

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

世界华人消化杂志[®]

WORLD CHINESE JOURNAL OF DIGESTOLOGY

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

2012 年 6 月 18 日 第 20 卷 第 17 期 (Volume 20 Number 17)



17/2012

ISSN 1009-3079



9 771009 307056

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

世界华人消化杂志[®]

编辑委员会

2012-01/2014-12-31

wcjd@wjgnet.com www.wjgnet.com

总顾问

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

名誉主编

潘伯荣教授

主编

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

编委

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

洪天配教授
黄培林教授
黄晓东主任医师
黄颖秋教授
黄缘教授
季国忠教授
江米足教授
姜春萌教授
姜慧卿教授
姜相君主任医师
金瑞教授
蓝宇教授
李淑德教授
李瑜元教授
李玉民教授
廖家智副主任医师
林志辉教授
刘冰熔教授
刘凤斌教授
刘改芳主任医师
刘海峰主任医师
刘海林主任医师
陆伦根教授
马红主任医师
马欣主任医师
毛高平教授
孟庆华教授
倪润洲教授
欧希龙副教授
潘秀珍教授
朴云峰教授
秦成勇教授
任粉玉教授
任建林教授
邵先玉教授
沈琳主任医师
沈薇教授
施瑞华教授
宋军副教授
唐世刚教授
王邦茂教授
王炳元教授
王承党教授
王江滨教授
王俊平教授
王晓艳副教授
夏冰教授
夏时海副教授
徐可树教授
杨建民教授

姚树坤教授
张国梁主任医师
张军教授
张小晋主任医师
张筱茵副教授
张志坚教授
郑培永副教授
郑鹏远教授
郑素军副主任医师
周国雄主任医师
周宇教授
邹晓平主任医师
诸琦教授
于珮主任医师
消化外科学
白雪巍副主任医师
蔡开琳副教授
蔡三军主任医师
曹杰主任医师
陈光教授
陈海龙教授
陈积圣教授
陈进宏副主任医师
陈凛教授
陈汝福教授
陈亚军主任医师
陈钟教授
程爱国教授
程树群副教授
崔云甫教授
戴朝六教授
戴冬秋教授
丁义涛教授
杜顺达副教授
房林教授
傅红副教授
傅华群教授
傅志仁主任医师
高毅主任医师
葛海燕教授
巩鹏副教授
谷俊朝主任医师
顾国利副主任医师
顾岩教授
韩天权教授
郝纯毅主任医师
郝立强副教授
何超教授
何晓顺教授
何裕隆教授
黄志勇教授

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

王石林主任医师
王文跃主任医师
王悦华副主任医师
王振宁教授
王正康教授
王志刚副主任医师
王忠裕教授
吴泰璜教授
伍晓汀教授
谢敏主任医师
徐迅迪教授
徐泱副主任医师
许戈良教授
许剑民教授
薛东波教授
杨柏霖副主任医师
杨桦教授
杨家和主任医师
杨银学教授
殷正丰教授
于聪慧教授
于则利教授
禹正杨副教授
张必翔主任医师
张宏伟教授
张佳林教授
张进祥副教授
张俊副研究员
张力为副教授
赵刚副教授
智绪亭教授
周伟平教授
邹小明教授
消化感染病学
陈国凤主任医师
陈红松研究员
陈建杰教授
陈志辉副主任医师
丁惠国教授
范建高教授
范小玲主任医师
范学工教授
高润平教授
高泽立副教授
龚国忠教授
管世鹤副教授
胡国信主任医师
靳雪源主任医师
刘正稳教授
钱林学主任医师

世界华人消化杂志[®]

编辑委员会

孙殿兴主任医师

谭德明教授

汤华研究员

王凯教授

王怡主任医师

吴君主任医师

宣世英教授

杨江华副教授

姚鹏副教授

张明辉副主任医师

张占卿主任医师

赵桂鸣主任医师

赵秀英副教授

周霞秋教授

朱传武教授

庄林主任医师

消化中医药学

陈治水主任医师

杜群副研究员

黄恒青主任医师

李军祥教授

李康副教授

李晓波教授

李勇副教授

李振华教授

刘成海研究员

刘绍能主任医师

南极星教授

牛英才研究员

王富春教授

邢建峰副教授

徐列明教授

许玲教授

徐庆教授

袁红霞研究员

张声生教授

消化肿瘤学

曹秀峰教授

曹志成院士

代智副研究员

李瑗教授

刘宝瑞教授

刘平教授

刘云鹏教授

沈克平主任医师

王阁教授

向德兵副教授

肖文华主任医师

谢丹教授

张凤春教授

消化影像学

白彬主任医师

官泳松教授

胡红杰主任医师

李健丁教授

龙学颖副主任医师

倪才方教授

魏经国教授

肖恩华教授

徐辉雄教授

严惟力副教授

赵卫主任医师

消化内镜及介入治疗学

郝俊鸣副主任医师

茅爱武教授

孙明军教授

万军教授

袁友红副教授

消化中西医结合学

唐文富副教授

王学美研究员

魏睦新教授

杨钦河教授

张春虎副教授

消化基础研究

曹洁副教授

曹鹏副研究员

陈敬贤教授

陈志龙教授

崔莲花副教授

樊红教授

高国全教授

高英堂研究员

管冬元副教授

何敏教授

黄昆教授

黄武林教授

黄园教授

李刚教授

李君文研究员

李增山副教授

刘克辛教授

刘森副教授

任超世研究员

任浩副教授

任晓峰副教授

台桂香教授

谭学瑞教授

田文静副教授

汪思应教授

王钦红教授

魏继福研究员

吴道澄教授

吴军研究员

吴俊华副教授

徐宁志研究员

许文燮教授

阴赪宏研究员

郁卫东副研究员

喻荣彬教授

周南进研究员

周素芳教授

周晓武副主任医师

消化病理学

杜祥教授

季菊玲副教授

李淳副教授

李晟磊副主任医师

刘丽江教授

刘勇钢副主任医师

门秀丽教授

潘兴华副主任医师

王鲁平主任医师

王娅兰教授

颜宏利副教授

于颖彦教授

余宏宇教授

张锦生教授

赵春玲副教授

朱亮副教授

世界华人消化杂志

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

● 目 次 ●

2012年6月18日

第20卷

第17期

(总第385期)

述 评	1489 抗血小板治疗导致胃肠道损伤及其防治的研究进展 蓝宇, 路国涛
基础研究	1495 丙泊酚对小鼠胃缺血/再灌注后细胞增殖及凋亡的影响 刘河霞, 费素娟, 叶惠惠, 张姣丽, 张咏梅 1502 厄洛替尼联合放疗对MKN45细胞株的影响 张圣林, 刘春丽, 王淑萍, 郝玉静, 王雅棣, 李青山
临床研究	1509 S100A7 mRNA和蛋白在胃癌组织中的表达及其意义 赵洁, 米文, 孙红英, 陈会军, 孙晓黎, 曾燕, 盛之玲 1515 瞬时弹性成像与非酒精性脂肪性肝病病理纤维化分期的相关性 范丽娟, 廖慧钰, 姜太一, 黄云丽, 刘燕敏 1520 sFRP-1在胰腺导管腺癌组织中的表达及其临床意义 满晓华, 王伟, 王世峰, 高军, 龚燕芳, 李兆申
文献综述	1526 术前同步放化疗在食管癌综合治疗中的作用 周国志, 吴清泉 1531 饮食在肠易激综合征症状发作和治疗中的作用 王维达, 方秀才, 柯美云
研究快报	1537 As ₂ O ₃ 联合Aspirin对诱导肝癌细胞凋亡的影响 郝立晓, 刘铁夫 1542 联合丝裂霉素、碘油及肝动脉栓塞对大鼠肝癌的介入治疗 周利华, 彭俊红, 钱坤, 钱骏 1547 藤梨根提取物对HT-29荷瘤裸鼠的抑制及诱导凋亡作用的影响 陈永杰, 史仁杰 1553 肠上皮细胞来源整合素αVβ6对树突状细胞功能的影响 李晓蕾, 郑鹏远, 李付广, 刘志强
临床经验	1559 Ezrin和HER2在胃癌组织芯片中的表达及意义 郭云娣, 李小宁, 白光辉 1564 黏胆症临床文献复习及诊治分析80例 禹正杨, 郭涛, 李汉贤, 王婷安, 邓国庆, 朱钢 1570 口服硫酸镁对ERCP术后胰腺炎发生和血淀粉酶水平的影响 丁国乾, 秦鸣放, 邹富胜, 赵宏志 1574 感染对IBS患者肠黏膜细胞因子表达的影响 鞠辉, 刘希双, 魏良洲, 刘华, 尹继平 1579 环氧化酶-2基因启动子区多态性与结直肠癌的易感性 张颖, 刘长明, 彭惠平, 张剑治, 蔡晓琴, 冯全林
病例报告	1585 自身免疫性肝炎合并干燥综合征、桥本甲状腺炎伴白细胞减少1例 戴敏, 赵鹏, 贝明龙, 张国强

附录	1588 《世界华人消化杂志》投稿须知 1593 2012年国内国际会议预告
志谢	1594 志谢世界华人消化杂志编委
消息	1508 《世界华人消化杂志》栏目设置 1514 《世界华人消化杂志》外文字符标准 1519 WJG成功通过评审被PMC收录 1530 《世界华人消化杂志》2011年开始不再收取审稿费 1536 《世界华人消化杂志》参考文献要求 1552 《世界华人消化杂志》修回稿须知 1558 《世界华人消化杂志》被评为中国精品科技期刊 1569 《世界华人消化杂志》再次入选《中文核心期刊要目总览》(2011年版) 1578 WJG总被引频次排名位于第174名 1584 《世界华人消化杂志》出版流程 1587 中国科技信息研究所发布《世界华人消化杂志》影响因子0.694
封面故事	《世界华人消化杂志》编委, 蓝宇, 教授, 100035, 北京市, 北京大学第四临床医学院, 北京积水潭医院消化科
本期责任人	编务 周媛; 送审编辑 李军亮, 张姗姗; 组版编辑 鲁亚静; 英文编辑 王天奇; 责任编辑 张姗姗; 形式规范审核编辑部主任 李军亮; 最终清样审核总编辑 马连生

<p>Shijie Huaren Xiaohua Zazhi</p> <p>吴阶平 题写封面刊名 陈可冀 题写版权刊名 (旬刊) 创刊 1993-01-15 改刊 1998-01-25 出版 2012-06-18 原刊名 新消化病学杂志</p> <p>期刊名称 世界华人消化杂志 主管单位 山西省科学技术厅 主办单位 太原消化病研治中心</p> <p>编辑 世界华人消化杂志编辑委员会 030001, 山西省太原市双塔西街77号 电话: 0351-4078656 E-mail: wcjd@wjgnet.com http://www.wjgnet.com</p> <p>出版 世界华人消化杂志编辑部 030001, 山西省太原市双塔西街77号 电话: 0351-4078656 E-mail: wcjd@wjgnet.com http://www.wjgnet.com</p>	<p>主编 程英升, 教授, 200072, 上海市, 同济大学附属第十人民医院影像临床医学中心 党双锁, 教授, 710004, 陕西省西安市, 西安交通大学医学院第二附属医院感染科 江学良, 教授, 250031, 山东省济南市, 中国人民解放军济南军区总医院消化科 刘连新, 教授, 150001, 黑龙江省哈尔滨市, 哈尔滨医科大学第一临床医学院普外科 刘占举, 教授, 200072, 上海市, 同济大学附属第十人民医院消化内科 吕宾, 教授, 310006, 浙江省杭州市, 浙江中医药大学附属医院(浙江省中医院)消化科 马大烈, 教授, 200433, 上海市, 中国人民解放军第二军医大学附属长海医院病理科 王小众, 教授, 350001, 福建省福州市, 福建医科大学附属协和医院消化内科 姚登福, 教授, 226001, 江苏省南通市, 南通大学附属医院临床医学研究中心 张宗明, 教授, 100016, 北京市, 清华大学第一附属医院消化医学中心</p> <p>编辑部主任 李军亮</p>	<p>印刷 北京科信印刷厂 发行 国内: 北京报刊发行局 国外: 中国国际图书贸易总公司 (100044, 北京市399信箱) 订购 全国各地邮电局</p> <p>《世界华人消化杂志》是一份同行评议性的旬刊, 是一份被《中国科技论文统计源期刊》和《中文核心期刊要目总览》收录的学术类期刊。《世界华人消化杂志》的英文摘要被美国《化学文摘》, 荷兰《医学文摘库/医学文摘》和俄罗斯《文摘杂志》收录。</p> <p>《世界华人消化杂志》正式开通了在线办公系统(http://www.baishideng.com/wcjcd/ch/index.aspx), 所有办公流程一律可以在线进行, 包括投稿、审稿、编辑、审读, 以及作者、读者、编者之间的信息反馈交流。</p> <p>特别声明 本刊刊出的所有文章不代表本刊编辑部和本刊编委会的观点, 除非特别声明。本刊如有印装质量问题, 请向本刊编辑部调换。</p> <p>2012年版权归世界华人消化杂志所有</p>
中国标准连续出版物号	ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) 邮发代号 国外代号 国内定价 广告经营许可证	CN 14-1260/R 82-262 M 4481 每期68.00元 全年2448.00元 1401004000050

World Chinese Journal of Digestology

June 2012 Contents in Brief Volume 20 Number 17

EDITORIAL	1489 Preventive and therapeutic strategies for gastrointestinal injury associated with antiplatelet therapy <i>Lan Y, Lu GT</i>
BASIC RESEARCH	1495 Effect of propofol on proliferation and apoptosis of gastric mucosal cells in gastric ischemia-reperfusion injury in mice <i>Liu HX, Fei SJ, Ye HH, Zhang JL, Zhang YM</i> 1502 Erlotinib increases sensitivity of MKN45 cells to radiotherapy <i>Zhang SL, Liu CL, Wang SP, Hao YJ, Wang YD, Li QS</i>
CLINICAL RESEARCH	1509 Significance of expression of S100A7 mRNA and protein in gastric carcinoma <i>Zhao J, Mi W, Sun HY, Chen HJ, Sun XL, Zeng Y, Sheng ZL</i> 1515 Correlation between liver stiffness measurement by Fibroscan and liver fibrosis staging based on a liver biopsy in patients with NAFLD <i>Fan LJ, Liao HY, Jiang TY, Huang YL, Liu YM</i> 1520 Clinical significance of sFRP-1 protein expression in pancreatic ductal adenocarcinoma <i>Man XH, Wang W, Wang SF, Gao J, Gong YF, Li ZS</i>
REVIEW	1526 Role of preoperative chemoradiotherapy in the comprehensive treatment of esophageal cancer <i>Zhou GZ, Wu QQ</i> 1531 Role of food in onset of symptoms and treatment of irritable bowel syndrome <i>Wang WD, Fang XC, Ke MY</i>
RAPID COMMUNICATION	1537 Aspirin enhances arsenic trioxide-induced apoptosis of hepatocarcinoma cells <i>Hao LX, Liu TF</i> 1542 Combined use of mitomycin, lipiodol and hepatic artery ligation for treating liver cancer in rats <i>Zhou LH, Peng JH, Qian K, Qian J</i> 1547 Effect of ethanol extract from radix of Actinidia chinensis on tumor growth and cell apoptosis in HT-29 human colon cancer xenografts in nude mice <i>Chen YJ, Shi RJ</i> 1553 Intestinal epithelial cell-derived integrin α V β 6 affects the function of dendritic cells <i>Li XL, Zheng PY, Li FG, Liu ZQ</i>
CLINICAL PRACTICE	1559 Clinical significance of expression of Ezrin and HER2 proteins in gastric cancer <i>Guo YD, Li XN, Bai GH</i> 1564 Diagnosis and treatment of mucobilia: A review and analysis of 80 cases <i>Yu ZY, Guo T, Li HX, Wang TA, Deng GQ, Zhu G</i> 1570 Oral magnesium prevents the development of pancreatitis and hyperamylasemia in patients after ERCP <i>Ding GQ, Qin MF, Zou FS, Zhao HZ</i> 1574 Effect of infection on cytokine expression in the colon mucosa of patients with irritable bowel syndrome <i>Ju H, Liu XS, Wei LZ, Liu H, Yin JP</i> 1579 Relationship between polymorphisms in the promoter region of the COX-2 gene and susceptibility to colorectal cancer <i>Zhang Y, Liu CM, Peng HP, Zhang JZ, Cai XQ, Feng QL</i>

CASE REPORT	1585 Autoimmune hepatitis complicated by Sjogren syndrome and Hashimoto thyroiditis with leukopenia: A report of one case <i>Dai M, Zhao P, Bei ML, Zhang GQ</i>	
APPENDIX	1588 Instructions to authors of <i>World Chinese Journal of Digestology</i> 1593 Meeting events calendar in 2012	
ACKNOWLEDGMENT	1594 Acknowledgments to reviewers of <i>World Chinese Journal of Digestology</i>	
COVER	Editorial Board Member of <i>World Chinese Journal of Digestology</i> , Yu Lan, Professor, Department of Gastroenterology, the Fourth Clinical Medical College of Peking University; Beijing Jishuitan Hospital, Beijing 100035, China	
RESPONSIBLE EDITORS FOR THIS ISSUE	Assistant Editor: <i>Yuan Zhou</i> Review Editor: <i>Jun-Liang Li, Shan-Shan Zhang</i> Electronic Page Editor: <i>Ya-Jing Lu</i> English Language Editor: <i>Tian-Qi Wang</i> Editor-in-Charge: <i>Shan-Shan Zhang</i> Proof Editor: <i>Jun-Liang Li</i> Layout Editor: <i>Lian-Sheng Ma</i>	
Indexed/Abstracted by Chemical Abstracts, EMBASE/ Excerpta Medica and Abstract Journals		
Shijie Huaren Xiaohua Zazhi	<p>EDITOR-IN-CHIEF Ying-Sheng Cheng, Professor, Medical Imaging Center, Shanghai Tenth People's Hospital, Tongji University, Shanghai 200072, China Shuang-Suo Dang, Professor, Department of Infectious Diseases, the Second Affiliated Hospital of Medical School of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710004, Shaanxi Province, China Xue-Liang Jiang, Professor, Department of Gastroenterology, General Hospital of Jinan Military Command of Chinese PLA, Jinan 250031, Shandong Province, China Lian-Xin Liu, Professor, Department of General Surgery, the First Clinical Medical College of Harbin Medical University, Harbin 150001, Heilongjiang Province, China Zhan-Ju Liu, Professor, Department of Gastroenterology, Shanghai Tenth People's Hospital, Tongji University, Shanghai 200072, China Bin Lv, Professor, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310006, Zhejiang Province, China Da-Lie Ma, Professor, Department of Pathology, Shanghai Hospital, the Second Military Medical University of Chinese PLA, Shanghai 200433, China Xiao-Zhong Wang, Professor, Department of Gastroenterology, Union Hospital, Fujian Medical University, Fuzhou 350001, Fujian Province, China Deng-Fu Yao, Professor, Clinical Research Center, Affiliated Hospital of Nantong University, Nantong 226001, Jiangsu Province, China Zong-Ming Zhang, Professor, Department of General Surgery, Digestive Medical Center, the First Affiliated Hospital, School of Medicine, Tsinghua University, Beijing 100016, China </p>	<p>SCIENCE EDITORS Director: Jun-Liang Li</p> <p>SUBSCRIPTION RMB 68 Yuan for each issue RMB 2448 Yuan for one year</p> <p>CSSN ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) CN 14-1260/R</p> <p>COPYRIGHT © 2012 Published by <i>World Chinese Journal of Digestology (WCJD)</i>. All rights reserved; no part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise without the prior permission of WCJD. Authors are required to grant WCJD an exclusive licence to publish.</p> <p>SPECIAL STATEMENT All articles published in this journal represent the viewpoints of the authors except where indicated otherwise.</p> <p>INSTRUCTIONS TO AUTHORS Full instructions are available online at www.wjgnet.com/1009-3079/tgxz.asp. If you do not have web access please contact the editorial office.</p> <p>Copyright © 2012 by Editorial Department of <i>World Chinese Journal of Digestology</i></p>

抗血小板治疗导致胃肠道损伤及其防治的研究进展

蓝宇, 路国涛

蓝宇, 路国涛, 北京大学第四临床医学院 北京积水潭医院消化科 北京市 100035

蓝宇, 主任医师, 教授, 主要从事胃肠运动障碍与疾病以及消化疾病的内镜诊治的研究.

作者贡献分布: 本研究的试验设计和论文部分撰写及修改由蓝宇负责; 路国涛进行资料查找和部分文章撰写.

通讯作者: 蓝宇, 主任医师, 教授, 100035, 北京市西城区新街口东街31号, 北京大学第四临床医学院, 北京积水潭医院消化科.

lanyu-mail@sohu.com

电话: 010-58516917

收稿日期: 2012-02-08 修回日期: 2012-03-11

接受日期: 2012-05-18 在线出版日期: 2012-06-18

Preventive and therapeutic strategies for gastrointestinal injury associated with antiplatelet therapy

Yu Lan, Guo-Tao Lu

Yu Lan, Guo-Tao Lu, Department of Gastroenterology, the Fourth Clinical Medical College of Peking University; Beijing Jishuitan Hospital, Beijing 100035, China

Correspondence to: Yu Lan, Professor, Chief Physician, Department of Gastroenterology, the Fourth Clinical Medical College of Peking University; Beijing Jishuitan Hospital, 31 Xinjiekou East Road, Xicheng District, Beijing 100035, China. lanyu-mail@sohu.com

Received: 2012-02-08 Revised: 2012-03-11

Accepted: 2012-05-18 Published online: 2012-06-18

Abstract

Antiplatelet therapy is the basic therapy for cardiovascular diseases and is widely used in clinical practice. It can cause damage to the gastrointestinal tract and induce severe events such as gastrointestinal bleeding. It is very important for clinicians to prevent and treat this side effect in patients taking low-dose aspirin and clopidogrel. In this paper we discuss the mechanism, prevention and treatment of gastrointestinal injury caused by aspirin and clopidogrel, and introduce the consensus recommendations on reducing the gastrointestinal risk of antiplatelet therapy.

Key Words: Antiplatelet therapy; Gastrointestinal injury; Preventive and therapeutic strategies

Lan Y, Lu GT. Preventive and therapeutic strategies for gastrointestinal injury associated with antiplatelet therapy. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2012; 20(17): 1489-1494

摘要

抗血小板药物治疗是进行心脑血管疾患预防及治疗的基石, 广泛应用于临床。但长期使用可造成胃肠道损害, 导致消化道出血等严重不良事件发生。如何在抗血小板治疗的同时进行消化系不良反应的防治, 是目前临床面临的重要问题。本文就常用抗血小板药物阿司匹林和氯吡格雷导致胃肠道损害的作用机制、特点、防治措施等相关问题进行阐述, 并对抗血小板药物相关消化道出血诊治指南和专家共识介绍。

■背景资料

随着抗血小板药物的广泛应用, 其导致胃肠道损害渐被关注。本文就抗血小板药物致胃肠损害的机制、特点、防治措施等问题进行介绍。

关键词: 抗血小板药物; 胃肠道损害; 防治策略

蓝宇, 路国涛. 抗血小板治疗导致胃肠道损伤及其防治的研究进展. 世界华人消化杂志 2012; 20(17): 1489-1494

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/1489.asp>

0 引言

大量循证医学证据已证实抗血小板药物对心脑血管疾病一级、二级预防的重要性。小剂量阿司匹林(low dose Aspirin, LDA)广泛应用于冠心病、短暂性脑缺血发作(transient ischemic attack, TIA)、脑梗塞等心脑血管疾病的治疗, 尤其是对于急性冠脉综合征(acute coronary syndromes, ACS)或植入药物洗脱支架(DES)的患者, 临幊上更强调LDA联合氯吡格雷双重抗血小板药物的使用^[1], ACS(非ST段抬高患者), 阿司匹林与氯吡格雷合用, 较单用阿司匹林者心血管死亡、非致死性心肌梗死或中风降低20%。但随着阿司匹林、氯吡格雷等抗血小板药物的广泛使用, 消化系不良事件也日渐增多, 而至今仍未引起临幊医师的足够认识和重视, 实际防治工作不容乐观^[2]。对于需抗血小板治疗的患者, 评价及权衡心脑血管缺血性疾病发作及胃肠出血风险, 用药过程中注意认识抗血小板治疗导致的消化系不良反应的表现, 采取有效的预防措施及正确处理严重消化系不良反应非常必要。

1 胃肠道损伤的作用机制

1.1 阿司匹林相关胃肠道损伤的机制

1.1.1 局部作用: 阿司匹林(Aspirin, ASA)对胃黏

■同行评议者
陈贻胜, 教授, 福建省立医院

■研发前沿

以往虽曾有阿司匹林(ASA)引起胃黏膜损伤的综述性文章,但针对抗血小板药物治疗作为专题的较少。文中的防治抗血小板治疗相关胃肠损伤的对策及氯吡格雷和PPI的相互作用等均是当前的热点话题。

膜有直接的损伤作用。在酸性环境下ASA不能离子化而以原物溶解于胃液,脂溶性的ASA原物能穿透胃黏膜上皮细胞膜,破坏黏膜屏障^[3]。ASA能透过胃黏膜上皮脂蛋白膜层,破坏脂蛋白膜的保护作用;ASA在胃内崩解,还可增加白三烯等细胞毒性物质释放,进而造成胃黏膜损伤^[4]。

1.1.2 全身作用: 生理性环氧化酶COX-1存在于胃肠黏膜、肾脏、内皮细胞、血小板等部位,被激活后合成前列腺素I2(prostaglandin I2, PGI2)、前列腺素E2(PGE2)和血栓素A2(thromboxane A2, TXA2)等,起到保护胃肠黏膜,维持正常肾脏灌流,调节血管张力及血小板凝集等作用。ASA可使环氧化酶(COX)活性中心的丝氨酸乙酰化,抑制胃黏膜的COX-1和COX-2活性,使血小板生成TXA2受到抑制,从而起到抗血小板聚集作用。与此同时,ASA抑制COX-1,使前列腺素合成减少,进而使胃黏液及HCO₃⁻分泌减少,胃黏膜血流减少,影响胃黏膜上皮的再生与更新,从而削弱了胃黏膜屏障功能,在胃酸、胃蛋白酶等内源性因素作用下,导致胃黏膜损伤。TNF-α及ICAM-1在小剂量ASA引起的胃黏膜损伤的发病机制中亦起一定的作用^[5]。

1.2 氯吡格雷引起胃肠道损伤的作用机制 氯吡格雷作为非竞争性血小板ADP受体拮抗剂,可抑制血小板聚集和促血管生长因子合成,进一步导致血小板源性生成因子释放减低和血管内皮生长因子合成减少,从而导致新生血管形成障碍,使得胃肠受损伤黏膜修复受阻^[6]。因此,氯吡格雷不是溃疡产生的直接原因,而是通过抑制血小板聚集及新生血管形成阻碍溃疡愈合,诱发已存在的无临床症状的溃疡出血。尚无确切证据表明氯吡格雷具有独立的损伤胃肠道黏膜的作用。

2 消化系损伤的临床表现及特点

2.1 阿司匹林 研究表明,ASA可使消化系损害危险增加2-4倍^[7]。服用ASA的早期,更易发生胃黏膜损伤。在服药后12 mo内为高发阶段,3 mo达高峰^[4]。随着应用ASA时间的延长,胃黏膜具有一定的适应性及耐受性,黏膜损伤反而减低。此类适应性改变的发生机制尚不清楚,但是认为与PG合成无关。临床常见的不良反应有恶心呕吐、上腹疼痛、上腹胀、反酸、烧心、呕血、黑便等临床症状及消化道糜烂出血、消化道溃疡或穿孔、食管炎等上消化道病变。我院进行的ASA相关胃肠道损伤的调查结果提示,ASA所导致的消化系症状前3位为反酸、烧心及上腹

痛,还有腹胀、呕吐、嗳气等消化不良症状及黑便;在消化道出血的患者中,多数无明显消化系症状。ASA所致溃疡多为无痛性,易发生出血及穿孔^[4],所以接受抗血小板药物治疗患者的消化道出血的监测尤为重要。

ASA相关消化系损伤呈剂量相关性。Serebruany等^[8]的荟萃分析显示:<100 mg/d、100-200 mg/d和>200 mg/d剂量ASA的总出血事件发生率分别为3.7%、11.3%和9.8%。美国心脏协会、欧洲心脏协会指南共同推荐对于冠状动脉疾病以及动脉粥样硬化性血管疾病的患者,均应长期服用LDA 100 mg/d(75-150 mg/d)。一项长达5年的观察队列研究显示,即使服用LDA,患者因上消化道出血而住院的年住院率仍占总人群的0.6%^[9]。尚无循证医学证据显示ASA肠溶片或ASA缓释剂能有效减低消化系不良反应^[10,11]。

2.2 氯吡格雷 CAPRIE研究通过对11 300多患者(其中7 000多患者接受治疗1年或以上)的临床观察,评价氯吡格雷的安全性^[12]。研究显示,氯吡格雷组胃肠道反应的发生率为27.1%,由于胃肠道的不良反应而退出治疗的患者占3.2%。常见症状为腹痛(6.0%)、腹泻(4.5%)、消化不良(5.0%)、消化道出血(2.0%)、消化道溃疡(0.7%)等,需住院治疗的出血占0.7%。国内调查结果显示,服用氯吡格雷组患者消化系不良反应发生率为18.6%,较ASA低,而消化性溃疡、出血的比例为5.9%、5.1%,与ASA比较无统计学差异^[13]。

2.3 联合用药 联合服用ASA和氯吡格雷双重抗血小板治疗患者的消化系不良反应事件明显高于单药抗血小板治疗。Delaney等^[14]的研究表明,ASA联合应用氯吡格雷消化系不良反应事件明显增加,高于ASA或氯吡格雷单一药物治疗。CURE研究表明,ASA(75-325 mg)联合氯吡格雷(75 mg)治疗1年,能有效减低心血管事件发生率,但与单用LDA相比,消化道出血率明显增高^[15]。ASA或氯吡格雷合并服用非甾体类抗炎药(non-steroidal anti-inflammatory drugs, NSAIDs)或华法令相关的消化系损伤均高于单一用药。此外,ASA合并服用糖皮质激素、螺内酯及抗抑郁药物等均能增加消化系不良反应的风险^[7]。

3 胃肠道损害的防治措施

3.1 氯吡格雷能否替换阿司匹林 对于长期服用ASA而出现胃肠道不良事件,尤其是上消化道出血患者,是否可以单独使用氯吡格雷替换ASA? CAPRIE研究将ASA 325 mg/d与氯吡格雷75 mg/d进行随机、双盲对照研究,显示氯吡

格雷75 mg、ASA 325 mg患者因胃肠道出血住院率分别为0.7%和1.1%($P = 0.012$)，因此曾认为，对于不能耐受ASA的急性冠脉综合征的患者，可使用氯吡格雷^[12]。对此，早在2006年ESC稳定性冠心病指南就曾提出质疑：因325 mg ASA并不是治疗冠心病的最佳疗效剂量(75-150 mg)，CAPRIE研究中氯吡格雷的疗效可能被高估^[16]。Lanas等^[17]回顾性分析了内镜下确诊的上消化道溃疡合并出血病例2 777例，对照病例5 532例，结果表明使用氯吡格雷75 mg/d者胃肠道出血风险与使用ASA 100 mg/d者出血风险相当。Serebruany等^[18]对51个研究共338 191例患者进行荟萃分析结果显示：LDA和双嘧达莫的出血危险最低；当ASA剂量>100 mg时，可增加出血事件发生的危险，与氯吡格雷和噻氯匹啶相似；LDA的安全性高于氯吡格雷。Chan等^[19]的一项前瞻性随机对照试验，对有消化道出血史的冠心病患者予以不同的消化道出血二级预防方法，随机分成氯吡格雷组($n = 161$ ，氯吡格雷75 mg/d)和ASA+质子泵抑制剂(proton pump inhibitor, PPI)组($n = 159$ ，ASA 80 mg/d+埃索拉唑20 mg/d)，随访12 mo。结果表明：氯吡格雷组复发溃疡出血发生率较ASA+PPI组明显升高，且氯吡格雷组胃肠外不良事件及死亡人数高于ASA+PPI组。Hsiao等^[20]的研究表明，氯吡格雷组因消化系不良事件再次住院率及死亡率均高于ASA+PPI组，且氯吡格雷组每人每年医疗费用明显高于ASA+PPI组。所以专家共识意见不推荐为降低复发性溃疡出血风险而用氯吡格雷替代ASA^[6]。

3.2 消化道出血时是否停用阿司匹林

当患者因服用ASA出现消化道出血不良反应，在上消化道出血急性期是否停用ASA，停服后患者将再次面临心脑血管疾病的风险，何时恢复使用ASA仍是临床医师经常面临亟待解决的问题之一。Collet等^[21]发现475例AMI住院患者中11例(均为病情平稳的稳定型冠心病患者)，停用ASA后9.4 d±3.2 d发生急性心肌梗死，因此推测停用ASA可导致急性冠状动脉血栓的形成。Ferrari等^[22]的研究得出相似结论，提示停用ASA可能导致心血管事件再发。一项随机双盲对照试验，纳入156名ASA导致的急性上消化道出血的患者，评估继续服用ASA对于急性上消化道出血患者的影响^[23]，患者随机分为ASA组($n = 78$ ，80 mg QD)及安慰剂组($n = 78$)，所有患者均接受72 h静脉PPI治疗后常规口服PPI治疗8 wk，试验终点为30 d内的再出血率及死亡率。结果表明，30 d内ASA组

患者的消化道再出血率(10.3%)明显高于安慰剂组(5.4%)；ASA组中仅有1人(1.3%)因再发心血管时间死亡，安慰剂组却有10名(13.0%)患者死亡，死因分别为再发心血管事件($n = 5$)、消化系并发症($n = 3$)、肺炎($n = 2$)。该研究表明，消化道出血期间继续服用ASA有加重消化道再出血的风险，但可能会减低患者最终死亡率。2010年美国内科学年鉴刊发的国际非静脉曲张消化道出血患者的诊治共识提出，对于此类患者，在治疗出血的同时，需着重权衡心血管事件与消化系事件利弊，若前者更为重要，应尽早恢复使用ASA(一般在7 d之内)^[24]。基于80%的再出血发生于首次出血的前3 d，而在骨髓生成新的血小板之前ASA的抗血小板活性是不可逆的，亚太非静脉曲张消化道出血共识提出在停药3-5 d，在出血情况稳定的情况下重新使用ASA是较为明智的做法^[25]。

3.3 如何选择预防用药

不论单独还是联合应用抗血小板药物治疗造成消化道黏膜损伤的风险普遍存在，如何预防高危人群发生严重消化系反应及消化道出血是临床医生必须面对的问题。首先实施抗血小板药物治疗的医师应对该治疗引起的不良反应有所认识，并针对性地采取预防措施，避免和减少消化道出血的发生。高危人群包括：>65岁、有消化道溃疡或出血病史、合并幽门螺杆菌感染、联合抗血小板治疗或抗凝治疗，或合并使用NSAIDs、糖皮质激素类药物^[4]。

