术筛选出能与靶分子高特异性、高亲和力结合的寡核苷酸配体-核酸适配子。此后, 核酸适配子在生命科学和化学领域的研究应用不断深入。

徐国峰, 张焜和, 南昌大学第一附属医院消化内科 江西省消化疾病重点实验室 江西省南昌市 330006
国家高技术研究发展计划(863计划)基金资助项目, No. 2007AA02Z462
江西省科技攻关计划基金资助项目, No. 20061B0302400
江西省卫生厅重大招标项目基金资助项目, No. 20074001
作者贡献分布: 徐国峰完成综述初稿; 张焜和审核修改。
通讯作者: 张焜和, 教授, 主任医师, 330006, 江西省南昌市永外正街17号, 南昌大学第一附属医院消化内科, 江西省消化疾病重点实验室, yfyzkh@sina.com
收稿日期: 2010-07-08 修回日期: 2010-08-21
接受日期: 2010-08-31 在线出版日期: 2010-10-28

Application of nucleic acid aptamers for digestive disease research

Guo-Feng Xu, Kun-He Zhang

Guo-Feng Xu, Kun-He Zhang, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Nanchang University & Jiangxi Provincial Key Laboratory for Digestive Diseases, Nanchang 330006, Jiangxi Province, China
Supported by: the National High Technology Research and Development Program of China (863 Program), No. 2007AA02Z462; the Key Technology R & D Program of Jiangxi Province, No. 20061B0302400; and the Major Program of Health Department of Jiangxi Province, No. 20074001

Correspondence to: Professor Kun-He Zhang, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Nanchang University, 17 Yongwai Zheng Avenue, Nanchang 330006, Jiangxi Province, China. yfyzkh@sina.com
Received: 2010-07-08 Revised: 2010-08-21
Accepted: 2010-08-31 Published online: 2010-10-28

Abstract

Nucleic acid aptamers, selected from a synthesized library of random single-stranded oligonucleotides by systematic evolution of ligands by exponential enrichment (SELEX), are oligonucleotide ligands binding to target molecules with high specificity and affinity. Nucleic acid aptamers have similar functions to antibodies, but possess the advantages of wider range of targets, better stability, easier modification and synthesis, showing promising prospects for diagnosis and treatment of diseases. In terms of digestive diseases, nucleic acid aptamers have been applied in the research of tumor markers, anti-tumor therapy, hepatitis virus C and liver imaging.

■同行评议者

黄国, 教授, 四川大学华西药学院药剂系

Key Words: Nucleic acid aptamers; Digestion disease; Application

Xu GF, Zhang KH. Application of nucleic acid aptamers for digestive disease research. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(30): 3220-3225

摘要

核酸适配子是能特异性结合靶分子的单链寡核苷酸配体, 通过指数富集的配体系统进化技术从人工合成的单链随机寡核苷酸文库中筛选得到。适配子的功能类似于抗体, 但某些特性优于抗体, 具有特异性高、亲和力强、靶标范围广、稳定性好、易于修饰、可人工合成等优点, 在疾病的诊断和治疗中有良好的应用前景。在消化系统疾病中, 适配子在肿瘤标志物、肿瘤治疗、丙型肝炎病毒、肝脏成像等领域的应用中已有报道。

关键词: 核酸适配子; 消化系统疾病; 应用

徐国峰, 张焜和. 核酸适配子在消化系统疾病研究中的应用. 世界华人消化杂志 2010; 18(30): 3220-3225

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/3220.asp>

0 引言

1990年, Tuerk等^[1]和Ellington等^[2]建立了一种基于组合化学和PCR扩增的体外筛选新技术, 从人工合成的单链随机寡核苷酸文库中分别筛选出能与噬菌体T4 DNA聚合酶和有机染料分子高特异性和高亲和力结合的单链寡核苷酸配体。这种体外筛选技术称为指数富集的配体系统进化(systematic evolution of ligands by exponential enrichment, SELEX)技术, 筛选出的单链寡核苷酸配体称为核酸适配子(aptamer)。问世之后, SELEX技术不断丰富和发展^[3], 并筛选到针对不同靶标的适配子^[4], 在疾病的诊断和治疗中显示出良好的应用前景^[5,6]。针对血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)165的适配子已开发为治疗老年性视网膜黄斑变性(age-related macular degeneration, AMD)的上市药品Macugen(pegaptanib sodium)^[7]。本文将简要

介绍核酸适配子的筛选及其特性, 并在此基础上对核酸适配子在消化系统疾病研究中的应用作一综述。

1 核酸适配子的筛选和特性

核酸适配子的SELEX技术筛选过程大致如下: 构建人工合成的单链随机DNA(ssDNA)文库, 其中的寡核苷酸分子两端为固定序列, 用作PCR扩增时的引物结合部位, 中间为随机序列, 长度一般在20-110 nt, 库容量为 1×10^{14} - 1×10^{15} 。ssDNA文库可直接用于筛选, 也可转录为RNA文库后用于筛选(RNA文库构象较ssDNA文库丰富, 易于筛选出特异性和亲和力更好的适配子, 但操作相对复杂, 且稳定性不及ssDNA)。将随机寡核苷酸文库与靶标孵育, 然后分离靶标-核酸结合物, 洗脱下结合的寡核苷酸, 进行PCR扩增, 制备出新的文库, 开始下一轮筛选。如此反复数轮, 一般进行4-20轮筛选后, 靶标与文库的结合率不再升高, 终止筛选, 并将最后1轮文库进行克隆测序, 分离出适配子, 进行特异性和亲和力鉴定, 其中有价值的适配子可用于与靶标相关的分子识别研究。

RNA或ssDNA片段的特点是易于形成发卡、口袋、假节、G-四聚体等丰富的分子构象, 能与构象互补的分子通过“假碱基对”的堆积、氢键、静电等作用机制而特异性结合。用于核酸适配子筛选的文库多样性达到 1×10^{14} 以上, 理论上可以通过SELEX技术筛选出与自然环境中存在的几乎所有分子相结合的核酸适配子。

适配子的功能与抗体类似, 但与抗体相比, 有其独特的优点: (1)靶分子广: 用于筛选的靶标可以是蛋白、多肽、小分子有机物、无机离子, 也可以是完整的病毒、细菌、细胞, 有毒分子也可作为靶标。(2)高亲和力和高特异性: 适配子与靶分子结合的解离常数可达纳摩尔和皮摩尔每升的水平, 可以区分分子结构上一个甲基或一个羧基的差别。(3)易于标记和修饰: 适配子易与某些标记分子结合, 从而标记上荧光素、生物素等。适配子为寡聚核苷酸片段, 在体内容易被降解, 可进行化学修饰以避免核酸酶的降解作用, 且修饰后的适配子保持原有的生物学活性。(4)稳定性好: 适配子为核酸, 可在常温下运输、保存, 高温变性后可复性。(5)易于制备: 可通过PCR扩增、人工合成或分子克隆等手段制备, 满足不同的用量需要。(6)适合体内应用: 适配子无免疫原性且比抗体小, 可用于体内甚至

细胞内诊断和治疗。适配子的上述特性, 使之在临床诊断和治疗方面有良好的前景^[8-11], 目前在病毒^[12-14]、肿瘤^[15,16]、心血管系统^[17,18]、泌尿系统^[19]、血液系统^[20-22]及神经系统疾病^[23-25]等方面已有研究报道。

2 核酸适配子在消化系统疾病研究中的应用

核酸适配子能与靶分子高特异性和高亲和力结合, 使之可作为分子识别工具应用于靶分子的检测和分析, 也可作为功能分子应用于靶分子的功能阻断或激活, 因而在疾病的诊断、治疗及发病机制研究中发挥重要作用。在消化系统疾病研究中, 核酸适配子的应用主要在肿瘤和丙型肝炎两个领域。

2.1 在肿瘤标志物研究中的应用 以消化系肿瘤相关的标志物为靶标筛选适配子, 可为消化系肿瘤的诊断开辟新途径。粘蛋白(mucin, MUC)是黏液的主要成分, 是由上皮细胞分泌的高糖基化、高分子量糖蛋白, 其中MUC1在肿瘤组织中表达丰富, 糖基化不完全, 在消化系统上皮源性肿瘤中广泛表达, 是一种新的肿瘤标志物^[26-29]。Ferreira等^[30]筛选到一组MUC1的DNA适配子, 其检测低限为1 mg/L, 线性范围在8-100 mg/L, 在MUC1检测中具有良好的应用前景。癌胚抗原(carcinoembryonic antigen, CEA)广泛存在于内胚叶起源的消化系统肿瘤, 是经典的结肠癌标志物。王立峰等^[31]经过7轮筛选, 获得的CEA适配子能与纯化的和天然的CEA蛋白特异性结合, 为高表达CEA的肿瘤的体外诊断及体内靶向诊断奠定了实验基础。我们采用甲胎蛋白的异质体AFP-L3为靶标进行SELEX技术筛选, 获得1组适配子, 其中部分适配子对肝癌血清具有较高的特异性^[32]。最近有人通过体内筛选, 得到在结肠直肠癌中表达上调的p38分子的RNA适配子, 在结肠直肠癌肝转移的诊断中可能有重要价值^[33]。

以细胞为靶标的核酸适配子筛选是“盲筛”^[34-36], 无需事先知道靶分子的相关知识和分离纯化靶分子, 因此可以在适配子筛选出来后用来捕获靶分子, 然后对捕获的靶分子进行分析鉴定, 从而发现新的标志物^[37]。Shangguan等^[38]通过SELEX技术筛选出1组能够特异性识别白血病细胞的核酸适配子, 并通过适配子发现了白血病细胞的特异性标志物-蛋白酪氨酸激酶7(protein-tyrosine kinase-7, PTK7)^[39]。

2.2 在肿瘤细胞表面分子研究中的应用 肿瘤细胞的发生和演变过程中, 各种相关基因表达异

■**研发前沿**
新生血管形成在实体瘤的生长过程中极为重要, 也是目前抗肿瘤策略研究的热点之一。

■相关报道

Vo等筛选到1组HCV的NS5B蛋白的适配子,可以特异性结合HCV的多聚酶,抑制其活性,具有潜在的抗HCV价值。

常,导致细胞各种表面分子尤其是表面蛋白分子的改变,成为肿瘤细胞区别于正常细胞的分子基础^[40-42]。Shangguan等^[43]以小鼠MEAR肝癌细胞系为靶标,进行细胞SELEX筛选,获得一组适配子,能特异性识别MEAR细胞,解离常数达到纳摩尔每升的水平,在小鼠体内能与肝癌细胞特异性结合,为适配子用于肿瘤的体内诊断提供了实验依据。Zhang等^[44]将小鼠MEAR肝癌细胞的特异性适配子TLS9a标记上量子点(quantum dot, QD)构建的量子点适配子(QD-Apt)只识别MEAR细胞,不识别BNL细胞和Hela细胞,且与细胞结合后不影响细胞的生长和活性,适合于活细胞成像。核仁素(nucleolin)在胃癌细胞表面丰富表达,与胃癌的发生发展关系密切^[45],Watanabe等^[46]发现核仁素的适配子AS1411与核仁素结合后明显抑制细胞增殖,使细胞周期阻滞。此外,适配子AS1411在肾细胞癌和急性髓系白血病的治疗已进入临床试验阶段^[47]。

以肿瘤细胞为靶标进行核酸适配子筛选^[48],有可能获得1组针对细胞表面不同分子的适配子,通过这些适配子的联合检测,可以了解细胞间表面分子的表达差异,达到肿瘤分子分型的目的^[49,50],为肿瘤的个体化诊断与治疗奠定基础。

2.3 在抗肿瘤研究中的应用 调控肿瘤生长相关的功能蛋白表达,可以抑制肿瘤细胞的生长,达到抗肿瘤的目的。大肠癌的 β -连环素(catenin)/T淋巴细胞因子(T-cell factor, TCF)的活力上调,其原因可能为结肠腺瘤性息肉(adenomatous polyposis coli, APC)基因突变失活,或 β -catenin发生突变后表达上调,从而激活其下游目的基因,抑制凋亡,促进肿瘤细胞的生长^[51]。Lee等^[52]筛选出针对 β -catenin的高亲和力RNA适配子,可抑制结肠癌细胞内的 β -catenin依赖细胞周期蛋白D1(cyclin D1)和细胞癌基因(cellular oncogene)c-Myc表达,阻滞细胞周期的进程,使肿瘤形成能力下降,有可能发展成为特异性肿瘤治疗药物。过氧化物酶增殖体激活受体 δ (peroxisome proliferator-activated receptor delta, PPAR- δ)是PPAR的3种亚型之一,参与炎症和肿瘤的形成。Kwak等^[53]为了了解PPAR- δ 在结肠癌发生发展中的作用,筛选出其特异性适配子并使之表达于数种结肠癌细胞系中,发现能抑制VEGF-A和环氧化酶2(cyclooxygenase-2, COX-2)的表达,特别是高水平表达PPAR- δ 适配子的HCT116细胞显示其致瘤性丧失,提示基于适配子的特异性抑制可能将成为肿瘤治疗的一种新途径。约90%

的胰腺癌存在K-ras基因突变,是胰腺癌发生的重要分子事件。Cogoi等^[54]将一段能特异性作用于K-ras基因启动子的寡核苷酸序列T-22AG稳定表达于胰腺癌细胞系Panc-1中,可使细胞的K-ras基因的mRNA及其蛋白表达产物p21 ras下降为对照的52%和40%,集落形成能力及增殖能力下降分别为对照的42%和34%。上述研究结果不但表明适配子可用于肿瘤发病分子机制研究,还为肿瘤的治疗提供了新的策略。

2.4 在抗肿瘤新生血管研究中的应用 新生血管形成在实体瘤的生长过程中极为重要,也是目前抗肿瘤策略研究的热点之一^[55,56]。与新生血管形成相关的因子可以作为SELEX的筛选靶标,筛选相应的适配子,应用于抗肿瘤新生血管形成的研究。VEGF在肿瘤的新生血管形成过程中起重要作用。Jellinek等^[57]筛选到1组能与VEGF特异结合的RNA适配子,可以抑制VEGF与细胞表面受体结合,阻断其功能。酪氨酸激酶受体Tie 2介导的细胞内事件在肿瘤新生血管形成过程中也发挥重要作用,其配体促血管生成素2(angiopoietin 2, Ang 2)在VEGF存在时起促血管生成作用。Sarraf-Yazdi等^[58]将小鼠结肠癌细胞CT26移植到小鼠的皮脊翼视窗(dorsal skinfold window chamber)内,再腹腔内注射Ang 2的适配子,发现可抑制Tie 2受体磷酸化,使移植瘤血管密度较对照组明显减少,肿瘤体积只有对照的50%,表明可抑制肿瘤新生血管形成和肿瘤生长。血小板衍生因子B(platelet-derived growth factor-B, PDGF-B)阻断剂可使肿瘤血管周细胞(pericytes)减少,抑制新生血管形成。Sennino等^[59]应用PDGF-B的适配子AX102可使转基因鼠的胰岛肿瘤的血管周细胞衰退,进而血管网变稀,这种现象在肺癌更为明显。

2.5 在丙型肝炎研究中的应用 以病原微生物的成分或完整的病原体颗粒为靶标筛选特异的核酸适配子,可用于微生物感染的诊断和治疗。HCV相关的适配子研究已有不少报道^[60]。Chen等^[61]利用细胞表面SELEX技术筛选出HCV外壳E2糖蛋白的适配子,其中适配子ZE2能与E2阳性细胞高特异性和亲和力结合,可以特异性捕获HCV颗粒,使用ZE2检测丙型肝炎患者血清中E2蛋白的结果与HCV RNA定量和抗-HCV抗体检测具有良好的相关性,因而认为ZE2有希望用于丙型肝炎表面抗原的早期诊断试剂开发。同时,适配子ZE2能竞争性抑制E2蛋白结合到HCV受体CD81,并且显著地阻断HCV体外感染肝细

胞Huh7.5.1, 因而有希望发展成为治疗丙型肝炎的药物. Lee等^[62]以HCV核心抗原为靶标进行筛选, 得到的RNA适配子只特异性结合核心抗原, 不与非结构蛋白5区(non-structure 5, NS5)结合, 用于检测血清中的HCV核心抗原具有良好的特异性, 可用于早期诊断HCV感染. Jones等^[63]筛选出3a亚型HCV多聚酶的适配子, 不与其他亚型HCV结合, 对于HCV的分型诊断具有潜在应用价值. Vo等^[64]筛选到1组HCV的NS5B蛋白的适配子, 可以特异性结合HCV的多聚酶, 抑制其活性, 具有潜在的抗HCV价值. 詹林盛等^[65]筛选出HCV NS3螺旋酶(non-structure 3 helicase, NS3h)的适配子, 其中适配子H2在体外对HCV NS3h的活性具有一定的抑制作用, 抑制率达44%, 显示出治疗的应用前景.

核酸适配子应用于HCV感染的诊断具有高度的敏感性. Cho等^[66]建立的基于微球的适配子亲和色谱芯片可从0.8 μ L标本中检测出低达9.6 fmol的HCV RNA聚合酶. Hwang等^[67]建立的基于HCV螺旋酶适配子的纳米化学检测技术能检测出极微量(100 pg/mL)的HCV螺旋酶.

2.6 在肝脏成像研究中的应用 肝脏去唾液酸糖蛋白受体(asialoglycoprotein receptor, ASGPR)是一种数量丰富的异源低聚物的内吞受体, 主要存在于肝脏实质细胞朝向窦状隙一侧的细胞膜表面, 又称为肝糖凝集蛋白或肝凝集素. 由于ASGPR在正常肝细胞和病变肝细胞表面均大量且特异性的表达, 多年来一直被用于肝脏成像方面的研究. 刘嘉等^[68]经过12轮筛选获得了具有高亲和力的肝脏ASGPR特异性RNA适配子, 为开发诊断肝脏疾病的靶向性试剂奠定基础.

3 结论

目前, 核酸适配子在消化系疾病研究中的应用主要集中在消化系肿瘤和丙型肝炎两个方面, 虽然相关报道不多, 真正意义上的临床应用也还没有, 但现有的研究成果已经显示出良好的应用前景. 随着核酸适配子在消化系疾病的不断深入研究, 可以预见适配子将为消化系疾病的诊断和治疗开辟全新的途径.

4 参考文献

- 1 Tuerk C, Gold L. Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase. *Science* 1990; 249: 505-510
- 2 Ellington AD, Szostak JW. In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands. *Nature* 1990;

- 346: 818-822
- 3 张慧卿, 方念, 张焜和. 适配子筛选技术. *中国生物工程杂志* 2008; 28: 113-118
- 4 谭新颖, 张焜和. 从靶标的多样性看核酸适配子在分子识别中的优势与前景. *实验与检验医学* 2010; 28: 161-164
- 5 郭芳玉, 张贝, 张焜和. SELEX技术及核酸适配子在临床诊断中的应用前景. *国外医学·内科学分册* 2006; 33: 489-492
- 6 张贝, 郭芳玉, 张焜和. 核酸适配子及其在肿瘤诊断与治疗中的应用. *国际肿瘤学杂志* 2006; 33: 756-759
- 7 Rosina C, Bottoni F, Staurenghi G. Clinical experience with pegaptanib sodium. *Clin Ophthalmol* 2008; 2: 485-488
- 8 Thiel KW, Giangrande PH. Therapeutic applications of DNA and RNA aptamers. *Oligonucleotides* 2009; 19: 209-222
- 9 Cerchia L, Giangrande PH, McNamara JO, de Francis V. Cell-specific aptamers for targeted therapies. *Methods Mol Biol* 2009; 535: 59-78
- 10 Barbas AS, White RR. The development and testing of aptamers for cancer. *Curr Opin Investig Drugs* 2009; 10: 572-578
- 11 Perkins AC, Missailidis S. Radiolabelled aptamers for tumour imaging and therapy. *Q J Nucl Med Mol Imaging* 2007; 51: 292-296
- 12 甘龙杰, 兰小鹏. SELEX技术在病毒感染诊断和治疗中的应用. *生物技术通讯* 2009; 20: 745-748
- 13 Kissel JD, Held DM, Hardy RW, Burke DH. Active site binding and sequence requirements for inhibition of HIV-1 reverse transcriptase by the RT1 family of single-stranded DNA aptamers. *Nucleic Acids Res* 2007; 35: 5039-5050
- 14 Jang KJ, Lee NR, Yeo WS, Jeong YJ, Kim DE. Isolation of inhibitory RNA aptamers against severe acute respiratory syndrome (SARS) coronavirus NTPase/Helicase. *Biochem Biophys Res Commun* 2008; 366: 738-744
- 15 许川山, Albert WING Nang Leung, 杨青, 曾霞波. 利用SELEX技术构建靶向光敏药物. *中国激光医学杂志* 2006; 15: 386-388
- 16 张飞, 牛瑞芳. 核酸适配子在肿瘤学研究中的进展. *中华肿瘤防治杂志* 2006; 13: 1911-1914
- 17 Mann MJ, Whitemore AD, Donaldson MC, Belkin M, Conte MS, Polak JF, Orav EJ, Ehsan A, Dell'Acqua G, Dzau VJ. Ex-vivo gene therapy of human vascular bypass grafts with E2F decoy: the PREVENT single-centre, randomised, controlled trial. *Lancet* 1999; 354: 1493-1498
- 18 Kuliczowski W, Floyd J, Malinin A, Serebruany V. Aptamers: the emerging class of future anticoagulation for vascular disease. *Expert Rev Cardiovasc Ther* 2010; 8: 503-507
- 19 Farokhzad OC, Cheng J, Tepley BA, Sherifi I, Jon S, Kantoff PW, Richie JP, Langer R. Targeted nanoparticle-aptamer bioconjugates for cancer chemotherapy in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103: 6315-6320
- 20 Shanguan D, Li Y, Tang Z, Cao ZC, Chen HW, Mallikaratchy P, Sefah K, Yang CJ, Tan W. Aptamers evolved from live cells as effective molecular probes for cancer study. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103: 11838-11843
- 21 Tang Z, Shanguan D, Wang K, Shi H, Sefah K, Mallikaratchy P, Chen HW, Li Y, Tan W. Selection of aptamers for molecular recognition and characterization of cancer cells. *Anal Chem* 2007; 79:

■应用要点

核酸适配子与抗体都是生物分子的特异性配体, 但适配子有许多抗体不具备的特性, 如毒性分子、无免疫原性的小分子均可用作制备适配子的靶标. 因此, 当抗体制备或应用有困难时, 可选择核酸适配子.

■同行评价

本文可读性好, 具有较好的临床参考价值。

- 4900-4907
- 22 Herr JK, Smith JE, Medley CD, Shangguan D, Tan W. Aptamer-conjugated nanoparticles for selective collection and detection of cancer cells. *Anal Chem* 2006; 78: 2918-2924
- 23 袁超, 刘慧, 张天伟. SELEX技术在神经系统疾病研究中的应用. *医学分子生物学杂志* 2010; 7: 254-257
- 24 Takahashi T, Tada K, Mihara H. RNA aptamers selected against amyloid beta-peptide (A β) inhibit the aggregation of A β . *Mol Biosyst* 2009; 5: 986-991
- 25 de Franciscis V, Esposito CL, Catuogno S, Cellai L, Cerchia L. Aptamers as innovative diagnostic and therapeutic agents in the central nervous system. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 2009; 8: 393-401
- 26 Inagaki Y, Xu H, Nakata M, Seyama Y, Hasegawa K, Sugawara Y, Tang W, Kokudo N. Clinicopathology of sialomucin: MUC1, particularly KL-6 mucin, in gastrointestinal, hepatic and pancreatic cancers. *Biosci Trends* 2009; 3: 220-232
- 27 Guo Q, Tang W, Inagaki Y, Midorikawa Y, Kokudo N, Sugawara Y, Nakata M, Konishi T, Nagawa H, Makuuchi M. Clinical significance of subcellular localization of KL-6 mucin in primary colorectal adenocarcinoma and metastatic tissues. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 54-59
- 28 Xu HL, Inagaki Y, Seyama Y, Sugawara Y, Kokudo N, Nakata M, Wang FS, Tang W. Expression of KL-6 mucin, a human MUC1 mucin, in intrahepatic cholangiocarcinoma and its potential involvement in tumor cell adhesion and invasion. *Life Sci* 2009; 85: 395-400
- 29 Zhang K, Tang W, Qu X, Guo Q, Inagaki Y, Seyama Y, Abe H, Gai R, Kokudo N, Sugawara Y, Nakata M, Makuuchi M. KL-6 mucin in metastatic liver cancer tissues from primary colorectal carcinoma. *Hepato-gastroenterology* 2009; 56: 960-963
- 30 Ferreira CS, Papamichael K, Guilbault G, Schwar-zacher T, Garipey J, Missailidis S. DNA aptamers against the MUC1 tumour marker: design of aptamer-antibody sandwich ELISA for the early diagnosis of epithelial tumours. *Anal Bioanal Chem* 2008; 390: 1039-1050
- 31 王立峰, 魏嘉, 殷海涛, 钱晓萍, 禹立霞, 刘宝瑞. 癌胚抗原特异性寡核苷酸适配子的体外筛选及其意义. *医学研究生学报* 2007; 20: 903-907
- 32 Zhang KH, Fang N, Zhang HQ, Chen WX, Zhu X, Lv NH. Selection and analysis of aptamers binding *Lens culinaris* agglutinin-reactive alpha-fetoprotein. *Hepatol Int* 2009; 3: 154
- 33 Mi J, Liu Y, Rabbani ZN, Yang Z, Urban JH, Sullenger BA, Clary BM. In vivo selection of tumor-targeting RNA motifs. *Nat Chem Biol* 2010; 6: 22-24
- 34 Sefah K, Shangguan D, Xiong X, O'Donoghue MB, Tan W. Development of DNA aptamers using Cell-SELEX. *Nat Protoc* 2010; 5: 1169-1185
- 35 Kim Y, Liu C, Tan W. Aptamers generated by Cell SELEX for biomarker discovery. *Biomark Med* 2009; 3: 193-202
- 36 Guo KT, Ziemer G, Paul A, Wendel HP. CELL-SELEX: Novel perspectives of aptamer-based therapeutics. *Int J Mol Sci* 2008; 9: 668-678
- 37 Ulrich H, Wrenger C. Disease-specific biomarker discovery by aptamers. *Cytometry A* 2009; 75: 727-733
- 38 Shangguan D, Cao ZC, Li Y, Tan W. Aptamers evolved from cultured cancer cells reveal molecular differences of cancer cells in patient samples. *Clin Chem* 2007; 53: 1153-1155
- 39 Shangguan D, Cao Z, Meng L, Mallikaratchy P, Sefah K, Wang H, Li Y, Tan W. Cell-specific aptamer probes for membrane protein elucidation in cancer cells. *J Proteome Res* 2008; 7: 2133-2139
- 40 罗飞兵, 张焜和. Glypican-3与原发肝癌关系研究进展. *世界华人消化杂志* 2010; 18: 155-159
- 41 常彬霞, 辛绍杰. 甲胎蛋白及其临床应用研究进展. *世界华人消化杂志* 2010; 18: 576-580
- 42 唐光华, 倪润洲, 肖明兵, 江枫, 陈健华, 黄华. 血小板衍化内皮细胞生长因子在胰腺癌组织中的表达及其临床意义. *世界华人消化杂志* 2010; 18: 143-148
- 43 Shangguan D, Meng L, Cao ZC, Xiao Z, Fang X, Li Y, Cardona D, Witek RP, Liu C, Tan W. Identification of liver cancer-specific aptamers using whole live cells. *Anal Chem* 2008; 80: 721-728
- 44 Zhang J, Jia X, Lv XJ, Deng YL, Xie HY. Fluorescent quantum dot-labeled aptamer bioprobes specifically targeting mouse liver cancer cells. *Talanta* 2010; 81: 505-509
- 45 Watanabe T, Tsuge H, Imagawa T, Kise D, Hirano K, Beppu M, Takahashi A, Yamaguchi K, Fujiki H, Suganuma M. Nucleolin as cell surface receptor for tumor necrosis factor-alpha inducing protein: a carcinogenic factor of *Helicobacter pylori*. *J Cancer Res Clin Oncol* 2010; 136: 911-921
- 46 Watanabe T, Hirano K, Takahashi A, Yamaguchi K, Beppu M, Fujiki H, Suganuma M. Nucleolin on the cell surface as a new molecular target for gastric cancer treatment. *Biol Pharm Bull* 2010; 33: 796-803
- 47 Mongelard F, Bouvet P. AS-1411, a guanosine-rich oligonucleotide aptamer targeting nucleolin for the potential treatment of cancer, including acute myeloid leukemia. *Curr Opin Mol Ther* 2010; 12: 107-114
- 48 李真真, 韩跃武, 刘玲玲, 韩亚萍, 路艳, 王春霞. SELEX法体外筛选胃癌细胞适配子方法的建立. *生物技术* 2009; 19: 42-46
- 49 Sefah K, Tang ZW, Shangguan DH, Chen H, Lopez-Colon D, Li Y, Parekh P, Martin J, Meng L, Phillips JA, Kim YM, Tan WH. Molecular recognition of acute myeloid leukemia using aptamers. *Leukemia* 2009; 23: 235-244
- 50 Li N, Ebright JN, Stovall GM, Chen X, Nguyen HH, Singh A, Syrett A, Ellington AD. Technical and biological issues relevant to cell typing with aptamers. *J Proteome Res* 2009; 8: 2438-2448
- 51 Morin PJ, Sparks AB, Korinek V, Barker N, Clevers H, Vogelstein B, Kinzler KW. Activation of beta-catenin-Tcf signaling in colon cancer by mutations in beta-catenin or APC. *Science* 1997; 275: 1787-1790
- 52 Lee HK, Choi YS, Park YA, Jeong S. Modulation of oncogenic transcription and alternative splicing by beta-catenin and an RNA aptamer in colon cancer cells. *Cancer Res* 2006; 66: 10560-10566
- 53 Kwak H, Hwang I, Kim JH, Kim MY, Yang JS, Jeong S. Modulation of transcription by the peroxisome proliferator-activated receptor delta-binding RNA aptamer in colon cancer cells. *Mol Cancer Ther* 2009; 8: 2664-2673
- 54 Cogoi S, Quadrioglio F, Xodo LE. G-rich oligonucleotide inhibits the binding of a nuclear protein to the Ki-ras promoter and strongly reduces cell growth in human carcinoma pancreatic cells. *Biochemistry* 2004; 43: 2512-2523
- 55 Saijo N. [Treatment with antiangiogenic drugs] *Nippon Rinsho* 2010; 68: 1007-1013
- 56 Sato Y. [Anti-angiogenic drugs] *Nippon Rinsho* 2010;

- 68: 1054-1058
- 57 Jellinek D, Green LS, Bell C, Janjić N. Inhibition of receptor binding by high-affinity RNA ligands to vascular endothelial growth factor. *Biochemistry* 1994; 33: 10450-10456
- 58 Sarraf-Yazdi S, Mi J, Moeller BJ, Niu X, White RR, Kontos CD, Sullenger BA, Dewhirst MW, Clary BM. Inhibition of in vivo tumor angiogenesis and growth via systemic delivery of an angiopoietin 2-specific RNA aptamer. *J Surg Res* 2008; 146: 16-23
- 59 Sennino B, Falcón BL, McCauley D, Le T, McCauley T, Kurz JC, Haskell A, Epstein DM, McDonald DM. Sequential loss of tumor vessel pericytes and endothelial cells after inhibition of platelet-derived growth factor B by selective aptamer AX102. *Cancer Res* 2007; 67: 7358-7367
- 60 徐冬, 曹俊娜. 丙型肝炎病毒相关适配分子的研究进展. *世界华人消化杂志* 2008; 16: 1440-1445
- 61 Chen F, Hu Y, Li D, Chen H, Zhang XL. CS-SELEX generates high-affinity ssDNA aptamers as molecular probes for hepatitis C virus envelope glycoprotein E2. *PLoS One* 2009; 4: e8142
- 62 Lee S, Kim YS, Jo M, Jin M, Lee DK, Kim S. Chip-based detection of hepatitis C virus using RNA aptamers that specifically bind to HCV core antigen. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; 358: 47-52
- 63 Jones LA, Clancy LE, Rawlinson WD, White PA. High-affinity aptamers to subtype 3a hepatitis C virus polymerase display genotypic specificity. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50: 3019-3027
- 64 Vo NV, Oh JW, Lai MM. Identification of RNA ligands that bind hepatitis C virus polymerase selectively and inhibit its RNA synthesis from the natural viral RNA templates. *Virology* 2003; 307: 301-316
- 65 詹林盛, 卓海龙, 王会中, 彭剑淳, 王全立. 丙型肝炎病毒NS3螺旋酶寡核苷酸适配子的筛选与鉴定. *生物化学与生物物理进展* 2005; 32: 245-249
- 66 Cho S, Lee SH, Chung WJ, Kim YK, Lee YS, Kim BG. Microbead-based affinity chromatography chip using RNA aptamer modified with photocleavable linker. *Electrophoresis* 2004; 25: 3730-3739
- 67 Hwang KS, Lee SM, Eom K, Lee JH, Lee YS, Park JH, Yoon DS, Kim TS. Nanomechanical microcantilever operated in vibration modes with use of RNA aptamer as receptor molecules for label-free detection of HCV helicase. *Biosens Bioelectron* 2007; 23: 459-465
- 68 刘嘉, 杨燕, 胡斌, 马智勇, 余源, 黄红平, 陆蒙古, 冯新华, 郭培宣, 杨东亮. 肝脏去唾液酸糖蛋白受体特异性RNA适配子的SELEX筛选与鉴定. *医学分子生物学杂志* 2009; 6: 197-202

编辑 李军亮 电编 何基才

ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) CN 14-1260/R 2010年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

《世界华人消化杂志》性质、刊登内容及目标

本刊讯 《世界华人消化杂志》[国际标准刊号ISSN 1009-3079 (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496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。

淤血预处理对大鼠小肠黏膜通透性的影响

王仕忠, 朱春富, 李飞, 翁立新

■背景资料

长时间阻断肝门(如肝移植、肝叶切除)可导致肠道的淤血再灌注损伤、肠黏膜通透性增高,进而发生肠道细菌移位、肠源性内毒素血症,激发全身炎症反应,甚至诱发多脏器功能衰竭。淤血预处理可以减轻淤血再灌注导致的肠黏膜损伤,但预处理对肠黏膜通透性的影响仍未见报道。

王仕忠, 李飞, 南京医科大学附属常州市第二人民医院中心实验室 江苏省常州市 213003
朱春富, 翁立新, 南京医科大学附属常州市第二人民医院普外科 江苏省常州市 213003
常州市科技局指导性基金资助项目, No. CS2008914
作者贡献分布: 王仕忠与朱春富对此文所作贡献两均等; 此课题由翁立新与朱春富共同设计和申请; 研究过程由王仕忠、朱春富及李飞完成; 模型建立由李飞完成; 数据分析和写作由翁立新与朱春富共同完成。
通讯作者: 翁立新, 主任医师, 硕士生导师, 213003, 江苏省常州市兴隆巷29号, 南京医科大学附属常州市第二人民医院普外科。
zcfmlm@yahoo.com.cn
电话: 0519-88125373 传真: 0519-88125373
收稿日期: 2010-07-18 修回日期: 2010-08-09
接受日期: 2010-08-17 在线出版日期: 2010-10-28

Congestion preconditioning protects against intestinal mucosal hyperpermeability induced by congestion-reperfusion injury in rats

Shi-Zhong Wang, Chun-Fu Zhu, Fei Li, Li-Xin Weng

Shi-Zhong Wang, Fei Li, Department of Central Laboratory, Changzhou Second People's Hospital Affiliated to Nanjing Medical University, Changzhou 213003, Jiangsu Province, China

Chun-Fu Zhu, Li-Xin Weng, Department of General Surgery, Changzhou Second People's Hospital Affiliated to Nanjing Medical University, Changzhou 213003, Jiangsu Province, China

Supported by: the Leading Fund of Changzhou Municipal Science and Technology Bureau, No. CS2008914

Correspondence to: Li-Xin Weng, Department of General Surgery, Changzhou Second People's Hospital Affiliated to Nanjing Medical University, 29 Xinglong Lane, Changzhou 213003, Jiangsu Province, China. zcfmlm@yahoo.com.cn

Received: 2010-07-18 Revised: 2010-08-09

Accepted: 2010-08-17 Published online: 2010-10-28

Abstract

AIM: To investigate the effects of congestion preconditioning on intestinal barrier dysfunction caused by portal occlusion in rats.