治疗胃肠道损伤的药物有PPI、H₂受体阻滞剂(H₂RA)、抗酸药及胃黏膜保护剂等。但上述药物是否能有效预防ASA相关的胃肠道损害，不同研究者的结果不尽相同。Berstad等^[26]对健康志愿者进行的随机双盲试验结果表明：抗酸药不能预防ASA相关的胃黏膜损害。Yamamoto等^[27]的研究表明，对于单用抑酸药无法控制ASA相关的消化系损害症状时，加用瑞巴派特可能是一项有效措施。另有研究表明，瑞巴派特、硫糖铝等胃黏膜保护剂用于预防ASA相关溃疡无效，而抑酸药有确切疗效^[28]。米索前列醇100 mg能有效防治ASA所致的胃十二指肠损伤。对于既往有消化道溃疡病史的患者，米索前列醇能有效预防患者服用ASA的溃疡复发，但腹泻等不良反应限制了其在临床的广泛使用^[29,30]。

近年来关于抑酸药用于预防LDA相关的胃肠道损害的研究报道渐多。Taha等^[31]的一项随机双盲安慰剂对照试验，入选了长期服

■创新盘点
本文对临床常见的通过改变ASA剂型以及氯吡格雷替换ASA来减少胃肠道反应的错误概念及作法予以特别指出。

■应用要点

了解抗血小板药物造成胃肠损伤的机制及特点,对照相关的国际国内专家共识意见,可用于指导临床实践。

用75-325 mg ASA进行心脑血管疾病预防的患者,随机分为安慰剂组和法莫替丁组,随访12 wk,观察内镜下表现显示,法莫替丁能有效预防胃十二指肠溃疡及糜烂性食管炎的发生。雷尼替丁在此类患者中的效应亦被证实^[32]。一项随机对照试验结果表明,对于>60岁既往无消化系基础疾病的患者,埃索美拉唑能有效减低长期服用ASA所带来的消化道溃疡风险^[33]。兰索拉唑及奥美拉唑均能显著减低胃肠道损害。对于有消化系疾病的高危患者,ASA联合应用PPI能减少因消化系疾病风险而造成的再住院率^[20]。对于既往有ASA相关的消化道溃疡或糜烂的患者预防再出血,H₂RA法莫替丁的效果不及PPI潘妥拉唑^[34]。2008年ACCF、ACG和AHA联合发表《降低抗血小板药物和NSAIDs的消化道出血风险专家共识》推荐PPI作为预防抗血小板药物不良反应的首选药物^[6]。对于需联合使用ASA及华法令的患者,建议同时服用PPI预防消化系不良反应,并监测凝血INR值在2.0-2.5之间^[19]。

与ASA不同的是,目前关于防治氯吡格雷相关胃肠道损害的研究多集中于氯吡格雷同PPI的协同关系,未见硫糖铝、米索前列醇及其他胃黏膜保护剂能有效预防氯吡格雷相关胃肠道损伤的报道。近年来,PPI对联合服用ASA及氯吡格雷进行双重抗血小板治疗的患者消化系不良反应进行预防而带来的心血管风险备受关注。氯吡格雷与PPI都在肝内通过P450酶(尤其是2C19)代谢,二者同时使用时PPI可能通过竞争性抑制CYP2C19而影响氯吡格雷的生物转化,影响其抗血小板作用,进而导致不良心血管事件的发生^[35]。但也有研究显示,潘妥拉唑及埃索美拉唑不影响服用氯吡格雷患者的血小板聚集^[36,37]。有人建议对于消化道出血风险及消化系症状而言,低风险患者偶有症状或有持续症状时,高消化系疾病风险患者偶有症状或无症状时,经验性H₂RA治疗;效果欠佳或症状持续时应用PPI^[38]。但另一项研究结果显示,H₂RA联合氯吡格雷与PPI联合氯吡格雷效果无显著差异,但与单用氯吡格雷相比,患者的心血管事件(因ACS再住院率及入院后3 mo内的死亡率)增加^[39]。由此可见,H₂RA联合氯吡格雷不是解决PPI增加氯吡格雷心血管事件的途径。新近一项多中心随机双盲双模拟安慰剂对照研究显示:应用氯吡格雷和ASA双重抗血小板治疗的患者,联用PPI,与安慰剂比较,可降低上消化道出血的风险,而不增加心血管风险^[40],为接受双重抗血小板药物治疗的患者上消化道

出血风险的预防带来新的希望。2010年亚太非静脉曲张上消化道出血共识中,专家组建议服用双重抗血小板药物患者有必要加用PPI^[25]。

3.4 有关幽门螺杆菌根除治疗 幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *H. pylori*)感染和服用ASA是导致消化性溃疡的两个独立危险因素。多项研究结果均提示二者在溃疡形成过程中有协同作用,*H. pylori*感染可加重ASA所导致的胃肠道损伤,增加长期服用小剂量ASA的患者上消化道出血^[41]及胃十二指肠溃疡的发生率的几率^[7]。对于有*H. pylori*感染及既往有上消化道出血病史的患者,服用ASA前根除*H. pylori*能有效预防上消化道再出血,与长期服用奥美拉唑作用相仿^[42]。在决定长期应用抗血小板药物治疗前,对于有溃疡病史的患者,建议检测并根除*H. pylori*^[6]。也有人对*H. pylori*感染与ASA致溃疡及出血的协同作用提出异议。日本Kawai等^[43]提出,ASA所致的溃疡多为浅表性溃疡,且与*H. pylori*感染无相关。Fletcher等^[44]对近年来发表的13篇关于长期服用ASA出现消化道出血与*H. pylori*感染关系的研究进行回顾性分析,结果显示:无足够的证据表明*H. pylori*感染是诱发长期服用ASA患者消化道出血的独立危险因素。

3.5 抗血小板药物相关的胃肠道损害防治的专家共识 2008年,ACCF、ACG和AHA联合发表《降低抗血小板药物和NSAIDs的消化道出血风险专家共识》,该共识建议^[6]: (1)由于NSAIDs与抗血小板制剂(特别是ASA)可以增加患者溃疡性胃肠道合并症的危险,故对于高危患者应给予必要的胃肠道保护性治疗;(2)使用低剂量ASA进行心血管病预防时可使上消化道出血事件危险性增加2-3倍。肠溶制剂并不能降低出血性并发症的危险。对于胃肠道出血性事件危险较高的患者,需要予以相应的胃肠道保护性治疗。上消化道出血事件的危险性随着ASA剂量的增加而升高;(3)联合应用ASA与抗凝药物(包括华法林、普通肝素和低分子量肝素)可以显著增加有临床意义的出血事件的危险性,其中多数为上消化道出血。因此这种联合用药方式需要严格掌握适应征,且患者需要同时应用PPI;(4)不推荐为降低复发性溃疡出血风险而用氯吡格雷替代ASA,其效果逊于ASA加PPI;(5)为预防或治疗NSAID与ASA所致的胃肠道损害,PPI是首选药物;(6)有溃疡病史的患者,在开始启动长期抗血小板治疗之前,建议先检查*H. pylori*,若结果阳性应首先进行根除*H. pylori*治疗;(7)对于发生急性溃疡出血的患者,必

须根据患者具体情况决定是否停用ASA; (8)对于接受双重抗血小板治疗的高危心血管病患者, 发生溃疡出血后可能需要内镜治疗。

2009年,《抗血小板药物消化道损伤的预防和治疗中国专家共识》颁布。该指南提出ASA等抗血小板药物相关的胃肠道风险事先预防优于事后补救。同时做出如下总结^[4]: (1)ASA是心脑血管疾病患者长期抗血栓治疗的基石,包括一级预防和二级预防。对于有适应征的患者应坚持长期抗血小板治疗,同时采取适当的措施避免和减少消化系损伤的发生; (2)即使小剂量的ASA也可导致消化系损伤,ASA长期使用时的最佳剂量为75-100 mg/d,不同剂型ASA发生消化性溃疡及消化道出血危险的差异无统计学意义; (3)高危人群:>65岁、有消化道溃疡或出血病史、合并H. pylori感染、联合抗血小板治疗或抗凝治疗或联合使用NSAIDs、糖皮质激素类药物治疗; (4)对于长期服用抗血小板药物的高危人群应进行H. pylori筛查并根除,可联合应用PPI、H₂RA或黏膜保护剂进行防治; (5)发生消化系损伤后是否停用抗血小板药需平衡患者的血栓和出血风险; (6)对于ASA所致的溃疡、出血患者,不建议氯吡格雷替代ASA治疗,建议给予ASA联合PPI治疗; (7)临床医生和患者均需监测长期服用抗血小板药物治疗引起的消化系损伤,注意有无黑便,定期行便潜血检查。

4 结论

抗血小板被广泛用于心脑血管疾病的预防,其所导致的胃肠道不良反应受到愈来愈多临床医师的关注。了解并熟悉抗血小板药物治疗所致胃肠黏膜损伤,临床医生才能权衡心血管事件与消化道出血等事件的风险,合理充分地评估每个患者的风险与获益,给予每个患者最适合的治疗方案。

5 参考文献

- 1 U.S. Preventive Services Task Force. Aspirin for the prevention of cardiovascular disease: U.S. Preventive Services Task Force recommendation statement. *Ann Intern Med* 2009; 150: 396-404
- 2 Luk HH. Use of gastroprotective drugs in patients receiving low-dose aspirin. *J Chin Med Assoc* 2009; 72: 356-361
- 3 Scheiman JM, Tillner A, Pohl T, Oldenburg A, Angermüller S, Görlich E, Engel G, Usadel KH, Kusterer K. Reduction of non-steroidal anti-inflammatory drug induced gastric injury and leucocyte endothelial adhesion by octreotide. *Gut* 1997; 40: 720-725
- 4 抗血小板药物消化道损伤的预防和治疗中国专家共识组. 抗血小板药物消化道损伤的预防和治疗中国专家共识. 中华内科杂志 2009; 48: 607-611
- 5 张伟, 吴本俨, 王孟薇. 小剂量阿司匹林引起胃黏膜损伤机制的研究. 军医进修学院学报 2004; 25: 210-212
- 6 Bhatt DL, Scheiman J, Abraham NS, Antman EM, Chan FK, Furberg CD, Johnson DA, Mahaffey KW, Quigley EM, Harrington RA, Bates ER, Bridges CR, Eisenberg MJ, Ferrari VA, Hlatky MA, Kaul S, Lindner JR, Moliterno DJ, Mukherjee D, Schofield RS, Rosenson RS, Stein JH, Weitz HH, Wesley DJ. ACCF/ACG/AHA 2008 expert consensus document on reducing the gastrointestinal risks of antiplatelet therapy and NSAID use: a report of the American College of Cardiology Foundation Task Force on Clinical Expert Consensus Documents. *J Am Coll Cardiol* 2008; 52: 1502-1517
- 7 Yeomans ND, Lanas AI, Talley NJ, Thomson AB, Daneshjoo R, Eriksson B, Appelman-Eszczuk S, Långström G, Naesdal J, Serrano P, Singh M, Skelly MM, Hawkey CJ. Prevalence and incidence of gastroduodenal ulcers during treatment with vascular protective doses of aspirin. *Aliment Pharmacol Ther* 2005; 22: 795-801
- 8 Serebruany VL, Steinhubl SR, Berger PB, Malinin AI, Baggish JS, Bhatt DL, Topol EJ. Analysis of risk of bleeding complications after different doses of aspirin in 192,036 patients enrolled in 31 randomized controlled trials. *Am J Cardiol* 2005; 95: 1218-1222
- 9 Chey WD, Eswaren S, Howden CW, Inadomi JM, Fendrick AM, Scheiman JM. Primary care physician perceptions of non-steroidal anti-inflammatory drug and aspirin-associated toxicity: results of a national survey. *Aliment Pharmacol Ther* 2006; 23: 655-668
- 10 Walker J, Robinson J, Stewart J, Jacob S. Does enteric-coated aspirin result in a lower incidence of gastrointestinal complications compared to normal aspirin? *Interact Cardiovasc Thorac Surg* 2007; 6: 519-522
- 11 Kelly JP, Kaufman DW, Jurgeon JM, Sheehan J, Koff RS, Shapiro S. Risk of aspirin-associated major upper-gastrointestinal bleeding with enteric-coated or buffered product. *Lancet* 1996; 348: 1413-1416
- 12 CAPRIE Steering Committee. A randomised, blinded, trial of clopidogrel versus aspirin in patients at risk of ischaemic events (CAPRIE). *Lancet* 1996; 348: 1329-1339
- 13 张绍深. 阿司匹林与氯吡格雷消化道不良反应的临床分析. 临床合理用药杂志 2010; 3: 81-82
- 14 Delaney JA, Opatrný L, Brophy JM, Suissa S. Drug drug interactions between antithrombotic medications and the risk of gastrointestinal bleeding. *CMAJ* 2007; 177: 347-351
- 15 Peters RJ, Mehta SR, Fox KA, Zhao F, Lewis BS, Koppey SL, Diaz R, Commerford PJ, Valentini V, Yusuf S. Effects of aspirin dose when used alone or in combination with clopidogrel in patients with acute coronary syndromes: observations from the Clopidogrel in Unstable angina to prevent Recurrent Events (CURE) study. *Circulation* 2003; 108: 1682-1687
- 16 Fox K, Garcia MA, Ardissono D, Buszman P, Camici PG, Crea F, Daly C, De Backer G, Hjemdahl P, Lopez-Sendon J, Marco J, Morais J, Pepper J, Sechtem U, Simoons M, Thygesen K, Priori SG, Blanc JJ, Budaj A, Camm J, Dean V, Deckers J, Dickstein K, Lekakis J, McGregor K, Metra M, Morais J, Osterspey A, Tamargo J, Zamorano JL. Guidelines on the management of stable angina pectoris: executive summary: The Task Force on the Management of Stable Angina Pectoris of the European Society of Cardiology. *Eur Heart J* 2006; 27: 1341-1381
- 17 Lanas A, García-Rodríguez LA, Arroyo MT, Gomol-

■同行评价

本文概述了抗血小板药物治疗所致胃肠黏膜损伤及相对对策,对解除心血管及消化科医师面临的困惑有实用意义。

- lón F, Feu F, González-Pérez A, Zapata E, Bástida G, Rodrigo L, Santolaria S, Güell M, de Argila CM, Quintero E, Borda F, Piqué JM. Risk of upper gastrointestinal ulcer bleeding associated with selective cyclo-oxygenase-2 inhibitors, traditional non-aspirin non-steroidal anti-inflammatory drugs, aspirin and combinations. *Gut* 2006; 55: 1731-1738
- 18 Serebruany VL, Malinin AI, Eisert RM, Sane DC. Risk of bleeding complications with antiplatelet agents: meta-analysis of 338,191 patients enrolled in 50 randomized controlled trials. *Am J Hematol* 2004; 75: 40-47
- 19 Chan FK, Ching JY, Hung LC, Wong VW, Leung VK, Kung NN, Hui AJ, Wu JC, Leung WK, Lee VW, Lee KK, Lee YT, Lau JY, To KF, Chan HL, Chung SC, Sung JJ. Clopidogrel versus aspirin and esomeprazole to prevent recurrent ulcer bleeding. *N Engl J Med* 2005; 352: 238-244
- 20 Hsiao FY, Tsai YW, Huang WF, Wen YW, Chen PF, Chang PY, Kuo KN. A comparison of aspirin and clopidogrel with or without proton pump inhibitors for the secondary prevention of cardiovascular events in patients at high risk for gastrointestinal bleeding. *Clin Ther* 2009; 31: 2038-2047
- 21 Collet JP, Himbert F, Steg PG. Myocardial infarction after aspirin cessation in stable coronary artery disease patients. *Int J Cardiol* 2000; 76: 257-258
- 22 Ferrari E, Benhamou M, Cerboni P, Marcel B. Coronary syndromes following aspirin withdrawal: a special risk for late stent thrombosis. *J Am Coll Cardiol* 2005; 45: 456-459
- 23 Sung JJ, Lau JY, Ching JY, Wu JC, Lee YT, Chiu PW, Leung VK, Wong VW, Chan FK. Continuation of low-dose aspirin therapy in peptic ulcer bleeding: a randomized trial. *Ann Intern Med* 2010; 152: 1-9
- 24 Barkun AN, Bardou M, Kuipers EJ, Sung J, Hunt RH, Martel M, Sinclair P. International consensus recommendations on the management of patients with nonvariceal upper gastrointestinal bleeding. *Ann Intern Med* 2010; 152: 101-113
- 25 Sung JJ, Chan FK, Chen M, Ching JY, Ho KY, Kachintorn U, Kim N, Lau JY, Menon J, Rani AA, Reddy N, Sollano J, Sugano K, Tsoi KK, Wu CY, Yeomans N, Vakil N, Goh KL. Asia-Pacific Working Group consensus on non-variceal upper gastrointestinal bleeding. *Gut* 2011; 60: 1170-1177
- 26 Berstad K, Haram EM, Weberg R, Berstad A. Acute damage of gastroduodenal mucosa by acetylsalicylic acid: no prolonged protection by antacids. *Aliment Pharmacol Ther* 1989; 3: 585-590
- 27 Yamamoto T, Isono A, Mishina Y, Ebato T, Shirai T, Nakayama S, Nagasawa K, Abe K, Hattori K, Ishii T, Kuyama Y. Gastroduodenal mucosal injury in patients taking low-dose aspirin and the role of gastric mucoprotective drugs: possible effect of rebamipide. *J Clin Biochem Nutr* 2010; 47: 27-31
- 28 Nakashima S, Ota S, Arai S, Yoshino K, Inao M, Ishikawa K, Nakayama N, Imai Y, Nagoshi S, Mochida S. Usefulness of anti-ulcer drugs for the prevention and treatment of peptic ulcers induced by low doses of aspirin. *World J Gastroenterol* 2009; 15: 727-731
- 29 Goldstein JL, Huang B, Amer F, Christopoulos NG. Ulcer recurrence in high-risk patients receiving nonsteroidal anti-inflammatory drugs plus low-dose aspirin: results of a post HOC subanalysis. *Clin Ther* 2004; 26: 1637-1643
- 30 Donnelly MT, Goddard AF, Filipowicz B, Morant SV, Shield MJ, Hawkey CJ. Low-dose misoprostol for the prevention of low-dose aspirin-induced gastroduodenal injury. *Aliment Pharmacol Ther* 2000; 14: 529-534
- 31 Taha AS, McCloskey C, Prasad R, Bezlyak V. Famotidine for the prevention of peptic ulcers and oesophagitis in patients taking low-dose aspirin (FAMOUS): a phase III, randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet* 2009; 374: 119-125
- 32 Kitchingman GK, Prichard PJ, Daneshmend TK, Walt RP, Hawkey CJ. Enhanced gastric mucosal bleeding with doses of aspirin used for prophylaxis and its reduction by ranitidine. *Br J Clin Pharmacol* 1989; 28: 581-585
- 33 Yeomans N, Lanas A, Labenz J, van Zanten SV, van Rensburg C, Rácz I, Tchernev K, Karamanolis D, Roda E, Hawkey C, Nauckler E, Svedberg LE. Efficacy of esomeprazole (20 mg once daily) for reducing the risk of gastroduodenal ulcers associated with continuous use of low-dose aspirin. *Am J Gastroenterol* 2008; 103: 2465-2473
- 34 Ng FH, Wong SY, Lam KF, Chu WM, Chan P, Ling YH, Kng C, Yuen WC, Lau YK, Kwan A, Wong BC. Famotidine is inferior to pantoprazole in preventing recurrence of aspirin-related peptic ulcers or erosions. *Gastroenterology* 2010; 138: 82-88
- 35 Norgard NB, Mathews KD, Wall GC. Drug-drug interaction between clopidogrel and the proton pump inhibitors. *Ann Pharmacother* 2009; 43: 1266-1274
- 36 Siller-Matula JM, Spiel AO, Lang IM, Kreiner G, Christ G, Jilma B. Effects of pantoprazole and esomeprazole on platelet inhibition by clopidogrel. *Am Heart J* 2009; 157: 148. e1-e5
- 37 Sibbing D, Morath T, Stegherr J, Braun S, Vogt W, Hadamitzky M, Schömig A, Kastrati A, von Beckerath N. Impact of proton pump inhibitors on the antiplatelet effects of clopidogrel. *Thromb Haemost* 2009; 101: 714-719
- 38 Allen C, Dunn SP, Macaulay TE, Mukherjee D. Clopidogrel-proton pump inhibitor interaction: a primer for clinicians. *Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets* 2010; 10: 66-72
- 39 Wu CY, Chan FK, Wu MS, Kuo KN, Wang CB, Tsao CR, Lin JT. Histamine2-receptor antagonists are an alternative to proton pump inhibitor in patients receiving clopidogrel. *Gastroenterology* 2010; 139: 1165-1171
- 40 Bhatt DL, Cryer BL, Contant CF, Cohen M, Lanas A, Schnitzer TJ, Shook TL, Lapuerta P, Goldsmith MA, Laine L, Scirica BM, Murphy SA, Cannon CP. Clopidogrel with or without omeprazole in coronary artery disease. *N Engl J Med* 2010; 363: 1909-1917
- 41 Feldman M, Cryer B, Mallat D, Go MF. Role of Helicobacter pylori infection in gastroduodenal injury and gastric prostaglandin synthesis during long term/low dose aspirin therapy: a prospective placebo-controlled, double-blind randomized trial. *Am J Gastroenterol* 2001; 96: 1751-1757
- 42 Lanas A, Fuentes J, Benito R, Serrano P, Bajador E, Sainz R. Helicobacter pylori increases the risk of upper gastrointestinal bleeding in patients taking low-dose aspirin. *Aliment Pharmacol Ther* 2002; 16: 779-786
- 43 Kawai T, Fukuzawa M, Moriyasu F, Yamashina A. [Influence of H. pylori infection on upper gastrointestinal damage]. *Nihon Rinsho* 2010; 68: 2020-2024
- 44 Fletcher EH, Johnston DE, Fisher CR, Koerner RJ, Newton JL, Gray CS. Systematic review: Helicobacter pylori and the risk of upper gastrointestinal bleeding risk in patients taking aspirin. *Aliment Pharmacol Ther* 2010; 32: 831-839

丙泊酚对小鼠胃缺血/再灌注后细胞增殖及凋亡的影响

刘河霞, 费素娟, 叶惠惠, 张皎丽, 张咏梅

刘河霞, 费素娟, 叶惠惠, 张皎丽, 徐州医学院附属医院消化内科 江苏省徐州市 221004

张咏梅, 江苏省麻醉学重点实验室 徐州医学院麻醉生理学教研室 江苏省徐州市 221004

刘河霞, 在读硕士, 主要从事消化系疾病的研究.

国家自然科学基金资助项目, No. 81171041

江苏省自然科学基金资助项目, No. BK2011197

江苏省麻醉学重点实验室开放课题基金资助项目, No. KJS1103

江苏省2011年度普通高校研究生科研创新计划基金资助项目, No. CX2211-0752

徐州市社会发展科技计划基金资助项目, No. xzzd1051

徐州医学院院长基金资助项目, No. 09KJZ17, No. 09KJZ33

作者贡献分布: 课题设计由张咏梅主持; 研究过程由刘河霞、费素娟、叶惠惠及张皎丽共同完成; 数据分析由刘河霞完成; 论文写作由刘河霞与张咏梅共同完成.

通讯作者: 张咏梅, 教授, 221004, 江苏省徐州市淮海西路84号, 徐州医学院麻醉学重点实验室. zhangym700@163.com

收稿日期: 2012-02-28 修回日期: 2012-03-27

接受日期: 2012-04-19 在线出版日期: 2012-06-18

Effect of propofol on proliferation and apoptosis of gastric mucosal cells in gastric ischemia-reperfusion injury in mice

He-Xia Liu, Su-Juan Fei, Hui-Hui Ye, Jiao-Li Zhang, Yong-Mei Zhang

He-Xia Liu, Su-Juan Fei, Hui-Hui Ye, Jiao-Li Zhang, Department of Gastroenterology, the Affiliated Hospital of Xuzhou Medical College, Xuzhou 221004, Jiangsu Province, China

Yong-Mei Zhang, Department of Anesthetic Physiology, Xuzhou Medical College, Xuzhou 221004, Jiangsu Province, China

Supported by: the National Science Foundation of China, No. 81171041; the National Science Foundation of Jiangsu Province, No. BK2011197; the Open Subject Foundation For the Key Laboratory of Anesthesia in Jiangsu Province, No. KJS1103; the Scientific Research Innovation Programme Foundation For Graduate Student of Colleges and Universities in Jiangsu Province, No. CX2211-0752; and the Technology Program Foundation for Social Development of Xuzhou, No. xzzd1051

Correspondence to: Yong-Mei Zhang, Professor, Key Laboratory of Anesthetic Physiology, Xuzhou Medical College, 84 Huaihai West Road, Xuzhou 221004, Jiangsu Province, China. zhangym700@163.com

Received: 2012-02-28 Revised: 2012-03-27

Accepted: 2012-04-19 Published online: 2012-06-18

Abstract

AIM: To observe the changes in proliferation and apoptosis of gastric mucosal cells in gastric ischemia-reperfusion (I/R) injury, and to clarify

whether propofol has a gastric protection effect and the possible mechanisms involved.

METHODS: Seventy-two Kunming mice were randomly divided into four groups: sham operation group, I/R injury group, fat emulsion group, and propofol group. Except the sham operation group, I/R injury was induced in other groups by clamping the celiac artery for 30 min and allowing reperfusion for 1 h. The mice were finally sacrificed to observe morphological changes and investigate gastric mucosal damage index (GMDI). The histological changes of the stomach were observed using light microscopy. The content of malondialdehyde (MDA) and activity of superoxide dismutase (SOD) in gastric mucosal cells were measured by colorimetry analysis. Immunohistochemistry and TdT-mediated d-UTP-biotin nick end-labeling (TUNEL) assay were used to observe PCNA expression and apoptosis in gastric mucosa, and the expression of Bax and Bcl-2 proteins was determined by Western blot.

RESULTS: Severe mucosal lesions induced by gastric I/R were considerably reduced following administration of propofol (25 mg/kg); mucosal and submucosal hyperemia, edema, and deep erosion were improved significantly. Compared to the I/R group, treatment with propofol significantly reduced gastric mucosal MDA content and cell apoptosis ($33.9\% \pm 1.3\% vs 60.8\% \pm 6.9\%, P < 0.01$), enhanced SOD activity, promoted cell proliferation ($16.0\% \pm 1.8\% vs 6.4\% \pm 1.2\%, P < 0.01$), and regulated Bax ($0.453 \pm 0.025 vs 0.268 \pm 0.023, P < 0.01$) and Bcl-2 ($0.513 \pm 0.014 vs 0.752 \pm 0.015, P < 0.01$) protein expression.

CONCLUSION: Propofol protects against gastric I/R injury possibly by promoting gastric mucosal cell proliferation and inhibiting apoptosis.

Key Words: Propofol; Reperfusion injury; Malondialdehyde; Superoxide dismutase; Proliferation; Apoptosis

Liu HX, Fei SJ, Ye HH, Zhang JL, Zhang YM. Effect of propofol on proliferation and apoptosis of gastric mucosal cells in gastric ischemia-reperfusion injury in mice. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2012; 20(17): 1495-1501

■背景资料

在创伤、休克、肠道梗阻以及器官移植等外科手术过程中均可引起不同器官缺血/再灌注(I/R)损伤, 其中消化器官是比较敏感的器官, 较早较易受累, 还会产生许多严重的并发症, 对远隔器官如心、肺、肾等造成继发损害, 因此关于如何早期采取有效措施避免或减轻消化器官I/R损伤的研究已成为临床研究的热点.

■同行评议者

陆伦根, 教授, 上海交通大学附属第一人民医院消化科

■研发前沿

丙泊酚是临幊上常用的静脉麻醉药，现已有研究证实其除具有麻醉作用外，还具有较强的抗氧化作用，对I/R引起的组织器官损伤有较好的保护作用。但目前主要集中在对心、脑、肠等器官I/R损伤方面的研究，而对GI/RI的研究却相对较少。

摘要

目的：观察丙泊酚对小鼠胃缺血/再灌注(ischemia-reperfusion, I/R)后胃黏膜损伤程度及胃黏膜细胞增殖及凋亡的影响，探讨丙泊酚的胃保护作用及可能机制。

方法：72只♂昆明小鼠随机分为4组：假手术组(sham, S组)、I/R组、脂肪乳组(fat emulsion, F组)、丙泊酚组(propofol, P组)。通过夹闭小鼠腹腔动脉30 min后松开动脉夹再灌注1 h制作胃I/R模型。取胃观察大体形态变化、计算胃黏膜损伤指数，HE染色光镜下观察病理形态学变化，比色法测定丙二醛(malondialdehyde, MDA)含量和超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)活性，免疫组织化学方法和原位DNA末端标记(TUNEL)染色法分别检测胃黏膜细胞增殖和凋亡的表达情况，蛋白免疫印迹法(Western blotting)测定胃黏膜组织中Bcl-2、Bax蛋白的表达。

结果：腹腔注射25 mg/kg丙泊酚后胃黏膜损伤明显减轻，具体表现为胃黏膜及黏膜下层的充血、水肿及糜烂均有明显改善；与I/R组相比，P组细胞内MDA含量明显降低，SOD活性增强($P<0.01$)；与I/R组相比，丙泊酚可明显抑制胃黏膜细胞凋亡(33.9%±1.3% vs 60.8%±6.9%)、促进细胞增殖(16.0%±1.8% vs 6.4%±1.2%)、下调Bax(0.453±0.025 vs 0.268±0.023)及上调Bcl-2蛋白(0.513±0.014 vs 0.752±0.015)的表达(均 $P<0.01$)。

结论：丙泊酚能促进小鼠胃I/R后胃黏膜细胞增殖、抑制细胞凋亡，对胃I/R损伤有保护作用，其可能机制与其清除氧自由基、抑制脂质过氧化有关。

关键词：丙泊酚；再灌注损伤；丙二醛；超氧化物歧化酶；细胞增殖；细胞凋亡

刘河霞，费素娟，叶惠惠，张娇丽，张咏梅. 丙泊酚对小鼠胃缺血/再灌注后细胞增殖及凋亡的影响. 世界华人消化杂志 2012; 20(17): 1495–1501

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/1495.asp>

0 引言

胃缺血/再灌注损伤(gastric ischemia reperfusion injury, GI/RI)是临幊上普遍存在的一种脏器损伤现象，各种严重的应激性刺激，如创伤、烧伤、严重感染、休克、远隔器官的缺血再灌注、缺血性肠病及坏死性肠炎等^[1-3]情况均可不同程度的导致GI/RI。GI/RI涉及较多的病理生理过程，但主要与氧自由基有关^[4]；丙泊酚又叫异丙酚，

是临幊上常用的静脉麻醉药，现已有研究证实其除具有麻醉作用外，还具有较强的抗氧化作用，对缺血/再灌注(ischemia-reperfusion, I/R)引起的组织器官损伤有较好的保护作用，但目前主要集中在对心、脑、肠等器官I/R损伤方面的研究^[5-7]，而对GI/RI的研究却相对较少，本研究通过建立小鼠GI/RI模型，观察丙泊酚对GI/RI的影响，进一步探讨其可能的机制。

1 材料和方法

1.1 材料 健康昆明小鼠72只，♂，8-12周龄，由徐州医学院实验动物中心提供[由江苏省科技厅批准，许可证号：XYXK苏(2002-0038)]；丙泊酚注射液(批号：GM399，Astra Zeneca公司，意大利)；脂肪乳注射液(批号：80EF088，华瑞制药有限公司)；MDA、SOD试剂盒(南京生物建成生物工程)；小鼠抗大鼠增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen, PCNA)单克隆抗体、SABC试剂盒(武汉博士德生物工程公司)；Bax兔抗鼠多克隆抗体(P-19, sc-526)和Bcl-2兔抗鼠多克隆抗体(N-19, sc-492)(Santa Cruz公司，美国)；SDS-PAGE试剂盒(碧云天生物科技研究所)；原位细胞凋亡检测(TUNEL)试剂盒(Roche公司，德国)；其他试剂为国产分析纯试剂。

1.2 方法

1.2.1 分组：在12 h节律下饲养，室温及湿度分别维持在20 °C和50%左右，实验前禁食24 h、自由饮水。将动物随机分为4组：假手术组(sham, S组)、I/R组、脂肪乳组(fat emulsion, F组)、丙泊酚组(propofol, P组)，每组18只小鼠。

1.2.2 GI/RI模型的制备及标本采集：按照Zhang等^[8]方法制备GI/RI模型，实验时用10%水合氯醛0.3 mL/100 g腹腔麻醉，麻醉完全后将动物仰卧固定于手术台上，剪毛，开腹，分离并夹闭腹腔动脉30 min，去除动脉夹恢复血流。S组仅分离腹腔动脉，不进行夹闭；P组及F组按照文献报道^[9]分别在缺血30 min前腹腔注射丙泊酚或脂肪乳25 mg/kg，各组于再灌注1 h后处死动物快速取胃，向8只小鼠胃内注入40 g/L甲醛溶液10 mL固定5 min，沿纵轴大弯侧剖开，漂洗平铺拍照后继续固定于40 g/L甲醛溶液中用于病理学检测，其余10只用冰的生理盐水洗去内容物取黏膜置于-80 °C冰箱保存做分子生物学检测。

1.2.3 胃黏膜损伤指数的测定：参照Zhang等^[10]方法并加以改进测定胃黏膜损伤指数，以腺胃区局限于胃上皮的点状糜烂、溃疡、出血灶的长度累积计分：正常为0分，损伤≤1 mm计1分，-2 mm

表 1 丙泊酚对胃组织黏膜中SOD活性和MDA含量的影响 ($n = 6$, mean \pm SD)

分组	SOD(U/mg prot)	MDA(nmol/mg prot)
S组	65.82 \pm 5.40	0.4273 \pm 0.0323
I/R组	49.29 \pm 3.71 ^b	0.5584 \pm 0.0293 ^b
F组	47.54 \pm 5.31	0.5414 \pm 0.0470
P组	59.70 \pm 7.29 ^d	0.3985 \pm 0.0453 ^d

^b $P < 0.01$ vs S组; ^d $P < 0.01$ vs I/R组.

计2分, -3 mm计3分, 余类推. 损伤宽度超过1 mm时分数加倍. 每组小鼠损伤分数的平均值为损伤指数.

1.2.4 组织病理学检测: 取置于40 g/L甲醛溶液中的胃组织做常规病理学切片, 行苏木素-伊红(HE)染色, 光学显微镜下观察胃组织病理形态变化.

1.2.5 胃黏膜SOD活性和MDA含量的测定: 按超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、丙二醛(malondialdehyde, MDA)试剂盒说明操作, SOD利用752分光光度计于波长550 nm测定吸光度(*A*)值, MDA于波长532 nm测定*A*值, 然后代入相应公式计算SOD(U/mg prot)值和MDA(nmol/mg prot)值.

1.2.6 胃黏膜PCNA检测: 用免疫组织化学法按照SABC试剂盒说明检测胃黏膜组织PCNA蛋白的表达, 石蜡切片的抗原修复采用pH 6.0的柠檬酸修复液, 加热至沸腾后3 min缓慢冷却; PCNA(抗体稀释比1:100)4 °C过夜, 用PBS替代一抗作为阴性对照. 在高倍镜(×400)下随机选取10个细胞清晰的视野观察PCNA表达, 记录阳性细胞数及总细胞数, 以各组的阳性细胞百分率代表PCNA增殖指数. PCNA增殖指数(%) = PCNA阳性细胞数/计数细胞总数 × 100%.

1.2.7 胃黏膜细胞凋亡检测: 采用脱氧核糖核酸末端转移酶介导的缺口末端标记(TUNEL)法检测细胞凋亡, 操作过程严格按照试剂盒说明书进行, 将切片贴附于多聚赖氨酸处理过的载玻片上, 常规脱蜡至水, DAB显色, 苏木素复染, 脱水, 透明, 封片. 在显微镜下观察凋亡细胞核呈棕褐色. 每张切片随机取10个高倍镜视野(×400), 计数凋亡细胞及总细胞, 计算胃黏膜细胞凋亡指数, 胃黏膜细胞凋亡指数(%) = (凋亡细胞数目/总细胞数目) × 100%.

1.2.8 胃组织蛋白免疫印迹(Western blotting)分析: 将已制备的细胞蛋白提取液测其蛋白浓度后, 经100 °C水浴变性5 min, 取等量蛋白样品进行电泳, 经10%聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-

PAGE)分离后, 以湿转法转至NC膜上, 3%BSA封闭液封闭2 h后分别加入适当比例稀释的一抗(Bcl-2、Bax兔抗鼠多克隆抗体1:500), 4 °C过夜. 洗膜后加入相应的碱性磷酸酶标记的二抗, 室温孵育2 h, 洗膜后加入显色剂(NBT/BCIP显色试剂盒), 显色后条带经图像处理仪行激光扫描后测各条带*A*值, 蛋白激活水平以免疫印迹中相应条带的灰度值相对于内参组的比值来表示.

统计学处理 各组数据均以mean \pm SD表示, 采用SPSS13.0进行统计分析, 组间比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA), 两两比较采用*q*检验. $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义.

2 结果

2.1 丙泊酚对小鼠GI/RI胃组织形态学变化的影响 假手术组胃黏膜损伤不明显, 缺血30 min再灌注1 h后胃黏膜损伤明显增加, 胃黏膜损伤指数为118.0 \pm 24.3, 腹腔注射25 mg/kg丙泊酚后胃黏膜损伤较I/R组明显减少, 胃黏膜损伤指数为51.0 \pm 15.5, 差异有显著统计学意义($P < 0.01$). 而腹腔注射25 mg/kg脂肪乳后对缺血30 min再灌注1 h后胃黏膜损伤无明显影响, 黏膜损伤仍较重, 胃黏膜损伤指数为112.0 \pm 17.2(图1,2).

HE染色光镜下观察小鼠的胃组织形态, 结果显示: 假手术组胃黏膜上皮细胞及腺体排列整齐, 除有少量的出血点外无黏膜水肿和脱落, 胃组织结构基本完整; I/R组及脂肪乳组胃黏膜及黏膜下层出现严重的充血、水肿及糜烂; 与I/R组、脂肪乳组相比, 丙泊酚组胃组织病理变化明显减轻, 仅见轻度的黏膜上皮细胞脱落及黏膜下层水肿(图3).

2.2 丙泊酚对小鼠GI/RI胃黏膜组织中SOD活性和MDA含量的影响 胃缺血再灌注后胃黏膜组织SOD活性显著降低($P < 0.01$); MDA含量显著增高($P < 0.01$), 而丙泊酚组与I/R组比较, SOD活性显著增加($P < 0.01$); MDA含量则显著降低($P < 0.01$, 表1).

2.3 丙泊酚对小鼠GI/RI胃黏膜细胞增殖活性的影响 胃黏膜PCNA阳性细胞表达主要在黏膜层中上1/3交界附近, 假手术组胃黏膜此处有一定量的增殖细胞, PCNA增殖指数为25.9% \pm 4.9%. I/R 1 h后增殖细胞明显减少, PCNA增殖指数为6.4% \pm 1.2%, 与假手术组比较有显著性差异($P < 0.01$), 丙泊酚预处理后明显增加胃黏膜细胞PCNA蛋白的表达水平, PCNA增殖指数为16.0% \pm 1.8%, 较I/R组明显增加($P < 0.01$), I/R组与脂肪乳组(5.3% \pm 1.1%)相比, 无统计学意义(图4).

■相关报道
近年来众多实验研究表明丙泊酚的抗氧化特性、对炎性因子的影响、抑制钙超载及细胞凋亡等作用能减轻I/R对组织器官的病理、生理反应, 从而减少组织器官的损害.

■创新盘点

本文通过观察丙泊酚对小鼠胃I/R后胃黏膜损伤程度及胃黏膜细胞增殖及凋亡的影响,发现丙泊酚能促进胃黏膜细胞增殖、抑制细胞凋亡等,设计恰当简单,思路较新颖。

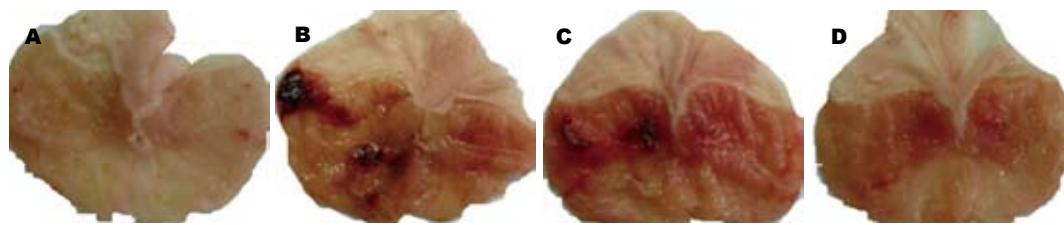


图1 小鼠GI/RI胃组织大体观. A: S组; B: I/R组; C: F组; D: P组.

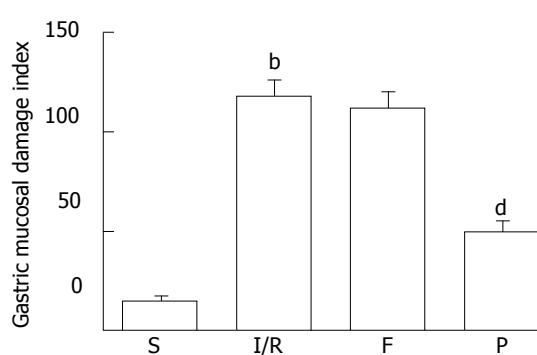


图2 胃黏膜损伤指数比较.^b $P<0.01$ vs S组; ^d $P<0.01$ vs I/R组.

2.4 丙泊酚对小鼠GI/RI胃黏膜细胞凋亡的影响
胃黏膜TUNEL阳性细胞染色为棕褐色,主要位于胞核,检测结果如图5所示:在假手术组,也会见到凋亡阳性细胞,平均细胞凋亡率是14.0%。在I/R组,细胞凋亡率明显增加($60.8\pm6.9\%$),与假手术组比较有显著统计学意义。I/R组与F组相比无统计学意义。然而与I/R组($60.7\pm6.9\%$)和脂肪乳组($55.7\pm2.9\%$)相比较,丙泊酚组($33.9\pm1.3\%$)的凋亡细胞率明显的降低(均 $P<0.01$)。

2.5 丙泊酚对小鼠GI/R胃黏膜组织中Bcl-2和Bax蛋白表达的影响 Western蛋白免疫印迹结果(图6)显示,在假手术组中,胃黏膜细胞Bax的蛋白表达水平很低(0.213 ± 0.021)。与I/R组(0.453 ± 0.025)及脂肪乳组(0.416 ± 0.032)胃黏膜Bax蛋白表达水平相比,丙泊酚组(0.268 ± 0.023)胃黏膜Bax蛋白表达水平明显下降,且有统计学意义($P<0.01$);而在假手术组中(0.922 ± 0.011)胃黏膜Bcl-2蛋白表达水平最高,I/R组和脂肪乳组胃黏膜Bcl-2蛋白表达水平分别为: 0.513 ± 0.014 、 0.486 ± 0.298 ,与丙泊酚组(0.752 ± 0.015)胃黏膜Bax蛋白表达水平相比差异均有显著性($P<0.01$)。

3 讨论

近年来有许多研究证实了I/R损伤与细胞凋亡之间的关系非常密切,是I/R损伤中细胞死亡的重要形式^[11-13],细胞凋亡是由体内外多种因素触发的、多种基因严格控制的一系列连锁反应的细胞死亡过程,也称为程序性细胞死亡,在正常情

况下,细胞凋亡与增殖保持着总数的平衡,当细胞正常增殖和分化被扰乱,平衡被打破导致细胞过度增殖和凋亡异常时,就会诱发疾病的發生^[14,15]。胃I/R时,机体氧化和抗氧化系统失衡,氧自由基产生增多,当在体内蓄积过多时就会使器官组织的细胞膜脂质过氧化,细胞线粒体受损,进而引起组织细胞凋亡坏死,造成器官组织的损伤^[16,17]。而在与细胞凋亡有关的基因中Bcl-2与Bax被认为是目前研究凋亡调节机制中最重要的基因之一,其中Bcl-2是重要的凋亡抑制基因,Bax是Bcl-2家族成员之一,但与Bcl-2的作用相反,属促凋亡基因,能促进细胞凋亡^[18-22]。

丙泊酚又叫异丙酚,化学名为2,6-双异丙基苯酚,作为一种静脉麻醉药已经应用于临床十余年,因其具有起效迅速、作用时间短、苏醒迅速而完全、持续输注后无蓄积等其他静脉麻醉药所无法比拟的特点,被麻醉医师广泛运用于麻醉诱导、麻醉维持等临床情况^[23-25]。近几年随着消化内镜技术的迅速发展,消化系统疾病的诊治率有了显著的提高,但是普通内镜操作往往具有一定的风险和创伤,易引起患者恶心、呕吐甚至恐惧而拒行内镜检查^[26],从而延误了疾病诊治的最佳时机,而无痛内镜的开展解决了此问题,在普通内镜的基础上对患者施以麻醉药物,让患者在睡眠状态下接受检查,是一种安全、舒适、有效的检查方法,不但可以减轻患者痛苦,还可以消除恐惧心理,越来越受到患者的青睐,具有较高的临床应用价值,其中因丙泊酚具有其他麻醉药无法比拟的优点,而被作为无痛内镜检查中最常用的麻醉药物^[27,28]。目前普遍认为丙泊酚除具有麻醉作用外,还具有抗自由基、抑制脂质过氧化反应,减轻细胞内钙超载以及抑制细胞凋亡等作用,对心、脑、肺、肾等全身多脏器I/R损伤有较强的保护作用,Acquaviva等^[29]研究进一步证实了上述观点并认为Bcl-2家族很可能是丙泊酚抑制细胞凋亡的主要作用位点。此外麻醉药丙泊酚预处理的给药时机为缺血再灌注前,与手术中麻醉药物的应用时间非常吻合,因此麻醉药的合理应用具有

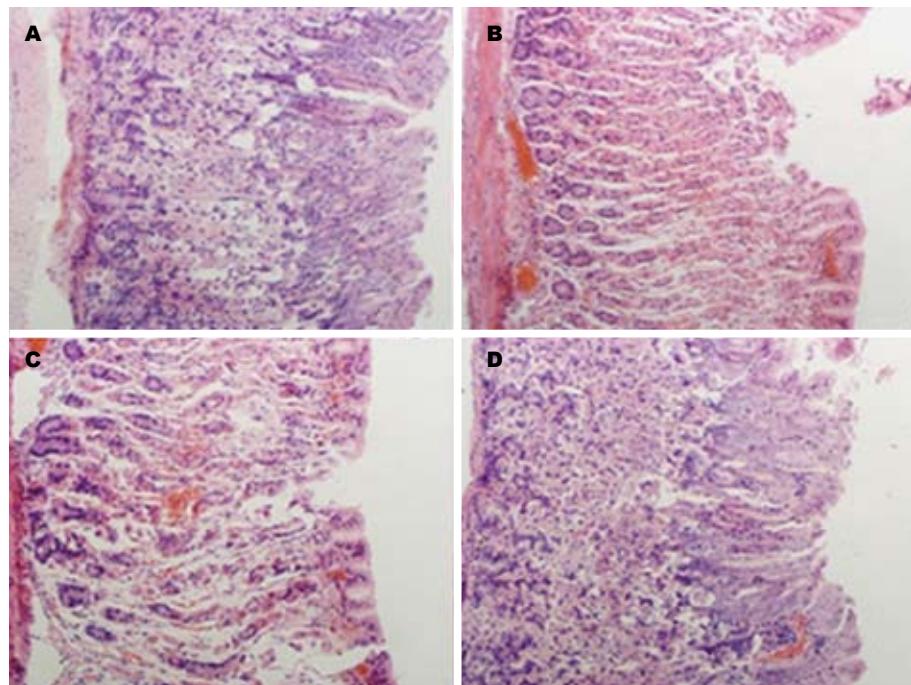


图 3 丙泊酚对小鼠GI/RI胃组织形态学变化的影响(HE染色 $\times 200$)。A: S组; B: I/R组; C: F组; D: P组。

■应用要点
本研究提示丙泊酚可为治疗或预防消化系统损伤提供新的药物靶点, 扩展了临幊上消化系统疾病的治疗途径。

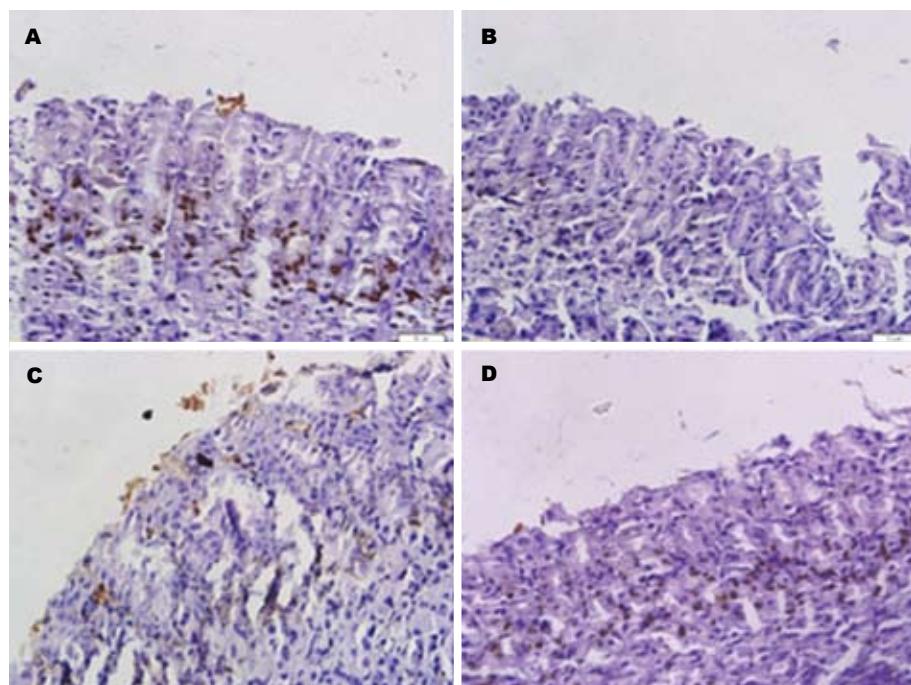


图 4 丙泊酚对小鼠GI/RI后胃黏膜细胞增殖的影响($\times 400$)。A: S组; B: I/R组; C: F组; D: P组。

更广阔的临幊应用价值。

目前麻醉药丙泊酚的缺血预处理对消化器官的保护作用多集中在肝、肠等方面的研究, Kim等^[30]研究表明丙泊酚对肝脏I/R有保护作用, Liu等^[31]研究表明丙泊酚对肠I/R有保护意义。而丙泊酚对胃I/R的影响尚少有报道, 本实验研究发现, 胃I/R后, MDA升高, SOD下降, 在缺血前30 min腹腔给予丙泊酚注射液25 mg/kg可以明显减轻由I/R引起的胃黏膜损伤, 提示丙泊酚可减少氧自由基产生并减轻体内脂质氧化程度, 上调Bcl-2蛋白和下调Bax蛋白的表达, 降低胃黏

膜细胞凋亡指数, 减轻胃黏膜细胞凋亡程度。结果表明丙泊酚能促进小鼠胃I/R后胃黏膜细胞增殖、抑制细胞凋亡, 对GI/RI有保护作用, 其可能机制与其清除自由基、抑制脂质过氧化有关。

总之, 丙泊酚可以通过清除自由基、抑制脂质过氧化, 促进抗凋亡调控因子Bcl-2的表达, 抑制促凋亡的调控因子Bax的表达, 进而抑制细胞凋亡、促进细胞增殖, 减轻胃I/R引起的胃黏膜的出血、糜烂, 从而对GI/RI发挥显著的保护作用, 初步阐明了丙泊酚对GI/RI的调控及在临幊上更加广阔的应用前景。本研究只观察了丙泊

■同行评价

本文观察了丙泊酚对胃I/R时胃黏膜细胞增殖、凋亡及病理变化的影响,设计合理,层次分明,对基础研究和临床研究具有一定的参考意义。

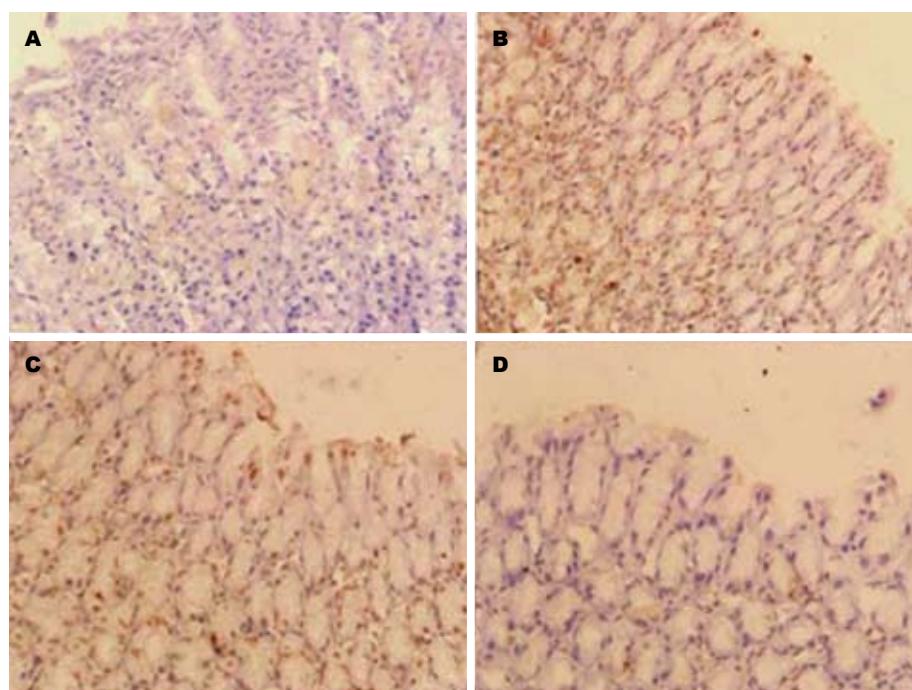


图 5 丙泊酚对小鼠胃黏膜细胞凋亡的影响($\times 400$)。A: S组; B: I/R组; C: F组; D: P组。

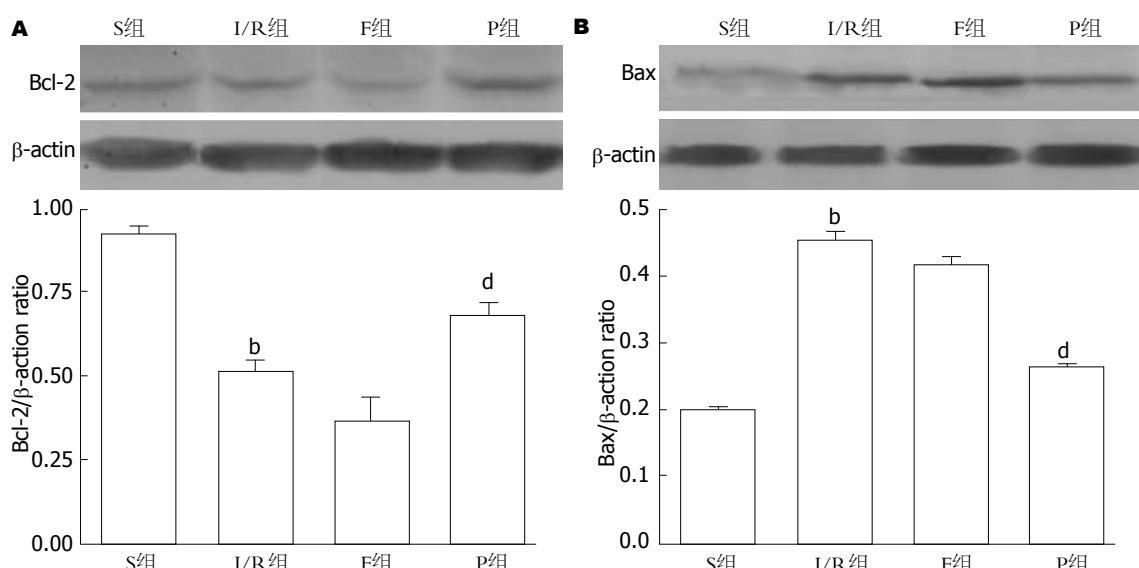


图 6 丙泊酚对小鼠GI/R胃黏膜组织中Bcl-2和Bax蛋白表达的影响。A: Bcl-2; B: Bax。^b $P<0.01$ vs S组; ^d $P<0.01$ vs I/R组。

酚对GI/R细胞凋亡的影响,但是丙泊酚对胃黏膜的保护作用是一个多基因、多环节、多途径调控的相互作用、相互影响的复杂过程,并不单单是某一种或某一类基因表达的结果,丙泊酚究竟是通过何种途径调控这一过程的,这还有待于我们进一步研究,以便更加准确地阐述丙泊酚对脏器I/R的保护作用机制,并且为临床治疗GI/RI提供重要的理论依据。

4 参考文献

- Brzozowski T, Konturek PC, Konturek SJ, Pajdo R, Kwiecien S, Pawlik M, Drozdowicz D, Sliwowski Z, Pawlik WW. Ischemic preconditioning of remote organs attenuates gastric ischemia-reperfusion

injury through involvement of prostaglandins and sensory nerves. *Eur J Pharmacol* 2004; 499: 201-213

2 Kotani T, Kobata A, Nakamura E, Amagase K, Takeuchi K. Roles of cyclooxygenase-2 and prostacyclin/IP receptors in mucosal defense against ischemia/reperfusion injury in mouse stomach. *J Pharmacol Exp Ther* 2006; 316: 547-555

3 Savas C, Ozogul C, Karaöz E, Delibas N, Ozgüner F. Splenectomy reduces remote organ damage after intestinal ischaemia-reperfusion injury. *Acta Chir Belg* 2003; 103: 315-320

4 El Eter E, Hagar HH, Al-Tuwaijri A, Arafa M. Nuclear factor-kappaB inhibition by pyrrolidinedithiocarbamate attenuates gastric ischemia-reperfusion injury in rats. *Can J Physiol Pharmacol* 2005; 83: 483-492

5 Jin YC, Kim W, Ha YM, Shin IW, Sohn JT, Kim HJ, Seo HG, Lee JH, Chang KC. Propofol limits rat myocardial ischemia and reperfusion injury with an associated reduction in apoptotic cell death in vivo.

- 6 *Vascul Pharmacol* 2009; 50: 71-77
- 6 Wang H, Luo M, Li C, Wang G. Propofol post-conditioning induced long-term neuroprotection and reduced internalization of AMPAR GluR2 subunit in a rat model of focal cerebral ischemia/reperfusion. *J Neurochem* 2011; 119: 210-219
- 7 李琳, 张丽, 赵京禹, 郝建华, 李平. 异丙酚对缺血再灌注大鼠肠黏膜的保护作用. 世界华人消化杂志 2008; 16: 1461-1464
- 8 Zhang JF, Zhang YM, Yan CD, Zhou XP. Neuroregulatory mechanism of hypothalamic paraventricular nucleus on gastric ischemia-reperfusion injury in rats. *Life Sci* 2002; 71: 1501-1510
- 9 Yuzbasioglu MF, Aykas A, Kurutas EB, Sahinkanat T. Protective effects of propofol against ischemia/reperfusion injury in rat kidneys. *Ren Fail* 2010; 32: 578-583
- 10 Zhang YM, Wei EQ, Hu X, Xu M, Shi Y, Zhang JF. Administration of angiotensin II in the paraventricular nucleus protects gastric mucosa from ischemia-reperfusion injury. *Brain Res* 2008; 1212: 25-34
- 11 Valen G. Cellular signalling mechanisms in adaptation to ischemia-induced myocardial damage. *Ann Med* 2003; 35: 300-307
- 12 Bedirli N, Akyürek N, Kurtipek O, Kavutcu M, Kartal S, Bayraktar AC. Thoracic epidural bupivacaine attenuates inflammatory response, intestinal lipid peroxidation, oxidative injury, and mucosal apoptosis induced by mesenteric ischemia/reperfusion. *Anesth Analg* 2011; 113: 1226-1232
- 13 Liao YH, Xia N, Zhou SF, Tang TT, Yan XX, Lv BJ, Nie SF, Wang J, Iwakura Y, Xiao H, Yuan J, Jevallee H, Wei F, Shi GP, Cheng X. Interleukin-17A contributes to myocardial ischemia/reperfusion injury by regulating cardiomyocyte apoptosis and neutrophil infiltration. *J Am Coll Cardiol* 2012; 59: 420-429
- 14 Vollmers HP, Dämmrich J, Hensel F, Ribbert H, Meyer-Bahlburg A, Ufken-Gaul T, von Korff M, Müller-Hermelink HK. Differential expression of apoptosis receptors on diffuse and intestinal type stomach carcinoma. *Cancer* 1997; 79: 433-440
- 15 Wagner S, Beil W, Westermann J, Logan RP, Bock CT, Trautwein C, Bleck JS, Manns MP. Regulation of gastric epithelial cell growth by Helicobacter pylori: evidence for a major role of apoptosis. *Gastroenterology* 1997; 113: 1836-1847
- 16 张咏梅, 张建福, 阎长栋. 胃缺血再灌注损伤的模型与机制. 世界华人消化杂志 2001; 9: 675-678
- 17 Qiao WL, Wang L, Zhang JF, Zhang YM. Effects of gastric ischemia-reperfusion on gastric mucosal cellular apoptosis and proliferation in rats. *Shengli Xuebao* 2006; 58: 237-243
- 18 Adams JM, Cory S. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science* 1998; 281: 1322-1326
- 19 Park SE, Park C, Kim SH, Hossain MA, Kim MY, Chung HY, Son WS, Kim GY, Choi YH, Kim ND. Korean red ginseng extract induces apoptosis and decreases telomerase activity in human leukemia cells. *J Ethnopharmacol* 2009; 121: 304-312
- 20 Garcia EJ, Lawson D, Cotsonis G, Cohen C. Hepatocellular carcinoma and markers of apoptosis (bcl-2, bax, bcl-x): prognostic significance. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2002; 10: 210-217
- 21 Huang YC, Chuang LY, Hung WC. Mechanisms underlying nonsteroidal anti-inflammatory drug-induced p27(Kip1) expression. *Mol Pharmacol* 2002; 62: 1515-1521
- 22 Brambilla E, Negoesco A, Gazzeri S, Lantuejoul S, Moro D, Brambilla C, Coll JL. Apoptosis-related factors p53, Bcl2, and Bax in neuroendocrine lung tumors. *Am J Pathol* 1996; 149: 1941-1952
- 23 Thiry JC, Hans P, Deby-Dupont G, Mouythis-Mickalad A, Bonhomme V, Lamy M. Propofol scavenges reactive oxygen species and inhibits the protein nitration induced by activated polymorphonuclear neutrophils. *Eur J Pharmacol* 2004; 499: 29-33
- 24 Xia Z, Huang Z, Ansley DM. Large-dose propofol during cardiopulmonary bypass decreases biochemical markers of myocardial injury in coronary surgery patients: a comparison with isoflurane. *Anesth Analg* 2006; 103: 527-532
- 25 Bovill JG. Intravenous anesthesia for the patient with left ventricular dysfunction. *Semin Cardiothorac Vasc Anesth* 2006; 10: 43-48
- 26 张志强, 高金贵, 安波. 异丙酚联合舒芬太尼或咪达唑仑用于纤维胃镜检查的临床观察. 临床荟萃 2007, 22: 243-246
- 27 Martínez J, Casellas JA, Aparicio JR, Garmendia M, Amorós A. [Safety of propofol administration by the staff of a gastrointestinal endoscopy unit]. *Gastroenterol Hepatol* 2007; 30: 105-109
- 28 Morse JW, Fowler SA, Morse AL. Endoscopist-administered propofol: a retrospective safety study. *Can J Gastroenterol* 2008; 22: 617-620
- 29 Acquaviva R, Campisi A, Murabito P, Raciti G, Avola R, Mangiameli S, Musumeci I, Barcellona ML, Vanella A, Li Volti G. Propofol attenuates peroxynitrite-mediated DNA damage and apoptosis in cultured astrocytes: an alternative protective mechanism. *Anesthesiology* 2004; 101: 1363-1371
- 30 Kim SK, Jee D, Kim JY, Choi JH. Effects of propofol on early phase of warm hepatic ischemia/reperfusion injury. *Hepatogastroenterology* 2007; 54: 2333-2336
- 31 Liu KX, Chen SQ, Huang WQ, Li YS, Irwin MG, Xia Z. Propofol pretreatment reduces ceramide production and attenuates intestinal mucosal apoptosis induced by intestinal ischemia/reperfusion in rats. *Anesth Analg* 2008; 107: 1884-1891

编辑 曹丽鸥 电编 鲁亚静

厄洛替尼联合放疗对MKN45细胞株的影响

张圣林, 刘春丽, 王淑萍, 郝玉静, 王雅棣, 李青山

■背景资料

胃癌是危害人类健康最常见的恶性肿瘤之一, 同步放化疗是胃癌R0切除术后的标准治疗, 同时引起的放化疗不良反应引起了临床广泛关注。

张圣林, 刘春丽, 王淑萍, 郝玉静, 李青山, 承德医学院附属医院放化疗科 河北省承德市 067000

王雅棣, 中国人民解放军北京军区总医院放疗科 北京市 100700

张圣林, 主治医师, 主要从事肿瘤放射治疗的临床与教学。

承德市科技局课题基金资助项目, No. 201121132

作者贡献分布: 此课题由张圣林、刘春丽及王雅棣设计; 研究过程由张圣林、刘春丽、王淑萍及郝玉静操作完成; 数据分析由张圣林、刘春丽及李青山完成; 本论文写作由张圣林、刘春丽及王雅棣完成。

通讯作者: 王雅棣, 教授, 100700, 北京市东城区东四十条南门仓5号, 中国人民解放军北京军区总医院放疗科。

wangyadi@hotmail.com

电话: 010-66721629

收稿日期: 2012-04-05 修回日期: 2012-05-09

接受日期: 2012-05-18 在线出版日期: 2012-06-18

Erlotinib increases sensitivity of MKN45 cells to radiotherapy

Sheng-Lin Zhang, Chun-Li Liu, Shu-Ping Wang, Yu-Jing Hao, Ya-Di Wang, Qing-Shan Li

Sheng-Lin Zhang, Chun-Li Liu, Shu-Ping Wang, Yu-Jing Hao, Qing-Shan Li, Department of Radiochemotherapy, Affiliated Hospital of Chengde Medical College, Chengde 067000, Hebei Province, China

Ya-Di Wang, Department of Radiotherapy, General Hospital of Beijing Military Command of Chinese PLA, Beijing 100700, China

Supported by: the Foundation of Chengde Science and Technology Bureau, No. 201121132

Correspondence to: Ya-Di Wang, Professor, Department of Radiotherapy, General Hospital of Beijing Military Command of Chinese PLA, 5 Nanmencang Road, Dongcheng District, Beijing 100700, China. wangyadi@hotmail.com

Received: 2012-04-05 Revised: 2012-05-09

Accepted: 2012-05-18 Published online: 2012-06-18

Abstract

AIM: To observe the effect of erlotinib combined with radiotherapy on cell cycle progression and apoptosis of human gastric carcinoma MKN45 cells to explore the mechanism by which erlotinib increases the sensitivity of MKN45 cells to radiotherapy.

METHODS: The effect of erlotinib and radiotherapy on MKN45 cells was examined by MTT assay and colony formation assay. The median inhibitory concentration (IC_{50}) and radiobiological parameters D_0 and D_q were calculated. Cell apoptosis and cell cycle progression were examined by flow cytometry. The expression of Bcl-2 and Bax proteins was detected by Western blot.

ined by flow cytometry. The expression of Bcl-2 and Bax proteins was detected by Western blot.

RESULTS: Both erlotinib and radiotherapy could inhibit MKN45 cell growth in a concentration- and dose-dependent manner (both $P < 0.01$). The inhibitory effect of erlotinib combined with radiotherapy on MKN45 cell growth was better than that of erlotinib or radiation alone. Combination treatment significantly decreased the percentages of cells in S phase cells and increased those in G_2/M and G_0/G_1 phases (71.87 ± 0.77 vs 60.72 ± 0.26 , $P < 0.01$) and cell apoptosis. After treatment with erlotinib combined with radiotherapy, Bcl-2 protein expression decreased and Bax protein expression increased.

CONCLUSION: Erlotinib increases radiosensitivity of MKN45 cells by increasing the percentages of cells in G_2/M and G_0/G_1 phases and decreasing Bcl-2/Bax ratio to induce apoptosis.