METHODS: Sprague-Dawley rats were divided into three groups: congestion-reperfusion group (CR group), congestion preconditioning group (CP group) and sham operation group (SO group). In the CR group, portal vein flow was occluded using a micro-clamp for 45 min and then unclamped by removing the micro-clamp.

In the CP group, the portal vein was clamped for 5 min and then unclamped for 5 min, followed by one repeat of this procedure before portal vein flow occlusion for 45 min. In the SO group, all the procedures were conducted except for the clamping of the portal vein. Portal blood samples were collected at baseline, 12 h and 24 h after the portal procedure for measurement of plasma endotoxin and TNF- α concentrations. Meanwhile, the intestine was loaded with 5 mL FITC-dextran 4400 (FD4, 0.2%). One hour later, portal blood samples were taken for detection of intestinal mucosal permeability by measuring the appearance of fluorescent probe FD4 in portal plasma.

RESULTS: The concentrations of FD4, endotoxin and TNF- α in portal plasma in the CR group were significantly higher than those in the SO group (24 h: 0.621 mg/L \pm 0.074 mg/L vs 0.107 mg/L \pm 0.015 mg/L, $P < 0.01$; 0.636 EU/mL \pm 0.064 EU/mL vs 0.056 EU/mL \pm 0.019 EU/mL, $P < 0.01$; 107.14 ng/L \pm 15.71 ng/L vs 11.98 ng/L \pm 3.15 ng/L, $P < 0.01$). Plasma endotoxin concentration was positively correlated with FD4 level in portal plasma ($r = 0.9118$, $P < 0.01$). The levels of FD4, endotoxin and TNF- α in portal plasma in the CP group were remarkably attenuated compared with those in the CR group (24 h: 0.391 mg/L \pm 0.070 mg/L vs 0.621 mg/L \pm 0.074 mg/L, $P < 0.01$; 0.452 EU/mL \pm 0.048 EU/mL vs 0.636 EU/mL \pm 0.064 EU/mL, $P < 0.01$; 73.38 ng/L \pm 5.37 ng/L vs 107.14 ng/L \pm 15.71 ng/L, $P < 0.01$).

CONCLUSION: Congestion preconditioning has a protective effect against intestinal mucosal hyperpermeability induced by congestion-reperfusion injury and could therefore alleviate endotoxemia and systemic inflammatory reaction.

Key Words: Congestion preconditioning; Intestinal mucosal barrier; Permeability; Congestion-reperfusion injury

Wang SZ, Zhu CF, Li F, Weng LX. Congestion preconditioning protects against intestinal mucosal hyperpermeability induced by congestion-reperfusion injury in rats. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(30): 3226-3230

■同行评议者

刘连新, 教授, 哈尔滨医科大学第一临床医学院普通外科

摘要

目的: 探讨淤血预处理对大鼠小肠黏膜通透性的影响。

方法: SD大鼠分为淤血组、预处理组和对照组。通过阻断门静脉、45 min后开放门静脉的方法制作小肠淤血再灌注损伤模型; 预处理组预先夹闭门静脉5 min, 开放5 min并重复1次, 然后阻断门静脉45 min后开放; 对照组不夹闭门静脉。各组于门静脉处理前、处理后12和24 h分别取门静脉血检测内毒素和TNF- α , 同时测定肠黏膜通透性。

结果: 大鼠小肠淤血再灌注损伤后肠黏膜通透性较对照组显著增大(24 h FD4浓度: $0.621 \text{ mg/L} \pm 0.074 \text{ mg/L}$ vs $0.107 \text{ mg/L} \pm 0.015 \text{ mg/L}$, $P < 0.01$), 门静脉血内毒素(24 h: $0.636 \text{ EU/mL} \pm 0.064 \text{ EU/mL}$ vs $0.056 \text{ EU/mL} \pm 0.019 \text{ EU/mL}$, $P < 0.01$)和TNF- α 浓度显著升高(24 h: $107.14 \text{ ng/L} \pm 15.71 \text{ ng/L}$ vs $11.98 \text{ ng/L} \pm 3.15 \text{ ng/L}$, $P < 0.01$); 相关性分析提示内毒素浓度与肠黏膜通透性显著正相关($r = 0.9118$, $P < 0.01$); 与淤血组比较, 淤血预处理则可显著减轻肠黏膜通透性增大的程度(24 h FD4浓度: $0.391 \text{ mg/L} \pm 0.070 \text{ mg/L}$ vs $0.621 \text{ mg/L} \pm 0.074 \text{ mg/L}$, $P < 0.01$), 同时可显著降低门静脉血内毒素(24 h: $0.452 \text{ EU/mL} \pm 0.048 \text{ EU/mL}$ vs $0.636 \text{ EU/mL} \pm 0.064 \text{ EU/mL}$, $P < 0.01$)和TNF- α 浓度(24 h: $73.38 \text{ ng/L} \pm 5.37 \text{ ng/L}$ vs $107.14 \text{ ng/L} \pm 15.71 \text{ ng/L}$, $P < 0.01$)。

结论: 淤血预处理可对淤血再灌注损伤小肠黏膜通透性产生显著的保护作用, 并因此而减轻肠源性内毒素血症和全身炎症反应。

关键词: 淤血预处理; 肠黏膜屏障; 通透性; 淤血再灌注损伤

王仕忠, 朱春富, 李飞, 翁立新. 淤血预处理对大鼠小肠黏膜通透性的影响. 世界华人消化杂志 2010; 18(30): 3226-3230
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/3226.asp>

0 引言

肝门阻断不仅可导致肝脏的缺血再灌注损伤^[1], 同时由于门静脉的阻断而导致小肠的淤血再灌注损伤^[2,3]。肠道损伤可导致肠黏膜屏障功能障碍, 肠黏膜通透性增大, 肠道细菌或内毒素通过受损的肠黏膜屏障进入血液循环, 引起细菌移位或内毒素血症, 进而引发一系列全身性改变^[4]。研究发现, 采用淤血预处理的方法可以显著改善小肠的淤血性损伤^[5], 但该种预处理方法对肠黏膜通透性的影响尚未见报道。在前期研究^[3,5]

的基础上, 本文进一步探讨淤血预处理对大鼠小肠黏膜通透性的影响。

1 材料和方法

1.1 材料 健康成年Sprague-Dawley大鼠(购自中科院上海实验动物研究所), 质量为200-250 g, 周龄6 wk, 适应性喂养1 wk后进入实验。异硫氰酸-葡聚糖4400(FD4)购自Sigma公司, ELISA试剂盒购自R&D公司, 显色基质鲎试剂内毒素检测试剂盒购自厦门市鲎试剂实验厂有限公司。F-4000荧光分光光度计(日本Hitachi), Bio-Rad680型酶标仪(美国伯乐)。

1.2 方法

1.2.1 小肠淤血再灌注损伤及预处理模型的建立: 实验前大鼠禁食12 h, 自由饮水。腹腔注射40 mg/kg戊巴比妥麻醉后, 固定后颈、腹部剃毛, 碘伏消毒, 铺无菌单。颈部小切口切开, 找到颈外静脉, 行颈外静脉插管, 术中输液及静脉压测定用。腹部中线切开, 解剖出门静脉主干后, 经颈外静脉输注0.3%肝素溶液(3 mL/kg)。淤血再灌注损伤模型的建立: 显微血管夹夹闭门静脉主干, 45 min后开放门静脉血流。预处理模型的建立: 先行夹闭门静脉主干5 min, 开放5 min, 再次夹闭5 min, 开放5 min后, 阻断门静脉45 min, 然后开放门静脉血流。假手术模型: 仅仅作门静脉简单分离而不作门静脉血流阻断, 其他操作与前两组相同。造模结束后关闭腹腔, 拔除颈外静脉插管并缝合伤口。

1.2.2 大鼠分组及标本获取: 大鼠随机分为3组: 淤血组(淤血再灌注损伤模型大鼠)、预处理组(预处理模型大鼠)和对照组(假手术模型大鼠), 每组大鼠雌雄各半。各组获取标本分3个时间点: 0、12和24 h, 其中各组0 h时间点为开腹后即刻、处理门静脉前, 故3组标本合为一组($n = 6$), 各组12和24 h时间点各取6只大鼠完成实验, 并分别取标本。

1.2.3 门静脉血液标本的获取: 各组于大鼠开腹后即刻、处理门静脉前抽取门静脉血1 mL(0 h时间点), 同时经颈外静脉注入生理盐水1 mL; 造模后12和24 h分别在戊巴比妥麻醉下无菌开腹, 12和24 h抽取门静脉血1 mL, 同时注入生理盐水1 mL。抽取门静脉血肝素抗凝并立即1 000 r/min离心10 min, 提取血浆后-20 °C保持, 留待作内毒素和细胞因子检测。

1.2.4 小肠黏膜通透性检测: 本模型采用肠道内灌注荧光物质FD4、1 h后测定门静脉血液中

■ 相关报道

曹德权等报道了全肝血流阻断20 min, 血流再灌注后4 h肠黏膜屏障损伤明显; 朱春富报道了淤血预处理可对淤血再灌注损伤肠黏膜产生显著的保护作用, 其机制可能与减轻肠黏膜的氧化性损伤、降低组织中ICAM-1的表达和改善肠道微循环等因素有关。

■创新盘点

本文研究了淤血预处理对淤血再灌注损伤肠黏膜通透性的影响, 结果表明淤血预处理可对肠黏膜通透性产生保护作用。

表 1 3组大鼠不同时间点门静脉血FD4浓度 (mean \pm SD, $n = 6$, mg/L)

分组	0 h	12 h	24 h
对照组	0.095 \pm 0.016	0.098 \pm 0.013	0.107 \pm 0.015
淤血组	0.095 \pm 0.016	0.440 \pm 0.085 ^{bd}	0.621 \pm 0.074 ^{bd}
预处理组	0.095 \pm 0.016	0.270 \pm 0.040 ^{bdf}	0.391 \pm 0.070 ^{bdf}

^b $P < 0.01$ vs 对照组; ^d $P < 0.01$ vs 同组0 h; ^f $P < 0.01$ vs 淤血组。

表 2 3组大鼠不同时间点门静脉血内毒素浓度 (mean \pm SD, $n = 6$, EU/mL)

分组	0 h	12 h	24 h
对照组	0.048 \pm 0.019	0.062 \pm 0.013	0.056 \pm 0.019
淤血组	0.048 \pm 0.019	0.438 \pm 0.075 ^{bd}	0.636 \pm 0.064 ^{bd}
预处理组	0.048 \pm 0.019	0.303 \pm 0.035 ^{bdf}	0.452 \pm 0.048 ^{bdf}

^b $P < 0.01$ vs 对照组; ^d $P < 0.01$ vs 同组0 h; ^f $P < 0.01$ vs 淤血组。

表 3 3组大鼠不同时间点门静脉血TNF- α 浓度 (mean \pm SD, $n = 6$, ng/L)

分组	0 h	12 h	24 h
对照组	5.61 \pm 0.44	11.30 \pm 2.67	11.98 \pm 3.15
淤血组	5.61 \pm 0.44	72.11 \pm 7.66 ^{bd}	107.14 \pm 15.71 ^{bd}
预处理组	5.61 \pm 0.44	68.18 \pm 4.05 ^{bd}	73.38 \pm 5.37 ^{bdf}

^b $P < 0.01$ vs 对照组; ^d $P < 0.01$ vs 同组0 h; ^f $P < 0.01$ vs 淤血组。

FD4浓度的方法来定量检测肠黏膜的通透性^[6]。各组大鼠分别于0 h、造模后12、24 h分别结扎小肠远、近端和肾蒂血管, 从近端小肠向肠腔内注入0.2% FD4溶液5 mL, 1 h后抽取门静脉血1 mL, 肝素抗凝并立即1 000 r/min离心10 min, 取血浆, 采用荧光光度计测定血浆中FD4浓度。FD4检测激发波长为492 nm, 发射波长为515 nm。

1.2.5 内毒素测定: 采用鲎试剂偶氮基质显色法定量检测门静脉血内毒素浓度。实验中所用无菌物品皆经过去热原处理, 实验严格按照试剂盒说明书进行。主要步骤: 取标本100 μ L与鲎试剂50 μ L轻轻混匀, 置37 $^{\circ}$ C水浴25 min, 加入鲎三肽50 μ L, 37 $^{\circ}$ C水浴3 min, 取出后依次加入亚硝酸钠、氨基磺酸钠、苯乙胺各500 μ L, 混匀后于波长545 nm处比色, 根据标准曲线换算内毒素量。

1.2.6 细胞因子TNF- α 测定: 采用双抗体夹心法测定门静脉血TNF- α 浓度, 实验严格按照试剂盒说明书进行。主要步骤: 取标本50 μ L加入反应板, 充分混匀后37 $^{\circ}$ C温育60 min, 弃反应液、洗涤液冲洗干净, 分别加入显色液, 避光反应15 min, 加入终止液50 μ L, 充分混匀, 酶标仪450 nm处测定A值, 根据标准曲线换算TNF- α 量。

统计学处理 计量资料均采用mean \pm SD表示, 各组均数之间的比较采用One-way ANOVA, 相关性分析采用偏相关分析法(Partial Correlations), SPSS16.0统计软件进行统计分析, $P < 0.05$ 认为有统计学意义。

2 结果

2.1 肠黏膜通透性 3组资料12 h和24 h时间点比较, 淤血组和预处理组FD4值皆显著高于对照组(均 $P < 0.01$), 而预处理组FD4值显著低于淤血组($P < 0.01$); 各组内不同时间点比较, 对照组各FD4值差异无统计学意义($P > 0.05$), 淤血组和预处理组12、24 h时间点FD4值皆显著高于0 h(均 $P < 0.01$), 而24 h时间点FD4值皆显著高于12 h(均 $P < 0.01$)。结果表明, 小肠淤血性损伤后肠黏膜通

透性明显增大, 且随着时间的延长(24 h内)肠黏膜通透性进一步增大; 预处理尽管不能防止肠黏膜通透性的增大, 但可显著降低其增大的程度(表1)。

2.2 门静脉血内毒素浓度 3组资料12和24 h时间点比较, 淤血组和预处理组内毒素值皆显著高于对照组($P < 0.01$), 而预处理组内毒素值显著低于淤血组($P < 0.01$); 各组内不同时间点比较, 对照组各内毒素值差异无统计学意义($P > 0.05$), 淤血组和预处理组12、24 h时间点内毒素值皆显著高于0 h($P < 0.01$), 而24 h时间点内毒素值皆显著高于12 h($P < 0.01$)。结果表明, 小肠淤血性损伤后门静脉内毒素浓度显著增大, 且随着时间的延长(24 h内)内毒素浓度进一步增大; 预处理不能防止内毒素浓度的增大, 但可以显著降低其增大的程度(表2)。

2.3 门静脉血TNF- α 浓度 3组资料12 h和24 h时间点比较, 淤血组和预处理组TNF- α 值皆显著高于对照组($P < 0.01$), 12 h时间点预处理组与淤血组比较无统计学意义($P > 0.05$), 而24 h时间点预处理组显著低于淤血组($P < 0.01$); 各组内比较, 对照组在不同时间点内毒素浓度差异无统计学意义($P > 0.05$), 淤血组随着时间的延长, TNF- α 值逐步增大($P < 0.01$), 预处理组12与24 h时间点比较无统计学意义($P > 0.05$), 但皆显著高于0 h时间点($P < 0.01$)。结果提示, 小肠淤血性损伤导致血液中TNF- α 浓度显著升高, 且随着时间的延长(24 h内)TNF- α 浓度进一步增大, 而预处理在一

定程度上可以降低其升高的程度(表3)。

2.4 相关性分析 将上述3个指标进行相关性分析。控制TNF- α 变量情况下, 内毒素与FD4显著正相关($r = 0.9118, P < 0.01$); 控制内毒素变量情况下, TNF- α 与FD4无显著相关性($r = -0.1632, P = 0.504$); 控制FD4变量情况下, TNF- α 与内毒素无显著相关性($r = 0.4434, P = 0.057$)。结果表明门静脉血内毒素浓度随着肠黏膜通透性的增大而增大, 而门静脉血TNF- α 浓度与肠黏膜通透性、内毒素浓度无显著相关性。

3 讨论

长时间阻断肝门会导致严重的肠道淤血, 产生肠道缺血、缺氧性损伤; 血流恢复可进一步产生肠道的再灌注损伤^[2,3], 且这种淤血性损伤远重于缺血性损伤^[7]。肠道损伤可导致肠黏膜屏障功能障碍, 后者的重要表现之一即为肠黏膜通透性增高。研究表明, 早在肠黏膜形态学出现明显损伤变化之前肠通透性增高已经发生, 肠黏膜通透性增高可反映早期肠黏膜和肠屏障损伤的程度^[8,9]。肠道是体内最大的细菌和内毒素库, 肠黏膜通透性增高导致肠道细菌移位、肠源性内毒素血症, 进而导致体内系列炎性介质和细胞因子的产生, 激发全身炎症反应, 甚至诱发多脏器功能衰竭。因此, 肠道被认为是多器官功能衰竭的起源、外科应急条件下的中心器官^[10,11]。如何避免或减轻肠道的损伤、保持肠黏膜屏障功能的完整性一直是医学研究的重要课题。

研究表明, 在组织或器官经历长时间缺血前, 预先使其经历数次短时间的缺血(即预处理)则可增强其对长时间缺血的耐受力, 从而对缺血再灌注损伤的组织、器官产生一定的保护作用^[12]。预处理已经被证明具有普遍性。我们前期研究表明, 采用淤血预处理的方法可以显著减轻淤血再灌注损伤小肠黏膜损伤程度, 提示淤血预处理对于小肠的淤血再灌注损伤有明显的保护作用^[5], 同时发现其机制与淤血预处理减轻肠黏膜的氧化性损伤、降低组织中细胞间黏附分子1(intercellular adhesion molecule, ICAM-1)的表达和改善肠道微循环等因素有关^[5]。

在前期研究的基础上, 本文进一步研究淤血预处理对小肠黏膜通透性的影响。研究结果表明预处理组小肠黏膜通透性显著低于淤血组, 提示淤血预处理在减轻肠道淤血再灌注损伤的同时, 亦对肠黏膜通透性产生了显著的保护作用。同时发现, 预处理组门静脉血液内毒素浓度

亦显著低于淤血组, 且门静脉血内毒素浓度与肠黏膜通透性显著正相关。该结果表明, 一方面由于内毒素进入血液循环的量随着肠黏膜通透性的增加而增加, 另一方面预处理对肠黏膜屏障产生显著保护作用, 从而导致内毒素进入血液循环的量明显减少。进入血液循环的内毒素可激活巨噬细胞、中性粒细胞、血管内皮细胞和补体系统, 并进一步诱导炎性细胞因子的合成与释放^[13], 后者可引起肠黏膜的损伤和肠黏膜通透性增大。因此, 血液循环中内毒素浓度的降低既是预处理对肠黏膜屏障产生保护作用的结果, 又可能是其发挥肠黏膜保护作用的机制之一。

本研究发现, 预处理组血液循环中炎症介质TNF- α 浓度明显低于淤血组, 表明预处理可以减少促炎细胞因子的释放, 从而减轻淤血再灌注损伤大鼠的全身炎症反应。由于肠道损伤和肠源性内毒素血症可导致炎症介质的合成与释放^[14,15], 因此, 减轻肠道组织损伤程度^[5]和减轻内毒素血症可能是预处理降低淤血再灌注损伤大鼠炎症介质释放的重要机制。研究发现, 炎症介质亦是引起肠黏膜损伤的重要因素, TNF- α 则是参与肠缺血再灌注损伤的关键介质之一。研究表明, TNF- α 可通过多种途径直接或间接引起肠黏膜损伤^[13,16,17], 且与黏膜损伤的程度直接相关^[18]。同时, 降低TNF- α 水平可减轻肠黏膜损伤并因此而降低肠黏膜通透性^[19]。因此, 减少炎症介质的释放亦可能是预处理对肠黏膜屏障产生保护作用的重要机制。

4 参考文献

- 1 Arab HA, Sasani F, Rafiee MH, Fatemi A, Javaheri A. Histological and biochemical alterations in early-stage lobar ischemia-reperfusion in rat liver. *World J Gastroenterol* 2009; 15: 1951-1957
- 2 Tsuchida Y, Aoki N, Fukuda O, Nakano M, Igarashi H. Changes in hemodynamics in jejunal flaps of rabbits due to ischemia, venous congestion, and reperfusion as measured by means of colored microspheres. *Plast Reconstr Surg* 1998; 101: 147-154
- 3 朱春富, 刘胜利, 徐皓, 黄海, 高毅明. 大鼠小肠淤血再灌注损伤的实验研究. *中国血液流变学杂志* 2005; 15: 200-203
- 4 Wu R, Dong W, Ji Y, Zhou M, Marini CP, Ravikumar TS, Wang P. Orexigenic hormone ghrelin attenuates local and remote organ injury after intestinal ischemia-reperfusion. *PLoS One* 2008; 3: e2026
- 5 朱春富, 徐皓, 陈小平, 戚美芬, 纪俊标, 高翔, 孙立. 淤血预处理对大鼠小肠淤血再灌注损伤的保护作用. *南京医科大学学报(自然科学版)* 2008; 28: 513-517
- 6 Unno N, Wang H, Menconi MJ, Tytgat SH, Larkin V, Smith M, Morin MJ, Chavez A, Hodin RA, Fink MP. Inhibition of inducible nitric oxide synthase ameliorates endotoxin-induced gut mucosal barrier dysfunction in rats. *Gastroenterology* 1997; 113:

■应用要点

对于需要长时间阻断肝门的病例如肝移植、肝叶切除, 在阻断肝门前预先短时间阻断, 开放肝门数次, 然后再长时间阻断, 可以减轻肠道尤其是肠黏膜的损伤, 从而对手术后的肠道功能障碍或全身炎症反应综合征产生一定的预防作用。

■同行评价

本文科学性较好, 有一定的临床实际意义, 可以为临床工作提供试验依据。

- 1246-1257
- 7 Yano K, Hata Y, Matsuka K, Ito O, Matsuda H. Time limits for intestinal ischemia and congestion: an experimental study in rats. *Ann Plast Surg* 1994; 32: 310-314
- 8 Rotstein OD. Pathogenesis of multiple organ dysfunction syndrome: gut origin, protection, and decontamination. *Surg Infect (Larchmt)* 2000; 1: 217-223; discussion 223-225
- 9 董红林. 肠道通透性试验及其临床意义. 世界华人消化杂志 2000; 8: 562-563
- 10 Swank GM, Deitch EA. Role of the gut in multiple organ failure: bacterial translocation and permeability changes. *World J Surg* 1996; 20: 411-417
- 11 Wilmore DW, Smith RJ, O'Dwyer ST, Jacobs DO, Ziegler TR, Wang XD. The gut: a central organ after surgical stress. *Surgery* 1988; 104: 917-923
- 12 Murry CE, Jennings RB, Reimer KA. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation* 1986; 74: 1124-1136
- 13 高金生, 杨书良. 肠黏膜屏障损伤的原因与机制研究进展. 世界华人消化杂志 2009; 17: 1540-1544
- 14 何效东, 董家鸿. 外科危重病症与肠源性细菌/内毒素易位. 中华胃肠外科杂志 2001; 4: 270-272
- 15 Mitsuoka H, Schmid-Schönbein GW. Mechanisms for blockade of in vivo activator production in the ischemic intestine and multi-organ failure. *Shock* 2000; 14: 522-527
- 16 宋红丽, 吕飒, 马力, 李颖, 刘沛. TNF- α 影响肠黏膜上皮细胞间紧密连接蛋白的表达. 世界华人消化杂志 2004; 12: 1303-1306
- 17 Hokari R, Tsuzuki Y, Miura S. The role of TNF- α in ischemic disease of mesenteric venous systems. *J Gastroenterol* 2004; 39: 1120-1122
- 18 李春艳, 肖福大, 于明. 肠缺血/再灌注时肿瘤坏死因子免疫组织化学研究. 中华小儿外科杂志 2002; 23: 150-152
- 19 Suenae P, Bulteel V, Lemmens L, Noman M, Geypens B, Van Assche G, Geboes K, Ceuppens JL, Rutgeerts P. Anti-tumor necrosis factor treatment restores the gut barrier in Crohn's disease. *Am J Gastroenterol* 2002; 97: 2000-2004

编辑 曹丽鸥 电编 何基才

ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) CN 14-1260/R 2010年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

《世界华人消化杂志》外文字符标准

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

嗜酸乳杆菌对甲硝唑耐药幽门螺杆菌的抑制作用

斯庆图娜拉, 王江滨, 李岩, 张永贵, 李红艳

斯庆图娜拉, 王江滨, 李岩, 张永贵, 李红艳, 吉林大学中日联谊医院消化内科 吉林省长春市 130033

作者贡献分布: 此课题由王江滨设计; 研究过程由斯庆图娜拉、张永贵及李红艳完成; 论文写作由斯庆图娜拉与李岩完成。

通讯作者: 王江滨, 教授, 博士生导师, 主任医师, 130033, 吉林省长春市, 吉林大学中日联谊医院消化内科。

zrlwangjb@medmail.com.cn

收稿日期: 2010-07-22 修回日期: 2010-09-01

接受日期: 2010-09-13 在线出版日期: 2010-10-28

Inhibitory effect of *Lactobacilli acidophilus* on metronidazole-resistant *Helicobacter pylori*

Siqingtunala, Jiang-Bing Wang, Yan Li,
Yong-Gui Zhang, Hong-Yan Li

Siqingtunala, Jiang-Bing Wang, Yan Li, Yong-Gui Zhang, Hong-Yan Li, Department of Gastroenterology, China-Japan Union Hospital, Jilin University, Changchun 130033, Jilin Province, China

Correspondence to: Professor Jiang-Bing Wang, Department of Gastroenterology, China-Japan Union Hospital, Jilin University, Changchun 130033, Jilin Province, China. zrlwangjb@medmail.com.cn

Received: 2010-07-22 Revised: 2010-09-01

Accepted: 2010-09-13 Published online: 2010-10-28

Abstract

AIM: To investigate the inhibitory effects of *Lactobacilli acidophilus* on metronidazole-resistant *Helicobacter pylori* (*H.pylori*).

METHODS: Four metronidazole-sensitive *H.pylori* strains (including two standard strains) were used to induce metronidazole-resistant strains *in vitro*. The culture supernatant of *Lactobacilli acidophilus* was added to culture plates containing *H.pylori* strains. After micro-aerobic culture for 72 h at 37 °C, the diameter of inhibition rings was measured. *Lactobacilli acidophilus* culture was then added into the liquid cultures of *H.pylori* strains. The culture medium was sampled at different time points to count colonies and determine the activity of urease.

RESULTS: Metronidazole-resistant *H.pylori* strains were successfully induced. The inhibitory effects of test *Lactobacilli acidophilus* strains (L4 and L6) on metronidazole-resistant *H.pylori*

strains were more obvious than those of standard *Lactobacilli acidophilus* strain LA (904: 1.92 ± 0.32 , 1.95 ± 0.25 vs 1.25 ± 0.33 ; 906: 1.98 ± 0.31 , 2.11 ± 0.23 vs 1.42 ± 0.29 ; all $P < 0.05$). L4 and L6 strains in either solid or liquid culture conditions had apparent inhibitory effects on both metronidazole-resistant and -sensitive *H.pylori* strains.

CONCLUSION: *Lactobacilli acidophilus* (L4 and L6 strains) has apparent inhibitory effects on metronidazole-resistant *H.pylori* strains.

Key Words: *Helicobacter pylori*; Drug resistance; *Lactobacilli acidophilus*; Metronidazole

Siqingtunala, Wang JB, Li Y, Zhang YG, Li HY. Inhibitory effect of *Lactobacilli acidophilus* on metronidazole-resistant *Helicobacter pylori*. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(30): 3231-3235

摘要

目的: 探讨嗜酸乳杆菌对甲硝唑耐药 *H.pylori* 菌株的抑制作用。

方法: 选用4株甲硝唑敏感 *H.pylori* 菌株(其中2株为标准菌株)通过E-test法测定最低抑菌浓度(MIC)后进行体外诱导, 获得甲硝唑耐药 *H.pylori* 菌株。将嗜酸乳杆菌上清液加入含 *H.pylori* 菌株培养板的孔中, 37 °C微需氧培养72 h, 记录抑菌环。嗜酸乳杆菌菌液加入含 *H.pylori* 菌株的培养液中, 于不同时间点分别取培养液, 计算菌落数和测定尿素酶活性。

结果: 4株 *H.pylori* 菌株均诱导出甲硝唑耐药菌株。本研究室分离培养的抗 *H.pylori* 嗜酸乳杆菌L4和L6诱导耐药后的抑制效应明显大于标准菌株(LA), 差异有统计学意义(*H.pylori* 临床分离904: 1.92 ± 0.32 , 1.95 ± 0.25 vs 1.25 ± 0.33 ; 906: 1.98 ± 0.31 , 2.11 ± 0.23 vs 1.42 ± 0.29 ; 均 $P < 0.05$)。酸乳杆菌L4和L6在固体和液体培养条件下对甲硝唑耐药和非耐药 *H.pylori* 菌株均有明显的抑制作用, 与布氏肉汤组比差异有统计学意义($P < 0.05$)。

结论: 抗 *H.pylori* 嗜酸乳杆菌L4和L6对甲硝唑

■背景资料

幽门螺杆菌 (*H.pylori*) 是慢性胃炎、消化性溃疡以及胃癌等多种胃肠道疾病的主要致病因素, 近年随着根除 *H.pylori* 治疗的普及和抗生素不规范的应用, 细菌对抗生素耐药的现象日益严重, 这成为根除治疗失败的主要原因。因此寻找一种既有治疗和预防作用, 又不增加人群耐药性的治疗方法成为研究热点。

■同行评议者

陈卫昌, 教授, 苏州大学附属第一医院消化内科

■研发前沿

*H.pylori*的发现使人类对胃肠道疾病有了新的认识,*H.pylori*感染治疗的研究也成为*H.pylori*研究领域中的热点。

耐药*H.pylori*菌株也有明显的抑制作用。

关键词: 幽门螺杆菌; 耐药; 嗜酸乳杆菌; 甲硝唑

斯庆图娜拉, 王江滨, 李岩, 张永贵, 李红艳. 嗜酸乳杆菌对甲硝唑耐药幽门螺杆菌的抑制作用. 世界华人消化杂志 2010; 18(30): 3231-3235

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/3231.asp>

0 引言

幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *H.pylori*)感染与慢性胃炎、消化性溃疡以及胃癌等多种胃肠道疾病密切相关, 已是人们的共识^[1,2]。目前质子泵抑制剂(proton pump inhibitor, PPI)联合两种抗生素的三联疗法或在此基础上加用铋剂的四联疗法是国内外推荐的一线治疗方案^[3], 但随着根除治疗的普及和抗生素不规范的广泛应用, *H.pylori*对抗生素耐药的现象日益严重, 其中*H.pylori*对甲硝唑的耐药最为常见。根据我国2005年进行的全国16个省市的大规模*H.pylori*耐药菌株流行病学调查和治疗相关多中心临床研究报道*H.pylori*在不同地区对甲硝唑耐药率为50%-100%, 平均73.3%^[4], 因此*H.pylori*对抗生素的耐药已成为根除失败的主要原因^[5-8]。近年来对*H.pylori*耐药流行病学和耐药机制方面的研究较多, 但针对耐药*H.pylori*菌株的基础研究非常少, 因此研究耐药*H.pylori*菌株的非抗生素治疗具有重要意义。近年来有研究者发现嗜酸乳杆菌(*Lactobacilli acidophilus*)对预防和治疗*H.pylori*感染有较好的疗效^[9-11]。有研究发现嗜酸乳杆菌虽然不能完全根除*H.pylori*, 但可以抑制胃内*H.pylori*的繁殖、减轻炎症反应并明显减少应用抗生素所产生的不良反应, 从而提出嗜酸乳杆菌是否可用于抗生素耐药*H.pylori*的根除以及根除后再感染预防的新观点^[12,13]。本项工作是在课题组预先已经筛选到抗*H.pylori*嗜酸乳杆菌, 并已证实其的确可预防小鼠*H.pylori*感染以及根除后再感染的基础上, 体外诱导出甲硝唑耐药菌株, 观察抗*H.pylori*嗜酸乳杆菌对甲硝唑耐药*H.pylori*菌株的拮抗作用, 为*H.pylori*相关疾病的防治提供新的思路。

1 材料和方法

1.1 材料 *H.pylori*标准菌株SS1、NCTC11637由中国疾病预防控制中心诊断室张建中、何利华教授惠赠。临床分离株904、906、812为吉林省消化系病重点实验室分离培养的菌株。具体分

离培养方法: 取患者胃窦部和体部黏膜的活检组织放在0.9%氯化钠溶液中, 采用直接划线法接种于Skirrow's选择性培养基上, 37℃微需氧(50 mL/L O₂, 100 mL/L CO₂, 850 mL/L N₂)培养5 d, 对可疑菌落进行鉴定。*H.pylori*的鉴定方法: 经触酶试验、尿素酶试验、氧化酶试验均阳性。每次进行实验前, 复苏的*H.pylori*菌株都在布氏培养基上至少培养3代, 以保证*H.pylori*纯度及活力。

抗*H.pylori*嗜酸乳杆菌(L4、L6)是本研究室分离培养并筛选出来的保存菌株。嗜酸乳杆菌标准株(LA)购自广州市微生物研究所。嗜酸乳杆菌鉴定: 取乳白色, 表面光滑湿润菌落, 革兰氏染色阳性, 形态为长杆状, 单个、成双或短链状, 触酶实验、葡萄糖产气实验、硝酸盐还原试验阴性。糖发酵实验显示甘露糖、纤维二糖、半乳糖、乳糖、麦芽糖、蔗糖、棉子糖、蜜二糖、七叶苷阳性; 甘露醇、山梨醇、海藻糖、木糖、鼠李糖、阿拉伯糖、松三糖阴性。

1.2 方法

1.2.1 标准菌株及临床分离菌株甲硝唑耐药状况: 收取培养72 h的新鲜*H.pylori*于布氏肉汤中, 用分光光度计调整细菌浓度为 1×10^8 cfu/mL(1麦氏浊度), 吸取100 μL菌液, 滴加至MH培养皿上, 用L棒均匀涂开, 晾干后放置含甲硝唑的E-test试纸条, 于37℃微需氧(50 mL/L O₂, 100 mL/L CO₂, 850 mL/L N₂)环境中培养72 h, 在椭圆抑菌环与试纸条的交界处读取最小抑菌浓度(minimum inhibitory concentration, MIC)值。

1.2.2 甲硝唑耐药*H.pylori*菌株的制备: 选取对甲硝唑敏感的临床分离株和标准菌株在无抗生素的平板上培养3代后接种在1/2 MIC值的甲硝唑平板上培养72 h, 观察*H.pylori*生长情况。若*H.pylori*生长良好则接种至浓度为前次2倍的甲硝唑平板和无甲硝唑的平板上培养72 h, 继续观察*H.pylori*生长情况。重复上述步骤, 直至*H.pylori*停止生长或*H.pylori*诱导成高度耐药菌株。为了保证*H.pylori*选择性耐药的稳定性, 再次确定MIC值之前, 在无抗生素培养基中培养3代。*H.pylori*耐药的判定标准: 甲硝唑浓度>8 mg/L为耐药; >16 mg/L为中度耐药; >64 mg/L为高度耐药。

1.2.3 抗*H.pylori*嗜酸乳杆菌在固体培养条件下对甲硝唑耐药*H.pylori*的抑菌实验: (1)嗜酸乳杆菌上清液的制备: 将复苏、鉴定的嗜酸乳杆菌(L4、L6)置于MRS培养液中, 调整细菌浓度为 1×10^9 cfu/mL(2麦氏浊度), 取0.1 mL菌液分别接

种于5 mL MRS液体培养液中, 37 °C厌氧培养96 h, 1 000 r/min 4 °C离心后收集上清液, 0.22 μm膜过滤, 分别测pH值, -80 °C保存备用. (2)固体培养打孔法观察嗜酸乳杆菌对甲硝唑耐药*H.pylori*菌株抑制作用. 将不同*H.pylori*菌株分别接种于布氏肉汤中, 37 °C微需氧环境(50 mL/L O₂、100 mL/L CO₂、850 mL/L N₂)振荡培养48 h, 分离后弃上清, 应用生理盐水将*H.pylori*重新悬浮, 调整细菌浓度为2×10⁹ cfu/mL. 取0.5 mL菌液分别置于直径9 cm平板中央, 倾注冷却至40 °C左右的含小牛血清的布氏肉汤琼脂9.5 mL, 迅速混匀, 待凝固后于平板上均匀打出直径约为0.5 cm的4个孔, 并用琼脂封底. 将抗*H.pylori*嗜酸乳杆菌(L4、L6)和LA上清液分别加入到上述制备好的含*H.pylori*菌株培养板的孔中, 以含5%小牛血清的布氏培养液为对照. 37 °C微需氧培养3 d, 记录抑菌环.