Key Words: Erlotinib; Radiotherapy; Gastric cancer; MKN45 cells; Apoptosis

Zhang SL, Liu CL, Wang SP, Hao YJ, Wang YD, Li QS. Erlotinib increases sensitivity of MKN45 cells to radiotherapy. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2012; 20(17): 1502-1508

摘要

目的: 观察厄洛替尼联合放疗对人胃癌MKN45细胞周期和凋亡的影响, 了解厄洛替尼对放疗增敏的作用机制。

方法: 通过MTT法和集落形成实验, 检测厄洛替尼和放射线对MKN45细胞的生长抑制作用, 计算出半数抑制浓度(50% inhibitory concentration, IC_{50})和放射生物学参数平均致死剂量(mean lethal dose, D_0)、准阈剂量(quasi-threshold, D_q)值, 得出放射增敏比; 流式细胞仪检测MKN45细胞经厄洛替尼及联合放疗处理后细胞的凋亡率及周期分布情况; Western blot法检测厄洛替尼及联合放疗对MKN45细胞的Bax与Bcl-2蛋白表达的影响。

结果: 厄洛替尼及放疗均能抑制MKN45细

胞的生长, 随用药浓度或剂量的增高, 抑制作用增强($P<0.01$)。厄洛替尼与放射线联合对MKN45细胞的抑制作用大于单药和单纯照射($P<0.01$); 两者联合使S期细胞比率明显降低, 放射敏感的G₂/M期和G₀/G₁期细胞比率明显增加(71.87 ± 0.77 vs 60.72 ± 0.26 , $P<0.01$), 细胞凋亡率增加; 厄洛替尼联合放射线作用于细胞后, Bcl-2蛋白表达明显减少, Bax蛋白表达则明显增加。

结论: 厄洛替尼通过增加G₂/M和G₀/G₁期细胞比率, 降低Bcl-2、升高Bax蛋白表达, 从而降低Bcl-2/Bax比率, 增加细胞凋亡, 以此提高MKN45细胞的放射敏感性。

关键词: 厄洛替尼; 放疗; 胃癌; MKN45细胞; 凋亡

张圣林, 刘春丽, 王淑萍, 郝玉静, 王雅棣, 李青山. 厄洛替尼联合放疗对MKN45细胞株的影响. 世界华人消化杂志 2012; 20(17): 1502-1508
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/1502.asp>

0 引言

胃癌早期症状隐匿, 超过70%的胃癌患者确诊时已是中晚期, 胃癌5年总存活率仅为20%左右^[1]。术后同期放化疗可将3年总生存率和无病生存率由单纯手术的41%、31%提高到50%、48%^[2]。因此, 2007的NCCN指南将胃癌R0切除术后(T3/4、N0, 任何T、N+)行5FU同步放化疗列入标准治疗^[3]。厄洛替尼是表皮生长因子酪氨酸激酶抑制剂^[4], 对非小细胞肺癌^[5]、晚期胰腺癌^[6]均有明显的抑制作用。文献显示表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)在胃癌组织中的阳性率接近50%^[7-9], 提示厄洛替尼有可能成为胃癌的一个靶向药物, 但厄洛替尼在胃癌中的研究及应用尚未见报道。最近Kishida等^[10]报道吉非替尼对胃癌细胞有放射增敏作用, 启发我们观察厄洛替尼对胃癌及对放射线的影响。

1 材料和方法

1.1 材料 DMEM培养基为GIBCO公司产品, 胰蛋白酶(trypsin)、二甲基亚砜(DMSO)、碘化丙啶(PI)为Sigma公司产品, MTT为华美生物技术有限公司产品, Annexin V-EGFP为南京凯基生物科技发展有限公司产品; 颗粒酶一抗、穿孔素一抗、 β -actin一抗及Western blot二抗为Santa Cruz公司产品; 厄洛替尼由罗氏公司(Roche, Penzberg, Germany)生产。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养: 人胃癌MKN45细胞株由南京凯基生物科技发展有限公司传代保存, 为单层贴壁生长。用含100 mL/L胎牛血清, 100 U/mL青霉素, 100 mg/L链霉素的DMEM培养基, 在37 °C、50 mL/L CO₂培养箱内进行传代培养。

1.2.2 MTT法检测厄洛替尼和放射线对MKN45细胞的作用: (1)MTT法检测厄洛替尼对MKN45细胞的增殖抑制作用: 取对数生长期的MKN45细胞, 消化、计数后以 3×10^3 /孔密度均匀接种于96孔板, 24 h细胞贴壁后加入浓度为2.5、5.0、10.0、15.0、25.0、50.0 μ mol/L厄洛替尼培养液, 每种浓度6个复孔, 并设不加药的细胞对照。分别培养24、48、72、96 h, 吸弃原含药培养液, 加入无血清培养液100 mL, 每孔加MTT(5 g/L)20 μ L, 继续培养4 h, 吸去原培养液, 加入DMSO 150 μ L/孔溶解沉淀, 用酶标仪(波长570 nm)测定每个孔的吸光度(A值)。抑制率(%) = $[(A_c - A_0) - (A_t - A_0)] / (A_c - A_0) \times 100\%$ (A_c 和 A_t 分别是细胞对照和实验组的A值, A_0 是背景对照的A值), 计算出不同时间各浓度细胞的存活分数(SF, SF = $A_t / A_c \times 100\%$), 并根据改良Herbst法计算IC₅₀, 以0.2×IC₅₀作为后续的实验浓度。实验重复3次; (2)MTT法检测放射线对MKN45细胞的增殖抑制作用: 取对数生长期MKN45细胞, 以 3×10^3 /孔密度接种于96孔板, 培养24 h后给予0、2、4、6、8 Gy剂量的照射。每个剂量设6个复孔。继续培养72 h, 用上面同样的方法在酶标仪(波长570 nm)测定每个孔的A值, 计算细胞抑制率。实验重复3次; (3)MTT法检测厄洛替尼联合放射线对MKN45细胞的增殖抑制作用: MKN45细胞按 4×10^3 /孔密度接种于96孔板, 培养24 h后, 给予6 Gy照射, 随后加入含厄洛替尼浓度为2.5、5.0、10.0、15.0、25.0、50.0 μ mol/L的培养液, 100 μ L/孔, 每种浓度6个复孔。再继续培养72 h, 以同样的方法计算细胞抑制率。实验重复3次; (4)单细胞集落形成实验检测厄洛替尼及放射线对MKN45细胞的增殖抑制作用: 取对数生长期MKN45细胞, 消化、计数并逐级稀释后, 将细胞接种于6 cm平皿中。分为对照组、照射组、厄洛替尼组和厄洛替尼+照射组, 每组3个平皿。照射组、厄洛替尼+照射组接受0、2、4、6、8 Gy的照射后, 更换含或不含2 μ mol/L厄洛替尼的新鲜培养液培养2 wk。显微镜下计数细胞数>50个的克隆数。单细胞集落形成率(PE) = (克隆数/接种的细胞数) × 100%。细胞存活率(SF) = [各实验组克隆数/(各实

■研发前沿

近年来的很多研究证实, 分子靶向药物具有放射增敏作用, 且展示出其在放射领域的良好前景和临床应用价值。

■ 相关报道

ToGA研究改变了胃癌的治疗模式,使根据患者的基本特性寻找肿瘤特定的生物标志进行个体化治疗成为可能。

验接种的细胞数×PE)]×100%。应用多靶单击模型 $S = 1 - (1 - e^{-D/D_0})^N$,采用GraphPad Prism4.0拟合存活曲线,分别计算平均致死剂量(mean lethal dose, D_0)、准阈剂量(quasi-threshold, D_q)值,放射增敏比为单纯照射组与厄洛替尼+照射组 D_0 值之比。实验重复3次。

1.2.3 厄洛替尼及放射线对细胞形态的影响:在倒置显微镜下观察培养瓶中细胞的生长状况及形态学改变。

1.2.4 厄洛替尼及放射线对细胞周期的影响:取对数生长期MKN45细胞,用6 Gy照射,分组同上。每组3瓶,用含2 $\mu\text{mol/L}$ 厄洛替尼的新鲜培养液分别培养24、48 h,胰酶消化后,PBS洗2遍、离心,用预冷的75%酒精于-20℃固定24 h,测定前取固定保存的细胞,PBS洗2遍,再离心收集细胞,加入500 μL PI混匀染色,置于4℃避光保存0.5 h。流式细胞仪测DNA-PI的荧光强度,结果用Muticycle软件系统进行分析以检测细胞周期分布。实验重复3次。

1.2.5 厄洛替尼及放射线对细胞凋亡的影响:取对数生长期的以上4组细胞,每组3瓶,照射后用含2 $\mu\text{mol/L}$ 厄洛替尼的新鲜培养液分别培养24、48 h,胰酶消化,PBS洗2遍、离心、收集细胞,调整细胞浓度为 $(5 \times 10^5)/\text{mL}$;加入500 μL 的Binding Buffer悬浮细胞和5 μL Annexin V-EGFP混匀后,再加入5 μL PI混匀;置于4℃室温避光反应15 min;在1 h内上流式细胞仪检测,结果用Muticycle软件系统进行分析。实验重复3次。

1.2.6 Western blot法检测厄洛替尼及放射线对Bax和Bcl-2的蛋白表达的影响:细胞培养及分组同上。处理后用含2 $\mu\text{mol/L}$ 厄洛替尼的新鲜培养液培养48 h。分别收集细胞约 5×10^6 个,加入裂解液提取蛋白,BCA法测定蛋白浓度。取已变性并混有溴酚蓝的蛋白样品,进行稳压电泳(浓缩胶,80 V;分离胶,120 V)2 h。电泳后将蛋白以2 mA/cm²恒流转膜, β -actin 4℃转膜2 h,MMP-1 4℃转膜3 h,MMP-2 4℃转膜4 h。取等体积的蛋白样品与电泳上样液混合后高温水浴处理10 min,用10% SDS-PAGE分离蛋白,采用湿转法转移蛋白至膜上,室温封闭2 h,TBST漂洗3次,加入一抗(MMP-1及MMP-2,1:200稀释;鼠抗人 β -actin抗体1:1 000稀释)4℃反应过夜,TBST漂洗3次,加入HRP标记的羊抗鼠IgG(1:5 000稀释),室温摇床反应2 h,ECL显色,X线胶片曝光,以 β -actin蛋白作内参照,以BAND-SCAN图像分析软件进行光密度积分值分析。实验重复3次。

统计学处理 所有数据资料以mean±SD表

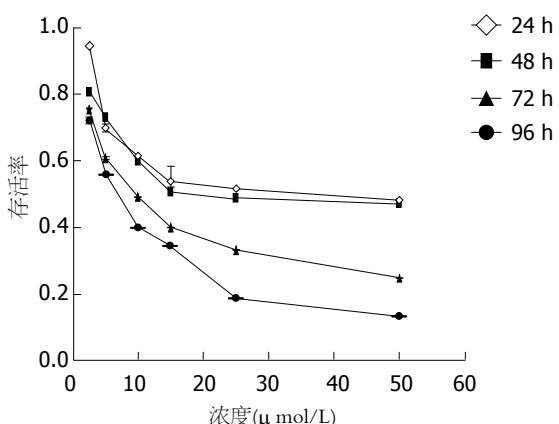


图1 厄洛替尼浓度及作用时间对MKN45细胞存活率的影响

示。采用SPSS11.5统计学软件进行统计处理,均数比较采用单因素方差分析,LSD-t检验,相关分析采用析因设计方差分析,以 $P<0.05$ 为有统计学差异。

2 结果

2.1 MTT法检测厄洛替尼和放射线对MKN45细胞的生长抑制作用

2.1.1 MTT法检测厄洛替尼对MKN45细胞的作用:厄洛替尼能明显抑制MKN45细胞的生长,随用药时间的延长和用药浓度的提高,抑制率明显增强($P<0.05$,图1)。

2.1.2 MTT法检测放射线对MKN45细胞的作用:给予MKN45细胞0、2、4、6、8 Gy照射后72 h,显示随着照射剂量的增大,抑制作用增强。

2.1.3 MTT法检测厄洛替尼和放射线对MKN45细胞的抑制作用:浓度为2.5、5.0、10.0、15.0 $\mu\text{mol/L}$ 厄洛替尼与放射线联合对细胞增殖的抑制作用大于单药或单独照射的作用,差异有统计学意义($P<0.01$,表1)。

2.2 单细胞集落形成实验检测厄洛替尼联合放射线对MKN45细胞的作用 单细胞集落形成实验发现厄洛替尼+照射组与单纯照射组的集落形成率分别是 $1.97\% \pm 0.14\%$ 、 $5.1\% \pm 0.21\%$,两者有显著差异($P<0.05$),显示厄洛替尼联合放疗能明显抑制MKN45细胞的克隆性增殖。应用多靶单击模型求得,经厄洛替尼处理后 D_0 值减低,D_q值变小,放射增敏比为1.54。提示厄洛替尼对MKN45细胞有放射增敏作用(图2)。

2.3 厄洛替尼及放射线作用后MKN45细胞形态变化 厄洛替尼及放射联合作用于MKN45细胞24 h后,随着药物浓度的增大和时间的延长,细胞表面可见突起小膜泡(凋亡小体)不断地脱落于培养液中;48 h后细胞变小变圆,皱缩变形的

表 1 厄洛替尼联和放射作用于MKN45细胞72 h的细胞抑制率 (mean \pm SD, n = 6)

厄洛替尼(μmol/L)	厄洛替尼		厄洛替尼+放射组	
	A ₅₇₀	抑制率(%)	A ₅₇₀	抑制率(%)
2.5	3.157 \pm 0.008	6.7	2.298 \pm 0.054	31.4
5.0	3.012 \pm 0.015	8.9	1.782 \pm 0.113	51.2
10.0	1.801 \pm 0.072	49.0	0.934 \pm 0.043	73.6
15.0	1.139 \pm 0.053	69.3	0.261 \pm 0.005	91.5
25.0	0.151 \pm 0.015	94.8	0.139 \pm 0.036	94.7
50.0	0.142 \pm 0.012	95.8	0.141 \pm 0.023	96.5
t值	38.653	33.786 21.978	37.660	0.672 -0.144
P值	0.000	0.000 0.000	0.000	0.689 0.991

表 2 MKN45细胞经厄洛替尼及放射线作用不同时间G₂/M、S期比例变化情况 (mean \pm SD, n = 3)

分组	G ₂ /M期		S期	
	24 h	48 h	24 h	48 h
对照组	6.93 \pm 0.12	12.89 \pm 0.45	52.87 \pm 0.33	33.92 \pm 0.54
厄洛替尼组	9.95 \pm 0.35 ^{ac}	12.19 \pm 0.42 ^{ac}	29.43 \pm 0.36 ^{ac}	24.75 \pm 0.28 ^{ac}
放射组	60.72 \pm 0.26 ^{ac}	66.37 \pm 0.12 ^{ac}	26.49 \pm 0.17 ^{ac}	20.54 \pm 0.27 ^{ac}
厄洛替尼+放射组	71.87 \pm 0.77 ^{ac}	78.56 \pm 0.23 ^{ac}	16.24 \pm 0.34 ^{ac}	11.46 \pm 0.36 ^{ac}

^aP<0.05 vs 对照组; ^cP<0.05 vs 24 h.

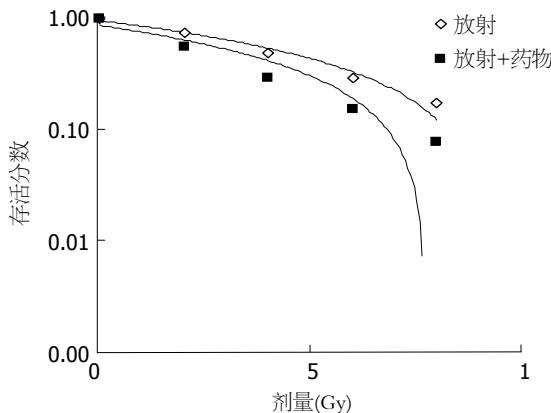


图 2 单纯放疗组与厄洛替尼及放疗联合组细胞生存曲线。

细胞进一步增多; 72 h后细胞数目显著减少, 部分细胞胞膜破裂, 胞浆浓缩呈泡状, 核仁消失。对照组细胞生长活跃, 呈梭形、多角形、大小不一, 细胞形态完整, 细胞核大, 核仁明显(图3)。

2.4 厄洛替尼及放疗对MKN45细胞周期的影响 经厄洛替尼作用后, MKN45细胞周期中的G₁/G₀期比例明显增多, 随着时间的延长S期比例减少, 24、48 h各时间段之间的差异有统计学意义($P<0.01$), 显示厄洛替尼可使MKN45细胞相对放疗敏感期细胞增多。MKN45细胞经单纯照射后, G₂/M期比例明显升高。厄洛替尼+照射组的G₂/M期比例较对照组也升高, 与照射组比较有统计

学意义($P<0.01$, 表2, 图4)。

2.5 厄洛替尼及放疗对MKN45细胞凋亡的影响 照射后48 h, 对照组、照射组和厄洛替尼组+照射组的凋亡率分别为4.34% \pm 0.63%、11.10% \pm 1.45%和23.2 \pm 0.41%, 经析因设计方差分析方法统计, 各组间有统计学意义($P<0.05$, 表3, 图5)。

2.6 Western blot法检测厄洛替尼及放疗对Bcl-2、Bax蛋白的影响 对照组的Bax蛋白表达较低, Bcl-2表达较高; 厄洛替尼及照射后, 出现Bcl-2蛋白表达量明显减少, 厄洛替尼+照射组减少最明显; Bax蛋白表达则以厄洛替尼+照射组增加最明显。厄洛替尼可增强放疗下调Bcl-2、Bax蛋白表达及Bcl-2/Bax比率的作用而在分子水平上抑制肿瘤生长(图6)。

3 讨论

厄洛替尼是一种小分子的酪氨酸激酶抑制剂, 主要通过与三磷酸腺苷竞争结合至EGFR胞内酪氨酸激酶功能域, 抑制受体自磷酸化而阻止下游信号传导, 产生抗肿瘤作用^[11], 对EGFR过表达的肿瘤细胞EGFR自身磷酸化有明显的抑制作用^[12]。研究发现厄洛替尼可以抑制许多癌细胞的生长, 如肺癌^[13,14]、头颈部恶性肿瘤^[15]、胰腺癌^[16]。但对于仅次于肺癌的世界第2大致死

■名词解释

厄洛替尼(erlotinib): 针对表皮生长因子受体(EGFR)的靶向药物, 已用于一线化疗失败的局部晚期或转移性非小细胞肺癌的治疗。

■ 同行评价

文章利用胃癌细胞系研究临床药物对放射治疗的增敏机制,解释了一定的临床现象,具有一定的临床研究意义。

表 3 MKN45细胞经厄洛替尼及照射作用不同时间后凋亡率变化情况 (mean \pm SD, n = 3)

	对照组	厄洛替尼组	放射组	厄洛替尼+放射组	F值	P值
24 h	5.23 \pm 0.32	9.87 \pm 1.65	11.35 \pm 1.12	18.09 \pm 2.56	13.238	0.002
48 h	4.34 \pm 0.63	11.10 \pm 1.45	12.14 \pm 0.87	23.20 \pm 0.41	123.728	0.000

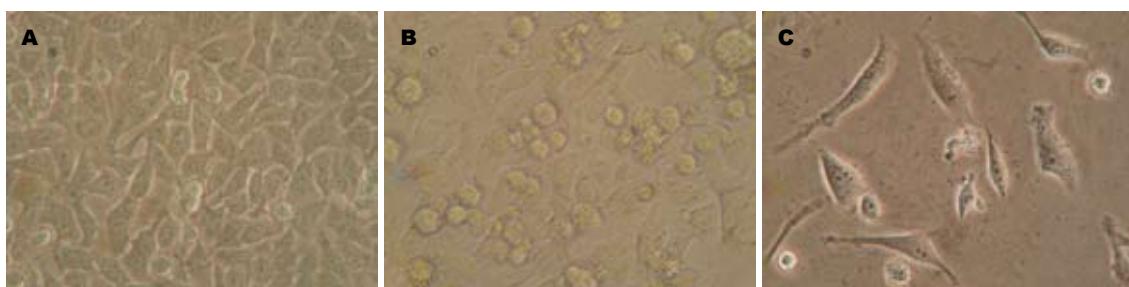
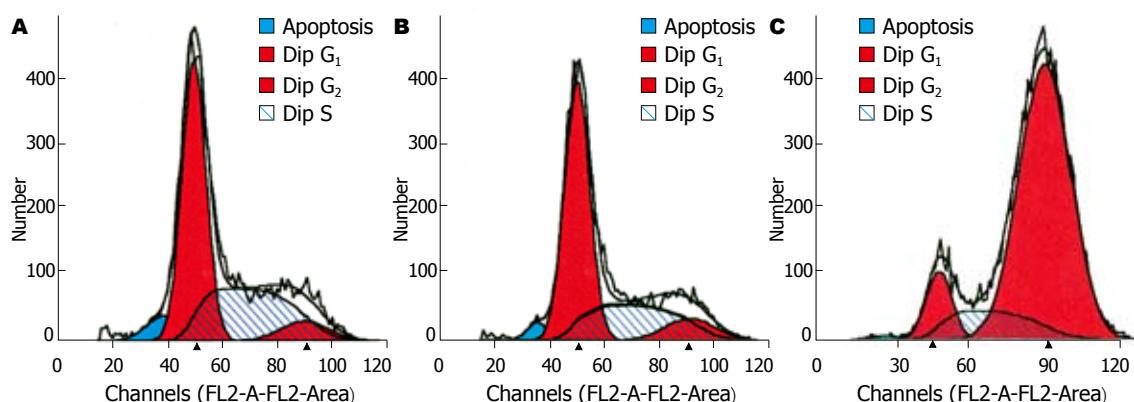
图 3 厄洛替尼及放射线联合作用后细胞形态变化($\times 400$)。A: 对照组; B: 联合组作用24 h; C: 联合组作用48 h。

图 4 厄洛替尼及放射线作用后细胞周期变化。A: 对照组; B: 厄洛替尼组; C: 联合组。

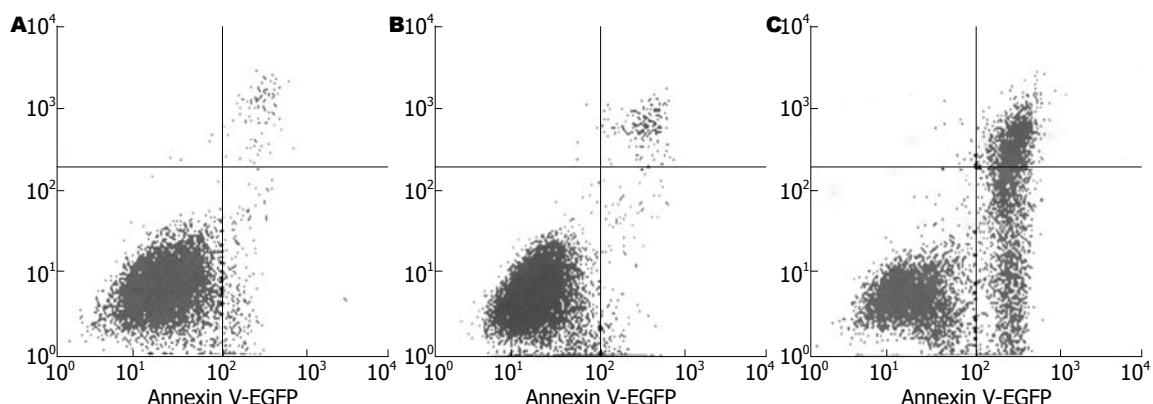


图 5 厄洛替尼及放射线作用后细胞凋亡的改变。A: 对照组; B: 厄洛替尼组; C: 联合组。

肿瘤-胃癌^[17], 2007年NCCN提出5FU同步放化疗是胃癌R0切除术后的标准治疗^[3], 治疗疗效较之前明显提高, 但患者依从性差。Kishida等^[10]在研究吉非替尼抑制胃癌细胞中SN38的诱导作用机制时提出吉非替尼对胃癌细胞有放射增敏作用。Nakata等^[18]研究发现选择性环氧合酶-2抑制剂

增强肿瘤细胞对放射的敏感性。本研究首次显示厄洛替尼对胃癌MKN45细胞有明显的生长抑制作用, 厄洛替尼与放射线联合随药物剂量或放射剂量的增大和作用时间的延长, 抑制增强, 厄洛替尼联合照射对MKN45细胞的抑制作用, 要强于二者单独时的作用。厄洛替尼联合放疗

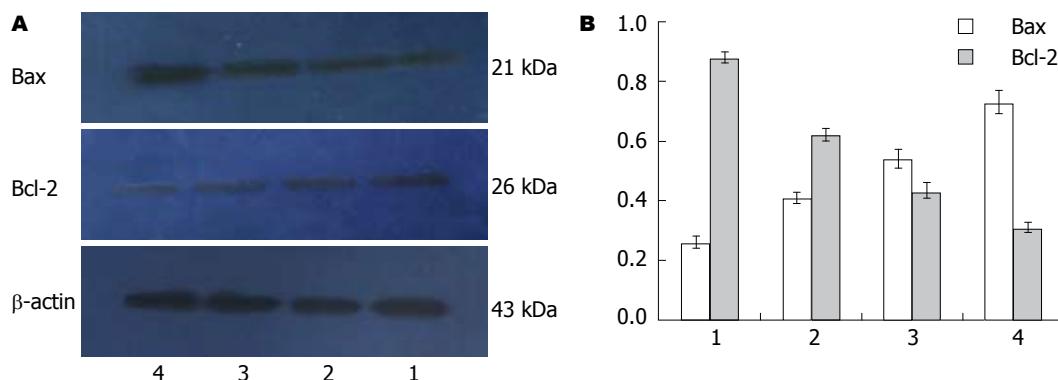


图 6 Western blot法检测Bax、Bcl-2蛋白的表达及其灰度值分析. A: 蛋白电泳图; B: 灰度值分析. 1: 对照组; 2: 放射组; 3: 厄洛替尼组; 4: 联合组.

能明显抑制MKN45细胞的克隆性增殖, 应用多靶单击模型求得, 放射增敏比为1.54, 提示厄洛替尼对MKN45细胞有放射增敏作用. 这也是我们首次报道厄洛替尼对MKN45细胞有放射增敏效应.

ToGA试验^[19]结果显示: 22.1%的胃癌Her-2阳性, 加用赫赛汀的治疗组与仅接受化疗的对照组比较, 总生存延长了2.7 mo, 且Her-2高表达者获益更大, 总生存期长达16 mo. ToGA研究改变了胃癌的治疗模式, 使根据患者的基因特性寻找肿瘤特定的生物标志进行个体化治疗成为可能. 胃癌Her-2阳性仅占20%左右, 而文献报道EGFR在胃癌组织中存在的高表达, 约在40%-65%之间. 研究^[20,21]证实EGFR的高表达与年龄、分化程度、分级相关, 多因素分析提示EGFR的高表达可能为一个独立的预后不良的标志. 一项II期临床试验^[22]第一次证明使用针对EGFR的靶向药物在EGFR表达并且低配体水平的胃癌患者中有较好的预后. 厄洛替尼是EGFR酪氨酸激酶抑制剂, 有研究^[23]显示在人肝癌细胞系的体外作用中其与西妥昔单抗协同作用的分子机制是进一步下调了活化EGFR的信号转导通路关键酶的表达. 多项研究证明EGFR的靶向治疗可以对胃癌起到治疗作用. 细胞凋亡是电离辐射所致细胞死亡的主要形式, 为研究厄洛替尼对胃癌的放射增敏机制, 我们检测了细胞凋亡和周期. 本研究显示: 经厄洛替尼和放射线联合作用后MKN45细胞的凋亡率明显增加, 对放射线最敏感G₂/M和G₀/G₁期细胞比率明显升高, 显示厄洛替尼通过增加细胞凋亡及增加敏感的G₂/M和G₀/G₁期细胞比率来发挥放射增敏作用. 孙晓江等^[24]综述探讨了分子靶向药物的放射增敏作用是使细胞周期阻滞在G₂/M期这一放

射敏感性最高的时期, 本研究结果验证了孙晓江的这一论断.

在胃癌细胞中Bcl-2家族阳性表达60%-80%^[25]. 目前研究表明Bcl-2是凋亡基因调节蛋白, 可抑制细胞凋亡, 增加细胞生存和肿瘤的播散侵袭能力. Bax的功能是拮抗Bcl-2, 促进细胞凋亡. 抗凋亡的基因Bcl-2和促凋亡基因Bax之间的失衡可能是肿瘤发生的机制之一^[26]. 有研究表明^[27,28]胃癌的发生不仅存在Bcl-2蛋白的表达上调及Bax蛋白的表达下调, Bax与Bcl-2的异常表达通过对细胞凋亡的调控共同参与胃癌的发生发展过程, 并与胃癌的浸润深度及分化程度等密切相关. 研究发现, Bax蛋白在照射组及厄洛替尼+照射组表达明显减少; 而Bcl-2蛋白表达相反, 厄洛替尼+照射组增加最明显. 厄洛替尼可通过增强放射调解Bcl-2、Bax蛋白表达及Bcl-2/Bax比率的作用而在分子水平上抑制肿瘤生长.

总之, 厄洛替尼对胃癌的放射增敏机制与诱导细胞凋亡、干预细胞周期及调解Bcl-2、Bax蛋白表达有关, 为厄洛替尼应用于胃癌的临床治疗提供了实验依据.

4 参考文献

- 王磊黎, 梁世雄. 放射治疗在胃癌治疗中的作用. 中国癌症防治杂志. 2010; 2: 74-76
- Macdonald JS, Smalley SR, Benedetti J, Hundahl SA, Estes NC, Stemmermann GN, Haller DG, Ajani JA, Gunderson LL, Jessup JM, Martenson JA. Chemoradiotherapy after surgery compared with surgery alone for adenocarcinoma of the stomach or gastroesophageal junction. *N Engl J Med* 2001; 345: 725-730
- Sasako M. Surgery and adjuvant chemotherapy. *Int J Clin Oncol* 2008; 13: 193-195
- Ma C, Wei S, Song Y. T790M and acquired resistance of EGFR TKI: a literature review of clinical reports. *J Thorac Dis* 2011; 3: 10-18
- 刘显红, 马丽霞, 张爽, 牛凯, 左学荣, 程颖. 厄洛替尼治疗吉非替尼失败后晚期非小细胞肺癌的疗效. 中国

- 老年学杂志 2011; 31: 4790-4791
- 6 隆艳艳, 王飞, 石燕, 陈丽, 戴广海. 厄洛替尼在晚期胰腺癌综合治疗中的作用. 临床肿瘤学杂志 2011; 16: 1108-1111
- 7 Fukuda K, Saikawa Y, Takahashi M, Takahashi T, Wada N, Kawakubo H, Takeuchi H, Kitagawa Y. Antitumor effect of cetuximab in combination with S-1 in EGFR-amplified gastric cancer cells. *Int J Oncol* 2012; 40: 975-982
- 8 Yashiro M, Qiu H, Hasegawa T, Zhang X, Matsuzaki T, Hirakawa K. An EGFR inhibitor enhances the efficacy of SN38, an active metabolite of irinotecan, in SN38-refractory gastric carcinoma cells. *Br J Cancer* 2011; 105: 1522-1532
- 9 Matsubara J, Yamada Y, Hirashima Y, Takahashi D, Okita NT, Kato K, Hamaguchi T, Shirao K, Shimada Y, Shimoda T. Impact of insulin-like growth factor type 1 receptor, epidermal growth factor receptor, and HER2 expressions on outcomes of patients with gastric cancer. *Clin Cancer Res* 2008; 14: 3022-3029
- 10 Kishida O, Miyazaki Y, Murayama Y, Ogasa M, Miyazaki T, Yamamoto T, Watabe K, Tsutsui S, Kiyohara T, Shimomura I, Shinomura Y. Gefitinib (Iressa, ZD1839) inhibits SN38-triggered EGF signals and IL-8 production in gastric cancer cells. *Cancer Chemother Pharmacol* 2005; 55: 584-594
- 11 安富荣, 崔岚, 夏玲红. 非小细胞肺癌靶向治疗新药—厄洛替尼. 中国新药与临床杂志 2007; 26: 793-797
- 12 谭芬来, 王印祥, 袁晓玲, 丁列明, 胡蓓, 张力, 周建英, 申屠建中, 孙燕. EGFR-TKIs治疗非小细胞肺癌进展. 中国新药杂志 2011; 20: 1594-1601
- 13 邹燕梅, 于世英. 吉非替尼治疗晚期非小细胞肺癌的临床研究. 肿瘤防治研究 2008; 35: 14-17
- 14 林萍萍, 谷蕾, 吕喜英. 厄洛替尼联合Survivin siRNA 对人肺腺癌细胞A549增殖的影响. 临床肺科杂志 2011; 16: 1904-1905
- 15 Cohen EE, Halpern AB, Kasza K, Kocherginsky M, Williams R, Vokes EE. Factors associated with clinical benefit from epidermal growth factor receptor inhibitors in recurrent and metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck. *Oral Oncol* 2009; 45: e155-e160
- 16 Conroy T, Mitry E. [Chemotherapy of metastatic pancreatic adenocarcinoma: challenges and encouraging results]. *Bull Cancer* 2011; 98: 1439-1446
- 17 杨正强, 于甬华. 放射治疗在胃癌综合治疗中的意义. 中国肿瘤 2010; 19: 465-469
- 18 Nakata E, Mason KA, Hunter N, Husain A, Raju U, Liao Z, Ang KK, Milas L. Potentiation of tumor response to radiation or chemoradiation by selective cyclooxygenase-2 enzyme inhibitors. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2004; 58: 369-375
- 19 Bang YJ, Van Cutsem E, Feyereislova A, Chung HC, Shen L, Sawaki A, Lordick F, Ohtsu A, Omuro Y, Satoh T, Aprile G, Kulikov E, Hill J, Lehle M, Rüschoff J, Kang YK. Trastuzumab in combination with chemotherapy versus chemotherapy alone for treatment of HER2-positive advanced gastric or gastro-oesophageal junction cancer (ToGA): a phase 3, open-label, randomised controlled trial. *Lancet* 2010; 376: 687-697
- 20 Kim MA, Lee HS, Lee HE, Jeon YK, Yang HK, Kim WH. EGFR in gastric carcinomas: prognostic significance of protein overexpression and high gene copy number. *Histopathology* 2008; 52: 738-746
- 21 Kahl BS. Update: gastric MALT lymphoma. *Curr Opin Oncol* 2003; 15: 347-352
- 22 Han SW, Oh DY, Im SA, Park SR, Lee KW, Song HS, Lee NS, Lee KH, Choi IS, Lee MH, Kim MA, Kim WH, Bang YJ, Kim TY. Phase II study and biomarker analysis of cetuximab combined with modified FOLFOX6 in advanced gastric cancer. *Br J Cancer* 2009; 100: 298-304
- 23 韦玮, 郭荣平, 李锦清, 徐立, 石明, 张亚奇. 西妥昔单抗联合厄洛替尼对人肝癌细胞的体外抑制作用. 癌症 2008; 27: 386-392
- 24 孙晓江, 邓清华. 分子靶向治疗的放射增敏作用及在临床中的应用. 肿瘤学杂志 2006; 12: 330-333
- 25 郭建波, 刘天卿, 郑玉军. TrkB、Survivin和Bcl-2在胃癌组织中的表达及意义. 大连医科大学学报 2010; 32: 151-155
- 26 黄伟, 邱俊勇. Bcl-2家族在胃癌中的表达研究. 华中医学杂志 2007; 31: 115-116
- 27 吴军, 张志广, 李漫, 卢向东, 闻淑军, 齐凤祥. 胃癌组织中HIF-1 α 、Bax、Bcl-2的表达及意义. 天津医科大学学报 2010; 16: 226-228, 248
- 28 蔡红星, 朱正秋, 朱祖安. 尼美舒利对人胃癌SGC-7901 细胞凋亡影响的实验研究. 南京医科大学学报(自然科学版) 2009; 29: 1668-1671, 1697

编辑 张姗姗 电编 鲁亚静

《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.

S100A7 mRNA和蛋白在胃癌组织中的表达及其意义

赵洁, 米文, 孙红英, 陈会军, 孙晓黎, 曾燕, 盛之玲

赵洁, 米文, 孙红英, 陈会军, 孙晓黎, 曾燕, 中国人民解放军济南军区第155中心医院消化内科 河南省开封市 475003
盛之玲, 郑州大学基础医学院生理教研室 河南省郑州市 450052

赵洁, 副主任医师, 主要从事消化系肿瘤的研究.

作者贡献分布: 此课题由盛之玲设计; 研究过程由赵洁、米文、孙红英、陈会军、孙晓黎及曾燕共同完成; 研究所用新试剂及分析工具由盛之玲提供; 数据分析由赵洁、米文、孙红英、陈会军、孙晓黎及曾燕共同完成; 论文写作由赵洁、米文及盛之玲共同完成.

通讯作者: 盛之玲, 副教授, 450052, 河南省郑州市科学大道100号, 郑州大学基础医学院生理教研室. zhilingsheng@gmail.com 电话: 0378-3958722

收稿日期: 2011-12-27 修回日期: 2012-03-15

接受日期: 2012-04-25 在线出版日期: 2012-06-18

Significance of expression of S100A7 mRNA and protein in gastric carcinoma

Jie Zhao, Wen Mi, Hong-Ying Sun, Hui-Jun Chen, Xiao-Li Sun, Yan Zeng, Zhi-Ling Sheng

Jie Zhao, Wen Mi, Hong-Ying Sun, Hui-Jun Chen, Xiao-Li Sun, Yan Zeng, Department of Gastroenterology, the 155th Central Hospital of Jinan Military Area Command of Chinese PLA, Kaifeng 475003, Henan Province, China

Zhi-Ling Sheng, Department of Physiology, College of Basic Medicine, Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, Henan Province, China

Correspondence to: Zhi-Ling Sheng, Associate Professor, Department of Physiology, College of Basic Medicine, Zhengzhou University, 100 Kexue Road, Zhengzhou 450052, Henan Province, China. zhilingsheng@gmail.com

Received: 2011-12-27 Revised: 2012-03-15

Accepted: 2012-04-25 Published online: 2012-06-18

Abstract

AIM: To investigate the expression of S100A7 mRNA and protein in gastric carcinoma, and to analyze the relationship between S100A7 expression and clinicopathological features of gastric carcinoma.

METHODS: *In situ* hybridization and immunohistochemistry were used to detect the expressions of S100A7 mRNA and protein in 53 cases of gastric carcinoma and 53 cases of normal gastric mucosa, respectively. SPSS13.0 software was utilized to analyze the relationship between S100A7 expression and clinicopathological features of gastric carcinoma.

RESULTS: The positive rates of S100A7 mRNA and protein expression in gastric carcinoma were significantly higher than those in normal gastric mucosa (77.36% vs 15.09%, 71.70% vs 13.21%; $\chi^2 = 41.330$, 37.110, both $P = 0.000$). Expression of S100A7 mRNA and protein was not associated with age or sex (both $P > 0.05$), but was closely related to differentiation degree, invasion depth, TNM stage and lymph node metastasis in gastric carcinoma (all $P < 0.05$).

■背景资料

越来越多的研究显示, S100A7作为S100蛋白信号家族的成员之一, 在多种不同的肿瘤中呈现高表达, 包括肺癌、膀胱癌、皮肤癌和食管鳞癌等, 提示其与肿瘤的发生发展密切相关.

CONCLUSION: S100A7 overexpression may play a pivotal role in the occurrence and development of gastric carcinoma, representing a novel marker for evaluating the malignant degree of gastric carcinoma.

Key Words: Gastric carcinoma; S100A7; Immunohistochemistry; *In situ* hybridization; Clinicopathological features

Zhao J, Mi W, Sun HY, Chen HJ, Sun XL, Zeng Y, Sheng ZL. Significance of expression of S100A7 mRNA and protein in gastric carcinoma. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2012; 20(17): 1509-1514

摘要

目的: 检测S100A7 mRNA和蛋白在胃癌组织中的表达情况, 分析其与胃癌临床病理学参数的关系.

方法: 应用原位杂交技术和免疫组织化学SP法分别检测53例胃癌组织和53例正常胃黏膜组织中S100A7 mRNA和蛋白的表达, 并分析其表达与临床病理学参数之间的关系.

结果: 胃癌组织中S100A7 mRNA和蛋白表达的阳性率(分别为77.36%和71.70%)显著高于正常胃黏膜组织(阳性率分别为15.09%和13.21%), χ^2 分别为41.330、37.110(均 $P = 0.000$). 此外, S100A7 mRNA和蛋白的表达与患者年龄、性别无关(均 $P > 0.05$), 但与胃癌患者的分化程度、浸润深度、TNM分期和淋巴结转移密切相关(均 $P < 0.05$).

结论: S100A7的高表达可能在胃癌的发生发

■同行评议者

陈光, 教授, 吉林大学第一医院消化器官外科

■研发前沿

因S100A7与多种不同的肿瘤发生发展关系密切,而备受广大科研工作者关注。然而,迄今为止,尚未见S100A7在胃癌中的研究报道。关于S100A7与恶性肿瘤关系的研究已成为热点。

展中发挥重要作用,其高表达可能是判定胃癌恶性程度十分重要的分子指标。

关键词: 胃癌; S100A7; 免疫组织化学; 原位杂交; 临床病理学参数

赵洁,米文,孙红英,陈会军,孙晓黎,曾燕,盛之玲. S100A7 mRNA和蛋白在胃癌组织中的表达及其意义. 世界华人消化杂志 2012; 20(17): 1509-1514
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/1509.asp>

0 引言

胃癌是世界上常见的恶性肿瘤之一,在肿瘤致死原因中居第2位^[1-4]。由于早期诊断和手术切除,胃癌的治疗有很大改善,然而,对于具有转移和不可切除的胃癌其效果仍不理想,中位存活时间仅7-10 mo^[5]。因此寻找胃癌发生发展的关键基因,对于胃癌的早期诊断和治疗具有十分重要的意义。S100A7作为S100家族成员之一,主要定位于人染色体1q21中,其表达蛋白的分子量为11.4 kDa^[6,7],最初在牛皮癣患者破损的皮肤上发现其表达上调^[8],因而被认为主要参与炎症反应。目前,越来越多的研究显示, S100A7在多种不同的肿瘤中呈现高表达,包括肺癌^[9]、膀胱癌^[10]、皮肤癌^[11]、食管鳞癌^[12]、口腔鳞癌^[13]和喉鳞癌^[14]等,但在唾液腺癌中呈低表达^[15],提示在不同的肿瘤中S100A7可能发挥不同的作用。然而,迄今为止,尚未见S100A7在胃癌中的研究报道,因此,本研究利用原位杂交技术和免疫组织化学方法检测胃癌组织和正常胃黏膜组织S100A7 mRNA和蛋白的表达,并分析其与临床病理学参数之间的关系,为寻找新的诊断和治疗胃癌的分子标志提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料 53例胃癌标本及其远端正常胃黏膜组织均取自于2009-06/2010-03河南省开封市中国人民解放军第155中心医院的手术切除病例,均经过病理确诊。>60岁有31例,≤60岁有22例;男35例,女18例;高分化胃癌16例,中分化胃癌14例,低分化胃癌23例;关于浸润深度,浸入浅层的27例,浸入深层的26例;I和II期占25例,III和IV期占28例;有淋巴结转移为23例,无淋巴结转移为30例。所有病例术前均未接收任何放疗、化疗和免疫治疗史。

原位杂交试剂盒购自武汉博士德生物工程有限公司; BCIP/NBT底物显色试剂盒购自天根

生化科技(北京)有限公司; SP免疫组织化学试剂盒购自北京中杉金桥生物技术有限公司; 鼠单克隆抗体S100A7(sc-52948)购自美国Santa Cruz公司。S100A7基因探针序列为: 5'-GAGAAGC-CAAGCCTGCTGACG-3', 探针由北京奥科生物技术有限公司经过5'端生物素标记并合成。

1.2 方法

1.2.1 原位杂交和免疫组织化学分析S100A7 mRNA和蛋白表达: 所有的胃癌组织和正常胃黏膜组织标本均经过40 g/L多聚甲醛固定,石蜡包埋和4-6 μm连续切片。原位杂交染色步骤: 标本经脱蜡和脱水后,采用新鲜配制的0.5%H₂O₂在室温下处理30 min(灭活内源性过氧化物酶); 3%柠檬酸新鲜配制蛋白酶(0.01 g/L)于37 °C孵育10 min(消化标本DNA结合蛋白); 滴加20 μL不含探针的预杂交液于42 °C预杂交4 h; 加入含探针(1 ng/L)的杂交液于42 °C湿盒内杂交12 h; 0.1 ×标准柠檬酸盐(SSC)42 °C漂洗,加SA-Bio-AP于37 °C孵育10 min; 后加NBT/BCIP,避光显色2-4 h。以不含探针的标本作阴性对照。采用免疫组织化学SP法, S100A7抗体稀释,稀释倍数均为1:100, DAB显色,苏木素复染。染色步骤严格按照说明书进行,以PBS液代替一抗作为阴性对照。

1.2.2 结果评估: S100A7 mRNA阳性信号呈蓝紫色,位于细胞质内;蛋白阳性信号呈浅黄色至棕黄色,位于细胞质或细胞核内。在高倍显微镜下,随机选取5个视野(每个视野计不少于200个细胞数),按阳性细胞所占比率和着色深浅进行结果判定。判定标准如下: 阳性细胞比率<5%, 0分; 5%-25%, 1分; 25%-50%, 2分; 50%-75%, 3分; >75%, 4分。染色强弱: 阴性为0分,淡黄(蓝)色染色为1分,中度黄(蓝)色染色为2分,棕黄(紫蓝)色染色为3分。然后按照“阳性细胞数分值×染色强弱分值”计总分,总分<1为阴性,其他分值定为阳性^[16]。

统计学处理 采用SPSS13.0软件进行统计学处理,行χ²检验,检验水准α=0.05。

2 结果

2.1 S100A7 mRNA在胃癌及正常胃黏膜组织中的表达 S100A7 mRNA主要定位于细胞质中,呈蓝紫色(图1)。S100A7 mRNA在胃癌组织中的表达阳性率为77.36%(41/53),显著高于正常胃黏膜组织(15.09%),二者之间S100A7 mRNA表达具有显著性差异($\chi^2=41.330, P=0.000$,表1)。

2.2 S100A7 mRNA表达与胃癌临床病理学参数

■相关报道

国内外研究发现,S100A7在多种恶性肿瘤的发生、发展中具有十分重要的作用,其异常表达可能与肿瘤的增殖分化及浸润转移关系密切。

■创新盘点

本文采用原位杂交和免疫组织化学2种方法联合检测食管鳞癌组织S100A7 mRNA和蛋白的表达情况,并分析其与临床病理学参数之间的关系。

表 1 S100A7 mRNA在胃癌和正常胃黏膜组织中的表达 ($n = 53$)

分组	S100A7 mRNA			χ^2 值	P值
	+	-	阳性率(%)		
胃癌组织	41	12	77.36	41.330	0.000
正常胃黏膜组织	8	45	15.09		

表 2 S100A7 mRNA表达与胃癌临床病理学参数的关系

病理特征	n	S100A7 mRNA			χ^2 值	P值
		+	-	阳性表达率(%)		
年龄					0.427	0.513
>60	31	23	8	74.19		
≥60	22	18	4	81.82		
性别					0.411	0.522
男	35	28	7	80.00		
女	18	13	5	72.22		
分化程度					6.636	0.036
高	16	9	7	56.25		
中	14	11	3	78.57		
低	23	21	2	91.30		
浸润深度					6.512	0.011
浅层	27	17	10	62.96		
深层	26	24	2	92.31		
TNM分期					12.325	0.000
I + II	25	14	11	56.00		
III + IV	28	27	1	96.43		
淋巴结转移					7.764	0.005
无	30	19	11	63.33		
有	23	22	1	95.65		

表 3 S100A7蛋白在胃癌和正常胃黏膜组织中的表达 ($n = 53$)

分组	S100A7蛋白			χ^2 值	P值
	+	-	阳性率(%)		
胃癌组织	38	15	71.70	37.110	0.000
正常胃黏膜组织	7	46	13.21		

的关系 S100A7 mRNA表达与患者年龄、性别无关(均 $P>0.05$), 但与分化程度、浸润深度、TNM分期和淋巴结转移均具有显著的相关性(均 $P<0.05$, 表2)。

2.3 S100A7蛋白在胃癌及正常胃黏膜组织中的表达

S100A7蛋白主要定位于细胞质或细胞核中, 呈棕黄色(图2). S100A7蛋白在胃癌组织中表达的阳性率(71.70%)明显高于正常胃黏膜组织(13.21%), 二者表达具有显著性差异($\chi^2 = 37.110$, $P = 0.000$, 表3)。

2.4 S100A7蛋白表达与胃癌临床病理学参数的

关系 S100A7蛋白表达与患者年龄、性别无关(均 $P>0.05$), 但与分化程度、浸润深度、TNM分期和淋巴结转移均具有明显的相关性(均 $P<0.05$, 表4)。

3 讨论

S100基因家族包含至少20个成员, 具有共同的结构特征, 即Ca²⁺结合的EF手指基序。S100蛋白参与多种不同的生物学过程, 包括: 免疫反应、细胞分化、细胞骨架重塑、酶活性以及细胞的增殖^[17-19]。目前研究显示, S100A7作为S100蛋白

■应用要点

S100A7 mRNA和蛋白有望成为食管鳞癌早期诊断和分子靶向治疗的指标之一。

表 4 S100A7蛋白表达与胃癌临床病理学参数的关系

病理特征	n	S100A7蛋白		χ^2 值	P值
		+	-		
年龄				0.020	0.889
>60	31	22	9	70.97	
≥60	22	16	6	72.73	
性别				0.496	0.481
男	35	24	11	68.57	
女	18	14	4	77.78	
分化程度				10.516	0.005
高	16	7	9	43.75	
中	14	10	4	71.43	
低	23	21	2	91.30	
浸润深度				7.068	0.008
浅层	27	15	12	55.56	
深层	26	23	3	88.46	
TNM分期				13.097	0.000
I + II	25	12	13	48.00	
III + IV	28	26	2	92.86	
淋巴结转移				11.490	0.001
无	30	16	14	53.33	
有	23	22	1	95.65	

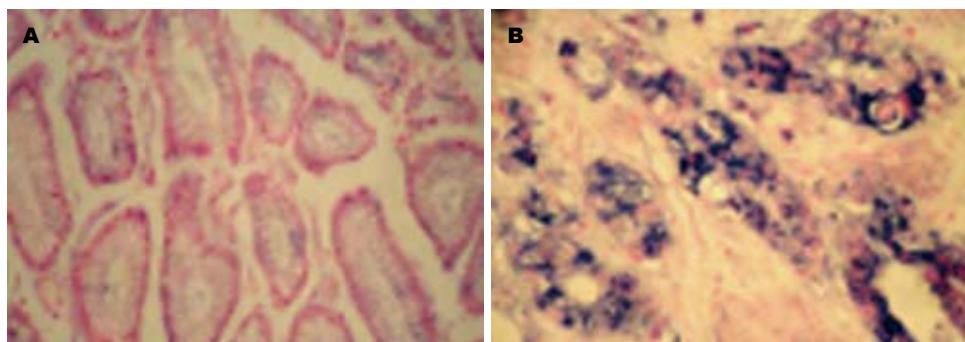


图 1 原位杂交检测S100A7 mRNA在正常胃黏膜和胃癌组织中的表达($\times 200$)。A: 正常胃黏膜组织; B: 胃癌组织。

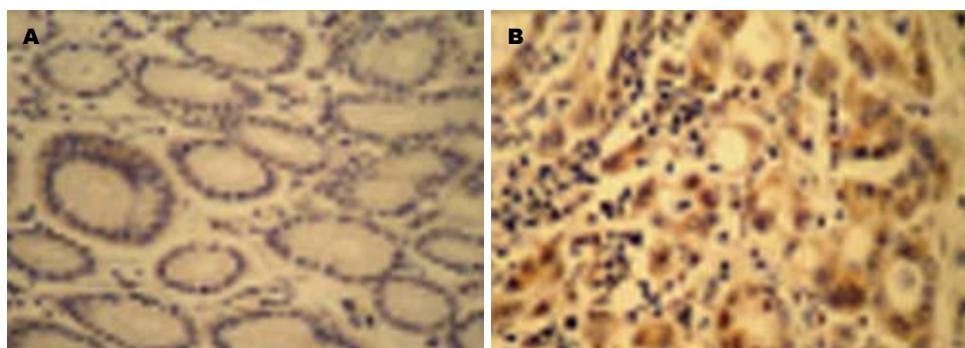


图 2 免疫组织化学检测S100A7蛋白在正常胃黏膜和胃癌组织中的表达($\times 200$)。A: 正常胃黏膜组织; B: 胃癌组织。

信号家族的成员之一，因其与多种不同肿瘤的发生、发展关系密切，而备受广大科研工作者关注。研究显示^[20-25]，S100A7在乳腺导管上皮癌的原位癌中高表达，但在正常乳腺导管上皮及其侵袭性癌中则低表达或不表达。此外，S100A7表达与升高的血管生成密切相关^[26]，并被证实

其能激活多种不同的信号途径调控肿瘤细胞的增殖^[27-29]。Banerjee等^[30]研究发现S100A7在恶性进展中的重要功能，他们通过基因芯片和免疫组织化学证实，S100A7是口腔癌形成初期表达上调最显著的基因之一。这些研究提示S100A7可能与肿瘤的发生、发展关系十分密切，进一

步研究有望成为多种不同肿瘤的分子治疗靶点。目前, S100A7在胃癌中的表达如何? 国内外尚未见报道, 因此, 为了了解胃癌组织中S100A7 mRNA和蛋白的表达情况, 在本研究中, 我们通过原位杂交、免疫组织化学检测53例胃癌组织和相应的53例正常胃黏膜组织中S100A7 mRNA和蛋白的表达。结果表明, 53例胃癌组织中41例呈现S100A7的阳性表达, 阳性率为77.36%, 而相应的正常胃黏膜组织中, 其阳性表达率仅为15.09%, 二者表达具有显著性差异($\chi^2 = 41.330$, $P = 0.000$), 提示胃癌组织中呈现S100A7 mRNA的高表达。进一步的免疫细胞化学结果也显示胃癌组织中S100A7蛋白的表达显著高于正常胃黏膜组织的表达, 差异具有统计学意义($P < 0.05$), 提示高表达的S100A7蛋白可能参与胃癌的发生发展过程。

此外, 为了初步阐明S100A7 mRNA和蛋白在胃癌组织中高表达的可能意义, 我们利用SPSS13.0软件分析S100A7表达与胃癌临床病理学参数之间的关系, 结果发现, S100A7 mRNA和蛋白与胃癌患者的年龄、性别无关(均 $P > 0.05$), 但与分化程度、浸润深度、TNM分期和淋巴结转移显著相关(均 $P < 0.05$), 表明S100A7可能成为胃癌临床应用的关键指标, 但其详细的分子机制还有待进一步探讨。

总之, 我们初步的研究结果显示, S100A7 mRNA和蛋白在胃癌组织中呈现高表达, 其高表达可能与胃癌的发生、发展密切相关, 但相关的分子机制有待进一步研究, 未来深入研究S100A7的功能有望为胃癌的基因治疗提供新的分子靶点。

4 参考文献

- 1 Danaei G, Vander Hoorn S, Lopez AD, Murray CJ, Ezzati M. Causes of cancer in the world: comparative risk assessment of nine behavioural and environmental risk factors. *Lancet* 2005; 366: 1784-1793
- 2 Kelley JR, Duggan JM. Gastric cancer epidemiology and risk factors. *J Clin Epidemiol* 2003; 56: 1-9
- 3 Hohenberger P, Gretschel S. Gastric cancer. *Lancet* 2003; 362: 305-315
- 4 El-Omar EM, Carrington M, Chow WH, McColl KE, Bream JH, Young HA, Herrera J, Lissowska J, Yuan CC, Rothman N, Lanyon G, Martin M, Fraumeni JF, Rabkin CS. Interleukin-1 polymorphisms associated with increased risk of gastric cancer. *Nature* 2000; 404: 398-402
- 5 Ohotsu A, Yoshida S, Saijo N. Disparities in gastric cancer chemotherapy between the East and West. *J Clin Oncol* 2006; 24: 2188-2196
- 6 Heizmann CW, Fritz G, Schäfer BW. S100 proteins: structure, functions and pathology. *Front Biosci* 2002; 7: d1356-d1368
- 7 Celis JE, Madsen P, Rasmussen HH, Leffers H, Honoré B, Gesser B, Dejgaard K, Olsen E, Magnusson N, Kiil J. A comprehensive two-dimensional gel protein database of noncultured unfractionated normal human epidermal keratinocytes: towards an integrated approach to the study of cell proliferation, differentiation and skin diseases. *Electrophoresis* 1991; 12: 802-872
- 8 Madsen P, Rasmussen HH, Leffers H, Honoré B, Dejgaard K, Olsen E, Kiil J, Walbum E, Andersen AH, Basse B. Molecular cloning, occurrence, and expression of a novel partially secreted protein "psoriasin" that is highly up-regulated in psoriatic skin. *J Invest Dermatol* 1991; 97: 701-712
- 9 Zhang H, Zhao Q, Chen Y, Wang Y, Gao S, Mao Y, Li M, Peng A, He D, Xiao X. Selective expression of S100A7 in lung squamous cell carcinomas and large cell carcinomas but not in adenocarcinomas and small cell carcinomas. *Thorax* 2008; 63: 352-359
- 10 Celis JE, Rasmussen HH, Vorum H, Madsen P, Honoré B, Wolf H, Orntoft TF. Bladder squamous cell carcinomas express psoriasin and externalize it to the urine. *J Urol* 1996; 155: 2105-2112
- 11 Moubayed N, Weichenthal M, Harder J, Wandel E, Sticherling M, Gläser R. Psoriasin (S100A7) is significantly up-regulated in human epithelial skin tumours. *J Cancer Res Clin Oncol* 2007; 133: 253-261
- 12 Ji J, Zhao L, Wang X, Zhou C, Ding F, Su L, Zhang C, Mao X, Wu M, Liu Z. Differential expression of S100 gene family in human esophageal squamous cell carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol* 2004; 130: 480-486
- 13 邱乐宏, 马洪. 口腔鳞癌组织蛋白差异表达的蛋白组学测定. 口腔医学 2011; 31: 453-455
- 14 Barbieri MR, Andrade CD, Silva WA, Marques AA, Leopoldino AM, Montes MB, Dias-Baruffi M, Soares IC, Wakamatsu A, Alves VA, Laure HJ, Zago MA, Greene LJ. Expression of human protein S100A7 (psoriasin), preparation of antibody and application to human larynx squamous cell carcinoma. *BMC Res Notes* 2011; 4: 494
- 15 Kesting MR, Stoeckelhuber M, Kuppek A, Hasler R, Rohleder N, Wolff KD, Niebler M. Human β -defensins and psoriasin/S100A7 expression in salivary glands: anti-oncogenic molecules for potential therapeutic approaches. *BioDrugs* 2012; 26: 33-42
- 16 Liu HT, Wang N, Wang X, Li SL. Overexpression of Pim-1 is associated with poor prognosis in patients with esophageal squamous cell carcinoma. *J Surg Oncol* 2010; 102: 683-688
- 17 Emberley ED, Murphy LC, Watson PH. S100 proteins and their influence on pro-survival pathways in cancer. *Biochem Cell Biol* 2004; 82: 508-515
- 18 Moog-Lutz C, Bouillet P, Régnier CH, Tomasetto C, Mattei MG, Chenard MP, Anglard P, Rio MC, Basset P. Comparative expression of the psoriasin (S100A7) and S100C genes in breast carcinoma and co-localization to human chromosome 1q21-q22. *Int J Cancer* 1995; 63: 297-303
- 19 Masiakowski P, Shooter EM. Nerve growth factor induces the genes for two proteins related to a family of calcium-binding proteins in PC12 cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988; 85: 1277-1281
- 20 Leygue E, Snell L, Hiller T, Dotzlaw H, Hole K, Murphy LC, Watson PH. Differential expression of psoriasin messenger RNA between *in situ* and

■名词解释

S100A7: 作为S100家族成员之一, 主要定位于人染色体1q21中, 其表达蛋白的分子量为11.4 kDa, 最初在牛皮癣患者破损的皮肤上发现其表达上调, 因而被认为主要参与炎症反应。

■同行评价

本研究丰富了胃癌分子生物学的研究,对研究胃癌的发生发展有一定帮助,并对胃癌的生物治疗和预后判断有意义。

- invasive human breast carcinoma. *Cancer Res* 1996; 56: 4606-4609
- 21 Al-Haddad S, Zhang Z, Leygue E, Snell L, Huang A, Niu Y, Hiller-Hitchcock T, Hole K, Murphy LC, Watson PH. Psoriasin (S100A7) expression and invasive breast cancer. *Am J Pathol* 1999; 155: 2057-2066
- 22 Enerbäck C, Porter DA, Seth P, Sgroi D, Gaudet J, Weremowicz S, Morton CC, Schnitt S, Pitts RL, Stampf J, Barnhart K, Polyak K. Psoriasis expression in mammary epithelial cells in vitro and in vivo. *Cancer Res* 2002; 62: 43-47
- 23 Emberley ED, Murphy LC, Watson PH. S100A7 and the progression of breast cancer. *Breast Cancer Res* 2004; 6: 153-159
- 24 Emberley ED, Niu Y, Leygue E, Tomes L, Gietz RD, Murphy LC, Watson PH. Psoriasis interacts with Jab1 and influences breast cancer progression. *Cancer Res* 2003; 63: 1954-1961
- 25 Emberley ED, Niu Y, Njue C, Kliewer EV, Murphy LC, Watson PH. Psoriasis (S100A7) expression is associated with poor outcome in estrogen receptor-negative invasive breast cancer. *Clin Cancer Res* 2003; 9: 2627-2631
- 26 Krop I, März A, Carlsson H, Li X, Bloushtain-Qimron N, Hu M, Gelman R, Sabel MS, Schnitt S, Ramaswamy S, Kleer CG, Enerbäck C, Polyak K. A putative role for psoriasis in breast tumor progression. *Cancer Res* 2005; 65: 11326-11334
- 27 Emberley ED, Niu Y, Curtis L, Troup S, Mandal SK, Myers JN, Gibson SB, Murphy LC, Watson PH. The S100A7-c-Jun activation domain binding protein 1 pathway enhances prosurvival pathways in breast cancer. *Cancer Res* 2005; 65: 5696-5702
- 28 Paruchuri V, Prasad A, McHugh K, Bhat HK, Polyak K, Ganju RK. S100A7-downregulation inhibits epidermal growth factor-induced signaling in breast cancer cells and blocks osteoclast formation. *PLoS One* 2008; 3: e1741
- 29 West NR, Watson PH. S100A7 (psoriasis) is induced by the proinflammatory cytokines oncostatin-M and interleukin-6 in human breast cancer. *Oncogene* 2010; 29: 2083-2092
- 30 Banerjee AG, Bhattacharyya I, Vishwanatha JK. Identification of genes and molecular pathways involved in the progression of premalignant oral epithelia. *Mol Cancer Ther* 2005; 4: 865-875

编辑 张姗姗 电编 鲁亚静

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

•消息•

《世界华人消化杂志》外文字符标准

本刊讯 本刊论文出现的外文字符应注意大小写、正斜体与上下角标。静脉注射iv, 肌肉注射im, 腹腔注射ip, 皮下注射sc, 脑室注射icv, 动脉注射ia, 口服po, 灌胃ig. s(秒)不能写成S, kg不能写成Kg, mL不能写成ML, lcpm(应写为1/min)÷E%(仪器效率)÷60 = Bq, pH不能写PH或P^H, H pylori不能写成HP, T1/2不能写成t1/2或T_{1/2}, V_{max}不能V_{max}, μ不写为英文u. 需排斜体的外文字, 用斜体表示。如生物学中拉丁学名的属名与种名, 包括亚属、亚种、变种。如幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *H.pylori*), *Ilex pubescens* Hook, et Arn.var.*glaber* Chang(命名者勿划横线); 常数K; 一些统计学符号(如样本数n, 均数mean, 标准差SD, F检验, t检验和概率P, 相关系数r); 化学名中标明取代位的元素、旋光性和构型符号(如N, O, P, S, d, l)如n-(normal, 正), N-(nitrogen, 氮), o-(ortho, 邻), O-(oxygen, 氧, 习惯不译), d-(dextro, 右旋), p-(para, 对), 例如n-butyl acetate(醋酸正丁酯), N-methylacetanilide(N-甲基乙酰苯胺), o-cresol(邻甲酚), 3-O-methyl-adrenaline(3-O-甲基肾上腺素), d-amphetamine(右旋苯丙胺), l-dopa(左旋多巴), p-aminosalicylic acid(对氨基水杨酸). 拉丁字及缩写in vitro, in vivo, in situ; Ibid, et al, po, vs; 用外文字母代表的物理量, 如m(质量), V(体积), F(力), p(压力), W(功), v(速度), Q(热量), E(电场强度), S(面积), t(时间), z(酶活性, kat), t(摄氏温度, °C), D(吸收剂量, Gy), A(放射性活度, Bq), ρ(密度, 体积质量, g/L), c(浓度, mol/L), φ(体积分数, mL/L), w(质量分数, mg/g), b(质量摩尔浓度, mol/g), l(长度), b(宽度), h(高度), d(厚度), R(半径), D(直径), T_{max}, C_{max}, Vd, T_{1/2} CI等. 基因符号通常用小写斜体, 如ras, c-myc; 基因产物用大写正体, 如P16蛋白.

瞬时弹性成像与非酒精性脂肪性肝病病理纤维化分期的相关性

范丽娟, 廖慧钰, 姜太一, 黄云丽, 刘燕敏

范丽娟, 廖慧钰, 黄云丽, 刘燕敏, 首都医科大学附属北京佑安医院肝病免疫科 北京市 100069

姜太一, 首都医科大学附属北京佑安医院感染科 北京市 100069

范丽娟, 主治医师, 硕士, 主要从事内科学传染病的研究.

作者贡献分布: 本课题由范丽娟与刘燕敏设计; 研究过程及数据分析由范丽娟与姜太一完成; 论文写作由范丽娟完成; 文章审核由廖慧钰、黄云丽及刘燕敏完成.

通讯作者: 刘燕敏, 副教授, 主任医师, 100069, 北京市丰台区右安门外西头条8号, 首都医科大学附属北京佑安医院肝病免疫科, yanmin130@sina.com

收稿日期: 2012-01-16 修回日期: 2012-04-23

接受日期: 2012-05-18 在线出版日期: 2012-06-18

Correlation between liver stiffness measurement by Fibroscan and liver fibrosis staging based on a liver biopsy in patients with NAFLD

Li-Juan Fan, Hui-Yu Liao, Tai-Yi Jiang, Yun-Li Huang, Yan-Min Liu

Li-Juan Fan, Hui-Yu Liao, Yun-Li Huang, Yan-Min Liu, Department of Hepatology-Immunology, Beijing Youan Hospital Affiliated to Capital Medical University, Beijing 100069, China

Tai-Yi Jiang, Department of Infectious Diseases, Beijing Youan Hospital Affiliated to Capital Medical University, Beijing 100069, China

Correspondence to: Yan-Min Liu, Associate Professor, Chief Physician, Department of Hepatology-Immunology, Beijing Youan Hospital Affiliated to Capital Medical University, 8 Xitoutiao Road, Fengtai District, Beijing 100069, China. yanmin130@sina.com

Received: 2012-01-16 Revised: 2012-04-23

Accepted: 2012-05-18 Published online: 2012-06-18

Abstract

AIM: To evaluate the role of Fibroscan (FS) in the diagnosis of liver fibrosis in patients with nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD).

METHODS: A total of 83 patients who were pathologically diagnosed with NAFLD and underwent liver stiffness measurement using FibroScan at Beijing Youan Hospital from April 2008 to February 2011 were included in this study. Staging of liver fibrosis based on a liver biopsy was performed in all patients. Other clinical tests included liver function, FBG, blood

lipids and UA. The correlation between liver stiffness and liver fibrosis degree was analyzed. The receive operating characteristic (ROC) curve was used to analyze the accuracy of Fibroscan in diagnosing liver fibrosis with NAFLD.

RESULTS: The liver stiffness differed among patients with different stages of liver fibrosis. The Fibroscan values were $4.28 \text{ kPa} \pm 1.32 \text{ kPa}$, $7.40 \text{ kPa} \pm 2.13 \text{ kPa}$, $11.52 \text{ kPa} \pm 3.86 \text{ kPa}$, and $19.99 \text{ kPa} \pm 5.42 \text{ kPa}$ for patients with S0 to S3 liver fibrosis, respectively, and liver stiffness was closely related to stage of liver fibrosis ($r = 0.768$, $P < 0.001$). Fibroscan score was positively correlated with ALT and AST, but negatively with HDL and ApoA (all $P < 0.05$). The area under the ROC curve for FibroScan score in assessing liver fibrosis was 0.889 (0.813, 0.965) in patients with S1 liver fibrosis, 0.838 (0.729, 0.948) in those with S2, and 0.938 (0.000, 1.000) in those with S3. The cut off values were 8.95 kPa, 10.60 kPa and 15.66 kPa, respectively.

CONCLUSION: Fibroscan is valuable for the diagnosis of liver fibrosis in patients with NAFLD.

Key Words: Transient elastography; Liver fibrosis; Diagnostic equipment; Diagnosis; Nonalcoholic fatty liver disease

Fan LJ, Liao HY, Jiang TY, Huang YL, Liu YM. Correlation between liver stiffness measurement by Fibroscan and liver fibrosis staging based on a liver biopsy in patients with NAFLD. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2012; 20(17): 1515-1519

摘要

目的: 评价瞬时弹性成像(Fibroscan, FS)在非酒精性脂肪性肝病(nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD)肝纤维化诊断中的作用.

方法: 选取2008-04/2011-02在北京佑安医院住院, 且经病理检查诊断为NAFLD的患者83例, 临床检测肝功能、空腹血糖、血脂、尿酸, 同时应用FS进行肝脏硬度检测. 以病理检查结果为金标准, 分析肝脏硬度、生化学指标及病

■背景资料

瞬时弹性成像(FS)是近年来研发的无创、简便的测定肝脏纤维化的新方法, 已经在慢性乙型肝炎及肝硬化、慢性丙型肝炎肝纤维化的无创性诊断方面做了大量的探索.