1.2.4 抗*H.pylori*嗜酸乳杆菌在液体培养条件下对甲硝唑耐药*H.pylori*的抑菌实验: 500 μL含*H.pylori*菌株(浓度为10⁵ cfu/mL)的培养液中分别加入嗜酸乳杆菌菌液(L4、L6和LA, 浓度为2×10⁹ cfu/mL)1 500 μL同时以布氏肉汤作为对照, 37 °C微需氧振荡培养. 于培养72 h后取10 μL培养液进行不同浓度倍比稀释后分别接种于含小牛血清的布氏培养基上培养, 观察*H.pylori*生长情况并计算菌落形成单位. 菌落形成单位(cfu)=3个平皿上的平均菌落数×稀释倍数.

1.2.5 抗*H.pylori*嗜酸乳杆菌在液体培养条件下对甲硝唑耐药*H.pylori*尿素酶活性的抑制实验: 在500 μL含*H.pylori*菌株(浓度为10⁵ cfu/mL)的培养液中分别加入嗜酸乳杆菌菌液(L4、L6和LA, 浓度为2×10⁹ cfu/mL)1 500 μL, 同时以布氏肉汤作为对照, 37 °C微需氧振荡培养. 于培养后不同时间点(4、8、12、24 h)从各培养管中分别取出10 μL培养液, 加入1 mL反应液(含1 g/mL尿素和850 mg/L酚红), 室温反应1 h, 应用分光光度计550 nm下测A值.

统计学处理 实验数据mean±SD表示, 采用*t*检验, 用SPSS13.0统计软件处理.

2 结果

2.1 甲硝唑对不同*H.pylori*菌株的最小抑菌浓度 通过E-test法测定甲硝唑对*H.pylori*标准株和临床分离株的MIC值显示, 标准株(SS1、NCTC11637)和临床分离株(904、906)MIC值<8 mg/L, 为甲硝唑敏感株. 临床分离株812 MIC值

表1 甲硝唑对不同*H.pylori*菌株的MIC值(mg/L)

分组	<i>H.pylori</i> 标准株		<i>H.pylori</i> 临床分离株		
	SS1	NCTC11637	904	906	812
诱导耐药前	0.064	0.094	0.75	1.5	128
诱导耐药后	16	32	64	64	128

为128 mg/L, 为原发耐药菌株. 诱导耐药之前临床分离株的MIC值大于LA. 经甲硝唑诱导试验, 4株甲硝唑敏感菌株均诱导甲硝唑耐药菌株, 其中标准株SS1和NCTC11637诱导中耐药菌株, 而临床分离株则诱导高度耐药菌株(表1).

2.2 不同嗜酸乳杆菌菌株培养上清液在固体培养条件下对甲硝唑耐药*H.pylori*菌株的抑制效应 在固体培养基上通过打孔法观察嗜酸乳杆菌上清液对*H.pylori*菌株的抑制效应, 以含5%小牛血清的布氏肉汤为对照组, 结果发现嗜酸乳杆菌培养上清液无论对诱导耐药前*H.pylori*菌株还是诱导耐药后*H.pylori*菌株均有抑制作用, 其中本研究室分离培养的抗*H.pylori*嗜酸乳杆菌L4和L6的抑制效应明显大于LA, 差异有统计学意义(*P*<0.05). 对不同*H.pylori*菌株的抑制效应没有显著性差异(表2).

2.3 不同嗜酸乳杆菌在液体培养条件下对甲硝唑耐药*H.pylori*菌株的抑制效应 采用倍比稀释, 菌落计数法对混合培养液中*H.pylori*菌株的增殖状况进行检测, 结果表明, 混合培养24 h后抗*H.pylori*嗜酸乳杆菌(L4和L6)能明显降低*H.pylori*菌株的平均菌落计数单位. 其中本研究室分离出的嗜酸乳杆菌L4和L6对*H.pylori*增殖的抑制作用明显强于LA, 差异有统计学意义(*P*<0.05), 与固体培养条下抑菌环实验结果相一致. 说明嗜酸乳杆菌对诱导耐药前和诱导耐药后*H.pylori*菌株均有抑制作用, 对*H.pylori*标准菌株和临床分离株的抑制作用之间差异无统计学意义(图1).

2.4 不同嗜酸乳杆菌在液体培养条件下对甲硝唑耐药*H.pylori*尿素酶活性的抑制效应 在不同*H.pylori*菌株液体培养液中加入嗜酸乳杆菌L4和L6菌株进行混合震荡培养, 于培养的不同时间点(4、8、12、24 h)测定液体培养液中*H.pylori*的尿素酶活性, 以布氏肉汤为对照组. 结果表明, 嗜酸乳杆菌在混合培养4 h就能抑制耐药*H.pylori*菌株尿素酶活性, 随着培养时间的延长*H.pylori*尿素酶活性逐渐降低. 布氏肉汤对照组*H.pylori*尿素酶活性则随着培养时间的延长明显

■ 相关报道

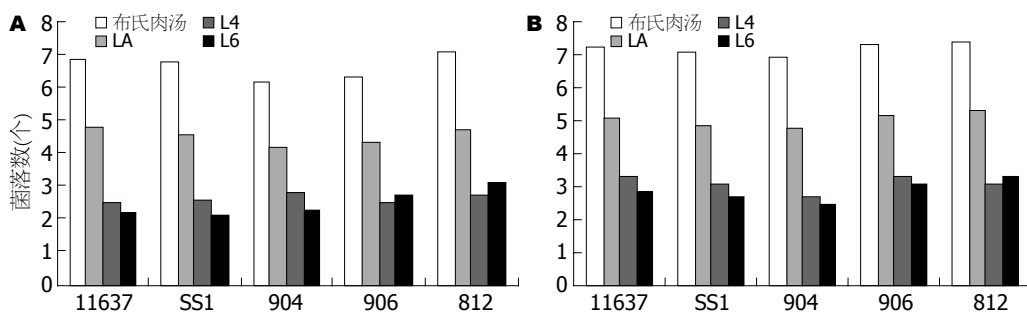
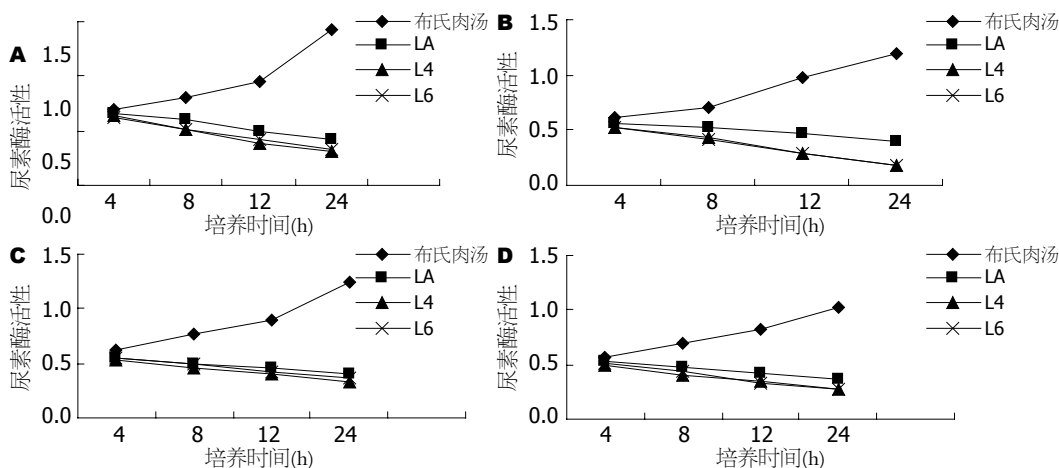
王锦鸿等筛选出2株抗*H.pylori*活性强的嗜酸乳杆菌菌株, 并通过体内动物实验证明抗*H.pylori*嗜酸乳杆菌菌株不仅可以预防小鼠感染*H.pylori*, 而且对于已经感染了*H.pylori*的小鼠也有一定的治疗作用.

■应用要点

通过观察抗 *H.pylori* 嗜酸乳杆菌对甲硝唑耐药 *H.pylori* 的抑制作用, 说明嗜酸乳杆菌除了调节肠道菌群、增强机体免疫力、降低血胆固醇等作用外, 还有抗 *H.pylori* 作用, 对耐药 *H.pylori* 菌株也有明显的抑制作用, 可用于难以根治的耐药菌株的治疗。

表 2 嗜酸乳杆菌上清液对不同 *H.pylori* 菌株的抑制效应 (mean \pm SD)

菌株	抑菌环直径(cm)		
	LA	L4	L6
<i>H.pylori</i> SS1			
诱导耐药前	1.41 \pm 0.32	2.26 \pm 0.17	2.30 \pm 0.24
诱导耐药后	1.45 \pm 0.42	2.11 \pm 0.32	2.07 \pm 0.43
<i>H.pylori</i> 11637			
诱导耐药前	1.47 \pm 0.31	2.15 \pm 0.21	2.06 \pm 0.26
诱导耐药后	1.35 \pm 0.41	2.09 \pm 0.39	2.25 \pm 0.20
<i>H.pylori</i> 临床分离904			
诱导耐药前	1.48 \pm 0.27	2.03 \pm 0.19	2.01 \pm 0.19
诱导耐药后	1.25 \pm 0.33	1.92 \pm 0.32	1.95 \pm 0.25
<i>H.pylori</i> 临床分离906			
诱导耐药前	1.60 \pm 0.19	2.06 \pm 0.19	2.02 \pm 0.18
诱导耐药后	1.42 \pm 0.29	1.98 \pm 0.31	2.11 \pm 0.23
<i>H.pylori</i> 临床分离812			
原发耐药菌株	1.06 \pm 0.24	1.89 \pm 0.14	1.86 \pm 0.21

图 1 嗜酸乳杆菌在液体培养条件下对不同 *H.pylori* 菌株的抑制效应. A: 非甲硝唑耐药菌株; B: 甲硝唑耐药菌株.图 2 嗜酸乳杆菌对不同 *H.pylori* 尿素酶活性的抑制效应. A: 诱导耐药前 *H.pylori*11637 菌株; B: 诱导耐药后 *H.pylori*11637 菌株; C: 诱导耐药前 *H.pylori*904 菌株; D: 诱导耐药后 *H.pylori*904 菌株.

增高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$, 图2).

3 讨论

H.pylori 的发现使人类对胃肠道疾病有了新的认识, *H.pylori* 感染治疗的研究也成为 *H.pylori* 研究

领域中的热点. 但随着抗生素根除 *H.pylori* 治疗的广泛应用, 耐药 *H.pylori* 菌株的发生率不断上升, *H.pylori* 根除率逐年下降. 反复根除治疗还可能破坏肠道正常菌群, 发生抗生素相关性腹泻, 甚至出现伪膜性肠炎等不良反应. 另一方面

耐药*H.pylori*菌株仍有一定的致病性, 患者临床症状不缓解或加重, 成为*H.pylori*感染治疗的难点, 因此耐药*H.pylori*菌株的研究也引起人们的普遍关注. 近年有研究报道嗜酸乳杆菌有提高“三联”或“四联”药物*H.pylori*根除率及减少药物不良反应等作用.

嗜酸乳杆菌是人体正常菌群的重要成员之一, 定植于胃肠道, 具有耐胃酸胆汁的特性. 田村明·他等^[14]报道, 胃内已定植乳酸菌的小鼠难以经口感染*H.pylori*; 已感染*H.pylori*的小鼠灌胃乳酸杆菌能使胃内*H.pylori*定植减少. 龙敏等^[15]分离并筛选出的具有明显拮抗*H.pylori*作用的嗜酸乳杆菌菌株, 本研究室从62株人源嗜酸乳杆菌中筛选出16株对*H.pylori*具有抑制效应的菌株, 其中2株(暂命名为L4和L6)抑制作用强并可以在模拟胃、十二指肠环境中存活, 而且毒性很小. 进一步研究还发现这2株抗*H.pylori*嗜酸乳杆菌与人SGC-7901胃癌细胞具有较强的黏附能力, 明显抑制*H.pylori*诱导SGC-7901细胞分泌的IL-1 β 、IL-6和IL-8; 通过动物实验证明抗*H.pylori*嗜酸乳杆菌可以预防*H.pylori*在小鼠胃黏膜上的定植并减轻*H.pylori*感染诱发的胃黏膜病理损伤^[16,17].

本研究在课题组前期工作的基础上, 选4株甲硝唑敏感*H.pylori*菌株在体外诱导出耐药菌株, 另选一株原发耐药*H.pylori*菌株, 通过体外实验观察嗜酸乳杆菌对甲硝唑耐药菌株是否也有拮抗作用. 结果发现无论在固体培养条件下还是液体培养条件下嗜酸乳杆菌对甲硝唑耐药*H.pylori*菌株具有明显的抑制作用. 3组实验均证明抗*H.pylori*嗜酸乳杆菌菌株(L4和L6)拮抗*H.pylori*作用明显强于LA). 从而为耐药*H.pylori*的治疗提供了新途径.

4 参考文献

- 1 Axon AT. Relationship between *Helicobacter pylori* gastritis, gastric cancer and gastric acid secretion. *Adv Med Sci* 2007; 52: 55-60
- 2 Makola D, Peura DA, Crowe SE. *Helicobacter pylori* infection and related gastrointestinal diseases. *J Clin Gastroenterol* 2007; 41: 548-558
- 3 胡伏莲, 胡品津, 刘文忠, 王继德, 吕农华, 萧树东, 张万岱, 成虹, 谢勇. 第三次全国幽门螺杆菌感染若干问题共识报告. *胃肠病学* 2008; 13: 42-46
- 4 中华医学会消化病学分会幽门螺杆菌学组/全国幽门螺杆菌科研协作组. 中国幽门螺杆菌耐药状况以及耐药对治疗的影响-全国多中心临床研究. *胃肠病学* 2007; 12: 525-528
- 5 Tanaka J, Fukuda Y, Shintani S, Hori K, Tomita T, Ohkusa T, Matsumoto T, Miwa H. Influence of antimicrobial treatment for *Helicobacter pylori* infection on the intestinal microflora in Japanese macaques. *J Med Microbiol* 2005; 54: 309-314
- 6 Khan S, Sharrack B, Sewell WA. Metronidazole-induced aseptic meningitis during *Helicobacter pylori* eradication therapy. *Ann Intern Med* 2007; 146: 395-396
- 7 Gu Q, Xia HH, Wang JD, Wong WM, Chan AO, Lai KC, Chan CK, Yuen MF, Fung FM, Wong KW, Lam SK, Wong BC. Update on clarithromycin resistance in *Helicobacter pylori* in Hong Kong and its effect on clarithromycin-based triple therapy. *Digestion* 2006; 73: 101-106
- 8 Yahav J, Samra Z, Niv Y, Evans CT, Passaro DJ, Dinari G, Shmueli H. Susceptibility-guided vs. empiric retreatment of *Helicobacter pylori* infection after treatment failure. *Dig Dis Sci* 2006; 51: 2316-2321
- 9 Hamilton-Miller JM. The role of probiotics in the treatment and prevention of *Helicobacter pylori* infection. *Int J Antimicrob Agents* 2003; 22: 360-366
- 10 Coconnier MH, Lievin V, Hemery E, Servin AL. Antagonistic activity against *Helicobacter* infection in vitro and in vivo by the human *Lactobacillus acidophilus* strain LB. *Appl Environ Microbiol* 1998; 64: 4573-4580
- 11 Kabir AM, Aiba Y, Takagi A, Kamiya S, Miwa T, Koga Y. Prevention of *Helicobacter pylori* infection by lactobacilli in a gnotobiotic murine model. *Gut* 1997; 41: 49-55
- 12 古賀泰裕. *Helicobacter pylori*にたいするプロバイオティクス療法. *臨床と微生物* 2003; 5: 85-88
- 13 神谷・茂. *Helicobacter pylori*感染症とプロバイオティクス. *日本細菌学雑誌* 2007; 62: 271-277
- 14 田村明・他, 古賀泰裕. プロバイオティクスによる*Helicobacter pylori*抑制効果. *いがくのあゆみ* 2003; 12: 845-849
- 15 龙敏, 龙北国, 别平华, 罗军. 体外拮抗幽门螺杆菌的人嗜酸乳杆菌菌株的选育. *中国微生物学杂志* 2000; 12: 317-319
- 16 王锦鸿, 王江滨, 李岩, 焦健, 张学英. 抗Hp嗜酸乳杆菌的筛选及其相关生物学特性的研究. *中国免疫学杂志* 2007; 23: 300-305
- 17 王锦鸿, 王江滨. 人嗜酸乳杆菌拮抗幽门螺杆菌及其对模拟胃肠道环境抗性的体外研究. *中华微生物学和免疫学杂志* 2007; 27: 633-635

■同行评价

本文科学性和可读性较好, 具有一定的研究价值.

编辑 曹丽鸥 电编 何基才

小剂量异丙酚联合舒芬太尼镇静/镇痛在食管静脉曲张套扎术中的应用

张慧伟, 李军祥, 吴俊超, 陈丽, 王晓

■背景资料

食管静脉曲张破裂出血是肝硬化患者最严重的并发症之一。自从内镜下食管静脉曲张套扎术(EVL)在临床上应用以来,已经发展成为治疗肝硬化食管静脉曲张的一种安全有效的方法。但是,内镜下进行套扎,患者常常存在剧烈的呕吐和呛咳反应,同时伴随有紧张、焦虑和恐惧感,这些因素可能会影响套扎的顺利进行和患者继续治疗的积极性。

张慧伟, 陈丽, 王晓, 四川大学华西医院麻醉科 四川省成都市 610041

李军祥, 川北医学院附属医院麻醉科 四川省南充市 637007
吴俊超, 四川大学华西医院消化内科 四川省成都市 610041

作者贡献分布: 本课题由王晓、张慧伟及李军祥设计; 实验由张慧伟与陈丽完成, 王晓与吴俊超协助; 数据分析由张慧伟与李军祥完成, 王晓修改; 论文写作由张慧伟完成, 王晓审核。

通讯作者: 王晓, 副教授, 610041, 四川省成都市, 四川大学华西医院麻醉科。wangxiao2005_1@hotmail.com

收稿日期: 2010-06-20 修回日期: 2010-08-05

接受日期: 2010-08-17 在线出版日期: 2010-10-28

Low-dose propofol combined with sufentanil for sedation/analgesia during endoscopic variceal ligation

Hui-Wei Zhang, Jun-Xiang Li, Jun-Chao Wu, Li Chen, Xiao Wang

Hui-Wei Zhang, Li Chen, Xiao Wang, Department of Anesthesiology, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, Sichuan Province, China

Jun-Xiang Li, Department of Anesthesiology, Affiliated Hospital of North Sichuan Medical College, Nanchong 637007, Sichuan Province, China

Jun-Chao Wu, Department of Gastroenterology, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, Sichuan Province, China

Correspondence to: Associate Professor Xiao Wang, Department of Anesthesiology, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, Sichuan Province, China. wangxiao2005_1@hotmail.com

Received: 2010-06-20 Revised: 2010-08-05

Accepted: 2010-08-17 Published online: 2010-10-28

Abstract

AIM: To evaluate the efficacy and safety of combined administration of low-dose propofol and sufentanil for sedation in cirrhotic patients undergoing endoscopic variceal ligation.

METHODS: Forty-six patients with cirrhosis scheduled for endoscopic variceal ligation were randomly allocated into general anesthesia group and conscious sedation group. The general anesthesia group was injected intravenously with fentanyl 1.5 µg/kg as well as propofol 1 mg/kg, and the endoscope was inserted after the eyelash reflex was lost and the patient was

unresponsive. The conscious sedation was given sufentanil 0.12 µg/kg as well as propofol 0.25-0.5 mg/kg, and the endoscope was inserted when an OAA/S score of 3 was achieved. Mean arterial pressure, pulse oxygen, and heart rate were recorded. The duration of endoscopy procedure and recovery time were also recorded.

RESULTS: In the conscious sedation group, no significant changes in mean arterial pressure, pulse oxygen and heart rate were noted after induction, whereas patients in the general anesthesia group suffered hypotension and hypoxemia that need intervention after induction (45.8% vs 4.5%, and 33.3% vs 9.1%, both $P < 0.05$). The recovery time in the conscious sedation group was shorter than that in the general anesthesia group (9.6 min ± 1.4 min vs 16.5 min ± 1.9 min, $P < 0.05$). There were no significant differences in the duration of endoscopy procedure and patient/doctor satisfaction between the two groups (all $P > 0.05$).

CONCLUSION: Low-dose propofol combined with sufentanil can provide better hemodynamic stability, less respiratory depression and shorter recovery time compared with general anesthesia in cirrhotic patients undergoing endoscopic variceal ligation.

Key Words: Propofol; Sufentanil; Esophageal varices; Ligation

Zhang HW, Li JX, Wu JC, Chen L, Wang X. Low-dose propofol combined with sufentanil for sedation/analgesia during endoscopic variceal ligation. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(30): 3236-3240

摘要

目的: 探讨小剂量异丙酚联合舒芬太尼用于肝硬化患者内镜下食管静脉曲张套扎术中镇静的安全性和有效性。

方法: 择期行胃镜下食管静脉曲张套扎术的患者46例, 随机分成全身麻醉组(G组)和清醒镇静组(S组)。G组给予芬太尼1.5 µg/kg, 异丙

■同行评议者

何松, 教授, 重庆医科大学附属第二医院消化内科

酚1 mg/kg, 待患者睫毛反射消失, 呼之不应时进行操作; S组给予舒芬太尼0.12 μ g/kg, 异丙酚0.25-0.5 mg/kg, 待患者OAA/S评分达3分时即进行操作. 记录患者的心率、血压、脉搏血氧饱和度, 同时记录胃镜操作时间、恢复时间、患者和内镜医师满意度评分以及术中、术后不良反应.

结果: S组患者血压、脉搏血氧饱和度、心率在诱导后无明显变化, 而G组的低血压、低氧血症的发生率明显高于S组(45.8% vs 4.5%, 33.3% vs 9.1%, 均 $P<0.05$); S组的恢复时间明显短于G组(9.6 min \pm 1.4 min vs 16.5 min \pm 1.9 min, $P<0.05$), 两组的操作时间, 患者和内镜医师满意度评分无明显差异($P>0.05$).

结论: 小剂量异丙酚联合舒芬太尼能安全有效地用于肝硬化患者内镜下食管静脉曲张套扎术, 患者具有较好的血流动力学稳定性和较少的呼吸抑制.

关键词: 异丙酚; 舒芬太尼; 食管静脉曲张; 套扎

张慧伟, 李军祥, 吴俊超, 陈丽, 王晓. 小剂量异丙酚联合舒芬太尼镇静/镇痛在食管静脉曲张套扎术中的应用. 世界华人消化杂志 2010; 18(30): 3236-3240

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/3236.asp>

0 引言

食管静脉曲张是肝硬化门脉高压最常见的并发症之一, 曲张静脉破裂出血的病死率高达30%-50%, 再出血的发生率为30%^[1,2]. 内镜下食管静脉曲张套扎术(endoscopic variceal ligation, EVL)自1986年问世以来, 已经成为一种安全有效的一线治疗方法^[3,4]. 但内镜下治疗通常比普通的胃镜检查刺激更大, 如果仅在咽喉部表面麻醉下操作, 患者反应剧烈, 加之患者极度紧张和恐惧导致机体强烈的应激反应, 使患者体内儿茶酚胺类激素水平显著升高, 诱发曲张静脉破裂出血和严重的心脑血管并发症^[5]. 无痛内镜下EVL, 患者舒适, 为内镜医师提供了良好的操作条件, 患者和内镜医师满意度较高^[6,7]. 但是, 由于全身麻醉下患者的意识和气道保护性反射消失, 一旦术中出现治疗失败, 曲张静脉破裂出血, 极易导致反流误吸危及生命. 清醒镇静是介于浅镇静(抗焦虑)和深镇静之间的一种镇静状态, 在这种镇静水平, 患者的意识得到一定程度的抑制, 同时能够对于言语指令做出反应, 而且患者的气道保护性反射存在, 循环功能基本正常, 因此在临床中应用十分广泛^[8]. 本研究通过与传统的全身麻

醉比较, 探讨舒芬太尼联合小剂量异丙酚清醒镇静用于EVL的安全性及有效性.

1 材料和方法

1.1 材料 美国麻醉医师协会(american society of anesthesiologists, ASA)分级II-III级, Child-Pugh分级B-C级, 年龄18-75岁, 择期行EVL的肝硬化患者46例. 排除标准: 有严重的心肺疾病及肾功能不全; 有精神心理疾病; 有阿片类药物和镇静药依赖; 有相关药物过敏. 采用Excel随机数字表随机分成全身麻醉组(G组)和清醒镇静组(S组), G组24例, 男18例, 女6例, 年龄50.9岁 \pm 12.3岁, 体质量56.8 kg \pm 8.5 kg, ASA分级II级19例, III级5例, Child-Pugh分级B级16例, C级8例; S组22例, 男14例, 女8例, 年龄51.8岁 \pm 13.1岁, 体质量58.2 kg \pm 8.6 kg, ASA分级II级18例, III级4例, Child-Pugh分级B级15例, C级7例. 两组的年龄、体质量、性别、ASA分级和Child-Pugh分级无统计学差异.

1.2 方法

1.2.1 麻醉: 每例患者在麻醉准备间开放右上肢静脉通路, 在检查前5 min含服利多卡因凝胶. 患者入胃镜室后左侧卧位于检查车上, 常规以8 L/min流量面罩吸氧, 同时连接各项监测. S组: 患者首先静脉给予舒芬太尼0.12 μ g/kg, 2 min后给予异丙酚0.25-0.5 mg/kg, 待患者意识状态达到Observer's Assessment of Alertness/Sedation (OAA/S, 表1)评分3分时, 即可进行胃镜检查, 术中根据患者情况追加异丙酚. G组: 静脉给予芬太尼1.5 μ g/kg, 2 min后缓慢静注异丙酚0.8-1.0 mg/kg(时间>60 s), 待患者睫毛反射消失, 呼之不应时, 我们则认为患者达到全身麻醉状态, 此时即可进行检查, 术中根据情况每次给予异丙酚10 mg, 以保证患者不动. 术中患者心率(heart rate, HR)<每分钟50次给予阿托品0.2-0.5 mg, 血压(blood pressure, BP)<80/50 mmHg时给予麻黄碱6-12 mg, 脉搏血氧饱和度(pulse oxygen saturation, SpO₂)<90%时, 则托下颌, 必要时行辅助通气.

1.2.2 内镜操作: 所有患者的EVL术均由一名有丰富套扎操作经验的内镜医师在Olympus电子胃镜下完成, 采用天津天医公司生产的6环连发套扎器. 首先, 按常规方法插入胃镜, 以确定有无静脉曲张以及观察曲张静脉的部位, 数目和曲张程度, 然后退出胃镜, 安装套扎器后再次插入胃镜, 对准曲张静脉进行套扎, 根据曲张程度可以套扎4-12点.

1.2.3 监测指标: 术中连续监测无创血压(nonin-

■研发前沿

探求新的镇静方法, 使肝硬化患者既能够舒适的完成EVL, 同时又不致于导致明显的呼吸抑制和剧烈的血流动力学变化是麻醉医生的目标. 清醒镇静是目前门诊内镜麻醉与镇静研究中的热点和重点.

■相关报道

睫毛反射消失长期以来被作为全身麻醉诱导的终点, Mourisse等使用异丙酚麻醉/镇静时并通过BIS监测患者的麻醉/镇静深度, 他们发现随着异丙酚的效应室浓度的增加, 患者的电诱发的瞬目反射和OAA/S镇静深度评分之间存在很强的相关性.

■创新盘点

有关肝硬化患者在EVL术中镇静问题,国内以芬太尼联合异丙酚全身麻醉为主,欧美国家则由内镜医师给予咪达唑仑联合喉罩行清醒镇静为主,二者均不能很好的同时解决舒适与安全问题。本研究联合使用短效的异丙酚和强效的镇痛药舒芬太尼对肝硬化患者在EVL时实施清醒镇静,不但效果确切,而且安全性也较高。

表 1 OAA/S评分

评分	语音	面部表情	眼睛	反应性
5(警觉)	正常	正常	清澈,无眼睑下垂	对正常语调呼名反应快
4	稍减慢或含糊	稍微放松	凝视或眼睑轻度下垂	对正常语调呼名反应冷漠
3	不清或明显变慢	明显放松	凝视或眼睑明显下垂	仅对大声或反复呼名有反应
2	吐词不清			仅对挤压三角肌有反应
1(深睡眠)				对挤压三角肌无反应

vative blood pressure, MAP), SpO₂, HR, 并每隔1 min通过OAA/S评分系统评估患者的意识状态。观察并记录麻醉前,诱导后即刻,套扎时,退镜时4个时点的生命体征(MAP, SpO₂, HR)和操作时间(从第1次进镜开始到套扎结束退镜),术毕所有患者送麻醉恢复室进行监护。记录恢复时间(从操作结束到患者Aldrete评分达9分,表2),以及苏醒期不良反应。在术毕对内镜医师满意度进行视觉模拟评分法(visual analogue scales, VAS)(0-10, 0为最不满意, 10为非常满意),术毕24 h内随访患者是否发生麻醉相关的不良反应并对患者满意度进行VAS评分。

统计学处理 所有数据采用SPSS13.0统计软件进行处理。计量资料采用mean±SD表示,组内比较采用重复测量的方差分析,组间比较采用两独立样本的t检验;计数资料采用非参数秩和检验。以P<0.05表示有统计学意义。

2 结果

2.1 术中呼吸循环参数 G组患者在麻醉诱导后MAP, SpO₂都降低,与术前比较,下降明显(P<0.05),随后逐渐恢复至术前水平,而HR无明显改变;S组患者诱导后的MAP, SpO₂, HR与术前比较均无统计学意义(表3)。

2.2 患者的恢复时间和操作时间 两组的操作时间几乎相同(9.0 min±1.2 min vs 8.9 min±1.7 min),但S组的恢复时间明显短于G组(9.6 min±1.4 min vs 16.5 min±1.9 min, P<0.05)。

2.3 麻醉期间的不良反应 G组的低血压和低氧血症的发生率明显高于S组,而S组呕吐反射和进镜时呛咳的发生率高于G组(表4)。

2.4 患者满意度和内镜医师满意度评分 G组的患者和内镜医师满意度VAS评分为(9.0±0.3)分和(9.2±0.5)分,而S组分别为(8.9±0.4)分和(9.0±0.4)分,两组比较无统计学差异。

3 讨论

EVL是预防和治疗肝硬化食管静脉曲张破裂出血

表 2 Aldrete评分系统

分类	描述	评分
意识	完全清醒,定位准确	2
	能够唤醒	1
	无反应	0
活动度	能够按要求移动四肢	2
	能够移动两个肢体	1
	肢体不能移动	0
呼吸	能够进行深呼吸和咳嗽	2
	呼吸受限和呼吸浅快	1
	呼吸暂停	0
循环	血压变化为麻醉前的±20%	2
	血压变化为麻醉前的±20%~49%	1
	血压变化为麻醉前的±50%	0
脉搏氧饱和度	吸空气SpO ₂ >92%	2
	需要给氧才能维持SpO ₂ >92%	1
	给氧后SpO ₂ 仍然<92%	0
满分		10

血的一种有效方法^[3]。无痛胃镜下行EVL,不但可以缓解患者的焦虑和恐惧感,使患者有更好的依从性,而且有利于内镜医师进行检查和治疗,增加成功率,在我国应用十分广泛^[6,7]。但是,深镇静或者全身麻醉下,患者的呼吸道保护性反射消失,有高度反流误吸的风险,而且容易导致心肺方面的并发症^[9]。因此,清醒镇静可能更适合这类患者。

异丙酚起效快,苏醒迅速而完全,但是异丙酚对呼吸和循环有一定的抑制作用,且与剂量相关,异丙酚与阿片类药物具有协同作用,可以减少其用量,从而减少药物的不良反应^[10-12]。舒芬太尼镇痛效果强,起效快,治疗指数大,是阿片类中最安全的一种镇痛药。在本研究中,我们使用了小剂量的异丙酚(<0.5 mg/kg)用于镇静,同时复合0.12 μg/kg的舒芬太尼实施清醒镇静,患者比使用异丙酚全身麻醉具有更好的血流动力学稳定性和更少的呼吸抑制。因此,我们认为,对于一般情况较差的患者,小剂量的异丙酚足以达到缓解焦虑和镇静的目的,而且避免了全

表 3 2组患者各个时点的呼吸循环参数

参数	分组	麻醉前	诱导后	套扎时	结束时
MAP(mmHg)	G组	82 ± 11	55 ± 4 ^a	65 ± 5 ^a	77 ± 8
	S组	81 ± 9	79 ± 11 ^c	77 ± 12 ^c	79 ± 12
HR(次/min)	G组	77 ± 19	75 ± 14	77 ± 17	79 ± 15
	S组	79 ± 15	76 ± 15	81 ± 18	79 ± 17
SpO ₂ (%)	G组	99 ± 1	92 ± 4 ^a	95 ± 4 ^a	97 ± 2
	S组	99 ± 1	99 ± 2 ^c	99 ± 2 ^c	99 ± 2

^a*P*<0.05 vs 麻醉前; ^c*P*<0.05 vs G组.