■研发前沿

研究表明FS与肝组织纤维化程度相关。但目前国内外尚未建立FS弹性测定针对非酒精性脂肪性肝病(NAFLD)的肝纤维化分期诊断标准。

理肝纤维化程度的相关性,采用受试者工作特征(ROC)曲线分析FS诊断NAFLD肝纤维化的准确性。

结果:不同程度肝纤维化分期的肝脏硬度值, S0期: 4.28 kPa±1.32 kPa, S1期: 7.40 kPa±2.13 kPa, S2期: 11.52 kPa±3.86 kPa, S3期: 19.99 kPa±5.42 kPa。肝脏硬度与肝纤维化程度呈正相关, Spearman相关系数为0.768, $P<0.001$ 。Pearson相关分析显示, FS肝脏硬度检测值与ALT、AST呈正相关,与HDL、ApoA呈负相关($P<0.05$)。FS诊断S0-S1、S2、S3期的ROC曲线下面积分别为0.889(0.813, 0.965)、0.838(0.729, 0.948)、0.938(0.000, 1.000), 诊断界值分别为8.95 kPa、10.60 kPa、15.66 kPa。

结论: FS对NAFLD肝纤维化有较高的诊断价值,可作为NAFLD患者诊断和动态随访的依据。

关键词: 瞬时弹性成像; 肝纤维化; 诊断设备; 诊断; 非酒精性脂肪性肝病

范丽娟, 廖慧钰, 姜太一, 黄云丽, 刘燕敏. 瞬时弹性成像与非酒精性脂肪性肝病病理纤维化分期的相关性. 世界华人消化杂志 2012; 20(17): 1515-1519
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/1515.asp>

0 引言

非酒精性脂肪性肝病(nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD)是21世纪全球重要的公共健康问题之一,亦是我国愈来愈重要的慢性肝病问题。目前肝活检被认为是诊断金标准。但有病理学者认为NAFLD肝损伤后肝脂肪变及纤维化在肝脏分布是不均匀的,肝穿所获样本的病理变化差异是造成误差的根本原因^[1],且因其为侵入性操作,在临床应用中受到一定限制。瞬时弹性成像(Fibroscan, FS)是一项无创测量肝组织纤维化程度的新方法,其工作原理为以超声检查为基础,脉冲回声测出低频弹性波在肝脏组织中的传导速度,通过计算得到组织的弹性数值,以千帕(kPa)表示^[2]。文献报道FS检测与病理活检具有良好的相关性^[3]。本文以NAFLD的病理学检查结果为金标准,探讨FS在NAFLD肝纤维化诊断中的价值。

1 材料和方法

1.1 材料 选取2008-04/2011-02在首都医科大学附属北京佑安医院住院,且经病理检查诊断为

NAFLD的患者83例,男62例,女21例,年龄33.71岁±10.64岁,平均年龄16-63岁。其中单纯性脂肪肝患者42例,非酒精性脂肪性肝炎患者41例,诊断符合2010年修订版《非酒精性脂肪性肝病诊疗指南》^[4]。排除条件:急性炎症、肿瘤、病毒性肝炎、药物性肝病、全胃肠外营养、肝豆状核变性、自身免疫性肝病等可导致脂肪肝的特定疾病;摄入乙醇量>140 g/wk(女性>70 g/wk);年龄>70岁或<16岁。

1.2 方法 全部患者入院后详细询问病史,进行体格检查,测量身高、体质量、血压,根据公式计算BMI(kg/m²)=体质量(kg)/身高(m²)。肝组织活检前后3 d内常规检测肝功能、血脂、空腹血糖、尿酸。血生化由OLYMPUS AU5400全自动生化分析仪进行检测。肝组织活检后10 d内应用瞬时弹性扫描仪(Fibroscan; Echosens, Paris, France)进行肝脏硬度检测(liver stiffness measurement, LSM)值测量。检测方法:检测区域选择右侧腋前线至腋中线第7、8、9肋间,连续检测,要求成功检测10次,取中位数作为最终测定结果,并以弹性值kPa表示,最终检测要求成功率≥60%,四分位间距(IQR)低于测量值中位数的1/3。FS检查由接受过专业培训的操作熟练医师完成。肝组织病理标本由我院病理科进行纤维化评分。肝组织炎症分级(G)分为G0、G1、G2、G3、G4共5级,肝纤维化分期(S)分为S0、S1、S2、S3、S4共5期。

统计学处理 应用SPSS17.0进行统计学分析,计量资料用mean±SD表示。肝脏硬度与肝纤维化程度的相关性用Spearman秩相关分析,检验水准 $\alpha=0.05$ 。肝脏硬度与临床生化特征的相关性分析采用Pearson相关分析。用受试者工作特征(ROC)曲线分析FS诊断肝纤维化的准确性。

2 结果

2.1 NAFLD肝脏硬度与肝脏纤维化程度(S)的相关性 本研究入组病例83例,其中S0期9例, S1期42例, S2期24例, S3期8例,无S4期病例。FS检测失败率为9.6%(8/83)。不同程度肝纤维化分期的肝脏硬度值, S0期4.28 kPa±1.32 kPa, S1期7.40 kPa±2.13 kPa, S2期11.52 kPa±3.86 kPa, S3期19.99 kPa±5.42 kPa。肝脏硬度与肝纤维化程度呈正相关, Spearman相关系数为0.768($P<0.001$, 表1)。

2.2 NAFLD肝脏硬度与临床及生化学指标的相关性 Pearson相关分析显示, FS肝脏硬度检测值与血清丙氨酸氨基转移酶(alanine aminotransfer-

表 1 NAFLD肝脏硬度与肝脏纤维化程度(S)的相关性

	S0期	S1期	S2期	S3期
n	9	42	24	8
FS检测失败(n)	0	2	4	2
FS检测值(kPa)	4.28 ± 1.32	7.40 ± 2.13	11.52 ± 3.86	19.99 ± 5.42
r值		0.768		
P值		<0.001		

表 2 肝脏硬度与临床及生化学指标的相关性

	mean ± SD	r值	P值
年龄(岁)	33.71 ± 10.64	-0.015	0.911
收缩压(mmHg)	125.77 ± 18.64	0.128	0.248
舒张压(mmHg)	69.66 ± 14.14	-0.080	0.471
BMI(kg/m ²)	26.35 ± 2.54	0.178	0.170
ALT(U/L)	79.46 ± 50.34	0.253	0.049
AST(U/L)	48.77 ± 25.12	0.439	0.000
TBIL(μmol/L)	16.95 ± 6.81	-0.990	0.446
GGT(U/L)	81.83 ± 56.04	0.032	0.805
ALP(U/L)	79.95 ± 28.47	0.052	0.690
TG(mmol/L)	2.15 ± 1.07	-0.118	0.336
CHO(mmol/L)	4.23 ± 0.98	0.090	0.142
LDL(mmol/L)	3.14 ± 0.91	0.018	0.892
HDL(mmol/L)	1.27 ± 10.40	-2.56	0.046
ApoA(mmol/L)	104.54 ± 25.03	-0.364	0.004
ApoB(mmol/L)	87.95 ± 21.33	0.060	0.643
Glu(mmol/L)	4.98 ± 1.64	-0.037	0.743
UA(μmol/L)	345.00 ± 79.02	0.147	0.184

ase, ALT)、门冬氨酸氨基转移酶(aspartate aminotransferase, AST)呈正相关, 与HDL、ApoA呈负相关(表2)。

2.3 FS诊断NAFLD各期肝纤维化的ROC曲线 FS诊断S0-S1、S2、S3期的ROC曲线如图1-3所示, 诊断评价结果见表3。各阶段肝纤维化的ROC曲线下面积均>0.8, 敏感度及特异度较高, 表明FS检查对NAFLD有较高的诊断价值。

3 讨论

目前NAFLD的诊断主要根据询问病史、体检、生物化学检测、影像诊断及肝组织活检。生物化学检测诊断本病特异性不高, B型超声检查诊断脂肪肝的特异性仅为62%, 且当肝脂肪变程度低于30%时, 超声检出能力大大降低^[5]。肝组织活检是诊断NAFLD的金标准, 但该检查为侵入性, 且存在抽样误差和标本穿刺偏倚现象等缺点^[6,7], 亦不适宜作为动态监测及评估病情的检查方法。肝脏FS测定方法已经在慢性乙型肝炎

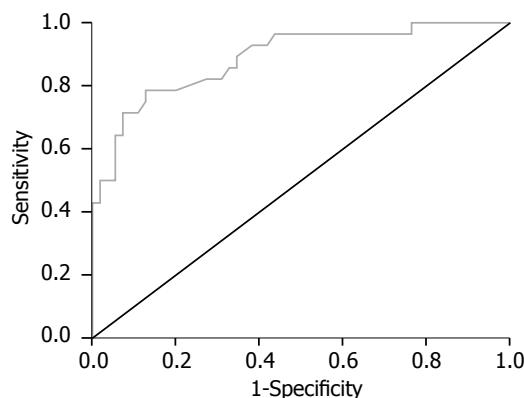


图 1 Fibroscan诊断NAFLD S0-S1期肝纤维化的ROC曲线。

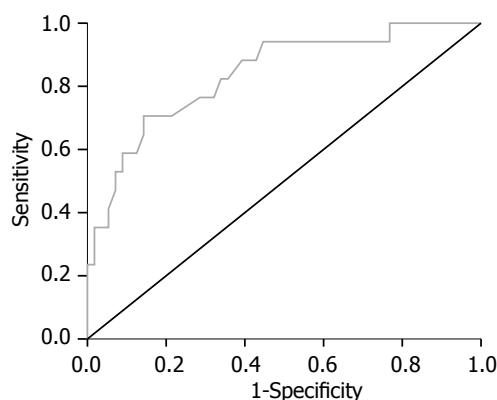


图 2 Fibroscan诊断NAFLD S2期肝纤维化的ROC曲线。

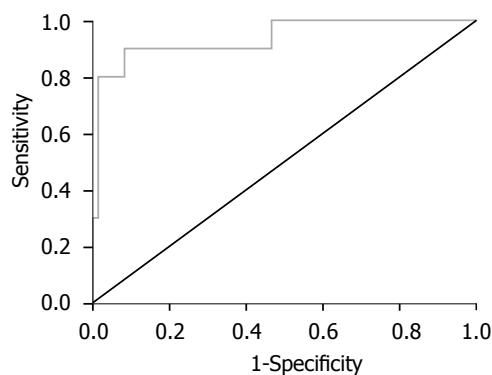


图 3 Fibroscan诊断NAFLD S3期肝纤维化的ROC曲线。

及肝硬化、慢性丙型肝炎肝纤维化的无创性诊断方面做了大量探索, 研究表明FS与肝组织纤维化程度强相关^[8]。但目前FS检测在NAFLD肝纤维化诊断的应用研究尚少, 国内外尚未建立针对NAFLD的肝纤维化分期诊断标准。本研究对NAFLD应用FS检测的诊断肝纤维化价值进行总结分析。

FS是一种非侵入性的检测方法, 其测量信息的采集来源为肝脏内约1 cm×2 cm×5 cm的区域, 约是肝穿刺活检组织的100倍, 受样本误差的几率降低, 观察者组内及组间重复性好^[9-11], 且较

■应用要点
本研究结果显示, NAFLD肝脏硬度与肝脏纤维化程度呈正相关, 对NAFLD肝纤维化有较高的诊断价值。

■名词解释

瞬时弹性成像(F-S): 一项无创测量肝组织纤维化程度的新方法, 其工作原理是以超声检查为基础, 脉冲回声测出低频弹性波在肝脏组织中的传导速度, 通过计算得到组织的弹性数值, 以千帕(kPa)表示。

表 3 Fibroscan诊断NAFLD各期肝纤维化的ROC曲线评价结果

肝纤维化分期	ROC曲线下面积	95%CI	诊断界值(kPa)	敏感度	特异度
S0-1	0.889	0.813, 0.965	8.95	0.786	0.836
S2	0.838	0.729, 0.948	10.60	0.706	0.857
S3	0.938	0.000, 1.000	15.66	0.900	0.918

肝组织活检更适用于对慢性肝病的动态随访, 反映肝组织纤维化这一动态的发展过程^[12-14]。

文献报道FS诊断(慢性丙型肝炎)S≥2、S≥3、S=4的阈值分别为7.1-8.8、9.5-9.6、12.5-14.6, 且肝纤维化程度愈严重, FS诊断准确性愈高^[15-18]。本研究结果显示, NAFLD肝脏硬度与肝脏纤维化程度呈正相关, 不同程度肝纤维化分期的肝脏硬度值, S0期4.28 kPa±1.32 kPa, S1期7.40 kPa±2.13 kPa, S2期11.52 kPa±3.86 kPa, S3期19.99 kPa±5.42 kPa。S0-1期、S2期、S3期的诊断界值分别为8.95 kPa、10.60 kPa、15.66 kPa, 较文献报道的慢性病毒性肝炎的诊断界值稍高, 因脂肪组织对低频剪切波和超声波具有强烈的衰减作用^[19], 故肝组织脂肪变可能导致FS检测值较同一纤维化分期的其他病因引起的慢性肝病更高。亦有研究者报道, 未发现肝脏脂肪变性对FS测定值有显著影响^[20,21], 与本文结果不同, 有待于进一步进行大样本量的研究分析。

本研究Pearson相关分析显示, FS肝脏硬度检测值与ALT、AST呈正相关, 与HDL、ApoA呈负相关。目前已有研究认为FS弹性值与肝组织炎症(ALT)相关, 同一纤维化分期患者中, 生化指标改善者弹性值相应降低^[12,22-24], 与本研究结论相符合。故可考虑进行大样本量的研究以观察FS弹性值是否能够较敏感地区分单纯性脂肪肝和非酒精性脂肪性肝炎。HDL及ApoA反映机体的脂代谢失衡程度, NAFLD存在较高比例的脂代谢异常, 故可认为FS弹性值与NAFLD的临床生化学指标有较好的相关性。FS诊断NAFLD各期肝纤维化的ROC曲线下面积均>0.8, 敏感度及特异度较高, 表明FS检查对NAFLD肝纤维化有较高的诊断价值。

总之, FS诊断NAFLD各期肝纤维化与肝组织病理有较好的相关性, 与人体学指标(如BMI、腰围)、生化学指标、B型超声结合分析, 可部分替代肝组织活检, 且具有可重复性, 可作为动态观察随访手段监测肝组织纤维化和炎症程度。但FS检测亦具有一定的局限性, 文献报道有2.4%-9.4%的失败率^[11]。本研究检测失败率

为9.6%(8/83)。影响检测成功率可能的因素有BMI>28、糖尿病、年龄>50岁、肋间隙相对狭窄的女性, 其中BMI>30是影响FS弹性测定的主要因素^[25-27]。

4 参考文献

- Ratziu V, Charlotte F, Heurtier A, Gombert S, Giral P, Bruckert E, Grimaldi A, Capron F, Poynard T. Sampling variability of liver biopsy in nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology* 2005; 128: 1898-1906
- 温欣, 王学梅, 王炳元. Fibroscan对肝纤维化诊断价值的研究进展. 世界华人消化杂志 2009; 17: 3223-3228
- Sporea I, Sirli R, Deleanu A, Tudora A, Curescu M, Cornianu M, Lazar D. Comparison of the liver stiffness measurement by transient elastography with the liver biopsy. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 6513-6517
- 范建高. 非酒精性脂肪性肝病诊疗指南(2010年修订版). 现代医药卫生 2011; 27: 641-644
- Roldan-Valadez E, Favila R, Martínez-López M, Uribe M, Méndez-Sánchez N. Imaging techniques for assessing hepatic fat content in nonalcoholic fatty liver disease. *Ann Hepatol* 2008; 7: 212-220
- 王炳元. 非酒精性脂肪性肝病的诊断. 中华肝脏病杂志 2008; 16: 808-810
- Friedrich-Rust M, Hadji-Hosseini H, Kriener S, Herrmann E, Sircar I, Kau A, Zeuzem S, Bojunga J. Transient elastography with a new probe for obese patients for non-invasive staging of non-alcoholic steatohepatitis. *Eur Radiol* 2010; 20: 2390-2396
- Yoneda M, Yoneda M, Mawatari H, Fujita K, Endo H, Iida H, Nozaki Y, Yonemitsu K, Higurashi T, Takahashi H, Kobayashi N, Kirikoshi H, Abe Y, Inamori M, Kubota K, Saito S, Tamano M, Hiraishi H, Maeyama S, Yamaguchi N, Togo S, Nakajima A. Noninvasive assessment of liver fibrosis by measurement of stiffness in patients with nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Dig Liver Dis* 2008; 40: 371-378
- Manns MP, Czaja AJ, Gorham JD, Krawitt EL, Mieleli-Vergani G, Vergani D, Vierling JM. Diagnosis and management of autoimmune hepatitis. *Hepatology* 2010; 51: 2193-2213
- Sandrin L, Fourquet B, Hasquenoph JM, Yon S, Fournier C, Mal F, Christidis C, Zioli M, Poulet B, Kazemi F, Beaugrand M, Palau R. Transient elastography: a new noninvasive method for assessment of hepatic fibrosis. *Ultrasound Med Biol* 2003; 29: 1705-1713
- Fraquelli M, Rigamonti C, Casazza G, Conte D, Donato MF, Ronchi G, Colombo M. Reproducibility of transient elastography in the evaluation of liver fibrosis in patients with chronic liver disease. *Gut* 2007; 56: 968-973
- Ganne-Carrié N, Zioli M, de Ledinghen V, Douvin

- C, Marcellin P, Castera L, Dhumeaux D, Trinchet JC, Beaugrand M. Accuracy of liver stiffness measurement for the diagnosis of cirrhosis in patients with chronic liver diseases. *Hepatology* 2006; 44: 1511-1517
- 13 李林芳, 戴琳, 张琪, 陈永鹏, 冯筱榕, 郭亚兵, 侯金林. 瞬时弹性记录仪检测肝纤维化影响因素及稳定性分析. 南方医科大学学报 2008; 28: 595-597
- 14 胡向东, 钱林学. 肝脏疾病弹性成像研究进展. 世界华人消化杂志 2010; 18: 472-478
- 15 Foucher J, Chanteloup E, Vergniol J, Castéra L, Le Bail B, Adhoute X, Bertet J, Couzigou P, de Lédinghen V. Diagnosis of cirrhosis by transient elastography (FibroScan): a prospective study. *Gut* 2006; 55: 403-408
- 16 Ziolkowski M, Handra-Luka A, Kettaneh A, Christidis C, Mal F, Kazemi F, de Lédinghen V, Marcellin P, Dhumeaux D, Trinchet JC, Beaugrand M. Noninvasive assessment of liver fibrosis by measurement of stiffness in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology* 2005; 41: 48-54
- 17 Castéra L, Vergniol J, Foucher J, Le Bail B, Chanteloup E, Haaser M, Darriet M, Couzigou P, De Lédinghen V. Prospective comparison of transient elastography, Fibrotest, APRI, and liver biopsy for the assessment of fibrosis in chronic hepatitis C. *Gastroenterology* 2005; 128: 343-350
- 18 Yeslau H, Oren R. Non invasive assessment of liver fibrosis. *Ann Transplant* 2008; 13: 5-11
- 19 Kettaneh A, Marcellin P, Douvin C, Poupon R, Ziolkowski M, Beaugrand M, de Lédinghen V. Features associated with success rate and performance of FibroScan measurements for the diagnosis of cirrhosis in HCV patients: a prospective study of 935 patients. *J Hepatol* 2007; 46: 628-634
- 20 Coco B, Oliveri F, Maina AM, Ciccorossi P, Sacco R, Colombo P, Bonino F, Brunetto MR. Transient elastography: a new surrogate marker of liver fibrosis influenced by major changes of transaminases. *J Viral Hepat* 2007; 14: 360-369
- 21 Boursier J, Konate A, Guilluy M, Gorea G, Sawado-
go A, Quemener E, Oberti F, Reaud S, Hubert-Fouchard I, Dib N, Calès P. Learning curve and interobserver reproducibility evaluation of liver stiffness measurement by transient elastography. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2008; 20: 693-701
- 22 Chan HL, Wong GL, Choi PC, Chan AW, Chim AM, Yiu KK, Chan FK, Sung JJ, Wong VW. Alanine aminotransferase-based algorithms of liver stiffness measurement by transient elastography (FibroScan) for liver fibrosis in chronic hepatitis B. *J Viral Hepat* 2009; 16: 36-44
- 23 Arena U, Vizzutti F, Corti G, Ambu S, Stasi C, Bresci S, Moscarella S, Boddi V, Petrarca A, Laffi G, Marra F, Pinzani M. Acute viral hepatitis increases liver stiffness values measured by transient elastography. *Hepatology* 2008; 47: 380-384
- 24 Jung KS, Kim SU, Ahn SH, Park YN, Kim do Y, Park JY, Chon CY, Choi EH, Han KH. Risk assessment of hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma development using liver stiffness measurement (FibroScan). *Hepatology* 2011; 53: 885-894
- 25 Foucher J, Castéra L, Bernard PH, Adhoute X, Laharie D, Bertet J, Couzigou P, de Lédinghen V. Prevalence and factors associated with failure of liver stiffness measurement using FibroScan in a prospective study of 2114 examinations. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2006; 18: 411-412
- 26 Wong VW, Vergniol J, Wong GL, Foucher J, Chan HL, Le Bail B, Choi PC, Kwo M, Chan AW, Merrouche W, Sung JJ, de Lédinghen V. Diagnosis of fibrosis and cirrhosis using liver stiffness measurement in nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2010; 51: 454-462
- 27 Chang PE, Lui HF, Chau YP, Lim KH, Yap WM, Tan CK, Chow WC. Prospective evaluation of transient elastography for the diagnosis of hepatic fibrosis in Asians: comparison with liver biopsy and aspartate transaminase platelet ratio index. *Aliment Pharmacol Ther* 2008; 28: 51-61

■同行评价

本文就FS与NAFLD病理纤维化分期的相关性作了深入研究, 方法科学, 逻辑性强, 具有一定的临床应用前景.

编辑 张姗姗 电编 鲁亚静

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

•消息•

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)

sFRP-1在胰腺导管腺癌组织中的表达及其临床意义

满晓华, 王伟, 高军, 龚燕芳, 李兆申

■背景资料

胰腺癌是一种凶险的恶性肿瘤, 然而目前临上尚缺乏有效的早期诊断与治疗方法, 被称为“21世纪医学的顽固堡垒”。因此, 深入研究胰腺癌侵袭转移的分子机制, 探索并建立新的分子靶标以提高胰腺癌的诊疗水平显得尤为迫切。

满晓华, 王伟, 高军, 龚燕芳, 李兆申, 中国人民解放军第二军医大学附属长海医院消化内科 上海市 200433

王世峰, 中国人民解放军海军医学研究所 上海市 200433

满晓华, 主管技师, 主要从事胰腺癌病理研究。

作者贡献分布: 满晓华与王伟共同为第一作者; 此课题由王伟、高军、龚燕芳及李兆申共同设计; 实验操作由满晓华、王伟及王世峰完成; 本文统计由王伟与高军完成; 论文写作由满晓华完成。

通讯作者: 李兆申, 教授, 主任医师, 200433, 上海市长海路174号, 中国人民解放军第二军医大学附属长海医院消化内科。zhsl@81890.net

电话: 021-81873241

收稿日期: 2011-12-03 修回日期: 2012-03-16

接受日期: 2012-05-18 在线出版日期: 2012-06-18

Clinical significance of sFRP-1 protein expression in pancreatic ductal adenocarcinoma

Xiao-Hua Man, Wei Wang, Shi-Feng Wang, Jun Gao, Yan-Fang Gong, Zhao-Shen Li

Xiao-Hua Man, Wei Wang, Jun Gao, Yan-Fang Gong, Zhao-Shen Li, Department of Gastroenterology, Shanghai Hospital, the Second Military Medical University of Chinese PLA, Shanghai 200433, China

Shi-Feng Wang, Navy Medical Research Institute of Chinese PLA, Shanghai 200433, China

Correspondence to: Zhao-Shen Li, Professor, Chief Physician, Department of Gastroenterology, Shanghai Hospital, the Second Military Medical University of Chinese PLA, 174 Shanghai Road, Shanghai 200433, China. zhsl@81890.net

Received: 2011-12-03 Revised: 2012-03-16

Accepted: 2012-05-18 Published online: 2012-06-18

Abstract

AIM: To detect the expression of secreted frizzled-related protein 1 (sFRP-1) protein in different pancreatic tissues (normal pancreatic duct, NP; pancreatic ductal adenocarcinoma, PDAC; pancreatic intraepithelial neoplasia, PanIN; and intraductal papillary mucinous neoplasm, IPMN) and evaluate its significance in the carcinogenesis of PDAC.

METHODS: Immunohistochemical detection of sFRP1 protein was performed in 21 foci of NP, 73 foci of PanIN-1, 29 foci of PanIN-2, 16 foci of PanIN-3, 20 cases of IPMN-adenoma (IPMA), 13 cases of IPMN-borderline (IPMB), 19 cases of IPMN-carcinoma (IPMC), and 50 cases of PDAC. The correlation between sFRP-1 expression and

clinicopathologic characteristics of PDAC was analyzed.

RESULTS: Immunohistochemical score (IHCS) of sFRP1 expression escalated with the severity of tissue atypia along the progressive multistage: NP→PanIN-1→PanIN-2, PanIN-3, PDAC or NP→IPMA, IPMB→IPMC, PDAC. sFRP-1 expression was significantly associated with tumor differentiation and neural infiltration.

CONCLUSION: sFRP-1 expression enhancement is an early event in the carcinogenesis of PDAC, representing an important molecular characteristic of neural infiltration.

Key Words: Pancreatic ductal adenocarcinoma; Pancreatic intraepithelial neoplasias; Intraductal papillary mucinous neoplasms; Secreted frizzled-related protein 1

Man XH, Wang W, Wang SF, Gao J, Gong YF, Li ZS. Clinical significance of sFRP-1 protein expression in pancreatic ductal adenocarcinoma. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2012; 20(17): 1520-1525

摘要

目的: 检测sFRP-1在不同胰腺组织(正常胰腺导管、胰腺导管腺癌及癌前病变胰腺上皮内瘤变和胰腺导管内乳头状粘液性肿瘤)中的表达水平, 分析其在胰腺癌发生过程中的作用, 为胰腺癌的临床诊疗提供新线索。

方法: 免疫组织化学SP法检测sFRP-1在21灶正常胰腺导管(normal pancreatic duct, NP), 73灶胰腺上皮内瘤变(pancreatic intraepithelial neoplasia-1, PanIN-1), 29灶PanIN-2, 16灶PanIN-3, 20例胰腺导管内乳头状粘液性肿瘤(IPMN-adenoma, IPMA), 13例(IPMN-borderline, IPMB), 19例(IPMN-carcinoma, IPMC)及50例胰腺导管腺癌(pancreatic ductal adenocarcinoma, PDAC)中的表达, 并分析sFRP-1的表达与临床病理特征及患者术后生存期的关系。

结果: sFRP-1的免疫组织化学评分在由NP导管→PanIN-1→PanIN-2、PanIN-3、PDAC及

NP→IPMA、IPMB→IPMC→PDAC的逐级进展过程中逐渐升高, sFRP-1的表达与肿瘤分化程度、神经浸润显著相关。

结论: sFRP-1的异常表达是PDAC发生中的早期事件, sFRP-1高表达是PDAC神经浸润的重要分子特征。

关键词: 胰腺导管腺癌; 胰腺上皮内瘤变; 导管内乳头状黏液性肿瘤; 分泌型卷曲相关蛋白

满晓华, 王伟, 王世峰, 高军, 龚燕芳, 李兆申. sFRP-1在胰腺导管腺癌组织中的表达及其临床意义. 世界华人消化杂志 2012; 20(17): 1520-1525

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/1520.asp>

0 引言

近年来, 研究发现Wnt信号通路在细胞转运、细胞凋亡及生物发育等生命过程中发挥重要作用^[1-3], 其异常活化与多种人类疾病^[4,5]及肿瘤^[6-8]的发生密切相关, 已经成为肿瘤发病机制研究的热点。并且已有研究证实Wnt信号通路在胰腺组织发育及肿瘤形成中起到重要作用, 经典的Wnt/β-Catenin信号不仅是胰腺前内胚层及外分泌腺形成的关键因素^[9-11], 而且其异常活化促进了胰腺癌的进展^[12-14], 这些研究为进一步揭示胰腺癌发病机制、探寻新的分子诊疗靶标提供了有力线索。分泌型卷曲相关蛋白(secreted frizzled-related proteins, sFRPs)是重要的Wnt受体拮抗剂, 他可以在细胞外阻断异常的Wnt信号, 从而抑制肿瘤细胞的增殖, 诱导肿瘤细胞凋亡^[15,16]。sFRP-1是sFRPs家族重要成员, 被证实参与了乳腺癌、宫颈癌、结直肠癌、前列腺癌、肺癌、膀胱癌等多种人类肿瘤的发生过程。大多研究认为sFRP-1基因的表观遗传改变和表达下调是Wnt通路异常活化的重要原因^[17-25], 因此sFRP-1被疑似为一种新的抑癌基因, 成为肿瘤治疗研究的新靶点。目前, sFRP-1在胰腺癌中的作用机制仍不清楚。

本研究通过免疫组织化学方法检测sFRP-1蛋白在不同胰腺组织包括正常胰腺导管(normal pancreatic duct, NP)、胰腺导管腺癌(pancreatic ductal adenocarcinoma, PDAC)及癌前病变胰腺上皮内瘤变(pancreatic intraepithelial neoplasia-1, PanINs)和胰腺导管内乳头状黏液性肿瘤(intraductal papillary mucinous neoplasm, IPMN)中的表达, 分析其在胰腺癌逐级进展过程中的表达变化及其与PDAC临床病理指标的相关性, 初步

揭示sFRP-1在PDAC发病中的作用, 为PDAC发病机制及临床诊疗研究提供新线索。

1 材料和方法

1.1 材料 收集2001-2010年我院的胰腺组织标本, 其中NP 12例(尸检9例、胰腺外伤1例、脾亢1例、异位胰腺1例)、IPMN 52例; 另从我院病理科获赠胰腺癌组织芯片1片、PanIN芯片3片。胰腺癌组织芯片共计198个组织点, 包含病例及随访资料完整的PDAC 50例; 3张PanIN芯片共计466个组织点, 包含PanIN共118灶, PanIN-1、PanIN-2、PanIN-3分别为73、29和16灶, PanIN与IPMN的分级诊断参照郑建明等^[26]、Tanaka等^[27]的分级方法。

1.2 方法 收集50例PDAC患者临床病例资料, 主要包括患者年龄、性别、肿瘤大小、肿瘤部位、神经浸润、血管浸润、分化程度、增殖活性、T分期、淋巴转移、远处转移及TNM分期(国际胰腺癌TNM分期, UICC 2002年标准); 并随访了50例患者, 计算了术后生存期。

石蜡4 μm连续切片, 使用兔抗人多克隆sFRP-1抗体(Abcam, ab4193, 工作浓度1:1 000)行SP法染色。NP、PanIN仅统计导管上皮细胞及其阳性细胞数, IPMN统计导管内细胞及其阳性细胞数, 每例标本至少随机观察5-10个高倍视野(×400)。sFRP-1染色结果以阳性细胞数及染色强度判定: 阳性细胞数<25%记1分, 25%-50%记2分, 50%-75%记3分, >75%记4分; 无染色记0分, 弱阳性记1分, 中等阳性记2分, 强阳性记3分。两者的乘积作为每例标本的免疫组织化学评分(immunohistochemical score, IHCS)。

统计学处理 采用SPSS13.0软件进行, 不同病变组之间sFRP-1的IHCS比较采用单变量方差分析; sFRP-1的表达与临床病理特征的相关性分析采用χ²检验; sFRP-1的表达与患者生存期的关系采用Kaplan-Meier法并行long-rank检验, 所有统计均以双尾P<0.05为显著性判断标准。

2 结果

2.1 sFRP-1在PanINs中的表达 sFRP-1蛋白在正常胰腺导管上皮细胞中不表达(图1A), 而在个别正常胰腺腺泡及胰岛细胞中可呈现棕黄色均质的胞浆表达。sFRP-1蛋白在PanIN-1A中开始出现弱阳性表达, 并随组织异型程度增加表达逐渐增强(图1B-E)。比较各组sFRP-1 IHCS时发现, 高级别瘤变组PanIN-2、PanIN-3中sFRP-1表

■研发前沿

近年来, 研究证实Wnt/β-catenin信号通路的异常活化促进了胰腺癌的进展, 而分泌型Wnt受体拮抗剂sFRP-1可以在细胞外阻断异常的Wnt信号通路, 从而抑制肿瘤细胞的增殖、诱导肿瘤细胞凋亡, 提示sFRP-1可能成为胰腺癌的潜在治疗靶点。

■ 相关报道

大多研究认为, sFRP-1在肿瘤中发挥抑癌基因功能, 其启动子区高甲基化导致的sFRP-1基因沉默是Wnt通路异常活化的重要原因。

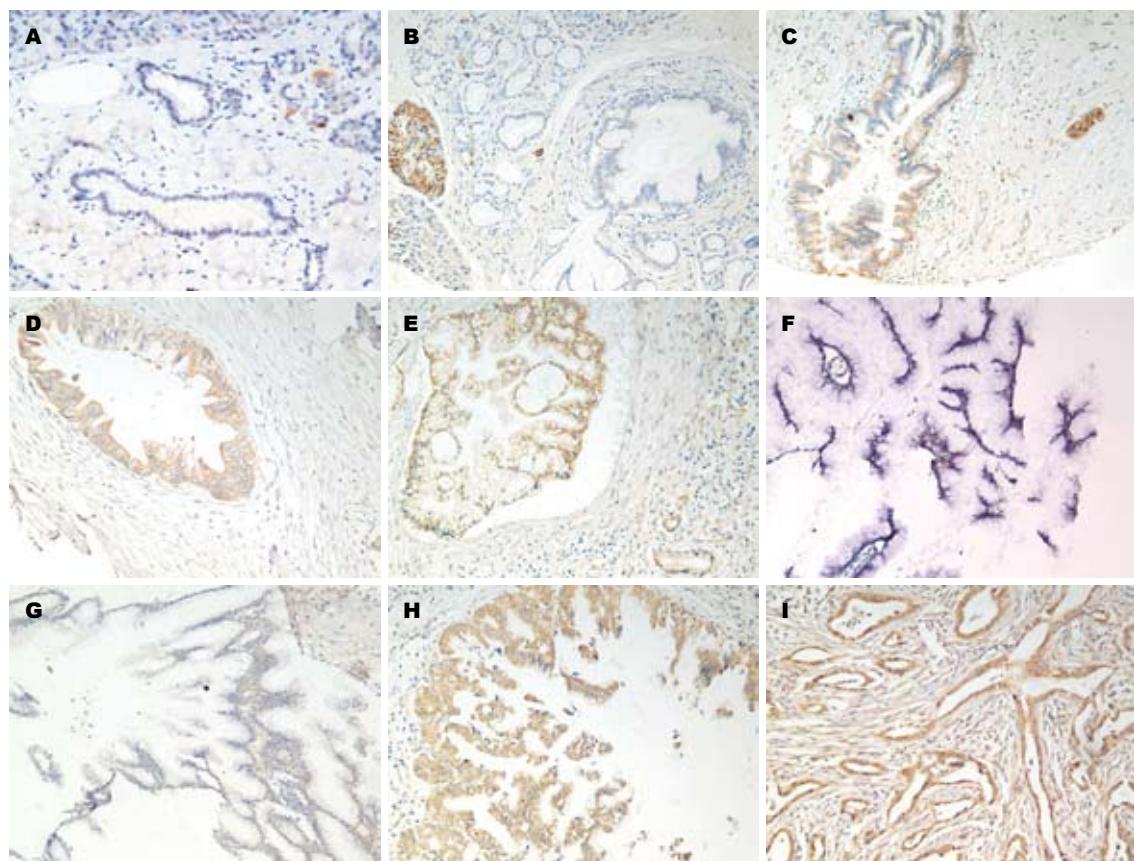


图1 sFRP-1在胰腺组织中的表达. A: NP($\times 400$); B: PanIN-1A; C: PanIN-1B; D: PanIN-2; E: PanIN-3; F: IPMA; G: IPMB; H: IPMC; I: PDAC($\times 200$).

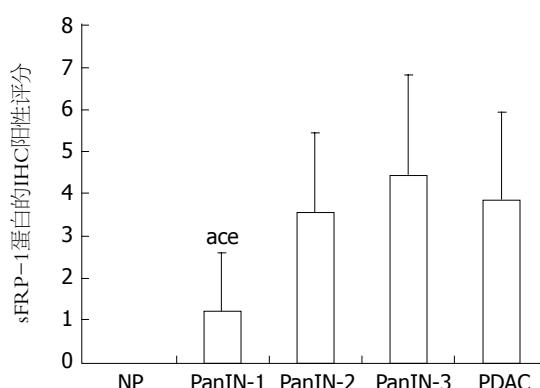


图2 sFRP-1在PanINs中的阳性比较. $^aP<0.05$ vs PDAC; $^bP<0.05$ vs PanIN-2; $^cP<0.05$ vs PanIN-3.

达明显高于低级别组PanIN-1(3.59 ± 1.842 , 4.44 ± 2.366 vs 1.22 ± 1.387 , $P<0.05$), 而PanIN-2、PanIN-3、PDAC(3.86 ± 2.065)之间无明显差异($P>0.05$, 图2)。

2.2 sFRP-1在IPMNs中的表达 sFRP-1在IPMA中开始出现弱阳性表达, 随组织异型程度增高其表达逐渐增强(图1F-H). 比较各组sFRP-1的IHCS时发现: IPMC(2.59 ± 1.387)组显著高于IPMB和IPMA组, PDAC(3.86 ± 2.065)组高于IPMC组($P<0.05$, 图3)。

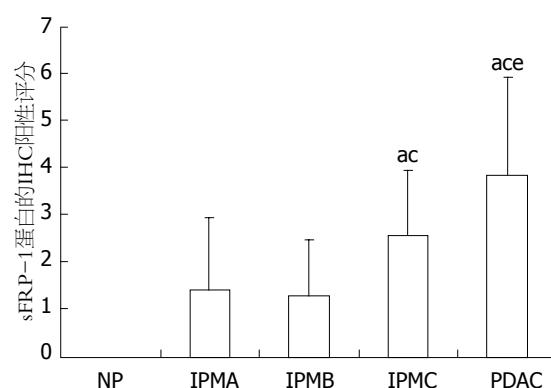


图3 sFRP-1在IPMNs中的阳性比较. $^aP<0.05$ vs IPMA; $^bP<0.05$ vs IPMB; $^cP<0.05$ vs IPMC.

2.3 sFRP-1的表达与胰腺癌临床病理特征及患者术后生存期的关系 PDAC中sFRP-1的IHCS第75百分位数(P75)为4, 选取P75 = 4作为sFRP-1高低表达的临界值, 结果显示, sFRP-1的表达与肿瘤分化程度、神经浸润有关($P<0.05$), 与患者年龄、性别、肿瘤大小、肿瘤部位、血管浸润、增殖活性、T分期、淋巴转移、远处转移及TNM分期无关($P>0.05$); 高分化组与低分化组的高表达率明显高于中分化组, 神经浸润组的高表达率明显高于对照组($57\% vs 27\%$, $P<0.05$,

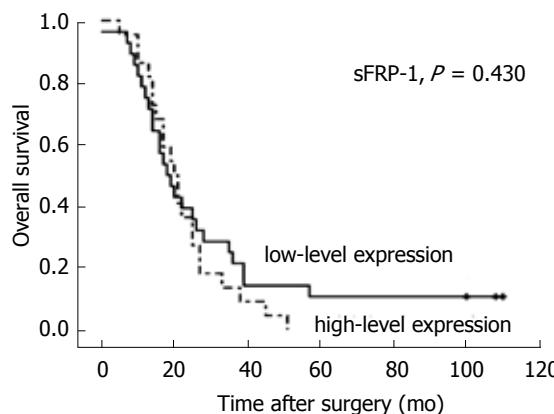


图 4 sFRP-1的表达与胰腺癌患者术后生存期的关系.

表1). sFRP-1的表达与患者的生存期无明显相关, 低表达组的中位生存期为20 mo(95%CI: 15.403, 24.597), 而高表达组中位生存期为18 mo(95%CI: 12.814, 23.186, $P=0.430$, 图4).

3 讨论

肿瘤信号通路是一个非常复杂的网络系统, 大部分情况下并非独立发挥作用. 同样Wnt信号通路在肿瘤的形成过程中也受到其他调节因子的正向或负向调控, 通过与其他信号通路之间的相互作用, 共同调节基因的转录和表达. 越来越多的研究表明, 分泌型Wnt受体拮抗剂sFRPs家族成员在Wnt信号传导中发挥重要作用, 他可以在细胞外阻断异常的Wnt信号通路, 从而抑制肿瘤细胞的增殖、诱导肿瘤细胞凋亡^[15,16].

sFRPs分子结构最重要的特征是位于N-末端的半胱氨酸富集区(cysteine rich domain, CRD), 他包含10个保守的半胱氨酸残基与一些其他的保守残基, 与Wnt受体(frizzled, Fz)蛋白的CRD区域有30%-50%的序列相似. sFRPs通过CRD区域与Wnt配体结合, 也可能与Fz受体相互作用形成无功能的复合物, 从而阻断Wnt信号通路^[28-30].

sFRP-1已被发现参与了人类多种肿瘤的发病过程. sFRP-1基因定位于染色体8p11.2上, 该位点在多种肿瘤中存在缺失现象, 因此sFRP-1基因被疑似为一种抑癌基因. 其编码的Wnt信号通路抑制因子sFRP-1失活可导致Wnt信号转导途径的紊乱, 影响肿瘤的发生发展. 近年来, 关于sFRP-1基因在乳腺癌、结直肠癌、前列腺癌、肺癌、膀胱癌等多种人类肿瘤发病机制中的研究报道越来越多, 大多学者认为sFRP-1基因的表观遗传改变和表达下调是Wnt通路异常活化的重要原因.

目前, 关于sFRP-1基因在胰腺疾病中的研究

表 1 sFRP-1的表达与胰腺癌临床病理特征的相关性分析
(n = 50)

临床病理指标	n	sFRP-1		P 值
		低表达	高表达	
年龄				0.068
<60	18	7	11	
≥60	32	11	11	
性别				0.144
男	26	12	14	
女	24	16	8	
肿瘤部位				0.251
头	38	23	15	
体尾	12	5	7	
肿瘤大小(cm)				0.962
<4	18	10	8	
≥4	32	18	14	
神经浸润				0.035
有	28	12	16	
无	22	16	6	
血管浸润				0.144
有	24	16	8	
无	26	12	14	
分化程度				0.02
高	11	4	7	
中	31	22	9	
低	8	2	6	
增殖活性				0.775
高	18	10	8	
中	16	8	8	
低	16	10	6	
T分期				0.709
T2	11	5	6	
T3	30	18	12	
T4	9	5	4	
淋巴转移				0.451
无	44	26	18	
有	6	2	4	
远处转移				0.437
无	46	27	19	
有	4	1	3	
TNM分期				1
I + II	39	22	17	
III + IV	11	6	5	
总计	50	28	22	

■应用要点

本研究证明, sFRP-1异常表达是胰腺导管腺癌(PDAC)的早期事件, sFRP-1高表达与PDAC神经浸润密切相关, 提示其可能成为PDAC的早期分子诊断靶标, 并且有助于揭示胰腺癌神经浸润的分子病理机制.

较少, 但已有证据表明sFRP-1基因在胰腺的生理功能及胰腺肿瘤的发生中起到了作用. Heller等^[31]研究认为, Wnt信号通路中Wnt、Frizzled、sFRP、DKK等多条基因在成人胰腺的生理功能方面发挥重要作用. Zou等^[32]研究发现, sFRP基因甲基化发生于胰腺癌、肺癌、结肠癌、黑色素瘤等多种人类肿瘤. 然而, sFRP-1基因在胰腺

■名词解释

癌前病变胰腺上皮内瘤变(PanINs):指胰腺导管上皮非典型性增生发展至原位癌这一“癌前病变”过程,而胰腺导管内乳头状粘液性肿瘤(IPMNs)是最近几年被认识的一种胰腺囊性肿瘤,PanINs和IPMNs在组织病理学上呈现出逐渐增加的细胞及组织结构异型表现。

肿瘤中的具体作用机制及其蛋白表达水平鲜有报道。

本研究采用免疫组织化学方法检测了sFRP-1蛋白在PDAC及其癌前病变PanINs和IPMNs的表达,结果发现sFRP-1蛋白在正常胰腺导管上皮中不表达,在PanIN-1A和IPMA中开始出现弱阳性表达,并随组织异型程度增加表达逐渐增强,高级别瘤变PanIN-2、PanIN-3中sFRP-1蛋白的IHCS接近于PDAC组,并且明显高于PanIN-1;同样,在由NP→IPMA、IPMB→IPMC→PDAC的进展过程中sFRP-1蛋白表达逐级增高,说明sFRP-1蛋白表达增强是PDAC发生中的早期事件,并且表达越强提示病变级别越高。然而,大多研究认为sFRP-1在肿瘤发生中发挥抑癌作用,并且在多种肿瘤中发生表观遗传学改变而表达降低或缺失。Caldwell等^[33]研究认为sFRP-1甲基化失活是结肠肿瘤发生中的早期事件,IHC检测结果显示sFRP-1蛋白在结肠肿瘤中低表达。因此,sFRP-1蛋白在PDAC进展过程中逐渐增强的表达方式说明:sFRP-1在PDAC的发生中的作用可能与其他肿瘤不同。sFRP-1蛋白在PDAC中有可能未发生甲基化改变,其表达增强有可能是对抗肿瘤作用加强的表现,也有可能是基因突变导致的无功能蛋白过度表达,具体的分子机制有待于进一步研究。

我们进一步分析了sFRP-1蛋白表达与PDAC临床病理特征的相关性,结果表明sFRP-1的表达与肿瘤的神经浸润和分化程度密切相关,神经浸润组的高表达率明显高于对照组,高分化组与低分化组的高表达率明显高于中分化组。近年来,研究认为神经浸润是PDAC常见的转移途径,并且是引起胰腺癌复发和癌性疼痛的重要原因,但胰腺癌神经组织浸润的确切分子机制至今尚不明朗。以往研究认为,胰腺癌神经浸润是在平面最小阻力处侵入神经,并在神经周围间隙内连续浸润到达远处形成新的转移灶。而新近研究发现,某些特异性分子和神经组织周围微环境在肿瘤的嗜神经性生长上可能发挥重要作用。本研究证实sFRP-1蛋白的高表达与PDAC神经浸润呈正相关,提示sFRP-1异常表达可能参与了PDAC的神经浸润,并预示PDAC的恶性生物学行为。然而,sFRP-1蛋白与PDAC分化程度在统计学上的相关性,并未体现出sFRP-1蛋白的表达与肿瘤分化程度之间的递变关系,无实际临床意义。此外,生存分析结果显示sFRP-1低表达组的中位生存期长于高表达

组(20 mo vs 18 mo),但差异无统计学意义($P = 0.430$)。

总之,本研究结果证实sFRP-1的异常表达是PDAC发生中的早期事件,sFRP-1高表达是PDAC神经浸润的重要分子特征,sFRP-1高表达提示PDAC患者预后不良。

4 参考文献

- Muroyama Y, Fujihara M, Ikeya M, Kondoh H, Takada S. Wnt signaling plays an essential role in neuronal specification of the dorsal spinal cord. *Genes Dev* 2002; 16: 548-553
- Sato N, Meijer L, Skaltsounis L, Greengard P, Brivanlou AH. Maintenance of pluripotency in human and mouse embryonic stem cells through activation of Wnt signaling by a pharmacological GSK-3-specific inhibitor. *Nat Med* 2004; 10: 55-63
- Petersen CP, Reddien PW. Wnt signaling and the polarity of the primary body axis. *Cell* 2009; 139: 1056-1068
- Toledo EM, Inestrosa NC. Activation of Wnt signaling by lithium and rosiglitazone reduced spatial memory impairment and neurodegeneration in brains of an APPswe/PSEN1DeltaE9 mouse model of Alzheimer's disease. *Mol Psychiatry* 2010; 15: 272-285, 228
- Dolmans GH, Werker PM, Hennies HC, Furniss D, Festen EA, Franke L, Becker K, van der Vlies P, Wolffenbuttel BH, Tinschert S, Toliat MR, Nothnagel M, Franke A, Klopp N, Wichmann HE, Nürnberg P, Giele H, Ophoff RA, Wijmenga C. Wnt signaling and Dupuytren's disease. *N Engl J Med* 2011; 365: 307-317
- Bienz M, Clevers H. Linking colorectal cancer to Wnt signaling. *Cell* 2000; 103: 311-320
- Gregory MA, Phang TL, Neviani P, Alvarez-Calderon F, Eide CA, O'Hare T, Zaberezhnyy V, Williams RT, Druker BJ, Perrotti D, Degregori J. Wnt/Ca²⁺/NFAT signaling maintains survival of Ph+ leukemia cells upon inhibition of Bcr-Abl. *Cancer Cell* 2010; 18: 74-87
- Vijayakumar S, Liu G, Rus IA, Yao S, Chen Y, Akiri G, Grumolato L, Aaronson SA. High-frequency canonical Wnt activation in multiple sarcoma subtypes drives proliferation through a TCF/β-catenin target gene, CDC25A. *Cancer Cell* 2011; 19: 601-612
- Wells JM, Esni F, Boivin GP, Aronow BJ, Stuart W, Combs C, Sklenka A, Leach SD, Lowy AM. Wnt/β-catenin signaling is required for development of the exocrine pancreas. *BMC Dev Biol* 2007; 7: 4
- McLin VA, Rankin SA, Zorn AM. Repression of Wnt/β-catenin signaling in the anterior endoderm is essential for liver and pancreas development. *Development* 2007; 134: 2207-2217
- Murtaugh LC. The what, where, when and how of Wnt/β-catenin signaling in pancreas development. *Organogenesis* 2008; 4: 81-86
- Wang L, Heidt DG, Lee CJ, Yang H, Logsdon CD, Zhang L, Fearon ER, Ljungman M, Simeone DM. Oncogenic function of ATDC in pancreatic cancer through Wnt pathway activation and β-catenin stabilization. *Cancer Cell* 2009; 15: 207-219
- Froeling FE, Feig C, Chelala C, Dobson R, Mein CE, Tuveson DA, Clevers H, Hart IR, Kocher HM. Retinoic acid-induced pancreatic stellate cell quies-

- cence reduces paracrine Wnt- β -catenin signaling to slow tumor progression. *Gastroenterology* 2011; 141: 1486-1497, 1497. e1-e14
- 14 Pilarsky C, Ammerpohl O, Sipos B, Dahl E, Hartmann A, Wellmann A, Braunschweig T, Löhr M, Jesenofsky R, Friess H, Wente MN, Kristiansen G, Jahnke B, Denz A, Rückert F, Schackert HK, Klöppel G, Kalthoff H, Saeger HD, Grützmann R. Activation of Wnt signalling in stroma from pancreatic cancer identified by gene expression profiling. *J Cell Mol Med* 2008; 12: 2823-2835
- 15 Kawano Y, Kypta R. Secreted antagonists of the Wnt signalling pathway. *J Cell Sci* 2003; 116: 2627-2634
- 16 Kongkham PN, Northcott PA, Croul SE, Smith CA, Taylor MD, Rutka JT. The SFRP family of WNT inhibitors function as novel tumor suppressor genes epigenetically silenced in medulloblastoma. *Oncogene* 2010; 29: 3017-3024
- 17 Trevant B, Gaur T, Hussain S, Symons J, Komm BS, Bodine PV, Stein GS, Lian JB. Expression of secreted frizzled related protein 1, a Wnt antagonist, in brain, kidney, and skeleton is dispensable for normal embryonic development. *J Cell Physiol* 2008; 217: 113-126
- 18 Kawano Y, Diez S, Uysal-Oganer P, Darrington RS, Waxman J, Kypta RM. Secreted Frizzled-related protein-1 is a negative regulator of androgen receptor activity in prostate cancer. *Br J Cancer* 2009; 100: 1165-1174
- 19 Ko J, Ryu KS, Lee YH, Na DS, Kim YS, Oh YM, Kim IS, Kim JW. Human secreted frizzled-related protein is down-regulated and induces apoptosis in human cervical cancer. *Exp Cell Res* 2002; 280: 280-287
- 20 Fukui T, Kondo M, Ito G, Maeda O, Sato N, Yoshioka H, Yokoi K, Ueda Y, Shimokata K, Sekido Y. Transcriptional silencing of secreted frizzled related protein 1 (SFRP 1) by promoter hypermethylation in non-small-cell lung cancer. *Oncogene* 2005; 24: 6323-6327
- 21 Martin-Manso G, Calzada MJ, Chuman Y, Sipes JM, Xavier CP, Wolf V, Kuznetsova SA, Rubin JS, Roberts DD. sFRP-1 binds via its netrin-related motif to the N-module of thrombospondin-1 and blocks thrombospondin-1 stimulation of MDA-MB-231 breast carcinoma cell adhesion and migration. *Arch Biochem Biophys* 2011; 509: 147-156
- 22 Lo PK, Mehrotra J, D'Costa A, Fackler MJ, Garrett-Mayer E, Argani P, Sukumar S. Epigenetic suppression of secreted frizzled related protein 1 (SFRP1) expression in human breast cancer. *Cancer Biol Ther* 2006; 5: 281-286
- 23 Suzuki H, Watkins DN, Jair KW, Schuebel KE, Markowitz SD, Chen WD, Pretlow TP, Yang B, Akiyama Y, Van Engeland M, Toyota M, Tokino T, Hinoda Y, Imai K, Herman JG, Baylin SB. Epigenetic inactivation of SFRP genes allows constitutive WNT signaling in colorectal cancer. *Nat Genet* 2004; 36: 417-422
- 24 Stoehr R, Wissmann C, Suzuki H, Knuechel R, Krieg RC, Kloppck E, Dahl E, Wild P, Blaszyk H, Sauter G, Simon R, Schmitt R, Zaak D, Hofstaedter F, Rosenthal A, Baylin SB, Pilarsky C, Hartmann A. Deletions of chromosome 8p and loss of sFRP1 expression are progression markers of papillary bladder cancer. *Lab Invest* 2004; 84: 465-478
- 25 Nojima M, Suzuki H, Toyota M, Watanabe Y, Maruyama R, Sasaki S, Sasaki Y, Mita H, Nishikawa N, Yamaguchi K, Hirata K, Itoh F, Tokino T, Mori M, Imai K, Shinomura Y. Frequent epigenetic inactivation of SFRP genes and constitutive activation of Wnt signaling in gastric cancer. *Oncogene* 2007; 26: 4699-4713
- 26 郑建明, 朱明华. 胰腺上皮内瘤变. 胰腺病学 2004; 4: 116-120
- 27 Tanaka M, Chari S, Adsay V, Fernandez-del Castillo C, Falconi M, Shimizu M, Yamaguchi K, Yamao K, Matsuno S. International consensus guidelines for management of intraductal papillary mucinous neoplasms and mucinous cystic neoplasms of the pancreas. *Pancreatology* 2006; 6: 17-32
- 28 Scardigli R, Gargioli C, Tosoni D, Borelli U, Sampaolesi M, Sciorati C, Cannata S, Clementi E, Brunelli S, Cossu G. Binding of sFRP-3 to EGF in the extra-cellular space affects proliferation, differentiation and morphogenetic events regulated by the two molecules. *PLoS One* 2008; 3: e2471
- 29 Hsieh M, Mulders SM, Friis RR, Dharmarajan A, Richards JS. Expression and localization of secreted frizzled-related protein-4 in the rodent ovary: evidence for selective up-regulation in luteinized granulosa cells. *Endocrinology* 2003; 144: 4597-4606
- 30 Bhat RA, Stauffer B, Komm BS, Bodine PV. Structure-function analysis of secreted frizzled-related protein-1 for its Wnt antagonist function. *J Cell Biochem* 2007; 102: 1519-1528
- 31 Heller RS, Klein T, Ling Z, Heimberg H, Katoh M, Madsen OD, Serup P. Expression of Wnt, Frizzled, sFRP, and DKK genes in adult human pancreas. *Gene Expr* 2003; 11: 141-147
- 32 Zou H, Molina JR, Harrington JJ, Osborn NK, Klatt KK, Romero Y, Burgart LJ, Ahlquist DA. Aberrant methylation of secreted frizzled-related protein genes in esophageal adenocarcinoma and Barrett's esophagus. *Int J Cancer* 2005; 116: 584-591
- 33 Caldwell GM, Jones CE, Taniere P, Warrack R, Soon Y, Matthews GM, Morton DG. The Wnt antagonist sFRP1 is downregulated in premalignant large bowel adenomas. *Br J Cancer* 2006; 94: 922-927

■同行评价

本文初步研究结果表明 sFRP-1 异常表达可能与 PDAC发生相关，并且是其神经湿润的重要分子特征，有一定的创新性。

编辑 张姗姗 电编 鲁亚静

术前同步放化疗在食管癌综合治疗中的作用

周国志, 吴清泉

■背景资料

食管癌患者大多数确诊时已是中晚期, 预后不佳, 其主要原因在于复发和转移。而远处转移是食管癌远期生存的重要影响因素。单纯手术5年总体生存率很低, 为改善患者预后, 众多学者热衷研究放化疗辅助外科手术治疗食管癌的综合治疗方法。研究证实术前同步放化疗有益于提高切除率、减少复发、改善预后。

周国志, 南京医科大学附属南京医院(南京市第一医院)肿瘤

外科 江苏省南京市 210006

吴清泉, 南京医科大学附属淮安市第一人民医院胸外科 江苏省淮安市 223300

通讯作者: 吴清泉, 223300, 江苏省淮安市淮阴区北京西路6号, 南京医科大学附属淮安市第一人民医院胸外科, 124278956@qq.com

收稿日期: 2011-10-20 修回日期: 2012-03-20

接受日期: 2012-04-25 在线出版日期: 2012-06-18

Role of preoperative chemoradiotherapy in the comprehensive treatment of esophageal cancer

Guo-Zhi Zhou, Qing-Quan Wu

Guo-Zhi Zhou, Department of Oncology Surgery, the Affiliated Nanjing Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210006, Jiangsu Province, China

Qing-Quan Wu, Department of Thoracic Surgery, the First People's Hospital of Huai'an, Nanjing Medical University, Huai'an 223300, Jiangsu Province, China

Correspondence to: Qing-Quan Wu, Department of Thoracic Surgery, the First People's Hospital of Huai'an, Nanjing Medical University, Huai'an 223300, Jiangsu Province, China. 124278956@qq.com

Received: 2011-10-20 Revised: 2012-03-20

Accepted: 2012-04-25 Published online: 2012-06-18

Abstract

Preoperative chemoradiotherapy plays an important role in the comprehensive treatment of patients with esophageal cancer. Concurrent administration of radiation and chemotherapy can produce additive or even synergistic effects, improve local control rate, help kill tumor cells in metastatic lesions located outside the target area, raise resection rate, reduce recurrence, and improve prognosis. However, preoperative chemoradiotherapy is also associated with many side effects, such as hematologic toxicity, cardiac toxicity, and radioactive lung damage, and often causes surgical difficulties, such as difficulty in intraoperative tumor manipulation and increased risk of complications. This paper focuses on the theoretical basis and possible mechanisms of preoperative chemoradiotherapy and discusses its role in reducing esophageal cancer stage and improving resection rate, pathologic response rate, and survival rate. We also briefly

discuss the pathogenesis and prevention of adverse reactions associated with preoperative chemoradiotherapy.

Key Words: Esophageal carcinoma; Preoperative chemoradiotherapy; Survival rate; Resection rate; Side effects

Zhou GZ, Wu QQ. Role of preoperative chemoradiotherapy in the comprehensive treatment of esophageal cancer. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2012; 20(17): 1526-1530

摘要

术前同步放化疗在食管癌综合治疗中起到了重要作用。利用放疗与化疗的互补和协同作用, 提高局部控制率, 有助于杀灭靶区以外转移病灶内的肿瘤细胞, 有益于提高切除率、减少复发、改善预后。但术前同步放化疗也会带来相应的不良反应, 如血液学毒性、心脏毒性、放射性肺损伤等, 同时也会给手术带来一定的难度, 如术中游离肿瘤困难可能性加大、术后并发症风险增加等。本文将重点阐述术前同步放化疗的理论基础、可能机制及其在降低食管癌分期、提高手术切除率及病理缓解率、提高生存率中的作用。同时也将简单阐述术前同步放化疗不良反应的机制和预防。

关键词: 食管肿瘤; 术前同步放化疗; 生存率; 切除率; 不良反应

周国志, 吴清泉. 术前同步放化疗在食管癌综合治疗中的作用. 世界华人消化杂志 2012; 20(17): 1526-1530
<http://www.wjnet.com/1009-3079/20/1526.asp>

0 引言

食管癌居世界癌症死因第7位, 中国癌症死因第4位^[1], 大多数患者确诊时已是中晚期, 预后不佳^[2,3], 其主要原因在于复发和转移。而远处转移是食管癌远期生存的重要影响因素^[4]。单纯手术5年总体生存率只有20%-30%^[5], 为改善患者预后, 众多学者热衷研究放化疗辅助外科手术治疗食管癌的综合治疗方法。研究证实术前同步放化疗有益于提高切除率、减少复发、改善预

后^[6-8]. 为此, 本文将重点讨论术前同步放化疗在食管癌综合治疗中的作用.

1 术前同步放化疗的理论基础及可能机制

食管癌是局部区域性病变, 更是全身性疾病. 多年来许多学者为提高食管癌的疗效进行了多种综合治疗模式的探索和研究^[9,10], 但疗效甚微. 然而, 探求综合治疗的最佳措施和手段却一直没有停滞. 其中主要的是手术前后放化疗, 而目前最受关注的是术前同步放化疗^[11]. 术前同步放化疗在欧洲和日本被认为是标准治疗方式^[12], 其目的是希望利用放疗与化疗的互补和协同作用, 提高局控率, 也有助于杀灭靶区以外转移病灶内的肿瘤细胞. 同步放化疗主要基于以下理论^[13]: (1)化疗药本身可使肿瘤缩小, 改善血供, 改善肿瘤缺氧情况, 提高放疗敏感性; (2)许多抗癌药物, (如顺铂、甲氨蝶呤、5氟尿嘧啶、博来霉素等)作用于细胞DNA合成期, 使肿瘤细胞同步分化而起放疗增敏作用; (3)化疗药物干扰或抑制肿瘤细胞放疗后亚致死性损伤及潜在致死性损伤的修复, 协同于放疗的作用; (4)化疗有助于消灭亚临床转移灶. 放化疗同时进行, 化疗药物可增强放疗敏感性, 能增加局部肿瘤控制率, 提高治愈率. 同步放化疗较序贯放化疗更能提高肿瘤的局控率和有效率, 且能缩短治疗时间, 减少放疗初期的局部水肿反应. 其轻中度不良反应虽有增加, 但重度不良反应增加不明显, 绝大多数患者能够耐受. 因此, 术前同步放化疗在局部病灶的控制、减少复发与转移、提高手术切除率与远期生存率方面优于术前序贯放化疗^[14].

基于上述理论, 经过长期的基础研究与临床实践, 我们总结出了术前同步放化疗的优点: (1)肿瘤血运完整, 靶区内化疗药物强度和氧浓度相对稳定; (2)术前的患者耐受性较好; (3)可降低肿瘤病期, 提高手术切除率; (4)早期杀灭靶区外亚临床转移灶内的肿瘤细胞, 甚至有完全控制的可能; (5)减少术中肿瘤种植转移; (6)放化疗具有互相增敏的协同作用; (7)可作为肿瘤对化疗药物体内敏感性的评价^[15]. 同步放化疗更是作为不宜手术食管癌的基本治疗手段.

2 术前同步放化疗的作用

既往一些术前化疗与单纯手术治疗食管癌的研究显示其病理完全缓解率(pCR)的结果令人失望, 这会严重影响患者的生活质量. 联合应用同步放化疗与手术治疗是一个合理的治疗策略, 可降低食管癌分期^[16], 提高完全切除率, 达到病理

完全缓解, 从而提高预后. 在前期研究中也显示了较好的病理缓解率及临床疗效^[17-20]. 术前同步放化疗与单纯手术对比治疗食管癌的Meta分析显示术前同步放化疗可取得10%-45%的临床及病理完全缓解率^[21]. 另有系列文献也均证实了术前同步放化疗能取得10.0%-53.8%的病理完全缓解率^[1,22-29]. 虽然存在肿瘤的异质性和个体化的不同, 但统计结果还是令人满意的. 众多研究表明化疗联合放疗可提高杀伤不同周期肿瘤细胞的敏感性, 当放疗在空间上发挥抗肿瘤作用时, 化疗还可发挥抗肿瘤微转移灶的效用, 疗效互补并增益. 从而达到延长生存期的目的.

单纯手术治疗食管癌疗效并不满意. 迄今为止, 各式各样的综合治疗手段层出不穷^[9,10]. 无论是术前放疗还是术后放疗, 都缺乏有力证据显示其有益于延长生存期^[24,30-32]. 既往研究结果表明, 完全切除和术前放化疗后病理完全缓解率是提高食管癌长期生存率、降低局部复发率的独立预后因素^[33]. 术前放化疗提高切除率及远期生存率主要机制为: 术前放疗可以使瘤体缩小, 与周围器官的癌性粘连因放疗坏死转为纤维性粘连而便于切除, 局部淋巴结转移癌也可能消失, 适量的放疗可能使癌体周围的淋巴管和小静脉闭合, 减少手术后的扩散和转移. 而化疗药物可改变细胞增殖周期, 使之趋于同步分化, 提高放疗敏感性, 以提高食管癌局部控制率, 同时能抑制或杀灭微小转移灶, 减少远处转移. 从而可提高切除率, 降低转移和复发, 增加生存率. 术前放化疗可使II B-III期食管癌患者病理完全缓解率达21%, 手术的完全切除率提高至55.0%-95.7%^[26,34,35]. 同样Lv等^[21]研究亦证实术前同步放化疗完全手术切除率明显比单纯手术高(OR = 1.53, 95%CI: 1.33-2.84; P = 0.007). van de Schoot等^[22]报道了应用紫杉醇和卡铂方案的术前放化疗II期临床试验. 病理完全缓解率达38%, 完全切除率达96%, 3、5年生存率分别为56%和48%.

亦有相关研究表明术前同步放化疗较单纯手术能明显提高患者生存率^[9]. 吕进等^[36]通过一项前瞻性研究, 在1997-2007年, 将477例诊断为食管鳞癌, 分期为II B-IV期患者随机分为4组: 术前化疗组、术前放疗组、术前放化疗组及单纯手术组(对照组), 3年生存率术前放疗组、术前放化疗组及对照组分别为69.5%、72.9%、53.4%, 对比差异具有统计学意义(P<0.05). 术前放化疗组与对照组5年生存率对比差异具有统

■研发前沿
食管癌是局部区域性病变, 更是全身性疾病. 多年来许多学者为提高食管癌的疗效进行了多种综合治疗模式的探索和研究, 但疗效甚微.