表 4 2组麻醉期间的不良反应

不良反应	G组		S组	
	<i>n</i>	发生率(%)	<i>n</i>	发生率(%)
低血压	11/24	45.8	1/22	4.5 ^a
低氧血症	8/24	33.3	2/22	9.1 ^a
呕吐反射	1/24	4.2	2/22	9.1
进镜时呛咳	1/24	4.2	2/22	9.1

^a*P*<0.05 vs G组.

身麻醉引起的剧烈血流动力学波动以及严重的低氧血症. 而且, 小剂量的异丙酚具有良好的遗忘和镇静作用, 在此剂量下的异丙酚对呼吸循环干扰小, 患者恢复迅速, 这可能是S组患者离院时间明显短于G组的主要原因, 从患者安全角度来看, 比全身麻醉更具有优势.

术中患者出现呕吐反射和剧烈呛咳是麻醉医师和内镜医师共同关注的焦点, 术中呕吐反射和剧烈呛咳不仅会影响内镜医师的操作, 而且有可能导致套扎失败, 甚至曲张静脉破裂出血. 舒芬太尼通过影响下丘脑血管运动中枢和交感神经的兴奋性, 降低血浆儿茶酚胺、β-内啡肽和抗利尿激素水平, 从而抑制应激反应, 同时舒芬太尼还可以抑制咽部传入神经冲动^[13]. 因此, 在进镜时患者不会有明显的咽部不适, 同时吞咽和咳嗽等气道保护性反射存在, 有效地避免了反流误吸的发生. 但是在S组分别有2例患者在进镜时出现呕吐反射和轻微呛咳反应, 而且在术后随访发现患者对整个操作过程有记忆, 对于这些患者来说, 镇静/镇痛可能不足.

尽管如此, 肝硬化患者由于一般情况较差, 同时并存有低蛋白血症和慢性贫血等并发症, 使得其对麻醉药物的耐受力减弱. 在本研究中, 即使采用了小剂量的异丙酚和舒芬太尼, 仍然有2例患者出现了低氧血症和1例低血压, 因此,

在临床中, 我们仍然需要密切监测患者的呼吸循环变化, 尤其是ASA分级≥III级的患者.

虽然以往的研究表明, 异丙酚联合阿片类药物深度镇静或者全身麻醉用于EVL取得了良好的效果, 患者和内镜医师满意度均比较高^[7,14]. 但是, 本研究提示小剂量异丙酚联合舒芬太尼清醒镇静能安全有效地用于EVL, 患者和内镜医师满意度与全身麻醉组相比无明显统计学意义. 因此, 对于这些体质较差, 有反流误吸高度危险的患者, 清醒镇静无疑是一种更好的选择.

脑双频指数(bispectral index, BIS)作为一种镇静深度的监测手段, 近年来在全身麻醉和镇静中应用日益广泛^[8], 但是由于其高昂的价格, BIS监测在门诊麻醉的应用受到了一定的限制. 因此, 在本研究中我们并没有使用BIS来监测患者的麻醉或镇静深度, 而是每隔1 min通过OAA/S评分来评估患者的意识状态. 以往的研究证明, OAA/S评分在评价患者的意识状态中的作用是值得肯定的, 而且, 他和BIS之间具有较高的相关性^[15,16].

总之, 本研究联合使用短效的异丙酚和强效的镇痛药舒芬太尼对肝硬化患者在EVL时实施清醒镇静, 不但效果确切, 安全性高, 而且简单方便, 在内镜镇静中值得推广.

4 参考文献

- Bornman PC, Krige JE, Terblanche J. Management of oesophageal varices. *Lancet* 1994; 343: 1079-1084
- Terblanche J, Krige JE, Bornman PC. Endoscopic sclerotherapy. *Surg Clin North Am* 1990; 70: 341-359
- Van Stiegmann G, Cambre T, Sun JH. A new endoscopic elastic band ligating device. *Gastrointest Endosc* 1986; 32: 230-233
- Qureshi W, Adler DG, Davila R, Egan J, Hirota W, Leighton J, Rajan E, Zuckerman MJ, Fanelli R, Wheeler-Harbaugh J, Baron TH, Faigel DO. ASGE Guideline: the role of endoscopy in the management of variceal hemorrhage, updated July 2005. *Gastrointest Endosc* 2005; 62: 651-655
- Cohen LB, Hightower CD, Wood DA, Miller KM,

■应用要点

本研究联合使用短效的异丙酚和强效的镇痛药舒芬太尼对肝硬化患者在EVL时实施清醒镇静, 不但效果确切, 安全性高, 而且简单方便, 在内镜镇静中具有较好的应用前景.

■同行评价

本文新颖性一般,有一定的临床指导意义。

- Aisenberg J. Moderate level sedation during endoscopy: a prospective study using low-dose propofol, meperidine/fentanyl, and midazolam. *Gastrointest Endosc* 2004; 59: 795-803
- 6 王彩艳, 徐红, 王丽波, 孙岩, 张建广, 徐为然, 药云波. 静脉麻醉在食管胃底静脉曲张内镜诊疗术中的临床应用(附80例报告). *吉林医学* 2006; 27: 1004-1006
- 7 罗俊, 吴俊超, 王晓, 王维. 表面或静脉麻醉下经胃镜食管静脉曲张结扎术患者的利弊比较. *中国内镜杂志* 2005; 11: 792-794
- 8 Waring JP, Baron TH, Hirota WK, Goldstein JL, Jacobson BC, Leighton JA, Mallery JS, Faigel DO. Guidelines for conscious sedation and monitoring during gastrointestinal endoscopy. *Gastrointest Endosc* 2003; 58: 317-322
- 9 Arrowsmith JB, Gerstman BB, Fleischer DE, Benjamin SB. Results from the American Society for Gastrointestinal Endoscopy/U.S. Food and Drug Administration collaborative study on complication rates and drug use during gastrointestinal endoscopy. *Gastrointest Endosc* 1991; 37: 421-427
- 10 廖元江, 梅浙川, 刘永军, 陈玉培, 何璐, 吴素华, 沈薇. 瑞芬太尼联合异丙酚用于无痛苦胃镜检查的最佳剂量的研究. *第三军医大学学报* 2007; 29: 1545-1546
- 11 Mertens MJ, Olofsen E, Engbers FH, Burm AG, Bovill JG, Vuyk J. Propofol reduces perioperative remifentanyl requirements in a synergistic manner: response surface modeling of perioperative remifentanyl-propofol interactions. *Anesthesiology* 2003; 99: 347-359
- 12 周少丽, 马武华, 陈秉学. 异丙酚对心血管系统的影响. *国外医学·麻醉学与复苏分册* 2002; 23: 329-331
- 13 张希艳, 王晓, 王宏伟, 宋华勇, 刘进. 舒芬太尼复合咪唑安定清醒镇静用于老年患者胃镜检查时最佳配伍剂量的研究. *华西医学* 2008; 23: 498-499
- 14 黄唯, 王安, 梁华敏, 郭婷婷, 郑梅兰. 芬太尼联合异丙酚在食管静脉曲张套扎中的有效性和安全性分析. *广东医学院学报* 2009; 27: 139-141
- 15 Barakat AR, Sutcliffe N, Schwab M. Effect site concentration during propofol TCI sedation: a comparison of sedation score with two pharmacokinetic models. *Anaesthesia* 2007; 62: 661-666
- 16 Mourisse J, Lerou J, Zwarts M, Booi L. Electromyographic assessment of blink reflexes correlates with a clinical scale of depth of sedation/anaesthesia and BIS during propofol administration. *Acta Anaesthesiol Scand* 2004; 48: 1174-1179

编辑 曹丽鸥 电编 何基才

ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) CN 14-1260/R 2010年版权归世界华人消化杂志

● 消息 ●

《世界华人消化杂志》修回稿须知

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

1 修回稿信件

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

2 稿件修改

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

3 版权

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

咳嗽与非咳嗽胃食管反流病的比较

陈维顺, 罗虹雨, 周婷

陈维顺, 罗虹雨, 周婷, 湖南省株洲市一医院消化内科 湖南省株洲市 412000

作者贡献分布: 此课题由陈维顺设计; 研究过程由陈维顺、罗虹雨及周婷完成; 资料收集、总结及论文撰写由陈维顺完成。

通讯作者: 陈维顺, 主任医师, 412000, 湖南省株洲市车站路23号, 株洲市一医院消化内科. chen8242123@sina.com

电话: 0731-28203211

收稿日期: 2010-08-01 修回日期: 2010-09-03

接受日期: 2010-09-13 在线出版日期: 2010-10-28

Comparative analysis of gastroesophageal reflux disease in patients with and without cough

Wei-Shun Chen, Hong-Yu Luo, Ting Zhou

Wei-Shun Chen, Hong-Yu Luo, Ting Zhou, Department of Gastroenterology, the First Hospital of Zhuzhou, Zhuzhou 412000, Hunan Province, China

Correspondence to: Wei-Shun Chen, Department of Gastroenterology, the First Hospital of Zhuzhou, Zhuzhou 412000, Hunan Province, China. chen8242123@sina.com

Received: 2010-08-01 Revised: 2010-09-03

Accepted: 2010-09-13 Published online: 2010-10-28

Abstract

AIM: To compare the clinical features of gastroesophageal reflux disease (GERD) between patients with and without cough.

METHODS: The clinical data for 42 GERD patients with cough and 30 GERD patients without cough, who were positive for 24-h esophageal pH and bile monitoring, were analyzed in this study.

RESULTS: The majority of GERD patients with cough had irritating cough. Of all the GERD patients with cough, 76.2% (32/42) had throat discomfort, such as foreign body sensation, pharyngeal itching, and sound dumb, and 69.0% (29/42) had substernal discomfort, such as feeling of chest tightness, chest congestion and chest pain. Typical reflux symptoms such as acid reflux, heartburn and upper abdominal pain were seen only in 11.9% (5/42), 19.0% (8/42) and 9.5% (4/42) of the patients, respectively. There was a significant difference in symptoms between GERD patients with and without cough ($P <$

0.05). No significant differences were noted in the reflux time and reflux contents between the two groups of patients ($P > 0.05$). After acid suppression therapy, the symptoms were relieved or disappeared in 14 d in 73.8% of patients with cough and in 90.0% of patients without cough. There is a significant difference in the percentage of patients achieving symptom improvement between the two groups ($P < 0.05$).

CONCLUSION: GERD patients with cough have unique clinical features. Besides cough, the majority of GERD patients with cough have no typical reflux symptoms. GERD patients with cough are less responsive to acid suppression treatment than those without cough.

Key Words: Gastroesophageal reflux cough; Diagnosis; Treatment; 24-h esophageal pH monitoring; 24-h esophageal bile monitoring

Chen WS, Luo HY, Zhou T. Comparative analysis of gastroesophageal reflux disease in patients with and without cough. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(30): 3241-3244

摘要

目的: 探讨咳嗽与非咳嗽胃食管反流病(GERD)的临床特征, 比较两者的差异, 为GERD的诊治提供临床理论依据。

方法: 对65例伴有咳嗽的患者(呼吸科申请者58例)进行了24 h食管pH及胆汁反流监测, 取其中42例监测结果阳性者作为观察组。另取同期24 h食管pH及胆汁监测阳性, 不伴咳嗽的30例GERD患者进行对照。

结果: (1)本组GERC的咳嗽多为刺激性干咳, 76.2%(32/42)的患者伴有咽喉部的不适, 如咽内异物感、咽痒、咽干, 声音嘶哑等不适, 69.0%(29/42)有胸骨后不适, 如胸闷、胸骨后阻塞感、胸骨后疼痛等, 但其他较典型的反流症状较少如反酸仅11.9%(5/42)、烧心19.0%(8/42)、上腹痛9.5%(4/42), 其临床症状与无咳嗽的GERD比较有显著性差异($P < 0.05$); (2)24 h食管pH及胆汁反流监测, 两组反流时间及反

■背景资料

胃食管反流病(GERD)是临床常见病, 其不但引起反酸、烧心等食管相关症状, 而且有食管外表现, 其中咳嗽是GERD常见的食管外症状, 称其为胃食管反流性咳嗽(GREC)。由于其与支气管炎、肺炎等所致的急慢性咳嗽不易鉴别, 临床常易误诊误治。

■同行评议者

施诚仁, 教授, 上海交通大学医学院附属新华医院小儿外科; 沈薇, 教授, 重庆医科大学附属第二医院消化内科

■相关报道

Merati等学者认为,GERC的发病机制一方面是反流物直接刺激咽喉及食管,另一方面是反流物增加了气管敏感性,导致轻微的有害刺激即可引起咳嗽。因此,气道反应性高可能是GERC的发病基础。

流物性质无显著差别($P>0.05$);(3)14 d的抑酸治疗,咳嗽组73.8%的患者症状减轻或消失,非咳嗽组90.0%的患者症状减轻或消失,两组比较有显著性差异($P<0.05$)。提示GERC的治疗效果不及非咳嗽患者,特别是治疗无效者较多。

结论:GERC有其独特的临床特征,部分患者除咳嗽外,其反流症状不典型,而且其治疗效果也不及典型的胃食管反流病。

关键词:胃食管反流性咳嗽;诊断;治疗;食管24 h动态pH监测;食管24 h动态胆汁监测

陈维顺, 罗虹雨, 周婷. 咳嗽与非咳嗽胃食管反流病的比较. 世界华人消化杂志 2010; 18(30): 3241-3244

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/3241.asp>

0 引言

关于胃食管反流病(gastroesophageal reflux disease, GERD)相关的食管和食管外表现的研究越来越多,研究证实GERD可单独或与其他原因共同导致慢性咳嗽,称胃食管反流性咳嗽(gastroesophageal reflux cough, GREC)。流行病学研究发现其引起慢性咳嗽的发生率为5%-41%,是引起成年人慢性咳嗽的最常见原因之一^[1-3]。但GERC的临床误诊率极高,大多以感染性咳嗽进行治疗,疗效不佳。为进一步提高对GERC的认识,本文对湖南省株洲市一医院42例经24 h食管pH监测诊断为GERC的患者进行临床分析,并与无咳嗽的GERD进行比较,现将结果报告如下。

1 材料和方法

1.1 材料 2009-01/2010-05湖南省株洲市一医院对65例伴有咳嗽的患者(呼吸科申请者58例)进行了24 h食管pH监测,其中42例监测结果为阳性,男13例,女29例,年龄22-65(平均 32.2 ± 6.7)岁(观察组)。另取同期24 h食管pH监测阳性,但不伴咳嗽的30例GERD患者(消化内科申请)进行对照。男11例,女19例,年龄19-63(平均 34.1 ± 7.2)岁。

1.2 方法

1.2.1 症状记录:在对患者进行食管内24 h动态pH监测前以表格形式记录其病程、临床症状、症状发生时间及程度等。

1.2.2 24 h食管动态pH及胆红素监测:应用Synectics Digitrapper便携式pH监测仪和Synectics Bilitec 2000胆汁监测仪(Medtronic Functional Diagnostics A/S公司)进行食管内24 h动态pH和胆汁监测,检查前禁食8-12 h,将校

表 1 两组患者反流症状的比较 (n)

分组	n	反酸	烧心	胸骨后痛 或不适	咽内异物感	上腹痛
观察组	42	5	8	29	32	4
对照组	30	17	12	21	11	19

表 2 两组食管内24 h动态pH和胆汁监测结果的比较 (n)

分组	n	酸反流	胆汁反流	混合反流
观察组	42	30	3	9
对照组	30	22	1	7

准的pH电极和胆汁监测光纤探头自鼻腔插入,置于下食管括约肌(lower esophageal sphincter, LES)上方5 cm处,开始记录。经计算机软件分析pH图形,以Demeester score >12.70 和(或)pH <4 的总时间 $>4.2\%$ 为病理性酸反流,以胆红素光吸收值 ≥ 0.14 为病理性胆汁反流。

1.2.3 诊断性治疗试验:对监测有酸反流的患者予以埃索美拉唑20 mg,每天2次,多潘立酮10 mg,治疗每天3次,疗程14 d。疗程结束后门诊或电话随访疗效。

1.2.4 GERC诊断标准:根据2009年我国《咳嗽的诊断和治疗指南》^[4]中的GERC的诊断标准为:(1)慢性咳嗽,以白天咳嗽为主。(2)24 h食管pH值监测Demeester积分 ≥ 12.70 ,和(或)SAP $\geq 75\%$ 。(3)抗反流治疗后咳嗽明显减轻或消失。

2 结果

2.1 两组患者反流症状比较 两组比较差异显著($\chi^2 = 5.04, P<0.05$, 表1),说明两组症状分布有差异,其中观察组以胸骨后痛或不适,咽内异物感为主,而对照组以反酸、烧心、上腹痛为主。

2.2 两组食管内24 h动态pH和胆汁监测结果比较 两组反流比较差异不显著($\chi^2 = 1.24, P>0.05$, 表2),说明两组反流物质基本相同。

2.3 埃索美拉唑治疗试验结果 两组有效率(症状消失和减轻)之间差异显著($\chi^2 = 7.56, P<0.05$, 表3),说明观察组治疗效果不及对照组。

3 讨论

GERC的临床特征:本组观察发现,GERC的咳嗽多为刺激性干咳,无痰或少痰,以白天为主,但晚上也有刺激性咳嗽者。咳嗽症状常反复发作,病程迁延,可持续数月,有时可自行缓解,但

表 3 两组埃索美拉唑治疗效果的比较 (*n*)

分组	<i>n</i>	症状消失	症状减轻	无效
观察组	42	7	24	11
对照组	30	19	8	3

患者多无心悸、呼吸困难等。本组71.4%(30/42)的患者在诊断GERC前均考虑为感染性咳嗽而使用过抗生素治疗,提示GERC的临床误诊率较高,主要是因为其反流症状不典型所致。虽然本组76.2%(32/42)的患者伴有咽喉部的不适如咽内异物感、咽痒、咽干,声音嘶哑等不适,69.0%(29/42)有胸骨后不适,如胸闷、胸骨后阻塞感、胸骨后疼痛等(其中7例患者曾诊断冠心病进行治疗),但其他较典型的反流症状较少如反酸仅11.9%(5/42)、烧心19.0%(8/42)、上腹痛9.5%(4/42),其临床症状与无咳嗽的GERD比较有显著性差异,上述表现与文献报道基本一致^[5],反流造成咳嗽症状与反流症状不一致的原因还不很清楚,一般认为造成咳嗽是因为反流物误吸入气管内刺激气管或支气管所致,但多数患者并无反流物达咽喉或口腔的现象,有可能通过其他机制引起,有文献通过随机对照研究证实,GERD也可通过刺激食管-支气管咳嗽反射引起慢性咳嗽^[6]。通过这个神经反射,反流至远端食管就可以引起咳嗽。当喉镜、支气管镜及胸片检查都正常,则可认为反流物通过刺激食管-支气管反射而导致咳嗽,很多临床研究认为后一种病理生理最常见^[7-9]。

GERC食管pH监测特征:GERC的反流物仍以酸反流为主,部分伴有胆汁的混合反流,而仅以胆汁反流者较少,GERC的反流各指标与非咳嗽组比较无显著性差异($P<0.05$),提示其咳嗽的发生并非与反流物的性质或反流量有关,而在于不同个体对反流物的敏感性不同所致,患者对反流物敏感性高可能与患者存在气道高反应性,对化学、物理刺激容易产生气道收缩反应有关^[10-12]。因此,有必要对GERC患者进行气道方面的检查。

GERC的治疗效果:抑酸治疗同样是GERC的主要治疗方法^[13,14],经14 d的抑酸治疗,观察组73.8%的患者症状减轻或消失,对照组90.0%的患者症状减轻或消失,两组比较有显著性差异,提示GERC的治疗效果不及非咳嗽患者,特别是治疗无效者较多,可能有以下几方面的原因:(1)GERC有其独特的临床特征和病理生理特

征,有研究认为胃食管反流引起的咳嗽类似于咳嗽变异性哮喘,可能有一种咳嗽变异性胃食管反流存在^[15],尽管抑酸后反流症状得到有效控制,但咳嗽仍然存在。(2)酸反流与其他慢性咳嗽原因并存,如与过敏性支气管炎、鼻后滴漏等重叠引起咳嗽,单纯抗反流只能使咳嗽减轻。(3)非酸性反流,大量研究表明,除酸反流外,一部分患者尚存在胆汁、胰液等碱性反流混合存在,如单纯抗酸反流也是疗效欠佳的原因之一。(4)疗程不够,一般GERC抗反流治疗时间应 >3 mo^[16],本组仅给予14 d疗程,可能也是疗效不满意的原因。因此,对于短期抗反流疗效不佳的患者,还应具体分析原因,提出更可行的诊治方案。

4 参考文献

- 柯会星, 居阳. 胃食管反流性咳嗽. 中国临床医生杂志 2007; 35: 14-16
- Merati AL. Reflux and cough. *Otolaryngol Clin North Am* 2010; 43: 97-110, ix
- Urita Y, Watanabe T, Ota H, Iwata M, Sasaki Y, Maeda T, Ishii T, Nanami M, Nakayama A, Kato H, Hike K, Hara N, Sanaka M, Nagai Y, Watanabe S, Nakanishi K, Nakajima H, Sugimoto M. High prevalence of gastroesophageal reflux symptoms in patients with both acute and nonacute cough. *Int J Gen Med* 2009; 1: 59-63
- 中华医学会呼吸病学分会哮喘学组. 咳嗽的诊断与治疗指南(2009版). 中华结核和呼吸杂志 2009; 32: 407-411
- Pratter MR. Overview of common causes of chronic cough: ACCP evidence-based clinical practice guidelines. *Chest* 2006; 129: 59S-62S
- Ciorba A, Bianchini C, Pelucchi S, Pastore A. Gastroesophageal reflux and its possible role in the pathogenesis of upper aerodigestive tract disorders. *Minerva Gastroenterol Dietol* 2007; 53: 171-180
- Tsoukali E, Sifrim D. The role of weakly acidic reflux in proton pump inhibitor failure, has dust settled? *J Neurogastroenterol Motil* 2010; 16: 258-264
- Irwin RS. Chronic cough due to gastroesophageal reflux disease: ACCP evidence-based clinical practice guidelines. *Chest* 2006; 129: 80S-94S
- Gurski RR, da Rosa AR, do Valle E, de Borba MA, Valiati AA. Extraesophageal manifestations of gastroesophageal reflux disease. *J Bras Pneumol* 2006; 32: 150-160
- Galmiche JP, Zerbib F, Bruley des Varannes S. Review article: respiratory manifestations of gastroesophageal reflux disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2008; 27: 449-464
- Irwin RS. Complications of cough: ACCP evidence-based clinical practice guidelines. *Chest* 2006; 129: 54S-58S
- Rosztóczy A, Makk L, Izbéki F, Róka R, Somfay A, Wittmann T. Asthma and gastroesophageal reflux: clinical evaluation of esophago-bronchial reflex and proximal reflux. *Digestion* 2008; 77: 218-224
- Patterson N, Mainie I, Rafferty G, McGarvey L, Heaney L, Tutuian R, Castell D, Johnston BT. Nonacid reflux episodes reaching the pharynx are important factors associated with cough. *J Clin Gastroenterol*

■应用要点

尽管GERC的表现不典型,但仍有69.0%(29/42)有胸骨后不适,部分患者伴有烧心、反酸,因此,详细询问病史对GERC诊断极为重要,在诊断困难时食管内pH及胆汁的动态监测是鉴别诊断的较好方法,如无此条件,短期的质子泵治疗试验对诊断也有帮助。

■同行评价

本文设计合理, 选题结合临床, 对于胃食管反流性咳嗽的临床诊断及合理治疗具有一定的实用价值.

- 2009; 43: 414-419
- 14 Sifrim D, Barnes N. GERD-related chronic cough: how to identify patients who will respond to antireflux therapy? *J Clin Gastroenterol* 2010; 44: 234-236
- 15 Blondeau K, Dupont LJ, Mertens V, Tack J, Sifrim D. Improved diagnosis of gastro-oesophageal reflux in patients with unexplained chronic cough. *Aliment Pharmacol Ther* 2007; 25: 723-732
- 16 Chandra KM, Harding SM. Therapy Insight: treatment of gastroesophageal reflux in adults with chronic cough. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol* 2007; 4: 604-613

编辑 李薇 电编 李薇

ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) CN 14-1260/R 2010年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

《世界华人消化杂志》出版流程

本刊讯 《世界华人消化杂志》[ISSN 1009-3079 (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. 编辑部主任每周一组织定稿会, 评估审稿人意见, 对评审意见较高, 文章达到本刊发表要求的稿件送交总编辑签发拟接受, 对不能达到本刊发表要求的稿件退稿.

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

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

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

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

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

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

《世界华人消化杂志》从收稿到发行每一步都经过严格审查, 保证每篇文章高质量出版, 是消化病学专业人士发表学术论文首选的学术期刊之一. 为保证作者研究成果及时公布, 《世界华人消化杂志》保证每篇文章从投稿到刊出4 mo内完成. (编辑部主任: 李军亮 2010-01-18)

腹腔镜非切除性胃部手术后功能性胃排空障碍的危险因素

岳平, 秦鸣放, 王庆, 邹富胜

岳平, 天津医科大学研究生院 天津市 300100
秦鸣放, 王庆, 邹富胜, 天津市南开医院 天津市微创外科中心 天津市 300100
作者贡献分布: 本文由秦鸣放指导, 岳平设计; 岳平搜集临床资料、进行统计学分析, 并在王庆与邹富胜协助指导下完成论文撰写。
通讯作者: 秦鸣放, 教授, 300100, 天津市南开区三纬路122号, 天津市南开医院. yuepingjun@sina.com
收稿日期: 2010-06-02 修回日期: 2010-08-20
接受日期: 2010-08-31 在线出版日期: 2010-10-28

Assessment of functional delayed gastric emptying after laparoscopic reconstructive gastric surgeries

Ping Yue, Ming-Fang Qin, Qing Wang, Fu-Sheng Zou

Ping Yue, Graduate School, Tianjin Medical University, Tianjin 300100, China
Ming-Fang Qin, Qing Wang, Fu-Sheng Zou, Tianjin Nankai Hospital & Tianjin Minimally Invasive Surgery Center, Tianjin 300100, China
Correspondence to: Professor Ming-Fang Qin, Tianjin Nankai Hospital & Tianjin Minimally Invasive Surgery Center, Tianjin 300100, China. yuepingjun@sina.com
Received: 2010-06-02 Revised: 2010-08-20
Accepted: 2010-08-31 Published online: 2010-10-28

Abstract

AIM: To identify possible predictors of functional delayed gastric emptying (FDGE) after laparoscopic reconstructive gastric surgeries.

METHODS: The clinical data for 471 patients who underwent laparoscopic reconstructive gastric surgeries (including laparoscopic fundoplication, repair of hiatal hernia, adjustable gastric banding and Heller myotomy) from January 2001 to December 2009 were collected and analyzed retrospectively.

RESULTS: The possible predictors of FDGE after laparoscopic reconstructive gastric surgeries include: age over 65 years, a history of diabetes, preoperative hypoproteinemia, anxiety disorder, duration of surgery longer than 150 min, and preoperative abdominal infection (all $P < 0.05$).

CONCLUSION: The etiology of FDGE after

laparoscopic reconstructive gastric surgeries is multi-factorial. The above-mentioned predictors are high risk factors for postoperative FDGE.

Key Words: Laparoscopy; Reconstructive gastric surgery; Functional delayed gastric emptying; Risk factor

Yue P, Qin MF, Wang Q, Zou FS. Assessment of functional delayed gastric emptying after laparoscopic reconstructive gastric surgeries. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(30): 3245-3248

摘要

目的: 探讨非切除性胃部手术后出现功能性胃排空障碍(functional delayed gastric emptying, FDGE)的危险因素。

方法: 回顾性分析自2001-01/2009-12, 9年间接受腹腔镜非切除性胃部手术(腹腔镜胃底折叠术、食管裂孔疝修补术、可调节胃束带术、Heller肌切开术)的471例患者的病历资料。

结果: 年龄 ≥ 65 岁、糖尿病病史、术前低蛋白血症、焦虑症、手术时间 ≥ 150 min、术后并发腹腔感染可能是腹腔镜非切除性胃部手术后发生FDGE的危险因素($P < 0.05$)。

结论: 非切除性胃部术后FDGE的原因是多因素的, 但上述因素是其发生的高危因素。在围手术期如能及时纠正并有效避免上述因素的影响, 将有可能降低术后FDGE的发生率。

关键词: 腹腔镜; 非切除性胃部手术; 功能性胃排空障碍; 危险因素

岳平, 秦鸣放, 王庆, 邹富胜. 腹腔镜非切除性胃部手术后功能性胃排空障碍的危险因素. *世界华人消化杂志* 2010; 18(30): 3245-3248
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/3245.asp>

0 引言

功能性胃排空障碍(functional delayed gastric emptying, FDGE)指腹部术后所并发的胃排空延迟所导致的恶心、呕吐、上腹部饱胀感等一系

■背景资料

随着腹腔镜广泛应用于临床, 在腹部外科中的特色日益明显, 甚至开创了传统开腹手术难以开展的术式。但是腹腔镜手术也出现了类似于传统开腹手术的术后并发症。

■同行评议者

戴冬秋, 教授, 中国医科大学附属第一医院肿瘤外科

■相关报道

Harberson等通过对28例FDGE患者的胃窦部取病理组织,通过病理切片发现胃窦肌间神经丛神经结构减少,证实FDGE发生与胃部神经结构变化相关。Speicher等报道,对于顽固性FDGE,经保守治疗无效时,可行全胃切除术。

列胃动力紊乱综合征,但必须排除器质性梗阻因素。FDGE的发生率为0.47%-28%^[1],常见于胃大部切除、胃全切除、胰十二指肠切除术后等。本文所探讨的非切除性胃部手术主要指治疗胃食管结合部良性疾病^[2](胃食管反流病,食管裂孔疝,贲门失迟缓症)所实施的腹腔镜胃底折叠术(laparoscopic fundoplication, LF)、食管裂孔疝修补术、贲门括约肌切开术(Heller手术)及单纯性肥胖病行腹腔镜可调节胃束带术(laparoscopic adjustable gastric banding, LAGB)。旨在回顾性分析上述4种胃部术后FDGE的临床资料,探讨非切除性胃部术后发生FDGE的危险因素。

1 材料和方法

1.1 材料 2001-01/2009-12,天津市微创外科中心采用腹腔镜手术治疗胃食管结合部良性疾病及单纯性肥胖共计471例,其中LF 288例(Nissen 128例, Toupet 57例, Dor 103例),食管裂孔疝修补加LF 116例, Heller手术33例, LAGB 34例。术后出现FDGE 19例(4.03%),其中男8例,女11例,年龄23-74(平均年龄53.4)岁,其中LF 9例,食管裂孔疝修补加LF 7例, Heller手术1例, LAGB 2例。

1.2 方法

1.2.1 FDGE的诊断标准: (1)临床症状: 持续性上腹部饱胀、嗝气、呕吐等症状,或术后数日拔除胃管进流质或由流质改为半流质时逐渐出现上述症状,可伴有顽固性呃逆; (2)经1项或多项检查提示无胃流出道机械性梗阻; (3)内镜和(或)上消化道造影提示胃蠕动差,胃内大量胃液存留。近年来国内外开展了放射性同位素检查-^{99m}Tc标记的低脂饮食测定胃排空的情况,被认为是诊断FDGE的金标准^[3]; (4)术后第7天仍需胃肠减压,且鼻胃管引流量>500 mL,或术后第10天鼻胃管引流量>300 mL,或术后第14天仍不能适应正常进食而频繁出现呕吐者^[4]; (5)无明显水和电解质平衡紊乱; (6)排除围手术期应用影响平滑肌收缩药物。

1.2.2 评定焦虑程度量表选用汉密尔顿焦虑量表(hamilton anxiety scale, HAMA): 评定标准^[5]: 评分为0-4分,共分为5级; 无症状为0分,症状轻为1分,症状中度为2分,症状重为3分,症状极重为4分。根据测评总分判断焦虑程度,总分>29分为严重焦虑, >21分为有明显焦虑, >14分为有焦虑, >7分为可能有焦虑, ≤7分为无焦虑。

统计学处理 应用 χ^2 检验做统计学分析,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

在471例病例中,发生FDGE 19例,占4.03%。本组研究对象中,19例患者全部采用非手术保守治疗,拔除胃管平均时间为术后21 d \pm 9 d,最长为术后42 d,住院平均时间为48 d \pm 15 d,逐渐恢复正常饮食,全部治愈。其中年龄 ≥ 65 岁、糖尿病病史、术前低蛋白血症、焦虑症、手术时间 ≥ 150 min、术后并发腹腔感染是发生FDGE的危险因素,而联合腹腔手术(腹腔镜阑尾切除、胆囊切除、肝囊肿开窗引流、卵巢囊肿剥除等术式)并不能成为FDGE的危险因素(表1)。在以上6个危险因素中,危险因素个数与术后FDGE的发生率呈正相关,当危险因素增加到4个时,其发生率高达21.05%(表2)。随着危险因素的逐渐增多,PDGE发生率成倍增长。

3 讨论

FDGE常见于腹部术后,尤其是胃部切除性手术,大多临床报道是以开腹方式术后。而以腹腔镜行胃部非切除性手术后出现FDGE的危险因素,临床鲜有系统性总结。由于特殊的手术方式及特点,分析其发生的危险因素有重要意义。

对于FDGE的发病机制,目前尚无统一的意见。但是,大部分学者认同,腹部外科术后,尤其是胃部术后,胃肠交感神经活动性增强,胃壁释放去甲肾上腺素等抑制性物质,直接与胃肠平滑肌细胞膜上的 α 、 β 受体结合,阻止胃肠平滑肌中的副交感神经释放乙酰胆碱,从而抑制胃的肌电活动,延缓胃的排空^[6]。Harberson等^[7]在一项研究中发现,通过对28例FDGE患者的胃窦部取病理组织,通过病理切片发现胃窦肌间神经丛神经结构减少,如Cajal间质细胞、NOS⁺及NOS⁻神经减少。实验模型进一步证实,肌间神经节受炎性浸润的影响导致神经结构减少以及胃平滑肌失去神经支配,由此导致了胃排空障碍的一系列临床症状。临床上而引起FDGE的因素是多方面的,本文所探讨的腹腔镜胃部非切除性手术后出现FDGE的危险因素,根据临床资料分析,我们认为,主要与高龄、糖尿病病史、术前低蛋白血症、术前焦虑症、手术时间过长、术后腹腔感染密切相关。而且危险因素个数与术后FDGE的发生率呈正相关。

分析上述危险因素造成术后FDGE的原因: (1)高龄: 高龄患者,胃的消化、吸收及内分泌功能减弱,胃排空功能受神经激素调节的能力容易更受到外界的影响。由于麻醉药物及炎性因

表 1 可能引起FDGE的相关因素

相关因素	<i>n</i>	FDGE组(<i>n</i>)	非FDGE组(<i>n</i>)	χ^2 值	<i>P</i> 值
年龄(岁)				18.87	<0.005
≥65	53	8	45		
<65	418	11	407		
糖尿病				5.99	<0.025
有	33	4	29		
无	438	15	423		
术前低蛋白血症				5.20	<0.025
有(<i>Ab</i> <35 g/L)	82	7	75		
无(<i>Ab</i> ≥35 g/L)	389	12	377		
术前焦虑症 ¹				3.92	<0.050
有(HAMA≥14分)	14	2	12		
无(HAMA<14分)	457	17	440		
手术时间(min)				4.89	<0.050
≥150	67	6	61		
<150	404	13	391		
术后腹腔感染				11.05	<0.005
有	7	2	5		
无	464	17	447		
联合手术				1.36	>0.050
有	23	2	21		
无	448	17	431		

¹HAMA为汉密尔顿焦虑量表评分表, ≥14分提示存在焦虑症。

应用要点

随着腹腔镜技术的推广及术式的拓宽,腹腔镜非切除性胃部手术将越来越广泛地应用于临床。对于存在FDGE危险因素(尤其是多种危险因素)的患者,可在术前消除可逆性危险因素,从而降低FDGE风险。

表 2 危险因素的个数与FDGE发生率的关系

危险因素 个数	<i>n</i>	FDGE 组(<i>n</i>)	非FDGE 组(<i>n</i>)	FDGE 发生率(%)
≤1	284	6	278	2.11 ^{ac}
2-3	168	9	159	5.36 ^e
≥4	19	4	15	21.05

^a*P*<0.05 vs 危险因素2-3个; ^c*P*<0.05, ^e*P*<0.05 vs 危险因素≥4个。

子刺激, 术后胃排空功能受到抑制, 恢复缓慢。(2)糖尿病: 文献报道糖尿病与FDGE的发生显著相关, 本研究也再次表明这一相关性。可能因为高血糖对胃动力的抑制作用, 以及糖尿病引起植物神经病变进而引起胃动力减弱^[8]。一般认为, 血糖控制在6-8 mmol/L较为适宜。(3)术前低蛋白血症: 术前患者营养状况差, 尤其是低蛋白血症, 术后容易导致胃壁水肿, 可引起胃局限性排空功能障碍。有文献报道血清白蛋白≥30 g/L是预防术后FDGE的保护因素^[9]。由此提示, 术前使用白蛋白或营养支持纠正低蛋白血症, 使血清白蛋白水平保持或接近正常值, 能降低FDGE发生的几率。(4)术前焦虑症: 焦虑及植物神经调

节功能紊乱会抑制胃排空功能, 胃呈无张力状态进而导致FDGE。本研究对象中, 部分患者长期经受胃食管反流或梗阻症状折磨或肥胖所造成的社会压力, 加之惧怕手术, 所造成的焦虑症, 从而增加了术后FDGE的风险。(5)手术时间过长: 胃部手术操作时间过长, 反复刺激胃壁黏膜, 易于导致术后胃壁水肿, 或麻醉时间相应延长, 或因操作困难, 对胃壁挤压、牵拉容易损伤迷走神经幽门支, 胃近端张力性收缩和远端蠕动收缩失去迷走神经调控, 胃收缩动力减弱, 使胃储存食物和机械运动能力降低, 导致胃排空迟缓^[10]。虽然本研究显示, 联合手术与FDGE无相关性, 但是联合手术会延长手术时间, 在一定意义上讲, 不能排除增加术后FDGE风险的可能性。(6)术后腹腔感染: 本研究显示, 术后腹腔感染会增加发生术后FDGE的可能。其中1例行腹腔镜食管裂孔疝修补加LF后出现间断高热及FDGE, CT提示食管裂孔间隙出现感染灶, 加强抗感染, 随着感染得到控制后, FDGE也逐渐好转。可能因为感染灶临近迷走神经, 对迷走神经造成炎性刺激, 影响胃的蠕动与排空功能。Hayakawa等^[11]的研究结果显示, 幽门螺旋杆菌阳性患者发生

■同行评价

本文实用性和科学性较好,有一定的临床参考价值.

FDGE的可能性大大高于阴性患者,而且发生率与*H.pylori*感染的严重程度呈正相关.而本组研究中尚缺乏支持此研究结果的证据.

FDGE与腹腔镜非切除性胃部手术的术式之间也存在一些联系.行LF时,游离食管、缝合针对胃部进行折叠,可能损伤迷走神经,折叠的胃底对食管下端过度牵拉,造成迷走神经张力过高,可能会导致胃排空功能障碍;行食管裂孔疝修补术,放置补片包绕食管,加之膈下易形成高位感染灶,异物或炎性刺激迷走神经,可能是形成FDGE的原因之一;Heller手术在纵行切开食管和食管-胃连接部前壁浆膜和基层时,容易误伤迷走神经,从而影响胃排空功能;腹腔镜可调节胃束带术,分离胃大小弯建立胃后隧道^[12],束带穿过胃后隧道,将胃腔一分为二,使胃在束带上方形成胃小囊,操作时间过长易使胃壁水肿,束带紧勒胃壁,压迫迷走神经而致FDGE.

术后FDGE一旦明确诊断后,首选非手术治疗^[13].主要包括:(1)心理疏导,建立良好医患沟通,消除患者疑虑,帮助患者树立信心;(2)禁食水、胃肠减压、肠内外营养支持治疗;(3)胃肠动力药,常用胃复安、吗丁啉,红霉素等.早期禁食水选择可经静脉给药剂型的药物;Kuo等^[14]通过实验观察到,头孢菌素类药物对实验小鼠胃排空的作用比红霉素或胃复安的作用更为明显;(4)中医与针灸的使用,一般与促胃肠动力药同步进行等;Speicher等^[15]报道,对于经保守治疗难以起效的患者可行全胃切除术.我们认为,保守疗法实际就是一种“耐心等待”疗法,多数患者能得到有效缓解,应格外谨慎,切忌贸然采取激进手术治疗.

4 参考文献

1 Bar-Natan M, Larson GM, Stephens G, Massey T.

Delayed gastric emptying after gastric surgery. *Am J Surg* 1996; 172: 24-28

2 秦鸣放, 赵宏志. 胃食管结合部良性疾病的腹腔镜治疗. *中国实用外科杂志* 2010; 30: 180-182

3 Stanciu GO. Gastroparesis and its management. *Rev Med Chir Soc Med Nat Iasi* 2001; 105: 451-456

4 王俊, 刘颖斌, 彭淑牖. 腹部术后功能性胃排空障碍的病因分析及防治进展. *中国实用外科杂志* 2006; 26: 807-808

5 沈海玉, 姜永胜, 郑春宁, 刘玲, 齐加芹, 孙少川. 围手术期心理干预对无张力疝修补术患者焦虑程度的影响. *中华疝和腹壁外科杂志(电子版)* 2010; 4: 186-171

6 蔡一亭, 秦新裕. 根治性胃大部切除术后胃瘫15例临床分析. *中国实用外科杂志* 1999; 19: 338-340

7 Harberson J, Thomas RM, Harbison SP, Parkman HP. Gastric neuromuscular pathology in gastroparesis: analysis of full-thickness antral biopsies. *Dig Dis Sci* 2010; 55: 359-370

8 Zárate N, Mearin F, Wang XY, Hewlett B, Huizinga JD, Malagelada JR. Severe idiopathic gastroparesis due to neuronal and interstitial cells of Cajal degeneration: pathological findings and management. *Gut* 2003; 52: 966-970

9 闫保功. 术后胃瘫综合征的危险因素分析. *中国现代药物应用* 2009; 3: 35

10 Hirao M, Fujitani K, Tsujinaka T. Delayed gastric emptying after distal gastrectomy for gastric cancer. *Hepatogastroenterology* 2005; 52: 305-309

11 Hayakawa T, Kaneko H, Konagaya T, Shinozaki K, Kasahara A, Funaki Y, Mori S, Yokoi T, Hirooka Y, Kusugami K, Kakumu S. Enhanced somatostatin secretion into the gastric juice with recovery of basal acid output after *Helicobacter pylori* eradication in gastric ulcers. *J Gastroenterol Hepatol* 2003; 18: 505-511

12 秦鸣放, 钱东, 王震宇, 曹占国. 腹腔镜可调节胃束带术治疗肥胖症的临床研究. *腹腔镜外科杂志* 2007; 12: 1-3

13 Rabine JC, Barnett JL. Management of the patient with gastroparesis. *J Clin Gastroenterol* 2001; 32: 11-18

14 Kuo WH, Wadwa KS, Ferris CD. Cephalosporin antibiotics accelerate gastric emptying in mice. *Dig Dis Sci* 1998; 43: 1690-1694

15 Speicher JE, Thirlby RC, Burggraaf J, Kelly C, Levasseur S. Results of completion gastrectomies in 44 patients with postsurgical gastric atony. *J Gastrointest Surg* 2009; 13: 874-880

编辑 曹丽鸥 电编 何基才

IFN- γ 对人胃腺癌Survivin分子通路的调控作用

邓昊, 黄萱, 高友晶, 镇鸿燕, 刘丽江

邓昊, 镇鸿燕, 江汉大学病理诊断所 湖北省武汉市 430056
黄萱, 高友晶, 江汉大学医学院病理学与病理生理学教研室
湖北省武汉市 430056
刘丽江, 江汉大学肿瘤研究所 湖北省武汉市 430056
武汉市青年科技晨光计划基金资助项目, No. 20045006071-7
湖北省自然科学基金资助项目, No. 2006AB191
作者贡献分布: 此课题由邓昊与刘丽江设计; 研究过程由邓昊与黄萱操作完成; 研究所用试剂及分析工具由高友晶提供; 数据分析由邓昊与镇鸿燕完成; 本论文写作由邓昊完成.
通讯作者: 刘丽江, 教授, 430056, 湖北省武汉市, 江汉大学肿瘤研究所. liulijiang@163.com
电话: 027-84226503 传真: 027-84226503
收稿日期: 2010-06-08 修回日期: 2010-08-10
接受日期: 2010-08-17 在线出版日期: 2010-10-28

Regulatory effect of IFN- γ on the survivin signaling pathway in gastric adenocarcinoma

Hao Deng, Xuan Huang, You-Jing Gao,
Hong-Yan Zhen, Li-Jiang Liu

Hao Deng, Hong-Yan Zhen, Institute of Diagnostic Pathology, Jiangnan University, Wuhan 430056, Hubei Province, China
Xuan Huang, You-Jing Gao, Department of Pathology and Pathophysiology, School of Medicine, Jiangnan University, Wuhan 430056, Hubei Province, China
Li-Jiang Liu, Tumor Institute, Jiangnan University, Wuhan 430056, Hubei Province, China
Supported by: the Young Chenguang Foundation of Wuhan, No. 20045006071-7; and the Natural Science Foundation of Hubei Province, No. 2006AB191
Correspondence to: Professor Li-Jiang Liu, Tumor Institute, Jiangnan University, Wuhan 430056, Hubei Province, China. liulijiang@163.com
Received: 2010-06-08 Revised: 2010-08-10
Accepted: 2010-08-17 Published online: 2010-10-28

Abstract

AIM: To characterize the role of survivin in the pathogenesis of gastric adenocarcinoma and to investigate the regulatory effect of interferon- γ (IFN- γ) on the survivin signaling pathway in gastric adenocarcinoma.

METHODS: Protein expression was examined by immunohistochemistry. After IFN- γ and antisense oligonucleotide against survivin were used to treat SGC7901 cells, mRNA and protein expression was tested by RT-PCR and immunocytochemistry, respectively, and apoptosis was determined by Hoechst 33258 staining. Statisti-

cal analysis was performed using the Spearman's rank correlation test and student's *t*-test.

RESULTS: There was a positive correlation between caspase-7 and survivin expression ($P = 0.03$) as well as between caspase-7 and p21^{waf} ($P = 0.02$) expression in gastric adenocarcinoma. Treatment with survivin antisense oligonucleotide down-regulated the protein expression of survivin ($P < 0.05$) but had no significant impact on caspase-7 and p21^{waf} protein expression (both $P > 0.05$). IFN- γ treatment down-regulated the mRNA expression of survivin ($P < 0.05$) but up-regulated the mRNA expression of caspase-7 and p21^{waf} (both $P < 0.05$). Treatment with either IFN- γ or survivin antisense oligonucleotide had no significant impact on cell apoptosis.

CONCLUSION: Although the expression of survivin is correlated with that of caspase-7 and p21^{waf}, survivin can not regulate apoptosis in gastric adenocarcinoma by regulating caspase-7 and p21^{waf} expression. IFN- γ can regulate apoptosis in gastric adenocarcinoma by down-regulating survivin expression and up-regulating caspase-7 and p21^{waf} expression.

Key Words: Survivin; Caspase-7; p21^{waf}; Interferon- γ ; Gastric adenocarcinoma

Deng H, Huang X, Gao YJ, Zhen HY, Liu LJ. Regulatory effect of IFN- γ on the survivin signaling pathway in gastric adenocarcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(30): 3249-3253

摘要

目的: 探讨胃癌中可能存在的Survivin通路以及IFN- γ 对该通路可能存在的调控。

方法: 人胃癌组织经免疫组织化学染色行相关性分析, SGC7901细胞经IFN- γ 及Survivin反义寡核苷酸处理, 应用RT-PCR和免疫细胞化学及图像分析的方法检测mRNA及蛋白水平的改变, 应用Hoechst33258染色观察细胞凋亡。组织学指标相关性采用Spearman等级相关分析, 平均光密度值采用*t*检验分析。

■背景资料

Survivin是迄今发现作用最强的肿瘤细胞凋亡抑制因子之一。34.5%胃癌组织不同程度表达Survivin, 且其表达水平与胃癌凋亡指数呈负相关。Survivin可与caspase-7和p21^{waf}等结合抑制细胞凋亡。干扰素 γ (IFN- γ)是II型干扰素中的唯一成员, 可通过上调p21^{waf}和caspase-7的表达而促进细胞凋亡。

■同行评议者

纪小龙, 教授, 武警总医院纳米医学研究所

■相关报道

近期的研究发现: 分别向胃癌细胞系HS-746T和MKN-45中导入Survivin反义寡核苷酸, 胃癌细胞凋亡均明显增强。

结果: 人胃癌组织中Survivin与caspase-7正相关($P = 0.03$); p21^{waf}与caspase-7正相关($P = 0.02$); 胃癌SGC7901细胞, 经不同浓度Survivin反义寡核苷酸处理后, Survivin蛋白表达明显下降($P < 0.05$), caspase-7和p21^{waf}无明显变化。经IFN- γ 处理后, Survivin mRNA表达明显下降($P < 0.05$), p21^{waf}和caspase-7 mRNA表达明显上升($P < 0.05$)。经IFN- γ 和Survivin反义寡核苷酸处理后细胞无明显凋亡。

结论: 胃癌中Survivin表达与caspase-7及p21^{waf}相关, 但不能通过调节caspase-7及p21^{waf}的表达发挥其抑制凋亡作用; IFN- γ 可使Survivin表达下调, 同时上调其下游促凋亡分子caspase-7以及p21^{waf}的表达, 以发挥其生物学作用。

关键词: 生存素; caspase-7; p21^{waf}; 干扰素- γ ; 胃癌

邓昊, 黄莹, 高友昆, 镇鸿燕, 刘丽江. IFN- γ 对人胃癌Survivin分子通路的调控作用. 世界华人消化杂志 2010; 18(30): 3249-3253

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/3249.asp>

0 引言

胃癌是严重威胁中国人群健康的恶性肿瘤之一。临床资料和实验研究显示: 胃癌细胞的凋亡明显受阻^[1]; 34.5%胃癌组织不同程度表达生存素(Survivin), 且其表达水平与胃癌凋亡指数呈负相关^[2]。Survivin是迄今发现作用最强的肿瘤细胞凋亡抑制因子之一, 可通过不同途径保护细胞周期不受checkpoint调控, 并抑制内、外源性因素(如BAX、Fas和化疗药物等)所诱导的肿瘤细胞凋亡^[3]。Survivin是凋亡抑制蛋白(inhibitor of apoptosis protein, IAP)家族的成员, 其具有调节细胞分化以及抑制凋亡的双重功能^[4]。IAP家族最早是在对杆状病毒的研究中发现的, 具有在宿主细胞受到病毒感染时抑制其死亡的功能^[5,6]。IAP家族是一个高度保守的抑制细胞死亡的家族, 其结构特征是, 具有1个到多个接近70个氨基酸的锌指结构, 即杆状病毒IAP重复序列(the baculoviral IAP repeat, BIR)^[7], 该结构被认为与抗凋亡功能有关。Survivin是分子最小的仅有一个BIR结构的IAP家族成员^[8]。与IAP家族其他成员不同的是, Survivin在有丝分裂时表达达到峰值^[9], 在胎儿组织中大量表达^[4,10], 而在正常的分化成熟的组织中无表达^[11], 在恶性肿瘤组织中过度表达。Survivin抑制凋亡的主要作用机制为: (1)Survivin直接与caspase-3和caspase-7

结合, 通过抑制其酶活性而抑制凋亡^[12]; (2)Survivin与细胞周期调节因子CDK4结合为复合物, 使p21^{waf}从p21^{waf}/CDK4复合物中释放, 并形成procaspase-3/p21^{waf}复合物, 抑制procaspase-3水解为活化的caspase-3, 从而抑制凋亡^[13]; (3)可在有丝分裂前期与纺锤体微管结合, 分裂中后期与纺锤体全长结合, 分裂末期与颗粒体结合, 通过保护有丝分裂过程中纺锤体和颗粒体的完整性, 间接抑制caspase对纺锤体的水解作用, 从而抑制细胞凋亡^[14]。近期的研究发现: 分别向胃癌细胞系HS-746T和MKN-45中导入Survivin反义寡核苷酸(antisense oligonucleotide, ASON), 胃癌细胞凋亡均明显增强^[15,16]。胃癌中Survivin的表达具有重要的临床意义^[17,18], 但Survivin在胃癌中抑制凋亡的分子机制, 尚未明确。IFN- γ 是II型IFN中的唯一成员, 可促进肿瘤细胞凋亡^[19], 所涉及的主要环节可能是IFN- γ 可通过膜受体途径上调p21^{waf}和caspase-7的表达而实现对细胞生长的调节^[20,21]。在前期研究中, 我们发现人胃癌中存在该现象^[22]。Survivin和IFN- γ 均可通过p21^{waf}和caspase-7分子调控细胞凋亡, 提示IFN- γ 信号途径可能存在对Survivin的调节作用或者两者之间存在相关性, 但胃癌中该方面的研究较少。据此, 本研究拟首先通过临床病理学方法, 对人胃癌组织中Survivin、p21^{waf}和caspase-7表达情况进行检测, 观察三者对人体组织中的相互关系; 其次, 通过细胞生物学及细胞病理学的方法, 使用Survivin ASON对胃癌细胞系SGC7901进行处理, 观察Survivin等分子在Survivin表达量改变时的变化及相互关系以及细胞凋亡情况, 以进一步明确人胃癌中存在的Survivin分子通路, 继而使用IFN- γ 对胃癌细胞系SGC7901进行处理, 观察细胞凋亡以及Survivin和其相关分子的变化及相互关系, 探讨胃癌中IFN- γ 对Survivin通路可能存在的调控作用。

1 材料和方法

1.1 材料 收集江汉大学附属医院1989-2003年胃癌根治性手术切除并有完整病理学检查数据的标本102例。所有病例术前均未进行放疗和化疗。胃癌细胞株SGC7901用含10%小牛血清(Gibco)的RMPI 1640培养基(Gibco), 置于37 °C, 50 mL/L CO₂的培养箱中培养。每2-3 d换1次液。

1.2 方法

1.2.1 ASON转染以及药物处理: ASON及引物由赛百胜生物技术有限公司合成。用阳离子脂质体Transfectin(TianGENE)进行转染。ASON的

表 1 经Primer 5.0软件设计的引物序列

基因	正义链	反义链	长度(bp)
Survivin	5'-CAGACTTGGCCAGTCTTTC-3'	5'-TTTCTCCGAGTTTCCTCA-3'	236
caspase-7	5'-ATTTGACAGCCCACTTTAGG-3'	5'-GCATGATTCCAGGTCTTTT-3'	297
p21 ^{waf}	5'-GCGACTGTGATGCGCTAATGG-3'	5'-TAGAAATCTGTCATGCTGGTCTGC-3'	358
β -actin 1	5'-TGCTGTCCCTCTACGCCTCT-3'	5'-GCTTCTCCTTGATGTCGC-3'	234
β -actin 2	5'-ATCATGTTTGAGACCTTCAACA-3'	5'-CATCTCTTGCTCGAAGTCCA-3'	318

■应用要点

本研究证实IFN- γ 对Survivin通路存在调控作用。该结论可望进一步完善当前凋亡调控理论,并为临床治疗提供新的角度和思考。

序列设计以及浓度根据已发表的文献。Survivin ASON: 5'-CCCAGCCTTCCAGCTCCTTG-3', 按照200和400 nmol/L的浓度转染^[23], 处理细胞24 h。细胞转染严格按照说明书操作, 反义寡核苷酸: 脂质体 = 1 : 2-3。使用1 000 IU/mL IFN- γ ^[24](102CY27, PEPROTECH EC)处理细胞0.5、3和24 h。

1.2.2 免疫组织化学及免疫细胞化学染色: 免疫组织化学及免疫细胞化学染色使用抗体为: 抗Survivin多克隆抗体(RAB-0536, Neomarker公司产品), 即用型鼠抗人caspase-7单克隆抗体(7CSP01, Neomarker公司产品), 即用型鼠抗人p21^{waf}单克隆抗体(F-5, Santa Cruz, sc-6246)和SP法即用型检测试剂盒均购自福州迈新生物公司。所有染色均经DAB显色。Survivin、caspase-7和p21^{waf}以癌细胞质内呈棕黄色表达为阳性。操作过程严格按照说明书要求进行。各细胞处理组免疫细胞化学染色步骤保持严格一致, 并同时进行操作, 染色结果经MOTIC图像分析系统(Med-6)测量其平均光密度, 进行相对定量。

1.2.3 RT-PCR检测及图像分析: 用TRIzol(Invitrogen)提取总RNA, 样品纯度和浓度经核酸测定仪测定, $A_{260/280}$ 值在1.8-2.0。严格按照RT-PCR试剂盒(TaKaRa)说明书操作进行RT-PCR。使用Primer 5.0引物设计软件分别设计Survivin、caspase-7、p21^{waf}和 β -actin的上游和下游引物(表1)。目的引物与 β -actin用一管法进行PCR。PCR产物经1.5 g/L的琼脂糖凝胶电泳检测, 使用Biostep Photo-impact软件分析各组目的基因与 β -actin条带的平均光密度值, 计算两者的比值, 进行相对定量。

1.2.4 Hoechst33258染色检测细胞凋亡: 无菌条件下取出细胞爬片并固定后, Hoechst33258孵育15 min, 0.01 mol/L PBS洗5 min。水溶性封片剂封片, 荧光显微镜紫外光下观察, Hoechst33258染料呈现蓝色荧光。高倍镜下观察, 凋亡细胞为蓝色亮点, 亮度明显强于未凋亡细胞, 形态学上出现核膜消失、核固缩、核碎裂等特征。随机数取1 000个细胞进行凋亡细胞数的判定。

统计学处理 全部数据经SPSS12.0统计学软件处理, 相关因素分析采用Spearman等级相关分析, 各组平均吸光度值采用 t 检验分析。 $P < 0.05$ 有统计学意义。

2 结果

2.1 胃癌组织Survivin、caspase-7、p21^{waf}分子表达之间的关系 全组102例胃癌, 男69例, 女33例。年龄26-77岁, 中位年龄59岁。Survivin阳性率为51%(52/102), caspase-7阳性率为35.3%(36/102), p21^{waf}阳性率为79.4%(81/102)。各指标表达情况经Spearman等级相关分析显示: Survivin与caspase-7正相关($P = 0.03$, $r = 0.21$); p21^{waf}与caspase-7正相关($P = 0.02$, $r = 0.22$)。

2.2 Survivin ASON处理后Survivin、caspase-7、p21^{waf}蛋白表达的变化 经Survivin ASON 200和400 nmol/L浓度抑制Survivin的表达后, Survivin蛋白表达量在200 nmol/L组($P = 0.0005$)和400 nmol/L组($P < 0.0001$)较未处理组出现不同程度的降低。且降低程度有浓度依赖性($P = 0.0005$)。caspase-7表达量在200 nmol/L组($P = 0.9$)和400 nmol/L组($P = 0.7$)较未处理组无明显变化。p21^{waf}表达量在200 nmol/L组($P = 0.72$)和400 nmol/L组($P = 0.11$)较未处理组无明显变化(图1)。

2.3 IFN- γ 处理0.5、3和24 h后Survivin、caspase-7、p21^{waf} mRNA表达的变化 胃癌细胞SGC7901经IFN- γ 处理0.5、3和24 h后, Survivin mRNA表达量下降($P < 0.0001$), caspase-7和p21^{waf} mRNA的表达量均上升(均 $P = 0.03$), 且均出现先下降后上升的趋势(图2)。

2.4 细胞凋亡的变化 SGC7901胃癌细胞在未处理组、IFN- γ 处理组、Survivin ASON 200 nmol/L组和Survivin ASON 400 nmol/L组中, 凋亡细胞数无明显变化($P > 0.05$)。

3 讨论

胃癌是我国最常见的恶性肿瘤之一, 一经发现多为进展期, 5年生存低。胃癌细胞凋亡率较低,

■同行评价

本文选题恰当, 对于治疗胃癌有一定的临床参考意义。

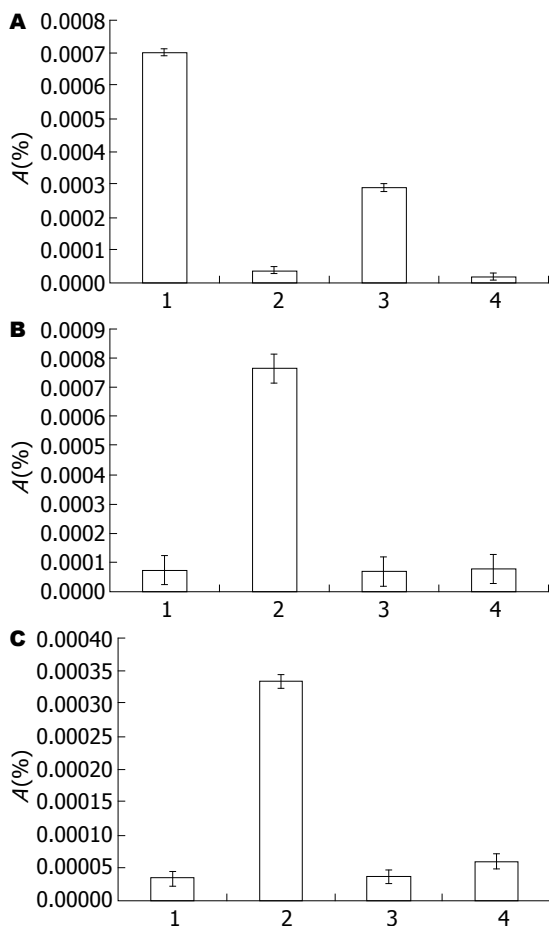


图1 SGC7901细胞经IFN- γ 1 000 IU, Survivin ASON 200、400 nmol/L处理24 h后, Survivin、caspase-7、p21^{waf}蛋白表达的变化。A: Survivin; B: caspase-7; C: p21^{waf}。1: 对照组; 2: IFN- γ 处理组; 3: ASON 200 nmol/L组; 4: ASON 400 nmol/L组。

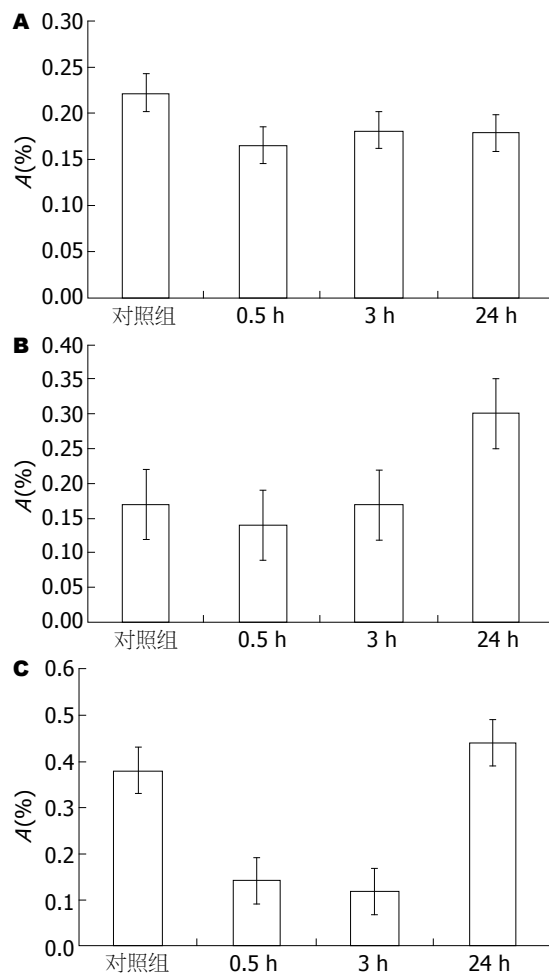


图2 IFN- γ 刺激SGC7901细胞0.5、3和24 h后Survivin、caspase-7、p21^{waf} mRNA表达变化。A: Survivin; B: caspase-7; C: p21^{waf}。

且Survivin表达水平与胃癌凋亡指数呈负相关^[2]。Survivin是IAP家族的成员具有强抑制凋亡作用。Survivin主要存在与胚胎期及婴儿期, 在成熟的组织中完全下调或消失, 但是在恶性肿瘤中又会出现。

本研究在人体胃癌组织中发现Survivin与caspase-7正相关; p21^{waf}与caspase-7正相关。其结果提示人胃癌中Survivin的作用机制可能与其他肿瘤一致, 主要通过与caspase-7以及p21^{waf}的结合, 实现抑制细胞凋亡功能。为证实这一推测, 本研究选用了胃癌细胞系SGC7901作为研究模型。SGC7901是1981年建立的一株胃癌淋巴结转移癌细胞系, 该细胞系具有凋亡率低而Survivin表达高的特点^[25], 是良好的符合本研究的体外模型。

通过使用不同浓度的Survivin ASON直接抑制Survivin的表达时, 我们发现Survivin表达出现明显抑制, 但是caspase-7以及p21^{waf}表达并无明显变化。印证了Survivin并非通过调控caspase-7以及

p21^{waf}的表达实现抑制细胞凋亡功能的理论推测。

通过IFN- γ 刺激SGC7901细胞时, caspase-7以及p21^{waf}表达上升, 同时, Survivin的表达明显下降。结合前期研究^[22], 该现象提示胃癌中, IFN- γ 可抑制Survivin的表达, 同时促进caspase-7以及p21^{waf}表达, 通过调控多条途径发挥其生物学作用, 其下游途径间调节机制及意义有待进一步研究。

在本研究中, IFN- γ 作用于胃癌SGC7901细胞, 其细胞凋亡水平无明显变化, 该结果与Reed等研究结果一致^[25]。而当Survivin ASON抑制Survivin表达时, 细胞凋亡水平也无明显变化, 该结果与胃癌细胞系HS-746T和MKN-45中的实验结果不一致^[17,18], 我们认为可能与本研究使用的Survivin ASON浓度有关, 并提示SGC7901细胞中可能存在多条凋亡抑制的途径。

4 参考文献

- 1 Lauwers GY, Scott GV, Karpeh MS. Immunohistochemical evaluation of bcl-2 protein expression in

- gastric adenocarcinomas. *Cancer* 1995; 75: 2209-2213
- 2 Lu CD, Altieri DC, Tanigawa N. Expression of a novel antiapoptosis gene, survivin, correlated with tumor cell apoptosis and p53 accumulation in gastric carcinomas. *Cancer Res* 1998; 58: 1808-1812
- 3 Giodini A, Kallio MJ, Wall NR, Gorbsky GJ, Tognin S, Marchisio PC, Symons M, Altieri DC. Regulation of microtubule stability and mitotic progression by survivin. *Cancer Res* 2002; 62: 2462-2467
- 4 Altieri DC, Marchisio PC. Survivin apoptosis: an interloper between cell death and cell proliferation in cancer. *Lab Invest* 1999; 79: 1327-1333
- 5 Birnbaum MJ, Clem RJ, Miller LK. An apoptosis-inhibiting gene from a nuclear polyhedrosis virus encoding a polypeptide with Cys/His sequence motifs. *J Virol* 1994; 68: 2521-2528
- 6 Crook NE, Clem RJ, Miller LK. An apoptosis-inhibiting baculovirus gene with a zinc finger-like motif. *J Virol* 1993; 67: 2168-2174
- 7 Deveraux QL, Reed JC. IAP family proteins--suppressors of apoptosis. *Genes Dev* 1999; 13: 239-252
- 8 Verdecia MA, Huang H, Dutil E, Kaiser DA, Hunter T, Noel JP. Structure of the human anti-apoptotic protein survivin reveals a dimeric arrangement. *Nat Struct Biol* 2000; 7: 602-608
- 9 Li F, Ambrosini G, Chu EY, Plescia J, Tognin S, Marchisio PC, Altieri DC. Control of apoptosis and mitotic spindle checkpoint by survivin. *Nature* 1998; 396: 580-584
- 10 Adida C, Crotty PL, McGrath J, Berrebi D, Diebold J, Altieri DC. Developmentally regulated expression of the novel cancer anti-apoptosis gene survivin in human and mouse differentiation. *Am J Pathol* 1998; 152: 43-49
- 11 Ambrosini G, Adida C, Altieri DC. A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma. *Nat Med* 1997; 3: 917-921
- 12 Riedl SJ, Renatus M, Schwarzenbacher R, Zhou Q, Sun C, Fesik SW, Liddington RC, Salvesen GS. Structural basis for the inhibition of caspase-3 by XIAP. *Cell* 2001; 104: 791-800
- 13 Monzó M, Rosell R, Felip E, Astudillo J, Sánchez JJ, Maestre J, Martín C, Font A, Barnadas A, Abad A. A novel anti-apoptosis gene: Re-expression of survivin messenger RNA as a prognosis marker in non-small-cell lung cancers. *J Clin Oncol* 1999; 17: 2100-2104
- 14 Swana HS, Grossman D, Anthony JN, Weiss RM, Altieri DC. Tumor content of the antiapoptosis molecule survivin and recurrence of bladder cancer. *N Engl J Med* 1999; 341: 452-453
- 15 Adida C, Haioun C, Gaulard P, Lepage E, Morel P, Briere J, Dombret H, Reyes F, Diebold J, Gisselbrecht C, Salles G, Altieri DC, Molina TJ. Prognostic significance of survivin expression in diffuse large B-cell lymphomas. *Blood* 2000; 96: 1921-1925
- 16 Kato J, Kuwabara Y, Mitani M, Shinoda N, Sato A, Toyama T, Mitsui A, Nishiwaki T, Moriyama S, Kudo J, Fujii Y. Expression of survivin in esophageal cancer: correlation with the prognosis and response to chemotherapy. *Int J Cancer* 2001; 95: 92-95
- 17 Deng H, Wu RL, Zhou HY, Huang X, Chen Y, Liu LJ. Significance of Survivin and PTEN expression in full lymph node-examined gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 1013-1017
- 18 Deng H, Wu RL, Chen Y, Liu LJ. STAT1 and Survivin Expression in Full Lymph Node Examined Gastric Cancer by Using Tissue Microarray Technique. *Chin Ger J Clin Oncol* 2006; 5: 249-252
- 19 Klampfer L. The role of signal transducers and activators of transcription in colon cancer. *Front Biosci* 2008; 13: 2888-2899
- 20 Klampfer L. Signal transducers and activators of transcription (STATs): Novel targets of chemopreventive and chemotherapeutic drugs. *Curr Cancer Drug Targets* 2006; 6: 107-121
- 21 Battle TE, Frank DA. The role of STATs in apoptosis. *Curr Mol Med* 2002; 2: 381-392
- 22 邓昊, 镇鸿燕, 周红艳, 陈琼霞, 刘丽江. 人胃癌IFN- γ -STAT1通路的作用及其机制. *世界华人消化杂志* 2009; 17: 1103-1107
- 23 Grandis JR, Drenning SD, Chakraborty A, Zhou MY, Zeng Q, Pitt AS, Tweardy DJ. Requirement of Stat3 but not Stat1 activation for epidermal growth factor receptor-mediated cell growth in vitro. *J Clin Invest* 1998; 102: 1385-1392
- 24 李莹, 韩炯, 王立峰, 林树新, 药立波, 俞强, 刘新平. 人胃癌细胞株抗脱落凋亡特性的分析. *第四军医大学学报* 2003; 24: 485-488
- 25 Reed JC, Bischoff JR. BIRing chromosomes through cell division--and survivin' the experience. *Cell* 2000; 102: 545-548

编辑 曹丽鸥 电编 何基才

ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) CN 14-1260/R 2010年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

《世界华人消化杂志》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.

超声弹性应变率比值在肝脏肿瘤诊断中的应用价值

冀建峰, 周巍, 郭佳

■背景资料

超声弹性成像是近年来发展的超声诊断新技术之一, 他通过探测肿瘤的硬度获得彩色图像, 为鉴别肿瘤的良恶性提供了新的途径, 已被广泛应用于乳腺、甲状腺等浅表器官, 但在肝脏方面的报道不多。

冀建峰, 周巍, 郭佳, 中国人民解放军第二军医大学附属东方肝胆外科医院超声科 上海市 200438

冀建峰, 中国人民解放军第94医院超声科 江西省南昌市 330002

作者贡献分布: 此课题由郭佳与冀建峰设计; 研究过程由冀建峰与周巍操作完成; 数据分析及论文撰写由冀建峰完成; 实验指导与论文修改由郭佳完成。

通讯作者: 郭佳, 教授, 200438, 上海市杨浦区长海路225号, 中国人民解放军第二军医大学附属东方肝胆外科医院超声科。

jia_guo@163.com

电话: 021-81875121

收稿日期: 2010-08-05 修回日期: 2010-09-08

接受日期: 2010-09-13 在线出版日期: 2010-10-28

Value of strain ratio in the diagnosis of liver tumors by ultrasonic elastography

Jian-Feng Ji, Wei Zhou, Jia Guo

Jian-Feng Ji, Wei Zhou, Jia Guo, Department of Ultrasonography, Eastern Hepatobiliary Surgery Hospital, the Second Military Medical University of Chinese PLA, Shanghai 200438, China

Jian-Feng Ji, Department of Ultrasonography, the 94th Hospital of Chinese PLA, Nanchang 330002, Jiangxi Province, China

Correspondence to: Professor Jia Guo, Department of Ultrasonography, Eastern Hepatobiliary Surgery Hospital, the Second Military Medical University of Chinese PLA, 225 Changhai Road, Yangpu District, Shanghai 200438, China. jia_guo@163.com

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

Accepted: 2010-09-13 Published online: 2010-10-28

Abstract

AIM: To investigate the diagnostic value of strain ratio in the differentiation of benign and malignant liver tumors.

METHODS: Ultrasonic elastography was performed in 145 patients with 157 liver tumors to obtain the strain images. The strain ratio of the tumors was then calculated. By comparing with the results of pathological diagnosis, the cut-off point for the strain ratio was determined using the receiver operating characteristic curve.

RESULTS: The strain ratio of benign tumors was significantly lower than that of malignant ones (2.75 ± 1.26 vs 8.33 ± 4.45 , $P < 0.01$). The strain ratio of intrahepatic cholangiocarcinoma

was highest, followed by hepatocellular carcinoma, metastatic liver carcinoma, and hepatic hemangioma. The cut-off point for strain ratio was set as 4.0. The sensitivity, specificity, accuracy, positive predictive value and negative predictive value were 89.4%, 86.8%, 88.5%, 93.0% and 80.7%, respectively. The area under the curve was 0.941.

CONCLUSION: Strain ratio could reflect the stiffness of liver tumors and represents a more objective diagnostic parameter for differentiation of benign and malignant liver tumors.

Key Words: Ultrasonic elastography; Strain ratio; Liver tumor

Ji JF, Zhou W, Guo J. Value of strain ratio in the diagnosis of liver tumors by ultrasonic elastography. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(30): 3254-3258

摘要

目的: 探讨弹性应变率比值(SR)对肝脏良恶性肿瘤的诊断价值。

方法: 对145例患者共157个肝脏肿瘤进行超声弹性成像检查, 获得弹性成像图后, 测量病灶与周围组织的SR, 经病理对照后, 采用接收者工作特征(ROC)曲线分析SR诊断良恶性肿瘤的准确性, 并确定临界点。

结果: 良性肿瘤的SR显著低于恶性肿瘤的SR, 两者差异具有统计学意义(2.75 ± 1.26 vs 8.33 ± 4.45 , $P < 0.01$)。其中胆管细胞型肝癌组的SR最高, 肝细胞型肝癌组与转移性肝癌组次之, 肝血管瘤组最低。通过ROC曲线确定的最佳诊断临界点是4.0, 敏感性、特异性、准确性、阳性预测值和阴性预测值分别是89.4%、86.8%、88.5%、93.0%和80.7%。曲线下面积(AUC)为0.941。

结论: SR测量可以较为客观的反映病灶的硬度情况, 是一种更为准确客观的诊断肝脏良恶性肿瘤的超声弹性成像新方法。

关键词: 超声弹性成像; 弹性应变率比值; 肝脏肿瘤

■同行评议者

袁友红, 副教授, 湖南省人民医院科研部

冀建峰, 周巍, 郭佳. 超声弹性应变率比值在肝脏肿瘤诊断中的应用价值. 世界华人消化杂志 2010; 18(30): 3254-3258
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/3254.asp>

0 引言

肝癌严重威胁人类健康, 全球每年约有60万人死于肝癌, 其中我国占56%, 约有34万人因肝癌死亡, 为恶性肿瘤的第2死因^[1]. 超声检查在肝癌的影像学诊断中占据重要的地位, 随着技术的发展, Ophir等^[2]于1991年首先提出了“弹性成像”的概念, 他通过探测肿瘤的硬度从而获得彩色图像, 为鉴别肿瘤的良恶性提供了新的途径. 目前超声弹性成像诊断标准仍参考Itoh等^[3]提出的5分法, 但在实际临床应用中, 我们发现不同的医生对同一弹性图像可以给出不同的评分, 其人为主观因素对评分影响较大, 对肿瘤良恶性性质的判断存在一定的偏差. 而弹性应变率比值(strain ratio, SR)为超声弹性成像诊断中的定量指标, 能客观的反映肿瘤的软硬度, 从而对肿瘤的良恶性进行较为准确的判断^[4]. 本研究组即探讨SR对肝脏良恶性肿瘤的鉴别诊断价值.

1 材料和方法

1.1 材料 2009-11/2010-05东方肝胆外科医院肝脏肿瘤患者145例(男103例, 女42例), 共157个病灶, 患者年龄22-67(平均 48 ± 9.6)岁, 肿瘤最大直径0.5-12.6(平均 3.7 ± 1.8) cm, 病灶深度1.3-10.8(平均 4.6 ± 1.4) cm. 所有病例均经手术或超声引导下穿刺病理确诊. 本研究中所取病例均征得患者同意, 并经过医院伦理委员会批准.

1.2 方法 仪器使用HITACHI公司的HIVISON 900型彩色超声诊断仪, 凸阵探头EUP-C532, 频率4-8 MHz, 具备弹性成像功能. 患者取仰卧位及左侧卧位, 由同一医师进行操作, 将探头置于剑突下或肋间, 在二维超声模式下充分显示病灶, 加彩色多普勒显示病灶的内部血流情况, 进行初步的诊断, 然后启动弹性成像功能. 操作时尽量保持探头的稳定性, 给予轻微的加压操作, 压力与压放频率维持在2-3之间, 维持2 s稳定的动态弹性成像, 冻结保存静态图像. 获得弹性图像后, 先进行5分法评分, 然后启动仪器附带的SR测量按钮. 5分法评分标准为: 病变区与周围组织完全为绿色覆盖, 评为1分; 病变区蓝绿混杂, 以绿色为主, 评为2分; 病变区以蓝色为主, 周边见部分绿色, 被评为3分; 病变区完全为蓝色覆盖, 为4分; 病变区完全为蓝色覆盖, 周围部分

组织也为蓝色, 为5分. 以评分4-5分的病灶诊断为恶性病变, 3分以下的病灶诊断为良性病变^[5]. 测量病灶与周围组织的SR的具体方法为: 利用超声仪器提供的测量方法, 分别勾画两处需要对比的感兴趣区域, 进行SR测量. 首先选取病灶区域作为感兴趣区A, 再选取周围组织作为感兴趣区B作为对照, 计算两者SR, 推断病灶相对于周围组织的硬度, $SR = \text{周围肝脏组织应变率B} / \text{病灶应变率A}$ ^[6].

为试图找出肝脏良恶性肿瘤SR的诊断临界点, 将所有157个病灶的SR尝试作为截断点, 分别计算相应的敏感性与特异性指标. 根据约登指数(敏感性+特异性-1)的最大值确定截断点即最佳诊断临界点. 采用接收者工作特征(receiver operator characteristic, ROC)曲线分析SR诊断良恶性肿瘤的准确性, 计算曲线下面积(area under the curve, AUC).

统计学处理 采用SPSS16.0统计软件包进行分析. 计量资料采用 $\text{mean} \pm \text{SD}$ 表示, 良恶性病灶的SR比较用 t 检验, 不同病理类型的SR比较用秩和检验, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义.

2 结果

2.1 良恶性肿瘤的SR 经病理结果证实, 157个病灶中, 良性53个, 全部为肝血管瘤; 恶性104个, 其中肝细胞型肝癌(hepatocellular carcinoma, HCC)72个, 胆管细胞型肝癌(intrahepatic cholangiocarcinoma, ICC)17个, 转移性肝癌15个. 良性肿瘤的SR为 2.75 ± 1.26 (图1A), 恶性肿瘤的SR为 8.33 ± 4.45 (图1B), 二者差异显著, 具有统计学意义($t = 11.88, P < 0.01$). 在这4种病理类型中, ICC的SR为 12.67 ± 5.19 , 转移性肝癌的SR为 8.81 ± 3.60 , HCC的SR为 7.20 ± 3.77 , 肝血管瘤的SR为 2.75 ± 1.26 (图2). 经秩和检验分析各组数据, 除了HCC组与转移性肝癌组之间差异没有统计学意义外($P = 0.078$), 其余任两组之间的差异都具有统计学意义.

2.2 最佳诊断临界点的确定 取约登指数最大值(0.762)时的截断点, 确定 $SR = 4.0$ 为肝脏良恶性肿瘤的最佳诊断临界点, 即当 $SR \geq 4.0$ 判断为恶性, 否则为良性, 此时的敏感性为89.4%, 特异性为86.8%, 准确性为88.5%, 阳性预测值为93.0%, 阴性预测值为80.7%(表1). 将不同截断点时的1-特异性为横轴, 敏感性为纵轴, 绘制ROC曲线, 曲线下面积 $AUC = 0.941$, 95%可信区间为0.905-0.976(图3).

■ 相关报道
智慧等提出乳腺良恶性肿瘤的诊断界点为3.08, 弹性应变率比值法的准确性高于5分法.

■ 创新盘点

本文研究分析了超声弹性成像应变率比值对肝脏良恶性肿瘤鉴别的准确性,提出了诊断临界点,并结合肝脏不同于乳腺等浅表器官的特殊性,确定了超声弹性应变率比值的诊断价值。

表 1 SR不同截断点的分析

截断点	敏感性(%)	特异性(%)	准确性(%)	阳性预测值(%)	阴性预测值(%)	约登指数
3.710	89.4	81.1	86.6	90.3	79.6	0.705
3.755	89.4	83.0	87.3	91.2	80.0	0.724
3.875	89.4	84.9	87.9	92.1	80.4	0.743
4.000	89.4	86.8	88.5	93.0	80.7	0.762
4.070	88.5	86.8	87.9	92.9	79.3	0.753
4.155	87.5	86.8	87.3	92.9	78.0	0.743
4.215	86.5	86.8	86.6	92.8	76.7	0.733

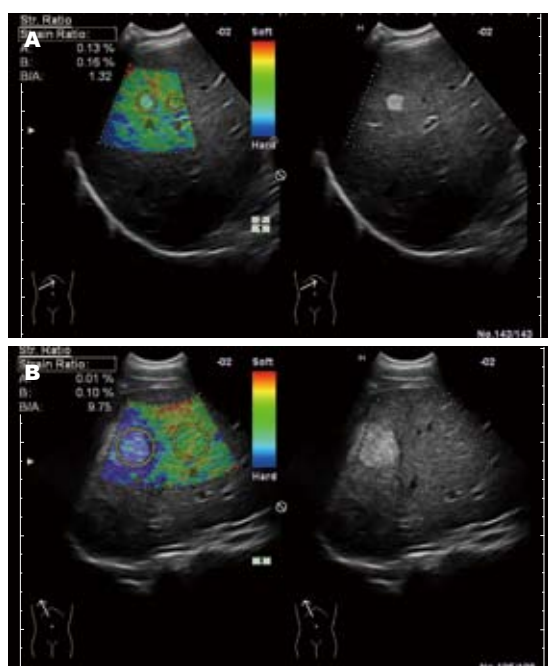


图 1 肝内占位性病灶. A: 肝血管瘤(SR = 1.32); B: HCC(SR = 9.75).

3 讨论

超声检查在肝癌的影像学诊断中占据重要的地位,目前临床主要依赖普通二维超声和彩色多普勒超声对肝脏肿瘤的病变性质做出判断,但敏感性和特异性均不理想.我们知道组织的硬度可以随着肿瘤的发生、发展、恶变而不同,恶性肿瘤的硬度大于正常组织或良性病变组织,利用这一特性,超声弹性成像就可对良恶性肿瘤进行鉴别诊断^[7].该技术在浅表器官的检查中已有较为成熟的应用,尤其对鉴别诊断乳腺良恶性病变的价值得到了肯定,准确性可达94.5%^[8].但超声弹性成像在肝脏肿瘤中的研究和应用较少,其价值还需进一步地探讨.目前超声弹性成像诊断的方法仍以传统的5分评分法为主,以评分4-5分的病灶诊断为恶性病变,3分以下的病灶诊断为良性病变.5分法通过弹性成

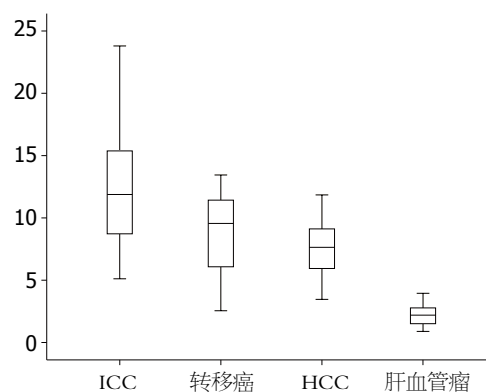


图 2 肝脏肿瘤不同病理类型的SR分布情况.

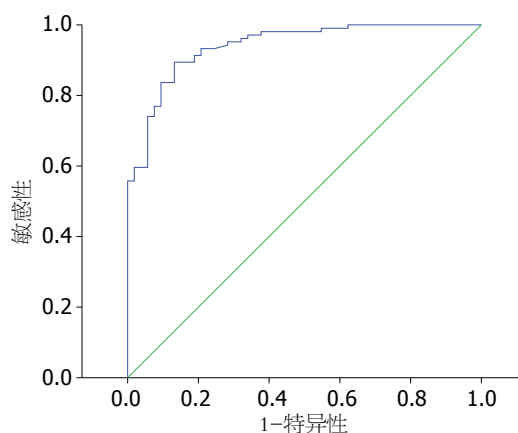


图 3 肝脏肿瘤SR的ROC曲线.

像图像颜色分布特点进行评分,受人为主观因素影响较大,有时不同的医生在相同条件下,对同一张超声弹性成像图可以给出不同的评分.而SR是一定量指标,他可以将病灶和周围组织的弹性图像色彩分布数值化,客观的反映病变组织的硬度信息. SR测量工具是超声仪器附带的软件,在对病灶区域及周围组织区域进行比较测量时,应该力求保持这两个感兴趣区域的划定范围同大小、同形状、同深度.关于SR选取的方法,国内已有学者研究,Zhi等^[9]对乳腺超

声弹性图像分析发现: 在进行乳腺SR测量时, 应选取病灶同一深度的乳腺组织作为参照, 得出的结果更能反应病灶的相对硬度, 因为同一深度的乳腺组织理论上与病灶接受的外力相同。

在本研究中, 我们发现肝脏良恶性肿瘤的SR各不相同, 其差异具有统计学意义, 反映了在一定外力作用下, 良恶性肿瘤的形变程度不同, 良性肿瘤质软形变大, 恶性肿瘤质硬而形变小。Masuzaki等^[10]用瞬时弹性技术(fibroscan)分析研究了不同病理类型肝脏肿瘤的硬度, 显示ICC的平均硬度约为75 kPa, 转移性肝癌的平均硬度约为66.5 kPa, 而HCC的平均硬度约为55 kPa, ICC的硬度高于转移性肝癌及HCC。病理研究也证实, 从大体标本上来看, 切开肿瘤后, HCC内部结构疏松而ICC则相对致密, 这是因为HCC富含血供, 肿瘤细胞之间布满了血窦, 肿瘤细胞在肿瘤内部分布比较均匀^[11]; 而ICC则少血供, 并且在肿瘤边缘以肿瘤细胞为主, 中央区则肿瘤细胞较少而纤维组织含量丰富, 其内血管分布较稀疏, 且多被包埋在间质纤维中, 肿瘤内部有很多纤维组织成分将其分隔^[12]。而肝血管瘤质地柔软, 切面呈蜂窝状, 可压缩, 状如海绵, 镜下见充满血液扩张的血窦^[13]。从病理角度分析, 肝内肿瘤的硬度: ICC>HCC>肝血管瘤。本研究显示肿瘤的SR与肿瘤的实际硬度之间存在一定的相关性, 能较为准确的反映肿瘤的实际硬度。

在本研究中, 共有157个病灶, 其中良性肿瘤53个, 恶性肿瘤104个, 比较根据SR进行良恶性诊断的敏感性与特异性, 绘制ROC曲线, 用AUC评价诊断试验的准确性, 其取值范围在0.5-1.0之间, AUC越接近1说明诊断的准确性越高, AUC = 0.5时说明该试验毫无诊断价值, 一般认为AUC为0.5-0.7时, 表示诊断准确性较低, 0.7-0.9时表示诊断价值中等, 0.9以上表示诊断价值较高^[14]。本研究组的AUC是0.941, 说明以SR作为肝脏良恶性肿瘤的诊断标准具有较高的准确性。根据约登指数最大值, 取得SR最合适诊断临界点为4.0, 即SR \geq 4.0者诊断为恶性肿瘤, 而SR<4.0者诊断为良性肿瘤。以此为标准, 在本研究组104个恶性病灶中, 经SR测量确诊93个, 漏诊11个, 53个良性病灶中, 确诊46个, 误诊7个, 其肝脏良恶性肿瘤的诊断敏感性为89.4%, 特异性为86.8%, 准确性为88.5%, 阳性预测值为93.0%及阴性预测值为80.7%, 表明以该点为临界点有较高的诊断准确性。

目前关于超声弹性成像研究的报道多采用

5分评分法来确定所检测病灶的良恶性, 1-5分表示病灶相对于正常组织的弹性系数是由小到大, 1-3分是相对较软的病灶, 为良性, 4-5分是相对较硬的病灶为恶性^[15]。但是在本研究中, 我们发现: 评分为1-2分的主要为良性病灶, 4-5分的主要为恶性病灶, 这是值得肯定的。而3分是良恶性的交界区间, 不能笼统的定义为良性, 在这一区间, 良恶性肿瘤重叠较多。对照病理结果进一步分析, 在3分位置的重叠主要是纤维化程度较高的肝血管瘤以及一些中心出现出血、坏死等病理改变的恶性肿瘤。况且对于弹性图像蓝绿色彩的分布情况, 不同的人会给出不同的评分, 存在人为主观因素, 在2-3分间, 尤为明显, 造成了5分法评价肿瘤的良恶性, 会出现一定的漏诊及误诊。而SR这一定量指标的引入, 可以弥补这一缺陷, 在评价肿瘤性质上, 更为客观和准确。

目前超声弹性成像技术在肝脏肿瘤中的研究和应用较少, 因为其不同于乳腺、甲状腺等浅表器官, 具有一定的特殊性。肝脏位置较深, 且被肋骨所遮盖, 有时弹性图像不能令人满意; 部分病灶体积较大, 不能被感兴趣区完全包绕, 影响到了弹性图像的分级; 特别是肝硬化基础上的肝脏肿瘤会造成SR偏低, 由于肝硬化肝组织的硬度大于正常肝组织, 而SR反映的是病灶对周围组织的相对硬度, 因此在肝硬化程度较重的肝脏肿瘤, 如测得SR<4.0, 却不能排除恶性肿瘤的可能, 需结合常规超声及彩色多普勒进行综合评价。

总之, 我们认为SR测量可以较为客观地反映病灶的硬度情况, 避免了5分法的一些人为主观影响, 是一种更为准确客观的诊断肝脏良恶性肿瘤的超声弹性成像新方法。

■应用要点

超声弹性成像技术可以作为一项鉴别肝脏良恶性肿瘤的评估手段, 有着良好的诊断效能和应用前景。超声弹性成像从病变的硬度上分析, 弥补了常规超声及彩色多普勒对硬度判断的不足, 丰富了超声诊断信息。

4 参考文献

- 1 朱明华. 肝脏肿瘤病理学研究展望. 中华病理学杂志 2007; 36: 721-722
- 2 Ophir J, Céspedes I, Ponnekanti H, Yazdi Y, Li X. Elastography: a quantitative method for imaging the elasticity of biological tissues. *Ultrason Imaging* 1991; 13: 111-134
- 3 Itoh A, Ueno E, Tohno E, Kamma H, Takahashi H, Shiina T, Yamakawa M, Matsumura T. Breast disease: clinical application of US elastography for diagnosis. *Radiology* 2006; 239: 341-350
- 4 智慧, 肖晓云, 杨海云, 文艳玲, 罗葆明, 梁碧玲. 超声弹性成像比值法与评分法在乳腺肿物诊断中的比较. 中华超声影像学杂志 2010; 19: 142-144
- 5 Thomas A, Fischer T, Frey H, Ohlinger R, Grunwald S, Blohmer JU, Winzer KJ, Weber S, Kristiansen G, Ebert B, Kümmel S. Real-time elastography-an advanced method of ultrasound: First results in 108 patients with breast lesions. *Ultrasound Obstet*

■同行评价

本文选题新颖, 科研设计严谨, 科学性、创新性和可读性较好.

- 6 智慧, 肖晓云, 杨海云, 文艳玲, 罗葆明, 梁碧玲. 弹性应变率比值在乳腺实性肿物良恶性鉴别诊断中的价值初探. *中华超声影像学杂志* 2009; 18: 589-591
- 7 Krouskop TA, Wheeler TM, Kallel F, Garra BS, Hall T. Elastic moduli of breast and prostate tissues under compression. *Ultrason Imaging* 1998; 20: 260-274
- 8 罗葆明, 欧冰, 冯霞, 文艳玲. 乳腺疾病实时组织弹性成像与病理对照的初步探讨. *中国超声医学杂志* 2005; 21: 662-664
- 9 Zhi H, Xiao XY, Yang HY, Wen YL, Ou B, Luo BM, Liang BL. Semi-quantitating stiffness of breast solid lesions in ultrasonic elastography. *Acad Radiol* 2008; 15: 1347-1353
- 10 Masuzaki R, Tateishi R, Yoshida H, Sato T, Ohki T, Goto T, Yoshida H, Sato S, Sugiyoka Y, Ikeda H, Shiina S, Kawabe T, Omata M. Assessing liver tumor stiffness by transient elastography. *Hepatol Int* 2007; 1: 394-397
- 11 董敬东, 王利芬. 原发性肝癌影像学特征与病理学关系的研究进展. *大连医科大学学报* 2005; 27: 474-476
- 12 Franco D, Usatoff V. Surgery for cholangiocarcinoma. *Hepatogastroenterology* 2001; 48: 53-55
- 13 崔彦, 董家鸿. 肝血管瘤的病理和临床特点及微创治疗. *中国微创外科杂志* 2006; 6: 338-340
- 14 Robertson EA, Zweig MH. Use of receiver operating characteristic curves to evaluate the clinical performance of analytical systems. *Clin Chem* 1981; 27: 1569-1574
- 15 徐智章, 俞清. 超声弹性成像原理及初步应用. *上海医学影像* 2005; 14: 3-5

编辑 李薇 电编 何基才

ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) CN 14-1260/R 2010年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

2009年《世界华人消化杂志》编委审稿总结

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

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

Budd-Chiari综合征在河南地区的发病年龄趋势

张文广, 丁鹏绪, 韩新巍, 李臻, 周朋利, 麻恒翔, 马彦高

张文广, 丁鹏绪, 韩新巍, 李臻, 周朋利, 麻恒翔, 马彦高, 郑州大学第一附属医院介入治疗中心 郑州大学介入治疗研究所 河南省郑州市 450052

作者贡献分布: 此课题由韩新巍指导; 由张文广、丁鹏绪及李臻共同设计完成; 周朋利、麻恒翔及马彦高进行部分数据统计分析; 张文广与韩新巍完成论文写作。

通讯作者: 韩新巍, 教授, 450052, 河南省郑州市建设东路1号, 郑州大学第一附属医院介入治疗中心。hanxinwei 2006@163.com

电话: 0371-66913623 传真: 0371-66971086

收稿日期: 2010-07-20 修回日期: 2010-08-22

接受日期: 2010-08-31 在线出版日期: 2010-10-28

Age trends in the prevalence of Budd-Chiari syndrome in Henan Province

Wen-Guang Zhang, Peng-Xu Ding, Xin-Wei Han, Zhen Li, Peng-Li Zhou, Heng-Xiang Ma, Yan-Gao Ma

Wen-Guang Zhang, Peng-Xu Ding, Xin-Wei Han, Zhen Li, Peng-Li Zhou, Heng-Xiang Ma, Yan-Gao Ma, Department of Interventional Radiology, the First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, Henan Province, China

Correspondence to: Professor Xin-Wei Han, Department of Interventional Radiology, the First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, Henan Province, China. hanxinwei 2006@163.com

Received: 2010-07-20 Revised: 2010-08-22

Accepted: 2010-08-31 Published online: 2010-10-28

Abstract

AIM: To analyze the changes in the age of patients with Budd-Chiari syndrome in Henan Province, China between 1995 and 2009, and to analyze the possible etiological factors contributing to such changes.

METHODS: The clinical data for 909 patients with Budd-Chiari syndrome treated at the Department of Interventional Radiology of the First Affiliated Hospital of Zhengzhou University from 1995 to 2009 were analyzed using the SPSS 13.0 statistical software.

RESULTS: The mean age of patients with Budd-Chiari syndrome is 39.17 ± 11.40 . An ascending trend was observed for the mean age of patients with Budd-Chiari syndrome in Henan Province from 1995 to 2009 ($P < 0.05$). Patients aged 35-44 years accounted for 19.87% during 1995-1997,

and 38.51% during 2007-2009. The percentage of patients aged 35-44 years showed an upward trend. In contrast, the percentage of patients aged 25-34 years showed a downward trend during this period. The percentages of other age groups of patients did not change greatly (all $P > 0.05$).

CONCLUSION: The age at diagnosis of patients with Budd-Chiari syndrome shows an upward trend in Henan Province from 1995 to 2009.

Key Words: Budd-Chiari syndrome; Age of onset; Etiology; Environmental factor

Zhang WG, Ding PX, Han XW, Li Z, Zhou PL, Ma HX, Ma YG. Age trends in the prevalence of Budd-Chiari syndrome in Henan Province. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(30): 3259-3261

摘要

目的: 分析1995-2009年15年期间河南地区Budd-Chiari综合征发病年龄变化趋势, 推测其发病原因。

方法: 选择1995-2009年郑州大学第一附属医院介入治疗中心保存资料齐全的909例Budd-Chiari综合征发病资料为研究对象, SPSS13.0对其进行数据分析。

结果: Budd-Chiari综合征患者平均年龄为 39.17 ± 11.40 岁, 发病年龄有上升趋势 ($P < 0.05$), 35-44岁年龄组的构成比从1995-1997年间的19.87%上升至2007-2009年间的38.51%, 总体呈逐年上升趋势 ($P < 0.05$), 25-34岁年龄组的构成比相对出现下降趋势 ($P < 0.05$), 其余年龄组未发生明显变化 ($P > 0.05$)。

结论: 河南地区Budd-Chiari综合征患者的发病年龄有上升趋势及年龄构成比发生变化, 可能与饮食因素改变有关。

关键词: Budd-Chiari综合征; 发病年龄; 病因学; 环境因素

张文广, 丁鹏绪, 韩新巍, 李臻, 周朋利, 麻恒翔, 马彦高. Budd-

■背景资料

Budd-Chiari综合征在世界范围内均有报道, 国内已有不少单位曾先后报道过大宗病例, 公认我国的河南、河北、江苏、山东和辽宁地区为该病的高发地区。虽然对我国Budd-Chiari综合征的治疗已取得了满意的疗效, 然则其病因仍不明确, 尚未有文献报道其发病年龄趋势有无变化。

■同行评议者

赵卫, 主任医师, 昆明医学院第一附属医院医学影像中心

■相关报道

郭成浩等发现 Budd-Chiari 综合征患者的尿碘明显高于对照组正常人群, 因此提出 Budd-Chiari 综合征的发病与外环境高碘有关的假说, 认为微量元素也可能参与 Budd-Chiari 综合征的形成。

Chiari 综合征在河南地区的发病年龄趋势. 世界华人消化杂志 2010; 18(30): 3259-3261

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/3259.asp>

0 引言

Budd-Chiari 综合征在世界范围内均有报道, 国内已有不少单位曾先后报道过大宗病例, 公认我国的河南、河北、江苏、山东和辽宁地区为该病的高发地区. 虽然对我国 Budd-Chiari 综合征的治疗已取得了满意的疗效, 然则其病因仍不确切, 尚未有文献报道其发病年龄趋势有无变化, 本研究目的皆在了解河南地区 Budd-Chiari 综合征患者的发病年龄有无变化, 探讨引起发病年龄上升的原因, 现报道如下.

1 材料和方法

1.1 材料 选择 1995-2009 年郑州大学第一附属医院介入治疗中心保存资料齐全的 909 例 Budd-Chiari 综合征发病资料为研究对象, 全部经数字减影血管造影证实, 其中男 569 例, 占 62.60%, 女 440 例, 占 38.40%, 男:女 = 1.29:1, 男女构成为 62.60:38.40.

1.2 方法 按年限分为 7 组(最低保持每组病例数超过 100 例), 按每增加 10 岁在各年限内划分年龄组, 比较不同年限内患者平均年龄的变化; 比较不同年限内相同年龄组构成比随时间的变化趋势.

统计学处理 对所得数据采用 SPSS13.0 统计软件进行统计学处理, 使用 χ^2 检验, 检验标准按 $\alpha = 0.05$.

2 结果

Budd-Chiari 综合征发病年龄分布见图 1, 不同年限内各年龄组构成比随时间变化趋势见表 1. 在 909 例 Budd-Chiari 综合征病例中, 年龄最小者为 3 岁半, 最长者为 75 岁, 疾病年龄主要集中在 25-34 岁、35-44 岁和 45-54 岁 3 个年龄组中, 约占总数的 82%. 35-44 岁年龄组构成比从 1995-1997 年的 19.87% 上升到 2007-2009 年的 38.51% ($P < 0.05$), 总体呈逐年上升趋势, 由于该年龄段的比例增高, 相应的 25-34 岁年龄组构成比从 1995-1997 年的 45.70% 下降到 2007-2009 年的 17.70% ($P < 0.05$), 其余年龄组尚未发生明显变化 ($P > 0.05$), 由于年龄构成比的变化, 使 1995-1997 年患者的平均年龄从 35.1 岁 \pm 10.24 岁上升到 2007-2009 年的 41.55 岁 \pm 10.87 岁 ($P < 0.05$).

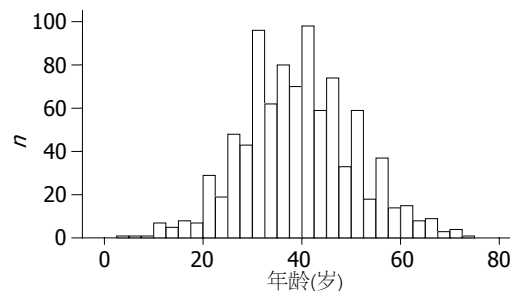


图 1 909 例 Budd-Chiari 综合征发病年龄分布.

3 讨论

Budd-Chiari 综合征是指由于各种原因引起的肝静脉和肝后段下腔静脉部分或完全性梗阻性血液回流障碍而致的门静脉高压症候群和/或下腔静脉高压症候群. Budd-Chiari 综合征的病因复杂, 多随地域、民族和病理类型不同而异, 在西方国家, 此病大多数由血液凝固异常, 血栓形成引起^[1,2]. 而我国目前则尚未统一定论^[3-5], 现多集中在先天性发育异常、感染或炎症、血液凝固异常与血栓形成或其他因素引起.

随着对 Budd-Chiari 综合征地深入研究, 除了上述病因外, 近来来已有学者开始意识到环境因素, 如饮食结构、饮食习惯等也有可能参与 Budd-Chiari 综合征的发病和进展, 郭成浩等^[6]发现 Budd-Chiari 综合征患者的尿碘明显高于对照组正常人群, 因此提出 Budd-Chiari 综合征的发病与外环境高碘有关的假说, 认为微量元素也可能参与 Budd-Chiari 综合征的形成.

根据流行病学特征可以推测疾病的病因和发病机制, 患者的发病年龄、地区分布等流行病学特征, 是形成病因假设的基础和重要来源^[7]. 对于慢性非传染性疾病的病因研究, 应重视环境因素的问题^[8]. 我国 Budd-Chiari 综合征主要分布在河南、河北、江苏、山东和辽宁 5 省的农村地区^[9]. 而这 5 省恰恰分布在黄淮海冬麦区, 那么是否饮食因素也参与该病的形成? 两者之间是否存在相关性? 鉴于此, 我们提出慢性食物中毒学说、营养失调学说, 即认为我国 Budd-Chiari 综合征高发地区的日常饮食中含有某些微量致病因子, 随着饮食的摄入, 这些致病因子在体内不断累积, 间接或直接参与下腔静脉阻塞隔膜的形成, 逐渐产生临床症状, 最终形成 Budd-Chiari 综合征.

查阅文献并对 Budd-Chiari 综合征河南高发地区进行查访, 我们发现, 近年来随着农民收入的不断提高, 生活水平逐渐改善, 农村地区的膳食结构发生了明显变化, 蛋白含量和维生素等

表 1 1995-2009年Budd-Chiari综合征各年龄组年龄构成比变化

时间	<i>n</i>	平均年龄(岁)	≤14岁 <i>n</i> (%)	15-24岁 <i>n</i> (%)	25-34岁 <i>n</i> (%)	35-44岁 <i>n</i> (%)	45-54岁 <i>n</i> (%)	55-64岁 <i>n</i> (%)	≥65岁 <i>n</i> (%)
1995-1997	151	35.10 ± 10.24	3(1.99)	15(9.93)	69(45.70)	30(19.87)	30(19.87)	4(2.65)	0(0.00)
1998-2000	150	35.85 ± 12.37	6(4.00)	16(10.67)	53(35.33)	41(27.33)	22(14.66)	9(6.00)	3(2.00)
2001-2003	128	38.26 ± 11.70	2(1.56)	8(6.25)	41(32.03)	42(32.81)	22(17.18)	10(7.81)	3(2.34)
2004-2006	158	42.11 ± 10.36	1(0.63)	5(3.16)	29(18.35)	69(43.67)	37(23.42)	12(7.59)	5(3.16)
2007-2009	322	41.55 ± 10.87	3(0.93)	19(5.90)	57(17.70)	124(38.51)	77(23.91)	36(11.18)	6(1.86)
合计	909	39.16 ± 11.40	15(1.65)	63(6.93)	249(27.39)	306(33.66)	188(20.68)	71(7.81)	17(1.87)

■同行评价

本文资料完整, 数据统计处理恰当, 讨论符合科学规律, 结论可靠。

摄入量已明显提高. 我们认为正是饮食结构的改变, 间接或直接影响了Budd-Chiari综合征的发生和进展, 使发病年龄发生变化. 由于膳食结构的改变, 减少了原来致病因子的摄入量, 使发生Budd-Chiari综合征所需的致病因子的累积时间延长, 进而推迟了该病的发生, 使发病年龄推迟. 但是由于农村地区长期的饮食习惯、饮食环境等仍未发生变化, 仍或多或少地摄入或接触致病因子, 这些致病因子一旦进入在体内, 就会不断积累, 直至达到可产生Budd-Chiari综合征的水平, 然后出现临床症状而就诊. 另外随着人口老龄化, Budd-Chiari综合征亦高龄化. 然而这只是种推测, 缺乏有充分证据的深入研究和系统研究, 尚需要进一步证实.

总之, 近年来Budd-Chiari综合征的发病年龄已发生变化, 年龄构成比也已随之改变. 我们推测这可能与农村地区饮食结构的改变有关, 饮食因素可能参与Budd-Chiari综合征的发生和进展. Budd-Chiari综合征的病因和发病机制与疾病的治疗和预防紧密相关, 需要继续深入地研究, 而且关于Budd-Chiari综合征的病因从现场

到临床, 从临床到实验室还有许多研究内容需要开展, 希望我国的农民早日摆脱Budd-Chiari综合征的困扰.

4 参考文献

- 1 Rav-Acha M, Gur C, Ilan Y, Verstandig A, Eid A. [Budd-Chiari syndrome: updated treatment modalities] *Harefuah* 2004; 143: 372-376, 389
- 2 Okuda K. Obliterative hepatocavopathy-inferior vena cava thrombosis at its hepatic portion. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2002; 1: 499-509
- 3 秦成勇, 许伟华. Budd-Chiari综合征的病因及发病机制. *世界华人消化杂志* 2002; 10: 1184-1189
- 4 Zhang XM, Li QL. Etiology, treatment, and classification of Budd-Chiari syndrome. *Chin Med J (Engl)* 2007; 120: 159-161
- 5 韩新巍, 陈呈世, 段广才. 布卡综合征与炎症及血栓的关系. *血栓与止血学* 2007; 13: 255-257
- 6 郭成浩, 边建朝, 王俭, 宝荣, 樊庆勇, 赵金旭, 金鲁明, 李广生. 山东省菏泽地区隔膜型布-加综合征外环境饮用水多元素测定. *中国地方病学杂志* 2005; 24: 207-209
- 7 陶秋山, 詹思延, 李立明. 流行病学研究中的病因与病因推断. *中华流行病学杂志* 2004; 11: 1000-1003
- 8 何兴舟. 原因不明性疾病病因学研究方法介绍. *卫生研究* 1981; 3: 106-110
- 9 王丹, 张在人, 李艳英, 闫文颖, 赵德利, 万勇. Budd-Chiari综合征影像诊断的进展. *世界华人消化杂志* 2008; 16: 746-750

编辑 曹丽鸥 电编 何基才

ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) CN 14-1260/R 2010年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

汤姆森-路透公布 2009 年 *WJG* 影响因子 2.092

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

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

PTEN、HER-2/neu和PKB在胆管癌组织中的表达及其意义

崔东旭, 于艳龙

■背景资料

胆管癌是起源于胆管上皮细胞的恶性肿瘤, 恶性程度高、发展迅速, 临床上难于早期发现, 因此对其发生、发展机制的研究有利于找出肿瘤发展过程中的标志物, 从而有利于早期诊断或是为肿瘤的生物治疗找到新的靶点。

崔东旭, 于艳龙, 中国医科大学附属盛京医院肝胆胰肿瘤移植外科 辽宁省沈阳市 110004

作者贡献分布: 此课题由崔东旭与于艳龙设计; 研究过程、数据分析及论文写作均由于艳龙完成。

通讯作者: 崔东旭, 教授, 110004, 辽宁省沈阳市, 中国医科大学附属盛京医院肝胆胰肿瘤移植外科, cuidongxu@hotmail.com

收稿日期: 2010-04-01 修回日期: 2010-09-03

接受日期: 2010-09-13 在线出版日期: 2010-10-28

Significance of expression of PTEN, HER-2/neu and PKB in cholangiocarcinoma

Dong-Xu Cui, Yan-Long Yu

Dong-Xu Cui, Yan-Long Yu, Department of Hepatobiliary and Pancreatic Oncology Surgery & Organ Transplantation, Shengjing Hospital of China Medical University, Shenyang 110004, Liaoning Province, China

Correspondence to: Professor Dong-Xu Cui, Department of Hepatobiliary and Pancreatic Oncology Surgery & Organ Transplantation, Shengjing Hospital of China Medical University, Shenyang 110004, Liaoning Province, China. cuidongxu@hotmail.com

Received: 2010-04-01 Revised: 2010-09-03

Accepted: 2010-09-13 Published online: 2010-10-28

Abstract

AIM: To investigate the expression of PTEN, HER-2 and protein kinase B (PKB) in cholangiocarcinoma and to analyze their correlation with the tumorigenesis and progression of cholangiocarcinoma.

METHODS: The expression of PTEN, HER-2/neu and PKB in 80 cholangiocarcinoma specimens and 24 normal bile duct tissue specimens was detected by immunohistochemistry.

RESULTS: The positive rate of PTEN expression in cholangiocarcinoma was significantly lower than that in normal bile duct tissue (40.00% vs 79.17%, $\chi^2 = 11.33$, $P = 0.001$). The positive rates of HER-2/neu and PKB expression were significantly higher in cholangiocarcinoma than in normal bile duct tissue (HER-2: 73.75% vs 33.33%, $\chi^2 = 13.16$, $P = 0.000$; PKB: 80.00% vs 54.17%, $\chi^2 = 6.41$, $P = 0.01$). There was a negative correlation between PTEN and HER-2/neu expression ($r = -0.456$, $P = 0.000$) and between PTEN and PKB

expression ($r = -0.355$, $P = 0.001$) but a positive correlation between HER-2/neu and PKB expression ($r = 0.374$, $P = 0.001$) in cholangiocarcinoma.

CONCLUSION: Loss of PTEN expression and HER-2/neu overexpression may lead to deregulated cell proliferation, which is closely related with the development and progression of cholangiocarcinoma. Both PTEN expression and HER-2/neu expression are associated with PKB expression, suggesting that PTEN and HER-2/neu regulate the development and progression of cholangiocarcinoma perhaps via the PI3K-PKB signaling pathway.

Key Words: Cholangiocarcinoma; PTEN; HER-2/neu; Protein kinase B; Immunohistochemistry

Cui DX, Yu YL. Significance of expression of PTEN, HER-2/neu and PKB in cholangiocarcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(30): 3262-3266

摘要

目的: 观察PTEN、HER-2/neu和PKB在胆管癌组织中的表达, 并探讨其与胆管癌发生、发展的关系及其意义。

方法: 应用免疫组织化学SP法检测80例胆管癌组织和24例正常胆管组织(取自其他良性疾病行胆管切除者)中PTEN、HER-2/neu和PKB的表达。

结果: 胆管癌组织中PTEN表达显著低于正常胆管组织(40.00% vs 79.17%, $\chi^2 = 11.33$, $P = 0.001$), HER-2/neu的表达显著高于正常胆管组织(73.75% vs 33.33%, $\chi^2 = 13.16$, $P = 0.000$), PKB的表达显著高于正常胆管组织(80.00% vs 54.17%, $\chi^2 = 6.41$, $P = 0.01$)。PTEN和HER-2/neu蛋白表达呈明显负相关($r = -0.456$, $P = 0.000$); PTEN与PKB蛋白表达呈明显负相关($r = -0.355$, $P = 0.001$); HER-2/neu与PKB蛋白表达呈明显正相关($r = 0.374$, $P = 0.001$)。

结论: PTEN表达的缺失和HER-2/neu过表达可能导致细胞增殖失控, 与胆管癌的发生、发展密切相关, 二者均与PKB呈相关性, 提示二

■同行评议者

英卫东, 教授, 安徽省立医院肝胆外科

者均可能通过PI3K-PKB信号转导参与胆管癌的发生发展。

关键词: 胆管癌; PTEN; HER-2/neu; 蛋白激酶B; 免疫组织化学

崔东旭, 于艳龙. PTEN、HER-2/neu和PKB在胆管癌组织中的表达及其意义. 世界华人消化杂志 2010; 18(30): 3262-3266
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/3262.asp>

0 引言

胆管癌是起源于胆管上皮细胞的恶性肿瘤, 近年来其发病率呈上升趋势^[1]. 胆管癌恶性程度高、发展迅速, 临床上难于早期发现; 另外由于胆管癌所在解剖部位复杂使得手术切除率很低; 加上一般的放、化疗疗效不满意, 所以胆管癌预后非常差. 鉴于胆管癌的上述特性, 有必要对其发生、发展机制进行更深入地研究. 研究证实, PTEN、人表皮生长因子受体2(human epidermal growth factor receptor 2, HER-2)和蛋白激酶B(protein kinase B, PKB)在人类多种肿瘤, 如神经胶质瘤、前列腺癌、子宫内膜癌、黑色素瘤及胃肠道肿瘤、肝癌、胰腺癌、上皮性卵巢癌等^[2-4]均存在异常表达, 提示PTEN、HER-2/neu和PKB的改变与肿瘤的发生、发展有关. 本研究旨在探讨PTEN、HER-2/neu和PKB在胆管癌组织中的表达和三者胆管癌发生发展中的关系及意义.

1 材料和方法

1.1 材料 收集2005-01/2008-10在中国医科大学附属盛京医院普通外科住院并行手术治疗的胆管癌患者资料, 选择其中临床资料完整的胆管癌患者80例, 均经病理检查确诊, 术前均未行放化疗. 另收集同期24例经病理证实的正常胆管组织标本(取自其他良性疾病行胆管切除者)作为正常对照. 标本均用10%甲醛溶液固定, 石蜡包埋, 4 μ m连续切片. 兔抗人HER-2/neu多克隆抗体(DAKOUSA)、鼠抗人PTEN单克隆抗体、SP和DAB(购自北京中杉金桥生物技术有限公司), 鼠抗人PKB多克隆抗体为Santa Cruz公司产品.

1.2 方法

1.2.1 免疫组织化学检测: 所有标本均经石蜡包埋、切片, 常规脱蜡, 水化后经3%过氧化氢处理, 微波抗原修复, 其余染色步骤按各试剂说明书分别进行PTEN、HER-2/neu和PKB免疫组织化学SP法检测. 以PBS代替一抗作阴性对照, 用

已知阳性片为阳性对照.

1.2.2 结果判定: (1)PTEN和PKB蛋白结果判定: 在显微镜下($\times 400$)观察, 随机计数10个高倍视野, 无阳性或阳性细胞 $<25\%$ 为(-), 阳性细胞 $25\%-50\%$ 为(+), 阳性细胞数 $50\%-75\%$ 为(++), 阳性细胞数 $\geq 75\%$ 为(+++), +或++视为PTEN、PKB过表达阳性, +++视为PTEN、PKB过表达强阳性. 不以染色深浅作为判断阳性程度指标, 以排除一抗浓度、DAB染色时间、标本保存时间等因素的干扰; (2)HER-2/neu结果判定: 按照DAKO标准进行染色强度分级: 在显微镜下($\times 400$)观察, 随机计数10个高倍视野, 阴性(-): 未着色或 $<10\%$ 的肿瘤细胞膜着色; (+): $>10\%$ 的肿瘤细胞膜呈微弱的着色且仅为细胞膜的不完全着色; (++) : $>10\%$ 的肿瘤细胞呈弱到中等强度的细胞膜完全着色; 强阳性(+++): $>10\%$ 的肿瘤细胞呈强的细胞膜着色, +或++视为HER-2/neu过表达阳性, +++视为HER-2/neu过表达强阳性.

统计学处理 采用SPSS13.0软件包进行统计学分析, 计数资料以 χ^2 检验和Fisher精确概率法进行统计分析, PTEN、HER-2/neu和PKB之间的相关性采用Spearman等级相关分析, 均以 $P < 0.05$ 认定为有统计学意义.

2 结果

2.1 PTEN、HER-2/neu和PKB蛋白在胆管癌和正常胆管组织中的表达 PTEN蛋白在胆管癌组织阳性表达率为40.00%, 多表达于胞质, 少数表达于细胞核, 出现明显棕黄色颗粒; 正常组织阳性表达率为79.17%, 两者存在显著性差异($\chi^2 = 11.33, P = 0.001$). HER-2/neu蛋白在胆管癌组织阳性表达率为73.75%, 细胞膜和细胞质出现棕黄色颗粒; 正常组织阳性表达率为33.33%, 两者存在显著性差异($\chi^2 = 13.16, P = 0.000$). PKB蛋白在胆管癌组织阳性表达率为80.00%, 多表达于胞质, 少数表达于细胞核, 出现明显棕黄色颗粒; 正常组织阳性表达率为54.17%, 两者存在显著性差异($\chi^2 = 6.41, P = 0.01$, 图1, 表1).

2.2 PTEN、HER-2/neu和PKB蛋白在胆管癌组织中表达的相关性 PTEN和HER-2/neu表达存在显著的负相关($r = -0.456, P = 0.000$); PTEN和PKB表达亦存在显著的负相关($r = -0.355, P = 0.001$); HER-2/neu和PKB表达则存在显著的正相关($r = 0.374, P = 0.001$, 表2-4).

3 讨论

癌基因和抑癌基因的表达失常或失衡所导致的

■ 研发前沿

检测胆管癌中不同基因的表达, 进一步研究胆管癌发生发展机制一直是研究的热点与难点, 结合临床特征, 对未来判定胆管癌的恶性程度、侵袭性以及评价预后具有重要意义, 同时或可为胆管癌的靶向药物治疗提供新的靶点.

■ 创新盘点

本研究探讨PTEN、HER-2/neu和PKB在胆管癌组织中的表达和三者胆管癌发生发展中的关系及意义, 这在国内发表的相关文章中尚不多见.

■应用要点

本文为胆管癌发生发展的研究提供了一些线索,并可能为胆管癌的靶向药物研究提供一些方向。

表 1 PTEN、HER-2/neu和PKB蛋白在胆管癌组织和正常组织中的表达率

分组	n	PTEN(n)		表达率(%)	χ^2 值	P值	HER-2/neu		表达率(%)	χ^2 值	P值	PKB		表达率(%)	χ^2 值	P值
		阴性	阳性				阴性	阳性				阴性	阳性			
正常组	24	5	19	79.17	11.33	0.001	16	8	33.33	13.16	0.00	11	13	54.17	6.41	0.01
病例组	80	48	32	40.00			21	59	73.75			16	64	80.00		

表 2 胆管癌组织PTEN与HER-2/neu表达间的相关性 (n)

HER-2/neu	PTEN			合计
	阴性	阳性	强阳性	
阴性	4	7	10	21
阳性	20	3	5	28
强阳性	24	5	2	31
合计	48	15	17	80

表 3 胆管癌组织HER-2/neu与PKB表达间的相关性 (n)

PKB	HER-2/neu			合计
	阴性	阳性	强阳性	
阴性	5	6	5	16
阳性	15	4	5	24
强阳性	1	18	21	40
合计	21	28	31	80

表 4 胆管癌组织PTEN与PKB表达间的相关性 (n)

PTEN	PKB			合计
	阴性	阳性	强阳性	
阴性	7	10	31	48
阳性	2	8	5	15
强阳性	7	6	4	17
合计	16	24	40	80

细胞信号转导紊乱、细胞失控增殖在肿瘤的发生、发展和转归上具有关键性作用。如前所述,大量研究表明,抑癌基因PTEN、癌基因HER-2/neu在多种肿瘤中均有异常表达,并且在调节肿瘤细胞生长、分化、侵袭转移和肿瘤血管新生等各方面均有重要作用^[5,6]。另一方面,细胞信号转导通路紊乱是肿瘤细胞的重要生物学特性之一,其中三磷酸肌醇激酶(phosphatidyl inositol 3-kinase, PI3K)/PKB信号转导通路在维持细胞恶性生物学特性中起着重要作用^[7]。

PTEN是迄今为止发现的第1个具有磷酸酶活性的抑癌基因,定位于人染色体10q23^[8],其表

达产物是PI3K/PKB信号转导通路上的关键蛋白。Furnari等^[9]在对脑胶质瘤细胞系的研究中也发现外源性野生型PTEN能显著抑制脑胶质瘤细胞系的生长。PTEN基因缺失和突变率非常高,在人类多种肿瘤中均有PTEN杂合性丢失或突变致畸失活,如在神经胶质瘤、子宫内膜癌、前列腺癌、在乳腺癌、卵巢癌、肾细胞癌、甲状腺癌、淋巴瘤、肝细胞癌,肺癌等多种恶性组织中均有PTEN表达的不同程度下降^[10]。本研究结果显示,PTEN蛋白在胆管癌组织中表达显著低于在正常胆管组织,提示胆管癌的发生发展过程中同样可能存在PTEN基因的突变或杂合性缺失。

HER-2/neu基因则位于人染色体17q-12-21.3的一种细胞癌基因,主要参与细胞的分裂和生长,于胚胎发育时期开始表达,成年后正常组织中仅可检测到少量的HER-2/neu基因。在正常情况下该基因处于非激活状态,其编码产物是具有酪氨酸酶活性的细胞跨膜糖蛋白(P185),其在某些肿瘤的细胞信号转导中起着重要作用,是肿瘤细胞生长、分化的重要调节因子^[11]。目前认为HER-2/neu主要通过对细胞转导通路的影响来参与细胞的增殖、分化、迁移、黏附、转化与凋亡,使细胞增殖加快,周期加速,使细胞呈现恶性表现。一些研究认为HER-2的过表达与临床进展相关,认为他是决定患者生存期的独立因素,并且有人认为血清HER-2蛋白水平是复发后预期存活的最强因素^[6]。本试验研究结果显示,HER-2/neu蛋白在胆管癌组织表达明显高于正常胆管组织;表明HER-2蛋白过表达同样与胆管癌发生、发展密切相关。

PKB是一个相对分子质量约60 000 Da的蛋白,是一类调解细胞凋亡/存活的胞质信号转导蛋白^[12],其在多种细胞中充当抗凋亡信号激酶的作用,参与调控细胞内若干程序信号转导,介导肿瘤发生发展^[13],因此PKB被认为是一个潜在的癌基因。细胞外生长信号通过PI3K作用产生磷脂酰肌醇3, 4, 5-三磷酸(phosphatidyl inositol 3, 4, 5-triphosphate, PIP3),后者激活PKB从而启动

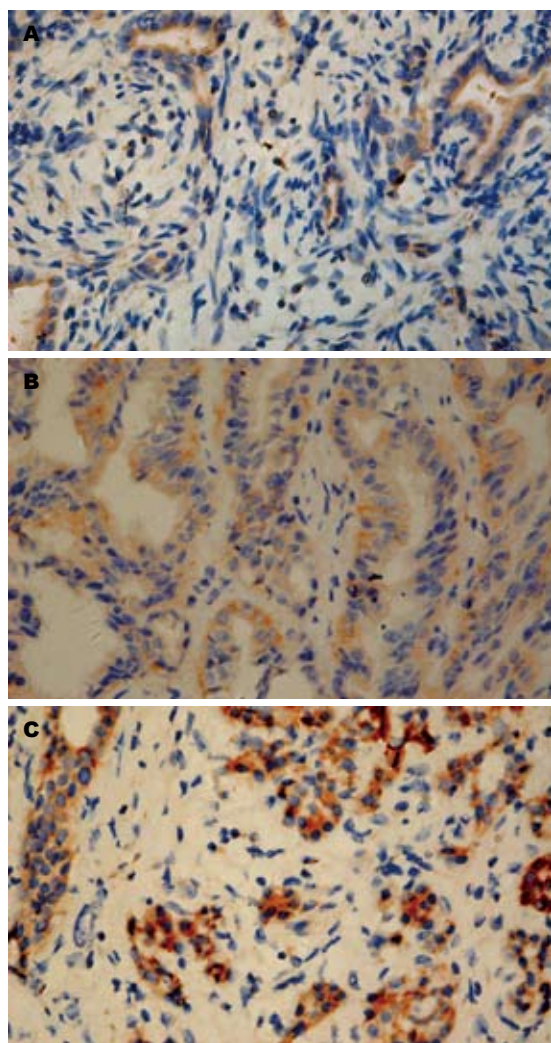


图 1 PTEN、HER-2和PKB在胆管癌组织中的表达。A: PTEN; B: HER-2; C: PKB.

一系列与细胞凋亡、细胞周期调控、端粒酶活性、血管生成、细胞亲信迁移相关的程序^[14-16], 此信号转导通路即为PI3K/PKB信号转导通路. 本试验研究结果显示胆管癌组织中PKB蛋白明显高表达, 并与PTEN、HER-2表达均显著相关, 表明PTEN、HER-2亦可能通过PI3K/PKB信号转导通路参与胆管癌的发生、发展. 有研究表明, PTEN可催化PIP3和PIP2去磷酸化, 进而抑制PKB的活性, PTEN突变则可引起PKB活性增强^[17]. HER-2/neu的激活多表现为野生型基因的扩增和过表达, 其激活后则可引起下游蛋白磷酸化而激活多条通路, 主要有Ras/Raf/MAPK、PI3K/PKB和cAMP等. HER-2/neu的激活可以活化PI3K, 在细胞膜内生成PIP3与PIP2, 进而与PKB相互作用介导细胞分化、迁移、存活、凋亡.

总之, 本研究结果表明PTEN、HER-2/neu和PKB与胆管癌的发生、发展密切相关, 并提示

肿瘤的发生是多种癌基因活化与抑癌基因失活共同作用的结果. 检测胆管癌中不同基因的表达, 可为胆管癌的基因靶向药物治疗提供新的靶点.

4 参考文献

- 1 Khan SA, Thomas HC, Davidson BR, Taylor-Robinson SD. Cholangiocarcinoma. *Lancet* 2005; 366: 1303-1314
- 2 Xu G, Zhang W, Bertram P, Zheng XF, McLeod H. Pharmacogenomic profiling of the PI3K/PTEN-AKT-mTOR pathway in common human tumors. *Int J Oncol* 2004; 24: 893-900
- 3 Kanamori Y, Kigawa J, Itamochi H, Shimada M, Takahashi M, Kamazawa S, Sato S, Akeshima R, Terakawa N. Correlation between loss of PTEN expression and Akt phosphorylation in endometrial carcinoma. *Clin Cancer Res* 2001; 7: 892-895
- 4 Chang F, Lee JT, Navolanic PM, Steelman LS, Shelton JG, Blalock WL, Franklin RA, McCubrey JA. Involvement of PI3K/Akt pathway in cell cycle progression, apoptosis, and neoplastic transformation: a target for cancer chemotherapy. *Leukemia* 2003; 17: 590-603
- 5 Mutter GL, Lin MC, Fitzgerald JT, Kum JB, Baak JP, Lees JA, Weng LP, Eng C. Altered PTEN expression as a diagnostic marker for the earliest endometrial precancers. *J Natl Cancer Inst* 2000; 92: 924-930
- 6 Krüger S, Weitsch G, Büttner H, Matthiensen A, Böhmer T, Marquardt T, Sayk F, Feller AC, Böhle A. HER2 overexpression in muscle-invasive urothelial carcinoma of the bladder: prognostic implications. *Int J Cancer* 2002; 102: 514-518
- 7 Bianco R, Melisi D, Ciardiello F, Tortora G. Key cancer cell signal transduction pathways as therapeutic targets. *Eur J Cancer* 2006; 42: 290-294
- 8 Nielsen-Preiss SM, Silva SR, Gillette JM. Role of PTEN and Akt in the regulation of growth and apoptosis in human osteoblastic cells. *J Cell Biochem* 2003; 90: 964-975
- 9 Furnari FB, Lin H, Huang HS, Cavenee WK. Growth suppression of glioma cells by PTEN requires a functional phosphatase catalytic domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94: 12479-12484
- 10 Di Cristofano A, Pesce B, Cordon-Cardo C, Pandolfi PP. Pten is essential for embryonic development and tumour suppression. *Nat Genet* 1998; 19: 348-355
- 11 Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, Levin WJ, Ullrich A, McGuire WL. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science* 1987; 235: 177-182
- 12 Marte BM, Downward J. PKB/Akt: connecting phosphoinositide 3-kinase to cell survival and beyond. *Trends Biochem Sci* 1997; 22: 355-358
- 13 Vivanco I, Sawyers CL. The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer. *Nat Rev Cancer* 2002; 2: 489-501
- 14 Datta SR, Brunet A, Greenberg ME. Cellular survival: a play in three Akts. *Genes Dev* 1999; 13: 2905-2927
- 15 Kim D, Kim S, Koh H, Yoon SO, Chung AS, Cho KS, Chung J. Akt/PKB promotes cancer cell invasion via increased motility and metalloproteinase production. *FASEB J* 2001; 15: 1953-1962
- 16 Zhong H, Chiles K, Feldser D, Laughner E, Hanrahan

■同行评价

本文内容较新颖, 有一定的创新性, 学术价值较好, 为进一步研究胆管癌发生发展的相关机制以及治疗提供了新途径.

C, Georgescu MM, Simons JW, Semenza GL. Modulation of hypoxia-inducible factor 1 α expression by the epidermal growth factor/phosphatidylinositol 3-kinase/PTEN/AKT/FRAP pathway in human prostate cancer cells: implications for tumor angiogenesis and therapeutics. *Cancer Res* 2000; 60: 1541-1545

17 Pore N, Liu S, Haas-Kogan DA, O'Rourke DM, Maity A. PTEN mutation and epidermal growth factor receptor activation regulate vascular endothelial growth factor (VEGF) mRNA expression in human glioblastoma cells by transactivating the proximal VEGF promoter. *Cancer Res* 2003; 63: 236-241

编辑 李军亮 电编 李薇

ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) CN 14-1260/R 2010年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

2008 年内科学类期刊总被引频次和影响因子排序

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

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

手术室内行内镜黏膜下剥离术治疗胃肠道病变102例

丁岩冰, 孙建宏, 陈姚生, 邓彬, 眭伟, 陈海燕, 赵烨

丁岩冰, 陈姚生, 邓彬, 陈海燕, 扬州市第一人民医院消化内科 江苏省扬州市 225001

孙建宏, 眭伟, 赵烨, 扬州市第一人民医院手术室 江苏省扬州市 225001

江苏省科技厅自然科学基金资助项目, No. BK-2008221

作者贡献分布: 丁岩冰与陈姚生对此文所作贡献均等; 手术由丁岩冰、孙建宏、陈姚生、眭伟、陈海燕及赵烨操作完成; 数据分析由丁岩冰与邓彬完成; 本论文写作由丁岩冰、陈姚生及邓彬完成。

通讯作者: 孙建宏, 主任医师, 225001, 江苏省扬州市, 扬州市第一人民医院手术室. brightlyq@sina.com

收稿日期: 2010-07-31 修回日期: 2010-09-03

接受日期: 2010-09-07 在线出版日期: 2010-10-28

Endoscopic submucosal dissection for gastrointestinal lesions in the operating room: an analysis of 102 cases

Yan-Bing Ding, Jian-Hong Sun, Yao-Sheng Chen, Bin Deng, Wei Sui, Hai-Yan Chen, Ye Zhao

Yan-Bing Ding, Yao-Sheng Chen, Bin Deng, Hai-Yan Chen, Department of Gastroenterology, Yangzhou First People's Hospital, Yangzhou 225001, Jiangsu Province, China

Jian-Hong Sun, Wei Sui, Ye Zhao, Yangzhou First People's Hospital, Yangzhou 225001, Jiangsu Province, China

Supported by: the Natural Science Foundation of Science of Jiangsu Province, No. BK-2008221

Correspondence to: Jian-Hong Sun, Yangzhou First People's Hospital, Yangzhou 225001, Jiangsu Province, China. brightlyq@sina.com

Received: 2010-07-31 Revised: 2010-09-03

Accepted: 2010-09-07 Published online: 2010-10-28

Abstract

AIM: To assess the efficacy and safety of endoscopic submucosal dissection (ESD) conducted in the operating room for gastrointestinal lesions.

METHODS: A total of 102 patients with gastrointestinal lesions diagnosed by endoscopy from March 2008 to May 2010 were enrolled. Chromoendoscopy and endoscopic ultrasonography were performed to confirm the extent and depth of the lesions. All the patients underwent routine preoperative evaluation. Tracheal intubation and general anesthesia were conducted in the operating room. The operation duration, volume of submucosal injection solution used,

changes in blood Hb levels, and the rates of en bloc resection and complications were recorded.

RESULTS: The maximum diameter of resected samples was $2.72 \text{ cm} \pm 0.81 \text{ cm}$. The volume of submucosal injection solution used was $35.5 \text{ mL} \pm 14.05 \text{ mL}$. The average operation duration was $65.91 \text{ min} \pm 25.49 \text{ min}$. The en bloc resection rate was 95.1%. The perforation rate was 2.9%. Two patients received emergency surgery because of perforation and uncontrolled delayed hemorrhage.

CONCLUSION: ESD conducted in the operating room is associated with less complications and permits prompt, convenient handling of complications and avoiding medical risks.

Key Words: Endoscopic submucosal dissection; Endoscopic surgery; Operating room; Gastrointestinal tract

Ding YB, Sun JH, Chen YS, Deng B, Sui W, Chen HY, Zhao Y. Endoscopic submucosal dissection for gastrointestinal lesions in the operating room: an analysis of 102 cases. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(30): 3267-3270

摘要

目的: 初步评价在手术室内行内镜黏膜下剥离术(ESD)治疗胃肠道病变的安全性及有效性。

方法: 收集2008-03/2010-05共102例病例患者, 内镜检查发现的胃肠道病灶患者作为入选对象, 术前行染色内镜和超声内镜检查, 确定病变范围和深度, 常规行术前评估, 手术室内行气管插管全身麻醉。观察手术时间、黏膜下注射液体量、手术前后血红蛋白水平变化、手术成功率及并发症发生率。

结果: 切除标本最大直径平均 $2.72 \text{ cm} \pm 0.81 \text{ cm}$; 术中平均黏膜下注射量为 $35.5 \text{ mL} \pm 14.05 \text{ mL}$; 手术平均手术操作时间 $65.91 \text{ min} \pm 25.49 \text{ min}$; 手术完整剥离成功率95.1%, 穿孔发生率2.9%, 其中1例穿孔行外科手术治疗, 1例发生迟发型出血, 行手术治疗。

结论: 手术室内行ESD有利于降低并发症的发生率, 而且有利于并发症的及时处理, 可有效

■背景资料

内镜黏膜下剥离术(ESD)是在内镜下黏膜切除术(EMR)的基础上发展起来的新技术, 由日本学者在1994年首先提出, 可完整大块地切除消化系病变, 提供完整的病理诊断资料, 达到实现根治肿瘤的效果。

■同行评议者

刘改芳, 主任医师, 河北医科大学第三医院消化内科

■研发前沿

ESD需要相当高的内镜操作技术,术中、术后出血、穿孔等严重的并发症发生率远高于EMR,如何掌握ESD操作技巧、减少严重并发症的发生,是该技术广泛推广应用的前提和研究热点。

地规避医疗风险。

关键词: 内镜下黏膜剥离术; 内镜外科手术; 手术室; 胃肠道

丁岩冰, 孙建宏, 陈姚生, 邓彬, 陆伟, 陈海燕, 赵烨. 手术室内行内镜黏膜下剥离术治疗胃肠道病变102例. 世界华人消化杂志 2010; 18(30): 3267-3270
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/3267.asp>

0 引言

内镜下黏膜剥离术(endoscopic submucosal dissection, ESD)是在内镜下黏膜切除术(endoscopic mucosal resection, EMR)的基础上发展起来的新技术,可完整大块地切除病变,具有创伤小、治疗成本低,疗效与外科手术相当,可提供完整切除病灶进行病理检查等优点,充分体现了微创治疗的优越性^[1]。但其由于ESD切除范围较大,操作时间长,治疗过程中出现并发症的概率也相应增加,达到10%-30%^[2-4],限制了其推广应用。我们自2008年始实施在手术室内ESD手术治疗胃肠道病变,到目前为止共完成治疗102例,现初步评价其安全性及有效性。

1 材料和方法

1.1 材料 2008-03/2010-05扬州市第一人民医院共实施ESD手术102例,其中男62例,女40例,年龄33-82(平均年龄61.4)岁。所有患者术前行染色内镜和超声内镜检查,确定病变范围和深度,手术前签署知情同意书。病变部位分布:食管21例,贲门9例,胃底5例,胃角6例,胃体10例,胃窦26例,十二指肠2例,结肠4例,直肠19例。采用Olympus XQ260-J电子胃镜、Olympus CF-260电子肠镜、EU-M2000超声探头主机,UM-2R小探头;NM-4L-1注射针、德国爱尔博APC300治疗仪、热活检钳、止血钛夹、头端绝缘的针状刀(insulated-tip knife, IT刀)、钩刀(hook knife, HOOK刀)等内镜手术器械。医用透明质酸钠凝胶(上海其胜生物有限公司)、甘油果糖(四川美大康佳乐药业公司)、0.2%靛胭脂(南京微创医学科技公司)、间苯三酚(南京恒生制药厂)、瑞素(华瑞制药, 500 mL)。

1.2 方法

1.2.1 手术: 术前常规行心肺功能、凝血功能等评估,明确无手术禁忌证,禁食12 h,禁饮4 h;手术室内予患者留置静脉通道,缓慢静脉滴注间苯三酚80 mg减轻胃肠蠕动,专职麻醉师常规行经鼻气管插管全身麻醉,监测血压、脉搏、呼

吸,创造良好的操作条件。手术步骤: (1)标记: 应用氩气刀(argon plasma coagulation, APC)于病灶边缘0.5 cm处进行标记; (2)黏膜下注射: 于病灶边缘标记点外侧进行多点黏膜下注射,每点约2 mL,可重复注射直至病灶明显抬起,黏膜下注射0.2%靛胭脂5 mL、医用透明质酸钠凝胶4 mL、甘油果糖100 mL(含甘油10 g、果糖5 g)、肾上腺素(浓度为1:10 000)混合液; (3)切开病变外侧缘黏膜: 应用HOOK刀沿病灶边缘标记点切开黏膜,先切开远端,再切开近端; (4)剥离病变: 应用HOOK刀或IT刀于病灶下方对黏膜下层进行剥离,剥离过程中可反复黏膜下注射,保持病灶处于隆起状态,剥离过程中如有出血可应用HOOK刀直接电凝止血或应用热活检钳钳夹出血点电凝止血; (5)创面处理: 切除病灶若可见裸露血管可应用APC凝固治疗,必要时应用金属止血夹夹闭粗大血管; (6)上消化道病灶在内镜直视下置入三腔胃肠管,前端送至十二指肠降部以下。

1.2.2 ESD术后处理: 治疗结束后,禁食24-48 h,常规补液、应用防治感染和止血药物,上消化道病例术后即经三腔胃肠管行胃肠减压,并于术后12 h内空肠内注入肠内营养剂(瑞素)行早期肠内营养。观察腹部体征、有无皮下气肿。所有切除组织送检病理检查,确定病变性质,观察病灶边缘或基地部有无病变累及。2 mo内复查胃镜,观察创面愈合情况。

1.2.3 观察指标: (1)测量切除标本最大直径; (2)切除标本病理诊断; (3)计算黏膜下注射液量; (4)操作时间; (5)手术成功率及并发症发生率; (6)术后病例随访。

2 结果

2.1 标本最大直径 切除标本最大直径2.4-6.5 cm,平均2.72 cm \pm 0.81 cm,其中2.1-3.0 cm 41例,3.1-4.0 cm 45例,4.1-5.0 cm 8例,5.1-6.0 cm 6例,>6.1 cm 2例。

2.2 病理诊断 黏膜慢性炎症7例,黏膜炎症伴肠化6例,低级别上皮内瘤变12例,高级别上皮内瘤变15例,黏膜内腺癌5例,绒毛管状腺瘤14例,管状腺瘤15例,绒毛管状腺瘤伴局灶癌变2例,类癌7例,平滑肌瘤9例,间质瘤7例,异位胰腺2例,脂肪瘤1例。

2.3 黏膜下注射液总量及手术时间 术中黏膜下注射液量12-76(平均黏膜下注射量为35.5 \pm 14.05) mL; 手术操作时间25-167(平均手术操作时间65.91 \pm 25.49) min。

2.4 手术成功率及并发症发生率 1例十二指肠间质瘤剥离困难, 中止剥离; 1例直肠类癌剥离标本基底部见局灶肿瘤细胞残留, 遂接受外科手术; 2例贲门部病灶剥离困难, 改行圈套器电切, 切除标本送检病理诊断分别为低级别上皮内瘤变及高级别上皮内瘤变, 基底部及边缘均未发现病灶残留, 1例食管低级别上皮内瘤变病例术中剥离困难, 改行APC治疗. 手术完整剥离成功率95.1%(97/102); 1例胃窦部间质瘤剥离过程中见穿孔, 金属夹夹闭后保守治疗痊愈; 1例直肠类癌术中穿孔, 出现皮下气肿, 内科保守治疗痊愈; 1例结肠腺瘤术中穿孔, 遂行外科手术治疗. 穿孔发生率2.9%(3/102), 其中胃窦穿孔发生率为16.7%(1/26), 直肠穿孔发生率为5.3%(1/19), 结肠穿孔发生率为25%(1/4). 迟发性出血发生率0.98%(1/102), 术后狭窄率0.98%(1/102), 术后复发率0.98%(1/102). 所有ESD治疗中均有创面少量出血, 经电凝、氩离子凝固能成功止血, 1例贲门早期癌患者术后第9天出现上消化系大出血, 行紧急外科手术发现剥离创面小动脉活动性出血, 结扎后治愈. 1例食管高级别上皮内瘤变术后2 mo出现病灶剥离部位环周狭窄, 行内镜下球囊扩张, 并予类固醇激素曲安奈德狭窄局部注射, 2 mo后复查胃镜食管狭窄治愈.

2.5 术后随访 目前所有ESD病例随访中, 平均随访时间5.2 mo, 所有病例术后2 mo左右复查内镜. 1例结肠巨大腺瘤病例术后2 mo复查, 肠镜见创面边缘病灶复发, 行分片黏膜切除术(endoscopic piecemeal resection, EPMR)治疗, 其余病例手术创面愈合良好, 无复发.

3 讨论

ESD术中出血发生率4.6%-7%, 穿孔的发生率约为4%-4.6%^[5-8], 并存在术中窒息、麻醉意外等风险, 如何尽可能避免并发症的发生, 如何在发生并发症后及时正确处理, 是ESD能否开展并普及的关键所在.

目前国内ESD工作刚刚开展, 尚无统一的操作规范, 各家单位的内镜室设施环境及操作者的水平不一, 各种并发症发生导致严重后果并不鲜见, 我们在总结学习国内外经验并在动物模型训练基础上, 目前已开展ESD手术102例, 开展此项工作伊始即将ESD操作定位于手术室内, 在实际操作中体会到在手术室内实施ESD的优势如下: (1)虽然消化内镜诊疗相关的

穿孔多可通过内镜下钛夹夹闭、生物胶黏堵等方法处理^[9], 然而因病灶位置、穿孔大小等因素, 为使并发症危害的严重性降低到最低限度, 部分病例必须得到及时的外科处理^[5], 在术前与患者充分沟通、充分评估的基础上, 手术室内行ESD, 一旦发生需要外科手术处理的穿孔等并发症, 可以及时实施外科手术治疗, 本组研究中结肠腺瘤病例术中穿孔, 能在最短时间内(30 min)及时安排外科手术, 与在内镜室内治疗出现并发症后转科治疗相比, 医疗效率明显提高, 有效地规避了医疗风险, 并在一定程度上避免了医疗纠纷; (2)本组研究的一次性完整剥离率95.1%, 较以往研究稍高(91.4%-94.2%)^[1,5-8], 而不能顺利完成ESD的病例, 无论十二指肠间质瘤或直肠类癌病例, 在放弃ESD治疗后均能及时转为外科手术治疗, 避免了ESD至外科手术时间窗内出血等并发症的风险, 有效地保证了医疗安全, 并缩短了治疗周期; (3)ESD与普通胃肠镜检查相比, 耗时多, 操作复杂, 难度更大, 手术室相对封闭的环境有利于内镜操作医师从容进行手术, 尤其部分术前合并有心血管等系统疾病的老年患者, 术中有可能发生心脑血管意外, 充分利用手术室内各种监护及抢救设备, 及时妥善处理, 可避免严重并发症的发生, 本组研究中无1例术中发生严重的心血管系统等并发症; (4)全身麻醉下行ESD可避免因术中腔内内容物反流造成窒息, 防止因恶心、呕吐、呛咳影响操作造成的出血、穿孔, 提高了手术质量和安全性, 有学者认为经口气管插管行全身麻醉为影响胃镜操作的不利因素^[10], 我们在术中采用经鼻气管插管全身麻醉, 从而最大限度地降低了对内镜操作的影响, 本组研究的穿孔率为2.9%, 低于以往文献报道^[5-8,11], 且无一例因术中不可控制的出血影响ESD操作.

术中减少出血、穿孔等并发症的最好方法是使病灶黏膜层充分的抬起^[12], ESD实施过程中黏膜下注射为病灶切开、剥离前的关键步骤. 目前国内在内镜治疗中多应用生理盐水加少量肾上腺素的配伍行黏膜下注射, 显示其基本能满足内镜下治疗的需要^[13,14], 但生理盐水为等渗溶液, 黏膜下注射难以维持理想高度, 且很快被周围组织吸收, 需反复注射. 近年来, 有多项在内镜治疗中应用高渗盐水或高渗葡萄糖、羟丙基甲基纤维素、人纤维蛋白原、果糖、透明质酸等行黏膜下注射的研究报道, 临床应用实践显示各有优劣^[15,16]. 我们选择透明质酸钠、甘油

■应用要点

手术室内行ESD有利于降低并发症的发生率, 而且有利于并发症的及时处理, 可有效地规避医疗风险.

■同行评价

本文选题合适, 具有一定的临床实用价值.

果糖混合液作为黏膜下注射液实施ESD手术治疗胃肠道黏膜及黏膜下病变, 平均黏膜下注射量为 $35.5 \text{ mL} \pm 14.05 \text{ mL}$, 可使黏膜下层隆起厚度 $>10 \text{ mm}$, 长时间维持黏膜下液体垫, 避免了反复注射, 简化了操作程序, 缩短了手术操作时间, 而且可在一定程度上避免肾上腺素过量导致的心动过速、血压升高等不良反应.

本组研究中上消化道病例均在术后置入三腔胃肠管行胃肠减压, 可以通过观察引流液的颜色、引流量等判断有无活动性出血, 以便及时干预, 而对于穿孔病例胃肠减压则有利于创面愈合. 另外, 通过三腔胃肠管术后12 h内即实施早期肠内营养, 与全胃肠外营养比较可减少医疗费用, 尚可有力地保障正常肠道功能, 控制炎症反应.

总之, 我们开展ESD治疗消化系肿瘤的工作尚处于起步阶段, 病例数较少, 随访时间较短, 需要在实践操作中进一步总结和体会. 各种处理方法的优劣有待进一步大宗病例的随机、对照临床研究证实, 但从控制风险的角度考虑, 手术室内实施ESD不失为一种安全高效的选择.

4 参考文献

- 1 Oka S, Tanaka S, Kaneko I, Mouri R, Hirata M, Kawamura T, Yoshihara M, Chayama K. Advantage of endoscopic submucosal dissection compared with EMR for early gastric cancer. *Gastrointest Endosc* 2006; 64: 877-883
- 2 Watanabe K, Ogata S, Kawazoe S, Watanabe K, Koyama T, Kajiwaru T, Shimoda Y, Takase Y, Irie K, Mizuguchi M, Tsunada S, Iwakiri R, Fujimoto K. Clinical outcomes of EMR for gastric tumors: historical pilot evaluation between endoscopic submucosal dissection and conventional mucosal resection. *Gastrointest Endosc* 2006; 63: 776-782
- 3 Fujishiro M. Perspective on the practical indications of endoscopic submucosal dissection of gastrointestinal neoplasms. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 4289-4295
- 4 Yamamoto H. Technology insight: endoscopic submucosal dissection of gastrointestinal neoplasms. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol* 2007; 4: 511-520
- 5 Chang CC, Lee IL, Chen PJ, Wang HP, Hou MC, Lee CT, Chen YY, Cho YP, Lin JT. Endoscopic submucosal dissection for gastric epithelial tumors: a multicenter study in Taiwan. *J Formos Med Assoc* 2009; 108: 38-44
- 6 Kakushima N, Fujishiro M. Endoscopic submucosal dissection for gastrointestinal neoplasms. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 2962-2967
- 7 Gotoda T, Yamamoto H, Soetikno RM. Endoscopic submucosal dissection of early gastric cancer. *J Gastroenterol* 2006; 41: 929-942
- 8 马丽黎, 陈世耀, 周平红, 徐美东, 钟芸诗, 张轶群, 陈巍峰, 胡健卫, 姚礼庆. 内镜黏膜下剥离术治疗上消化道病灶的初步评价. *中华消化内镜杂志* 2008; 25: 529-534
- 9 刘明. 消化内镜诊疗相关性穿孔的内镜治疗现状. *世界华人消化杂志* 2009; 17: 3123-3127
- 10 Ghazal AH, Sorour MA, El-Riwini M, El-Bahrawy H. Single-step treatment of gall bladder and bile duct stones: a combined endoscopic-laparoscopic technique. *Int J Surg* 2009; 7: 338-346
- 11 Fujishiro M, Yahagi N, Nakamura M, Kakushima N, Kodashima S, Ono S, Kobayashi K, Hashimoto T, Yamamichi N, Tateishi A, Shimizu Y, Oka M, Ogura K, Kawabe T, Ichinose M, Omata M. Successful outcomes of a novel endoscopic treatment for GI tumors: endoscopic submucosal dissection with a mixture of high-molecular-weight hyaluronic acid, glycerin, and sugar. *Gastrointest Endosc* 2006; 63: 243-249
- 12 Yamasaki M, Kume K, Yoshikawa I, Otsuki M. A novel method of endoscopic submucosal dissection with blunt abrasion by submucosal injection of sodium carboxymethylcellulose: an animal preliminary study. *Gastrointest Endosc* 2006; 64: 958-965
- 13 周平红, 姚礼庆. 内镜黏膜切除及黏膜下剥离术操作方法和技巧. *中华消化内镜杂志* 2008; 25: 564-567
- 14 张晓华, 朱人敏, 吴晓尉, 杨妙芳, 郭美霞, 许小兵. 内镜下黏膜切除术治疗老年及老年前期大肠息肉561例. *世界华人消化杂志* 2009; 17: 2644-2647
- 15 Fujishiro M, Yahagi N, Kashimura K, Matsuura T, Nakamura M, Kakushima N, Kodashima S, Ono S, Kobayashi K, Hashimoto T, Yamamichi N, Tateishi A, Shimizu Y, Oka M, Ichinose M, Omata M. Tissue damage of different submucosal injection solutions for EMR. *Gastrointest Endosc* 2005; 62: 933-942
- 16 Lee SH, Park JH, Park do H, Chung IK, Kim HS, Park SH, Kim SJ, Cho HD. Clinical efficacy of EMR with submucosal injection of a fibrinogen mixture: a prospective randomized trial. *Gastrointest Endosc* 2006; 64: 691-696

编辑 李薇 电编 何基才

大肠镜检阴性慢性腹泻与回肠末端病变的关系

李红玲, 王昌成, 刘树青, 徐东升, 张菊, 陈洪梅

李红玲, 王昌成, 刘树青, 徐东升, 张菊, 陈洪梅, 徐州医学院附属淮安医院消化内科 江苏省淮安市 223002

作者贡献分布: 此课题由李红玲设计; 研究过程由李红玲、王昌成、刘树青、徐东升、张菊及陈洪梅操作完成; 数据分析由李红玲完成; 本论文写作由李红玲与王昌成完成。

通讯作者: 李红玲, 副主任医师, 223002, 江苏省淮安市, 徐州医学院附属淮安医院消化内科. hacxy68@126.com

电话: 0517-86162268

收稿日期: 2010-07-16 修回日期: 2010-08-21

接受日期: 2010-08-31 在线出版日期: 2010-10-28

Relationship between chronic diarrhea with normal colonoscopic findings and terminal ileal lesions

Hong-Ling Li, Chang-Cheng Wang, Shu-Qing Liu, Dong-Sheng Xu, Ju Zhang, Hong-Mei Chen

Hong-Ling Li, Chang-Cheng Wang, Shu-Qing Liu, Dong-Sheng Xu, Ju Zhang, Hong-Mei Chen, Department of Gastroenterology, the Affiliated Huaian Hospital of Xuzhou Medical College, Huaian 223002, Jiangsu Province, China

Correspondence to: Hong-Ling Li, Department of Gastroenterology, the Affiliated Huaian Hospital of Xuzhou Medical College, Huaian 223002, Jiangsu Province, China. hacxy68@126.com

Received: 2010-07-16 Revised: 2010-08-21

Accepted: 2010-08-31 Published online: 2010-10-28

Abstract

AIM: To explore the relationship between chronic diarrhea with normal colonoscopic findings and terminal ileal lesions.

METHODS: Forty patients with chronic diarrhea and normal colonoscopic findings and 40 healthy controls without diarrhea were included in this study. Colonoscopy was inserted 20 cm or up into the terminal ileum for examination in both groups. Diarrhea patients were administered metronidazole and probiotics for 10-14 d after being diagnosed with ideal lesions.

RESULTS: Of 40 patients with chronic diarrhea and normal colonoscopic findings, 29 showed hyperemia, edema, erosion, ulcer of the terminal ileum, 10 showed hyperplasia and enlargement of lymphoid follicles (maximum diameter up to 7-8 mm), and 1 was normal. After treatment,

clinical symptoms disappeared in 35 patients, and endoscopic ileal lesions disappeared in 30 patients. In healthy controls, the terminal ileum showed scattered hyperplasia of lymphoid follicles in 5 patients, but the size of lymphoid follicles was small (maximum diameter, 3 mm). No congestion, edema, erosion and ulcer of the terminal ileum were found in controls. Colonoscopic manifestations were significantly different between the two groups of subjects ($\chi^2 = 58.38, P < 0.05$).

CONCLUSION: Patients with chronic diarrhea and normal colonoscopic findings often have lesions in the terminal ileum, such as erosion and ulcer of the terminal ileum, and hyperplasia of lymphoid follicles. Metronidazole and probiotics show good therapeutic effects in these patients.

Key Words: Chronic diarrhea; Negative colonoscopy; Terminal ileal lesion

Li HL, Wang CC, Liu SQ, Xu DS, Zhang J, Chen HM. Relationship between chronic diarrhea with normal colonoscopic findings and terminal ileal lesions. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(30): 3271-3273

摘要

目的: 探讨大肠镜检阴性慢性腹泻与回肠末端病变关系。

方法: 病例组为徐州医学院附属淮安医院2009-01/2010-06内镜大肠镜检阴性慢性腹泻患者40例, 排除甲状腺功能亢进症、糖尿病等。正常对照组为徐州医学院附属淮安医院同期体检无腹泻患者40例。两组患者均进镜至回肠末端20 cm或以上, 腹泻伴回肠末端有病变者予灭滴灵及微生态制剂治疗10-14 d。

结果: 内镜大肠镜检阴性慢性腹泻患者40例, 29例内镜下表现为回肠末端充血、水肿、糜烂、溃疡, 10例内镜下表现为回肠末端淋巴滤泡明显增生, 淋巴滤泡较大, 最大7-8 mm, 1例回肠末端正常。治疗后症状消失35例, 内镜复查30例回肠末端病变消失。对照组有5例散在淋巴滤泡增生, 淋巴滤泡较小, 最大3 mm, 无充血、水肿糜烂、溃疡。慢性腹泻组治疗

■背景资料

慢性腹泻发生率为3%-5%。腹泻是长期以来危害我国人民健康的常见病, 很多慢性腹泻患者往往去多个医院就诊, 但找不到病因。

■同行评议者

陈志辉, 副教授, 中国人民解放军第二军医大学附属长海医院感染科

■应用要点

大肠镜检正常的慢性腹泻患者,回肠末端往往有病变,内镜下表现为糜烂、溃疡、淋巴滤泡增生等,予灭滴灵及微生态制剂治疗效果较好。

前镜下表现与对照组比较有显著性差异($\chi^2 = 58.38, P < 0.05$)。

结论: 大肠镜检正常的慢性腹泻患者,回肠末端往往有病变,内镜下表现为糜烂、溃疡、淋巴滤泡增生等,予灭滴灵及微生态制剂治疗效果较好。

关键词: 慢性腹泻; 大肠镜检阴性; 回肠末端病变

李红玲, 王昌成, 刘树青, 徐东升, 张菊, 陈洪梅. 大肠镜检阴性慢性腹泻与回肠末端病变的关系. 世界华人消化杂志 2010; 18(30): 3271-3273

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/3271.asp>

0 引言

人群中持续腹泻4 wk以上(即慢性腹泻)发生率为3%-5%^[1]。腹泻是长期以来危害我国人民健康的常见多发病。但很多慢性腹泻患者往往去多个医院就诊,但找不到病因。大肠镜检阴性的患者,往往被当作肠易激综合征患者处理,效果不佳,导致患者反复就医,腹泻仍迁延不愈。本文旨在从循证医学角度研究大肠镜检阴性慢性腹泻与回肠末端病变的相关性。大肠镜检阴性慢性腹泻,排除慢性胰腺炎、肝硬化等,进镜至回肠末端往往发现病变,大肠镜检阴性慢性腹泻患者即可得到诊断。

1 材料和方法

1.1 材料 2009-01/2010-06徐州医学院附属淮安医院慢性腹泻或伴有腹痛患者40例为病例组,男26例,女14例,年龄19-56(平均年龄38)岁,患者病史1-3年,平均腹泻每日3次,其中伴腹痛16例,腹胀5例,便血1例,经肠镜检查大肠无明显充血、水肿、糜烂、溃疡、隆起,无呼吸道感染史,粪培养阴性,近1 mo内未使用抗生素史,排除甲状腺功能亢进、糖尿病、慢性胰腺炎、肝硬化、萎缩性胃炎、短肠综合征、结缔组织病。腹泻定义参照文献[2],腹泻(diarrhea)是一种消化系统常见的症状,多表现为排便的次数明显超过平时习惯的频率,粪质稀薄,含水分增多,含水量超过60%-75%,每日排便超过200 g,或含有未消化的食物、脓血及黏液等^[2]。慢性腹泻是指腹泻持续或反复超过4 wk^[1]。正常对照组40例,为徐州医学院附属淮安医院同期体检无腹泻患者,男26例,女14例,年龄18-58(平均年龄39)岁。两组性别、年龄均匹配。

1.2 方法 两组均进行肠镜检查,均进镜至回肠末

端20 cm或以上,回肠末端有病变者行组织活检,送病理检查,有症状组回肠末端有病变者予灭滴灵0.4 bid po及培菲康(微生态制剂)2 g tid po治疗,疗程共10-14 d。

统计学处理 采用SPSS13.0统计软件进行处理。两组计数资料比较采用 χ^2 检验,检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

内镜大肠镜检阴性慢性腹泻患者40例,29例内镜下表现为回肠末端10-20 cm黏膜充血、水肿、糜烂、溃疡,溃疡最大6 mm,底被白苔,10例内镜下表现为回肠末端淋巴滤泡明显增生,每位患者回肠末端20 cm内淋巴滤泡>40个,淋巴滤泡较大,部分表面充血,最大7-8 mm,病理均示慢性炎症,1例回肠末端正常,39例腹泻患者,予灭滴灵0.4 bid及培菲康(微生态制剂)2 g tid,疗程共10-14 d,上述治疗后,症状消失35例,内镜复查30例回肠末端病变消失,另9例病变好转。正常对照组有5例回肠末端10-20 cm处有散在的淋巴滤泡增生,每个人回肠末端淋巴滤泡<15个,淋巴滤泡较小,最大3 mm,活检送病理检查无炎症改变。

慢性腹泻组治疗前回肠末端镜下表现与对照组比较,有显著性差异($\chi^2 = 58.38, P < 0.05$),说明慢性腹泻患者,排除其他原因,回肠末端往往有病变;予灭滴灵0.4 bid po及培菲康2 g tid po(微生态制剂),疗程共10-14 d,症状消失35例,有效率为90%。内镜复查30例回肠末端病变消失,短期治愈率为77%。

3 讨论

WHO统计,全世界每年发生腹泻病例达30-50亿例次,人群中慢性腹泻发生率为3%-5%^[1]。腹泻是长期以来危害我国人民健康的常见多发病。急性腹泻病因诊断相对容易。慢性腹泻病因复杂,从腹泻的病因、发病机制等思路很难快速得出诊断。很多慢性腹泻患者往往去多个医院就诊而找不到病因,大肠镜检阴性的患者,往往被当作肠易激综合征患者处理,治疗效果不佳,导致患者反复就医,耗费大量的精力和财力,腹泻仍迁延不愈。慢性腹泻可引起电解质紊乱,特别是严重低钾血症可引起低钾性肾病,横纹肌溶解引起急性肾功能衰竭,严重心律失常等危及生命^[3];慢性腹泻可引起营养障碍;慢性腹泻严重影响人们的生活和工作。腹泻根据部位分为结肠性腹泻和结肠前性腹泻^[4]。如果大肠镜检查正常,考虑结肠前性腹泻,排除肠道以外病变,

进镜至回肠末端, 可发现病变. 以末端回肠炎为主, 内镜下表现为回肠末端10-20 cm以内黏膜充血、水肿、糜烂, 或并有溃疡, 淋巴滤泡增生, 予灭滴灵及微生态制剂效果较好. 末端回肠炎与慢性腹泻有极强的相关性. 回肠末端病变内镜漏诊率较高, 主要是认识不足及肠镜未插至回肠末端. 本文旨在从循证医学角度研究大肠镜检阴性慢性腹泻与回肠末端病变的相关性, 排除其他病因, 大肠镜检阴性慢性腹泻病变在回肠末端, 大部分大肠镜检阴性慢性腹泻患者可得到诊断.

目前对末端回肠炎认识不充分, 能检索到的文献较少. 目前国内有的学者认为末端回肠炎与淋巴滤泡增生症是两个概念, 但无界定标准, 一般认为末端回肠炎以充血、水肿、糜烂为主, 淋巴滤泡增生炎症改变不明显, 淋巴滤泡增生显著^[5], 正常人在回肠末端可有散在颗粒样淋巴滤泡^[6]. 有的学者认为末端回肠炎可分为浅表型、增殖型、萎缩型, 浅表型镜下主要为黏膜充血水肿、糜烂、溃疡, 增殖型主要为黏膜粗糙呈颗粒状, 结节样病变, 萎缩型为黏膜变薄, 绒毛稀疏. 他们之间关系尚不清楚, 可能是该病的3个不同时期, 浅表型、增殖型是早期表现, 萎缩型是后期表现^[7-9]. 另有学者建议分为: 浅表型、增殖型、萎缩型、溃疡型. 本研究组在观察回肠末端病变时, 经常发现各种病变并存, 所以把充血水肿、糜烂、溃疡明显, 淋巴滤泡增生不显著病例, 放在一起统计, 淋巴滤泡增生显著病例, 归在一起统计, 淋巴滤泡增生显著病例, 部分回肠末端亦有充血水肿等. 本文病例组未见到萎缩型, 可能与病史短有关, 支持该观点. 慢性末端回肠炎的发生、发展与感染因素和免疫因素有关, 可能是回盲瓣功能紊乱, 结肠内容物反流入末端回肠, 造成细菌移位, 形成内源性感染, 肠道微生态改变, 有害菌尤其是厌氧菌增多, 有益菌减少, 刺激有丰富淋巴组织回肠末端, 产生免疫反应引起局部黏膜损伤或淋巴滤泡增大^[7-9]. 在回肠末端炎中发现肠道淋巴组织显著增生, 淋巴滤泡扩大, 生发中心明显, 同时弥漫性淋巴组织增生, 充填于绒毛间质及腺体间等病理学变化. T淋巴细胞, B淋巴细胞增多, 提示局部细胞免疫、体液免疫应答增强, 为本病免疫反应参与提供形态学依据, 免疫组织化学示代表神经纤维的S-100阳性纤维增多, 5-羟色胺阳性细胞增多, 提示神经内分泌和免疫系统之间联系是密切的^[10,11]. 慢性末端回肠炎时杯状细胞明显增多, II型细胞为主, 引起分泌旺盛, 杯状细胞数目多, 可使吸收细胞受压, 影响吸收,

可引起腹泻^[12]. 回肠末端炎予抗厌氧菌及予微生态制剂治疗效果较好, 支持末端回肠炎与感染、微生态失衡有关观点^[13]. 少数患者治疗效果不好, 需用柳氮磺胺吡啶^[9].

回肠末端是小肠病变的好发部位, 以末端回肠炎较多^[14,15]. 胶囊内镜及双气囊小肠镜的临床应用使小肠疾病诊断水平有了显著的提高, 但由于检查费昂贵, 普及率低, 目前仍然以结肠镜逆行检查至回肠末端, 还能活检行病理检查^[11,16,17]. 我们认为回肠末端炎分为: 回肠末段炎充血、水肿为主; 回肠末段炎糜烂、溃疡为主, 回肠末段炎淋巴滤泡增生为主; 回肠末段炎黏膜萎缩为主; 可能更合理一些. 末端回肠炎一般仅累及回肠末端20 cm以内, 不发展为克罗恩病、淋巴瘤, 但难治性末端回肠炎是否会与克罗恩病有关, 有待进一步研究.

本文研究表明, 大肠镜检正常的慢性腹泻患者排除肠外病变, 回肠末端往往有病变, 内镜下表现为糜烂、溃疡、淋巴滤泡增生等, 予灭滴灵及微生态制剂治疗效果较好.

4 参考文献

- 1 张德铭, 张军. 消化疾病症状鉴别诊断学. 第1版. 北京: 科学出版社, 2009: 181
- 2 孙自勤, 刘晓峰. 肠道病学. 第1版. 济南: 山东科学技术出版社, 2005: 232
- 3 朱蕾, 于润江. 水、电解质与酸碱平衡紊乱. 第1版. 上海: 上海科学技术出版社, 2003: 72
- 4 陈其奎, 何兴祥, 朱兆华. 消化疾病诊断学. 第1版. 北京: 人民卫生出版社, 2006: 389
- 5 郭胜利, 王继德, 潘德寿. 电子结肠镜下检查回肠末端病变分析. 华北国防医药 2003; 15: 428
- 6 黄文柱. 大肠镜检查在诊断回肠末端疾病中的临床意义. 中华消化内镜杂志 2004; 21: 281
- 7 周国华, 左大镒, 冷明芳, 周红宇, 戈立东. 回肠末端淋巴滤泡增生症与慢性末端回肠炎的关系探讨. 中华消化杂志 2006; 26: 826-827
- 8 车筑萍, 朱大磊, 姜琼, 许良壁, 陈万伟. 回肠末端溃疡112例临床和内镜及病理分析. 贵阳医学院学报 2008; 33: 66
- 9 周国华. 末端回肠炎的基础与临床. 第1版. 北京: 北京人民军医出版社, 2008: 91-97
- 10 周国华, 左大镒, 周辉, 周红梅. 回肠末端炎神经内分泌与免疫活性细胞的变化及其意义. 中国现代医学杂志 2000; 10: 102-103
- 11 吴雄芳, 陈少兴, 莫青, 陈华飞, 吴海棠. 回肠末端病变140例临床分析. 中华消化内镜杂志 2006; 23: 306-307
- 12 周国华, 张熙纯. 回肠末端的杯状细胞超微结构变化及其意义探讨. 中国内镜杂志 1999; 5: 30, 38
- 13 张民生, 张琪, 江月萍, 李玫. 慢性腹泻与肠道功能紊乱、肠道菌群失调的关系探讨. 山东医药 2004; 44: 29
- 14 黄健, 许丽华. 电子结肠镜检查回肠末端300例临床分析. 实用临床医学 2009; 10: 32
- 15 马瑞军, 陈星, 原丽莉, 汪嵘. 末端回肠检查的重要性与临床相关性研究. 中国药物与临床 2010; 10: 323
- 16 颜丽平, 唐建光, 苏芝群, 刘晓敏. 结肠镜诊断回肠末端病变的临床意义. 中国内镜杂志 2007; 13: 985
- 17 冯忠平, 王晓莉. 结肠镜检查回肠末端825例的体会. 临床医学研究 2006; 23: 580

■同行评价

本文选题新颖, 对临床实践有较好的指导意义.