■相关报道

大多数试验均认为术前同步放化疗的食管癌患者预后更好，并且Meta分析结果显示术前同步放化疗与单纯手术治疗食管癌相比，能提高患者长期生存率，降低肿瘤局部区域复发率。

计学意义($P<0.05$)。

此外，胡巧英^[37]综合了所有8个随机对照试验($n=1110$)进行Meta分析，结果显示术前同步放化疗可以延长食管癌患者1年生存率(OR = 1.33; 95%CI: 1.03-1.72; $P = 0.03$)和3年生存率(OR = 1.62; 95%CI: 1.19-2.20; $P = 0.002$)。最新Meta分析显示术前同步放化疗与单纯手术比较，1年生存率对比无差异，但术前放化疗可使2、3、4、5年生存率显著提高。同时显示同步放化疗5年生存率显著优于单纯手术(OR = 1.45; 95%CI: 1.26-1.79; $P = 0.015$)^[21]。术前同步放化疗有益于可切除性食管癌患者的长期生存^[38-41]，其原因与降低食管癌的分期、提高病理完全缓解率、降低了肿瘤的局部区域复发率有关。2009年Ariga等^[42]报道，应用同步放化疗治疗食管癌，结合挽救性外科手术治疗，可以取得远高于单纯手术治疗的长期生存率。

3 术前同步放化疗的不良反应

术前同步放化疗辅助手术治疗食管癌是一个非常有前景的治疗模式，诸如可以提高病理完全缓解率、手术切除率、生存率等优点，但放化疗的不良反应不容忽视。其不良反应主要包括：肺部并发症、放射性食管炎、放射性气管炎、心脏毒性、脱发、恶心呕吐、白细胞减少、血小板减少、肝肾功能异常等。

肺部并发症是食管切除术后最常见的死亡原因，亦是术前同步放化疗的重要不良反应。肺毒性主要来源于放疗。术前同步放化疗后围手术期肺部并发症的发生率为19.9%^[43,44]。其主要机制为：食管癌术前放疗患者病程较长，病变向周围脏器的浸润也较重，在放射治疗中，部分肺组织因不可避免地受到一定剂量的射线照射而造成不同程度的放射损伤，导致肺毛细血管的通透性升高，造成肺间质水肿和炎性细胞浸润；而肺泡II型上皮细胞的损伤，破坏了肺泡表面的稳定性，引起肺泡塌陷，导致缺氧和呼吸困难^[45]；食管炎也是术前同步放化疗最常见的不良反应之一，发生率为63%-80%^[26]。其主要机制为：放射到达一定剂量时出现食管黏膜的炎症、充血、水肿；继而发生上皮坏死、脱落，食管黏膜逐渐发生慢性炎症及上皮再生，黏膜下及部分肌层开始纤维化，上皮在一度增生之后出现萎缩。同时化疗药物可直接损伤食管黏膜，并可间接通过增敏机制加重放疗对食管黏膜的损伤。此外心脏毒性是一种急性不良反应，尤其胸中、下段食

管癌的患者术前放化疗的围手术期心力衰竭发生率分别为6.9%、1%-4%^[46]。其主要机制为：放疗早期会诱导中小血管炎症，但是炎症处于潜伏状态，此时心肌的毛细血管内皮细胞损伤，血栓在毛细血管内腔形成，心肌缺血、坏死和纤维化随之产生^[47]。放化疗后肝损害也是常见的一种毒性反应，由于药物经代谢产生亲电子产物，通过共价结合，损伤肝细胞膜和肝线粒体、微粒体膜，引起细胞损伤。肾功能损伤主要为化疗药物(如DDP)与体内亲核胺基和含巯基团结合，沉积于肾小管，引起肾小管上皮细胞急性坏死、变性、间质水肿，肾小管扩张，重吸收功能下降，严重时引起肾功能衰竭^[48]。放化疗导致白细胞减少主要是由于：正常情况下骨髓内细胞的增殖成熟和释放，与外周血液中粒细胞的衰老、死亡、破坏和排出呈相对恒定状态。放化疗在其治疗过程中破坏了这种平衡，即出现白细胞减少，甚至全血细胞减少^[49]。

此外亦有Kelley等^[50]报道，术前同步放化疗手术后并发症发生率为22.9%(14/61)，两组并发症分类比较：肺部并发症为4.9%；心律失常为6.5%；狭窄发生率为6.5%。故控制放化疗的不良反应是保证术前同步放化疗顺利完成及获得理想疗效的关键。既往研究表明术前同步放化疗的毒性反应可通过调低化疗药物剂量和对症治疗得到缓解。但对化疗和放疗结合的时机、化疗的疗程、合理组合治疗方案的掌握以减少不良反应有待进一步研究。

另外，术前放化疗后外科医生将面临手术难度和术后并发症增加的可能。根治性放疗后食管癌的周围组织纤维化，肿瘤与周围组织无边界，分离困难易破损，加之肿瘤与气管膜部、胸主动脉浸润，冒然切除有生命危险时只能残留而造成污染，从而增加了脓胸的发生率。放疗还可能会增加吻合口漏和术后急性肺损伤的风险^[35]。因此，食管癌放化疗后再手术，患者应充分术前准备、手术时间应尽量缩短、术后采取有效综合措施可预防、减少低氧血症、呼吸衰竭的发生。

4 结论

目前食管癌的治疗主要以手术为主，但以术前同步放化疗为主的综合治疗不容忽视。大多数试验均认为术前同步放化疗的食管癌患者预后更好，并且Meta分析结果显示术前同步放化疗与单纯手术治疗食管癌相比，能提高患者长期生存率，降低肿瘤局部区域复发率。但不容忽视的是术前

同步放化疗治疗食管癌伴随着术后死亡率增加的风险。如何权衡利弊, 是临床工作中需要重视的问题。由于文献的研究对象来自不同种族、人群, 受到多种因素的影响, 故此结论尚需大样本多中心随机对照临床研究进一步论证。

5 参考文献

- 1 Cao XF, He XT, Ji L, Xiao J, Lv J. Effects of neoadjuvant radiochemotherapy on pathological staging and prognosis for locally advanced esophageal squamous cell carcinoma. *Dis Esophagus* 2009; 22: 477-481
- 2 曹秀峰, 吕进, 朱斌, 安红银, 王山, 吴必超, 纪律, 陶磊, 王冬冬. 局部晚期食管鳞状细胞癌术后放疗和化疗的前瞻性研究. 中华肿瘤杂志 2010; 32: 452-455
- 3 王志蕙, 侯海燕, 范士怀, 彭京凤. 缓释渗透增敏化疗加放疗综合治疗食管癌50例. 世界华人消化杂志 2006; 14: 2640-2644
- 4 陈龙奇. 食管癌国际TNM分期第7版解读与评价. 中华肿瘤杂志 2010; 32: 237-240
- 5 李晓丽, 邢月明, 宋翔, 吴伟. 中晚期食管癌TCF方案同期放化疗临床观察. 中华放射肿瘤学杂志 2008; 17: 401-402
- 6 安丰山, 黄金球, 谢映涛, 陈少湖, 戎铁华. 食管癌新辅助放化疗的前瞻性临床研究. 中华肿瘤杂志 2003; 25: 376-379
- 7 李方儒. 食管癌的放射治疗和化学治疗. 世界华人消化杂志 2000; 8: 1024-1026
- 8 Triboulet JP, Mariette C. [Oesophageal squamous cell carcinoma stage III. State of surgery after radiochemotherapy (RCT)]. *Cancer Radiother* 2006; 10: 456-461
- 9 de Manzoni G, Pedrazzani C, Pasini F, Bernini M, Minicozzi AM, Giacopuzzi S, Grandinetti A, Cordiano C. Chemoradiotherapy followed by surgery for squamous cell carcinoma of the thoracic esophagus with clinical evidence of adjacent organ invasion. *J Surg Oncol* 2007; 95: 261-266
- 10 Bedenne L, Michel P, Bouché O, Milan C, Mariette C, Conroy T, Pezet D, Roullet B, Seitz JF, Herr JP, Paillot B, Arveux P, Bonnetaud F, Binquet C. Chemoradiation followed by surgery compared with chemoradiation alone in squamous cancer of the esophagus: FFCD 9102. *J Clin Oncol* 2007; 25: 1160-1168
- 11 Ilson DH. Esophageal cancer chemotherapy: recent advances. *Gastrointest Cancer Res* 2008; 2: 85-92
- 12 翟医蕊, 冯勤付. 食管癌同步放化疗的研究进展. 肿瘤学杂志 2010; 16: 14-19
- 13 全吉钟, 孙秀梅, 董明新, 黄京子, 穆鑫. 同步放化疗在局部晚期鼻咽癌应用. 中国实用医药 2008; 3: 141-144
- 14 王鑫, 祝淑钗. 食管癌综合治疗研究进展. 中华放射肿瘤学杂志 2006; 15: 65-68
- 15 Amdal CD, Jacobsen AB, Tausjø JE, Wiig JN, Warloe T, Karlsen KO, Sandstad B, Bjordal K. Radical treatment for oesophageal cancer patients unfit for surgery and chemotherapy. A 10-year experience from the Norwegian Radium Hospital. *Acta Oncol* 2010; 49: 209-218
- 16 Safran H, Suntharalingam M, Dipetrillo T, Ng T, Doyle LA, Krasna M, Plette A, Evans D, Wanebo H, Akerman P, Spector J, Kennedy N, Kennedy T. Cetuximab with concurrent chemoradiation for esophagogastric cancer: assessment of toxicity. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2008; 70: 391-395
- 17 Stahl M, Walz MK, Stuschke M, Lehmann N, Meyer HJ, Riera-Knorrenchild J, Langer P, Engenhart-Cabillic R, Bitzer M, Königsrainer A, Budach W, Wilke H. Phase III comparison of preoperative chemotherapy compared with chemoradiotherapy in patients with locally advanced adenocarcinoma of the esophagogastric junction. *J Clin Oncol* 2009; 27: 851-856
- 18 Crehange G, Bonnetaud F, Peignaux K, Truc G, Blanchard N, Rat P, Chauffert B, Ghiringhelli F, Maingon P. Preoperative radiochemotherapy for resectable localised oesophageal cancer: a controversial strategy. *Crit Rev Oncol Hematol* 2010; 75: 235-242
- 19 Ishihara R, Yamamoto S, Iishi H, Takeuchi Y, Sugimoto N, Higashino K, Ueda N, Tatsuta M, Yano M, Imai A, Nishiyama K. Factors predictive of tumor recurrence and survival after initial complete response of esophageal squamous cell carcinoma to definitive chemoradiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2010; 76: 123-129
- 20 Hammoud ZT, Kesler KA, Ferguson MK, Battafarrano RJ, Bhogaraju A, Hanna N, Govindan R, Mauer AA, Yu M, Einhorn LH. Survival outcomes of resected patients who demonstrate a pathologic complete response after neoadjuvant chemoradiation therapy for locally advanced esophageal cancer. *Dis Esophagus* 2006; 19: 69-72
- 21 Lv J, Cao XF, Zhu B, Ji L, Tao L, Wang DD. Effect of neoadjuvant chemoradiotherapy on prognosis and surgery for esophageal carcinoma. *World J Gastroenterol* 2009; 15: 4962-4968
- 22 van de Schoot L, Romme EA, van der Sangen MJ, Creemers GJ, van Lijnschoten G, van Driel OJ, Rutten HJ, Nieuwenhuijzen GA. A highly active and tolerable neoadjuvant regimen combining paclitaxel, carboplatin, 5-FU, and radiation therapy in patients with stage II and III esophageal cancer. *Ann Surg Oncol* 2008; 15: 88-95
- 23 Rizk NP, Seshan VE, Bains MS, Ilson DH, Minsky BD, Tang L, Rusch VW. Prognostic factors after combined modality treatment of squamous cell carcinoma of the esophagus. *J Thorac Oncol* 2007; 2: 1117-1123
- 24 Tepper J, Krasna MJ, Niedzwiecki D, Hollis D, Reed CE, Goldberg R, Kiel K, Willett C, Sugarbaker D, Mayer R. Phase III trial of trimodality therapy with cisplatin, fluorouracil, radiotherapy, and surgery compared with surgery alone for esophageal cancer: CALGB 9781. *J Clin Oncol* 2008; 26: 1086-1092
- 25 Natsugoe S, Okumura H, Matsumoto M, Uchikado Y, Setoyama T, Yokomakura N, Ishigami S, Owaki T, Aikou T. Randomized controlled study on pre-operative chemoradiotherapy followed by surgery versus surgery alone for esophageal squamous cell cancer in a single institution. *Dis Esophagus* 2006; 19: 468-472
- 26 Burmeister BH, Smithers BM, Gebski V, Fitzgerald L, Simes RJ, Devitt P, Ackland S, Gotley DC, Joseph D, Millar J, North J, Walpole ET, Denham JW. Surgery alone versus chemoradiotherapy followed by surgery for resectable cancer of the oesophagus: a randomised controlled phase III trial. *Lancet Oncol* 2005; 6: 659-668
- 27 曹秀峰, 王山, 吴必超, 黄志华, 朱海文, 王和明, 黄水清, 朱斌, 纪律, 肖建. 新辅助放化疗对中晚期食管鳞癌病理分期及预后的影响. 世界华人消化杂志 2007; 15: 2413-2417

■同行评价

本文综述内容全面, 具有一定的临床实用性。

- 28 An FS, Huang JQ, Xie YT, Chen SH, Rong TH. [A prospective study of combined chemoradiotherapy followed by surgery in the treatment of esophageal carcinoma]. *Zhonghua Zhongliu Zazhi* 2003; 25: 376-379
- 29 Lee JL, Park SI, Kim SB, Jung HY, Lee GH, Kim JH, Song HY, Cho KJ, Kim WK, Lee JS, Kim SH, Min YI. A single institutional phase III trial of preoperative chemotherapy with hyperfractionation radiotherapy plus surgery versus surgery alone for resectable esophageal squamous cell carcinoma. *Ann Oncol* 2004; 15: 947-954
- 30 Chen G, Wang Z, Liu XY, Liu FY. Adjuvant radiotherapy after modified Ivor-Lewis esophagectomy: can it prevent lymph node recurrence of the mid-thoracic esophageal carcinoma? *Ann Thorac Surg* 2009; 87: 1697-1702
- 31 Schwer AL, Ballonoff A, McCammon R, Rusthoven K, D'Agostino RB, Scheftel TE. Survival effect of neoadjuvant radiotherapy before esophagectomy for patients with esophageal cancer: a surveillance, epidemiology, and end-results study. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2009; 73: 449-455
- 32 Allum WH, Stenning SP, Bancewicz J, Clark PI, Langley RE. Long-term results of a randomized trial of surgery with or without preoperative chemotherapy in esophageal cancer. *J Clin Oncol* 2009; 27: 5062-5067
- 33 Mulligan ED, Dunne B, Griffin M, Keeling N, Reynolds JV. Margin involvement and outcome in oesophageal carcinoma: a 10-year experience in a specialist unit. *Eur J Surg Oncol* 2004; 30: 313-317
- 34 陈克能, 徐光炜. 食管癌的诊断和治疗. 世界华人消化杂志 2000; 8: 196-202
- 35 曹秀峰. 食管癌新辅助放化疗对手术及生存率的影响. 世界华人消化杂志 2010; 18: 2511-2514
- 36 吕进, 曹秀峰, 朱斌, 纪律, 陶磊, 王冬冬. 手术联合术前放化疗治疗食管鳞癌. 中华实验外科杂志 2009; 26: 1378-1380
- 37 胡巧英. 食管癌新辅助放化疗结合手术与单纯手术治疗随机对照试验的Meta分析. 中华肿瘤 2007; 16: 361-364
- 38 Sjoquist KM, Burmeister BH, Smithers BM, Zalcberg JR, Simes RJ, Barbour A, Gebski V. Survival after neoadjuvant chemotherapy or chemoradiotherapy for resectable oesophageal carcinoma: an updated meta-analysis. *Lancet Oncol* 2011; 12: 681-692
- 39 Glynne-Jones R, Hoskin P. Neoadjuvant cisplatin chemotherapy before chemoradiation: a flawed paradigm? *J Clin Oncol* 2007; 25: 5281-5286
- 40 张晓东, 沈琳, 李洁, 李燕, 李健, 张小田, 金懋林. 放化疗联合与单独化疗对晚期食管癌生存期影响的比较. 中华肿瘤杂志 2007; 29: 474-477
- 41 Gebski V, Burneister B, Smithers BM, Foo K, Zalcberg J, Simes J. Survival benefits from neoadjuvant chemoradiotherapy or chemotherapy in oesophageal carcinoma: a meta-analysis. *Lancet Oncol* 2007; 8: 226-234
- 42 Ariga H, Nemoto K, Miyazaki S, Yoshioka T, Ogawa Y, Sakayauchi T, Jingū K, Miyata G, Onodera K, Ichikawa H, Kamei T, Kato S, Ishioka C, Satomi S, Yamada S. Prospective comparison of surgery alone and chemoradiotherapy with selective surgery in resectable squamous cell carcinoma of the esophagus. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2009; 75: 348-356
- 43 Fiorica F, Di Bona D, Schepis F, Licata A, Shahied L, Venturi A, Falchi AM, Craxì A, Cammà C. Preoperative chemoradiotherapy for oesophageal cancer: a systematic review and meta-analysis. *Gut* 2004; 53: 925-930
- 44 Wang S, Liao Z, Wei X, Liu HH, Tucker SL, Hu C, Ajani JA, Phan A, Swisher SG, Mohan R, Cox JD, Komaki R. Association between systemic chemotherapy before chemoradiation and increased risk of treatment-related pneumonitis in esophageal cancer patients treated with definitive chemoradiotherapy. *J Thorac Oncol* 2008; 3: 277-282
- 45 Lee HK, Vaporciyan AA, Cox JD, Tucker SL, Putnam JB, Ajani JA, Liao Z, Swisher SG, Roth JA, Smythe WR, Walsh GL, Mohan R, Liu HH, Mooring D, Komaki R. Postoperative pulmonary complications after preoperative chemoradiation for esophageal carcinoma: correlation with pulmonary dose-volume histogram parameters. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2003; 57: 1317-1322
- 46 Griffiths EA, Pritchard SA, Mapstone NP, Welch IM. Emerging aspects of oesophageal and gastro-oesophageal junction cancer histopathology - an update for the surgical oncologist. *World J Surg Oncol* 2006; 4: 82
- 47 Yarnold J, Brotons MC. Pathogenetic mechanisms in radiation fibrosis. *Radiother Oncol* 2010; 97: 149-161
- 48 Kuhlmann MK, Burkhardt G, Köhler H. Insights into potential cellular mechanisms of cisplatin nephrotoxicity and their clinical application. *Nephrol Dial Transplant* 1997; 12: 2478-2480
- 49 Carey PJ. Drug-induced myelosuppression: diagnosis and management. *Drug Saf* 2003; 26: 691-706
- 50 Kelley ST, Coppola D, Karl RC. Neoadjuvant chemoradiotherapy is not associated with a higher complication rate vs. surgery alone in patients undergoing esophagectomy. *J Gastrointest Surg* 2004; 8: 227-231; discussion 231-232

编辑 曹丽鸥 电编 鲁亚静

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

• 消息 •

《世界华人消化杂志》2011 年开始不再收取审稿费

本刊讯 为了方便作者来稿, 保证稿件尽快公平、公正的处理, 《世界华人消化杂志》编辑部研究决定, 从2011年开始对所有来稿不再收取审稿费。审稿周期及发表周期不变。(编辑部主任: 李军亮 2011-01-01)

饮食在肠易激综合征症状发作和治疗中的作用

王维达, 方秀才, 柯美云

王维达, 方秀才, 柯美云, 中国医学科学院 北京协和医学院 北京协和医院消化内科 北京市 100730

王维达, 医学博士, 主要从事功能性胃肠病的研究.

国家高技术研究发展计划(863计划)课题基金资助项目, No. 2010AA023007

“十一五”国家科技支撑计划基金资助项目, No. 2007BAI04B01

作者贡献分布: 本综述由王维达完成; 方秀才审校; 柯美云审阅.
通讯作者: 方秀才, 教授, 100730, 北京市东城区帅府园1号, 北京协和医院消化内科. fangxiucai2@yahoo.com.cn

电话: 010-65296892

收稿日期: 2012-02-18 修回日期: 2012-03-13

接受日期: 2012-05-18 在线出版日期: 2012-06-18

Role of food in onset of symptoms and treatment of irritable bowel syndrome

Wei-Da Wang, Xiu-Cai Fang, Mei-Yun Ke

Wei-Da Wang, Xiu-Cai Fang, Mei-Yun Ke, Department of Gastroenterology, Peking Union Hospital, Peking Union Medical College, Chinese Academy of Medical Science, Beijing 100730, China

Supported by: the National High Technology Research and Development Program of China, No. 2010AA023007; and the National Science and Technology Pillar Programs During the Eleventh Five-year Plan Period, No. 2007BAI04B01

Correspondence to: Xiu-Cai Fang, Professor, Department of Gastroenterology, Peking Union Hospital, 1 Shuaifuyuan, Dongcheng District, Beijing 100730, China. fangxiucai2@yahoo.com.cn

Received: 2012-02-18 Revised: 2012-03-13

Accepted: 2012-05-18 Published online: 2012-06-18

Abstract

Epidemiological studies have suggested that the onset of some symptoms in patients with irritable bowel syndrome (IBS) is related with food. Although the potential mechanisms are not fully elucidated, there is some evidence that the inherent prokinetic and crinogenic effects of food components, food intolerance and allergies, as well as poor eating habits could plausibly contribute to symptom onset. Food elimination, supplemental dietary fiber, and special additives such as probiotics and prebiotics could relieve IBS symptoms. In this article we will review current advances in understanding the relationship between food and onset of IBS symptoms, the possible mechanisms, and emerging therapeutics involving dietary administration.

Key Words: Irritable bowel syndrome; Food; Food intolerance; Dietary fiber; Probiotics

Wang WD, Fang XC, Ke MY. Role of food in onset of symptoms and treatment of irritable bowel syndrome. Shijie Huaren Zazhi 2012; 20(17): 1531-1536

■背景资料

肠易激综合征(IBS)作为病因不明的常见功能性胃肠病, 目前认为其发病可能涉及饮食因素.

摘要

流行病学研究资料提示, 肠易激综合征(irritable bowel syndrome, IBS)患者的症状发作与饮食有关. 饮食影响IBS症状的机制仍未完全阐明, 可能与食物的促动力和促胃肠激素分泌作用、食物不耐受、食物过敏和不良进食习惯等有关. 有证据表明采用食物剔除和添加膳食纤维、益生菌和益生元等特殊食物成分的饮食调整治疗能缓解IBS的症状. 本文从IBS与食物有关的表现、饮食影响IBS症状的原因和机制、饮食对IBS治疗的作用3个方面总结了相关研究的进展.

关键词: 肠易激综合征; 食饮; 食物不耐受; 膳食纤维; 益生菌

王维达, 方秀才, 柯美云. 饮食在肠易激综合征症状发作和治疗中的作用. 世界华人消化杂志 2012; 20(17): 1531-1536

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/1531.asp>

0 引言

肠易激综合征(irritable bowel syndrome, IBS)是一种常见的功能性胃肠病, 其临床表现以腹痛或腹部不适伴随排便习惯或粪便性状的改变为主, 缺乏可解释症状的形态学和生化学异常^[1]. 我国IBS患病率在4.6%-5.67%^[2], 已经注意到IBS的症状发作与饮食有一定关系, 另一方面症状反复发作或持续不缓解影响患者正常进食, 使其生活质量下降. 目前IBS的治疗手段有限, 探明饮食在IBS症状发作与治疗中的作用具有重要意义.

1 IBS和食物有关的表现

2005年美国对IBS患病的流行病学调查发现, 64%IBS患者存在引发症状发作的食物诱因^[3];

■同行评议者

陈治水, 主任医师,
中国人民解放军
第211医院中医科

■相关报道

Carroccio等通过粪便类胰蛋白酶、嗜酸性粒细胞阳离子蛋白(ECP)和人肌钙网蛋白水平的检测,提出25%的IBS患者存在乳蛋白或谷蛋白的不耐受。但由于检测试验的敏感性、特异性,患者人群的区域性,该结果可能不能代表世界各地的患者。

瑞典的一项临床研究发现,50%IBS患者腹痛发生在进餐后90 min内^[4]。与饮食相关的常见IBS症状有餐后上腹痛、腹胀、饱胀感或胀气以及餐后腹泻发作等^[5],在亚洲患者中上腹部不适的发生比例相对更高^[6]。鉴于饮食和IBS的密切关系,62%患者希望能够了解哪些食物是“忌口”的,而12%IBS患者为了缓解症状被迫采取营养不均衡的饮食^[7]。因此,2010年亚洲IBS共识意见^[8]认为:强调饮食和IBS症状之间的关系十分重要。

2 饮食影响IBS症状的可能机制

饮食因素诱发或加重IBS症状的具体机制尚未完全明确,目前提出以下3种主要途径。

2.1 食物的促动力和促胃肠道激素分泌作用 进餐时食物刺激口腔、咽部感受器,反射性引起胃容受性舒张和适应性舒张,小肠和结肠的运动增加^[9],并刺激胃肠道激素分泌,这种生理现象在IBS患者中得到放大,从而产生疼痛感。十二指肠内灌注脂肪后IBS患者较正常对照者结肠敏感性增加,引起内脏疼痛和胀气阈值下降^[10-12]。腹泻型IBS(IBS-D)患者进餐后皮质醇水平显著升高,餐后迷走神经兴奋性较正常对照和便秘型IBS(IBS-C)患者显著升高^[13]。IBS患者摄入水和脂肪之后,胃动素分泌较正常人降低,但胆囊收缩素分泌较正常人群显著延长^[14]。某些食物中含有的生物活性物质(如5-羟色胺及其底物色氨酸)可能会影响胃肠功能,但IBS患者和正常人群在日常菜谱中对这些食物的摄入并无差异^[15]。咖啡因也是改变胃肠道动力和神经内分泌的常见诱因,约30%IBS患者在进食咖啡、茶或巧克力后症状加重^[16],但在日常生活中IBS患者和正常人群在食用上述食物的频率和量方面没有差异^[13]。因此,我们认为IBS患者进餐后的神经、体液内分泌改变可能不是源于食物本身,而是患者对胃肠道激素的调控出现了异常。

2.2 食物不耐受 食物不耐受主要指对食物的非毒性、非免疫性不良反应,包括对食物中生物活性物质的药理反应、对吸收不良的高度发酵性碳水化合物(fermentable oligosaccharides, disaccharides, monosaccharides and polyols, FODMAPs)的代谢反应和酶缺乏导致的食物吸收不良。可能诱发食物不耐受的生物活性物质主要包括水杨酸盐、谷氨酸单钠盐和胺类等^[17],约0.6%IBS患者中对水杨酸盐不耐受^[18],这些患者可能对阿司匹林、非甾体抗炎药以及含有水杨酸盐的食物(例如咖啡、茶、土豆等蔬菜及大多

数水果)产生胃肠道乃至系统性的非变应性超敏反应,导致腹痛、腹泻等症状。流行病学资料显示IBS的发病和镇痛药物的使用相关^[19]。

FODMAPs主要指果糖等单糖、乳糖等双糖、果聚糖和多缩半乳糖等寡糖以及山梨醇等多元醇。给予IBS患者低FODMAPs膳食,并随机间歇性给予为期2 wk不同梯度的果糖、果聚糖膳食,约70%接受果糖、果聚糖膳食的患者出现了IBS症状或原有症状加重,其症状的严重程度和剂量正相关^[20]。结合FODMAPs的性质推测其可能的原因是:FODMAPs多不易被肠道吸收,从而使肠腔内渗透压升高,导致渗透性腹泻;能够迅速被肠道菌群分解、产气,诱发或加重腹胀。因此,果糖、乳糖等对IBS患者的症状诱发和加重可能是肠神经系统对肠道扩张的不适反应。

在西方IBS患者人群中,乳制品是常见饮食诱因之一,乳糖吸收不良在IBS患者的发生率为4%-78%^[21]。亚洲人群中发生率可能更高,印度北部IBS患者中乳糖吸收不良占66%-72%,与当地正常人群相当,IBS的各分型之间无显著性差异^[22]。巴西的一项研究通过对人乳糖酶基因标记C/T_13910和G/A_22018的测定,证实在IBS和正常人群中等位基因和基因型频率没有显著性差异^[23]。因此,乳糖吸收不良可能不是IBS的主要病因,乳糖吸收不良应该成为独立于IBS的诊断,或至少应该对IBS中的乳糖吸收不良患者区别处理。

谷蛋白不耐受(celiac disease),又称乳糜泻,因为缺乏特异性症状往往被诊断为IBS,但血清抗麦胶IgA、IgG抗体、上皮膜抗原抗体(EMA IgA)、抗肌动蛋白抗体(AAA IgA)和抗组织谷氨酰胺转移酶IgA抗体可能有一定标志性^[24]。土耳其的Korkut等^[25]研究发现,在符合罗马III标准诊断的IBS患者中2%上述抗体阳性;我国Wu等^[26]研究指出,IBS-D患者中血清抗麦胶IgG抗体和抗组织谷氨酰胺转移酶IgA抗体的阳性率分别为7.7%和2.6%,这些患者可能从剔除谷蛋白膳食中获益。在德国,IBS患者中HLA-DQ2阳性率为35%^[27],这些患者可能是潜在的谷蛋白不耐受者。另外也有一些所谓的“非乳糜泻的谷蛋白不耐受(non-celiac gluten intolerance)”患者,其症状能够在剔除膳食谷蛋白后得到控制,他们缺乏诊断乳糜泻的客观证据^[28]。因此,谷蛋白不耐受虽然与IBS是2个不同的疾病整体,但由于临床症状的相似和抗体筛查的不普及,在临幊上往往相混杂。

2.3 食物过敏 主要指由于食物中成分或食品添加剂导致的由IgE或非IgE(主要是IgG)介导的消化系统乃至全身的变态反应, 在儿童中发生率为6%-8%, 成人为1%-4%^[29]。在IBS的发病和症状发作中可能起作用的是包括IgE、IgG、T淋巴细胞、肥大细胞和嗜酸性粒细胞在内的一系列黏膜免疫因素介导的慢性、迟发性食物过敏反应, 导致长期轻度炎症刺激和内脏高敏感。目前对食物过敏的检测手段包括皮肤测试、血清抗体检测、结肠镜下变应原刺激试验等, 但最为严格的检查应该是食物剔除。在IBS患者人群中食物剔除试验阳性反应的比例为15%-71%^[30], 但鉴于临床试验数量有限, 食物过敏在IBS中扮演的角色仍有待进一步研究。

2.4 其他可能诱发或加重IBS症状的饮食习惯 Crowell等^[31]指出, 暴食行为能使患IBS相对风险增加2-4倍, 肥胖和IBS发病可能相关, 如加快结肠通过时间, 导致IBS患者排便急迫、排稀软便和排便次数增加^[32]。2007年美国的IBS患者教育需求问卷调查(patients educational needs questionnaire, PEQ)结果显示, 69%IBS患者认为避免暴食有助于缓解腹部症状^[7]。但来自美国明尼苏达州的流行病学调查资料未能证实暴食与IBS的关系^[13]。

3 饮食对IBS治疗的作用

目前主要研究的饮食调整治疗包括以下几方面。

3.1 食物剔除治疗 Atkinson等^[33]在2004年进行的一项随机双盲对照临床试验纳入150例IBS患者, 根据食物特异性IgG检测结果随机给予食物剔除方案和“假方案”, 结果显示“真方案”能够显著改善患者腹部症状和全身症状, 而重新摄入“致敏食物”后症状恶化。Drisko等^[34]的研究完善评估了食物剔除治疗IBS的有效性: 患者通过食物特异性IgG检测制定个体化的剔除方案并试用3-4 wk, 随后添加“致敏食物”, 证实其致敏作用并修正剔除方案, 并在第2个月起补充益生菌, 治疗干预阶段为期6 mo, 随访时间1年, 结果显示: 6 mo后患者的血清IgG水平显著下降, 排便频率、腹痛症状及IBS生活质量评分(IBS quality of life, IBS-QOL)显著改善, 肠道微生物菌群有改善趋势; 随访结果显示, 患者IBS症状发作频率有所减少, 发作时症状严重程度有所减轻, 食物剔除方案能够被患者接受。

食物引起IBS症状的机制途径不只是IgG介导的超敏反应, 完全依照IgG检测结果制定剔

除方案仍有争议。低FODMAPs膳食旨在总体性减少FODMAPs的摄入, 而不是片面禁止某些食物的摄取, 通过营养师推荐的个体化食谱, 适当减少FODMAPs摄入的同时, 增加葡萄糖等的摄入, 平衡摄入的碳水化合物构成。单纯限制果糖和/或甘露醇的若干临床试验均证实了其对IBS症状控制的作用, 62名果糖氢呼气试验阳性的IBS患者, 调整膳食方案并平均随访14 mo, 74%患者腹部症状缓解, 能够坚持膳食调整的患者中有85%获益, 显著高于不能坚持者(36%)^[35]。

IBS症状发作期与缓解期对食物的耐受性也有所不同, 所采取的饮食方案也应有所区别。食物剔除治疗的缺陷在于平均要对每个患者剔除6-7种食物, 有时患者较难接受, 且长期的饮食控制对患者生活质量、营养状况可能产生不良影响。37.7%IBS患者认为IBS可能导致营养不良^[7], 但没有证据表明IBS患者和一般人群之间存在体质指数(body mass index, BMI)的差异, IBS患者每日能量、蛋白质和维生素的摄入与正常人群无显著性差异^[13]。IBS患者中少有营养不良, 但IBS患者症状发作时他们往往倾向于控制饮食, 而食物剔除治疗更迫使他们选择营养“不均衡饮食”。Maudgal等^[36]的研究发现, IBS患者中视黄醇结合蛋白(retinol-binding protein, RBP)和甲状腺素结合前白蛋白(thyroxine-binding pre-albumin, TBPA)的显著降低, 这意味着IBS患者可能存在亚临床蛋白营养不良。因此, 在临床通过大规模地控制患者食物摄入种类来控制症状, 一方面可能加重IBS患者生活质量的下降, 另一方面也加重患者潜在的营养摄入不均衡乃至营养不良。我们建议, 结合现有的食物特异性IgG检测及呼气氢检测, 通过个体化的膳食症状日记发现明确的“致敏食物”并加以限制, 在达到控制症状同时最小限度地干预患者生活习惯、提高生活质量, 纠正营养摄入不均衡。

3.2 添加特殊饮食成分 在临床工作中, IBS患者往往希望能得到推荐、了解能够缓解IBS症状的饮食, 不过这方面的研究起步较缓, 由于食物的特殊性, 严格的双盲安慰剂对照临床试验较难开展, 目前尚未形成指南类的共识。下文总结了近期临床试验的食物或食物成分。

3.2.1 膳食纤维: 指由非淀粉多糖组成的不可消化的食物成分, 多来自于植物, 包括不可溶性(小麦、玉米等具有代谢惰性的谷物纤维)和可溶性纤维(来自大豆及根茎作物, 可以被结肠内菌群稳定分解)。膳食纤维显著增加肠腔内粪便

■创新盘点
本文主要就饮食因素在IBS的发病, 和治疗对IBS-食物相互作用进行论述, 概括总结了饮食因素诱发或加重IBS症状的不同机制, 将饮食干预IBS的临床证据进行阐述, 在复习基础的同时展现了最新的研究成果。

■名词解释

FODMAP: 可发酵的单糖、双糖、寡糖或多聚糖等，在IBS和炎症性肠病(IBD)患者中，都可通过限制FODMAP的摄入取得症状缓解。

体积和含水量，缩短胃肠通过时间，对慢性便秘(包括IBS-C)的治疗作用已得到公认^[37]。荟萃分析发现以欧车前子(ispaghula)为代表的可溶性膳食纤维对改善IBS的排便、腹痛以及全身症状明显有效，以麦麸为代表的不可溶膳食纤维对IBS的疗效与安慰剂无显著性差异^[38]。以可溶性膳食纤维瓜尔胶制作的部分水化瓜尔胶(partially hydrolyzed guar gum, PHGG)作为食品添加剂，其可通过润滑肠道、增加粪便体积来改善IBS-C的症状；在IBS-D患者，其可吸收结直肠多余水分，维持粪便连续性。他和他的代谢产物可作为益生元促进双歧杆菌、嗜酸乳杆菌等益生菌生长，从而减轻IBS患者的腹痛和腹胀感。在一项包括IBS-C和IBS-D的多中心开放试验中，患者随机分组，分别给予30 g/d小麦纤维素和5 g/d PHGG，1 mo后两组患者可以自由更换治疗方案，治疗共12 wk，结果显示PHGG能够显著改善排便习惯、腹痛症状和综合评分，且耐受性较好^[39]。因此英国胃肠病学会建议：当需要使用膳食纤维治疗IBS时，推荐选用可溶性纤维^[40]。

3.2.2 益生菌及益生元：IBS患者存在小肠细菌过度生长(small intestinal bacteria overgrowth, SIBO)^[41]和肠道菌群异常，主要表现为乳酸杆菌、双歧杆菌减少。在IBS患者中，乳果糖呼气试验阳性率54%，葡萄糖呼气试验阳性率31%，空肠吸取物细菌培养阳性率为4%，均较正常人群升高($OR = 3.45, 95\%CI: 0.9-12.7$)^[42]。肠道菌群异常可通过慢性炎症应激、细菌发酵产气等机制导致动力异常、内脏敏感性增高、肠道运动感觉功能和通透性的改变以及精神症状等^[43]，从而诱发或加重IBS症状。

益生菌通过改善宿主微生态平衡而发挥有益作用，对人类来讲主要是乳酸杆菌、双歧杆菌、放线菌、酵母菌等。补充的益生菌竞争性与肠黏膜上皮结合，抑制病原微生物的吸附，增强黏膜功能；酸化肠腔改善发酵，减少产气；改善局部应激，免疫调节以及降低内脏高敏感等，在许多胃肠道疾病中起到治疗作用^[44]。Moayyedi等^[45]在系统性回顾了19篇有关益生菌治疗IBS的随机对照临床试验后指出，益生菌在改善IBS患者总体症状方面优于安慰剂，对腹痛的缓解效果也明显高于安慰剂。婴儿双歧杆菌35624(*Bifidobacterium infantis* 35624)和乳酸双歧杆菌DN-173-010(*Bifidobacterium lactis* DN-173-010)较其他益生菌疗效稍好。复合制剂与单个菌种之间的疗效差别尚无定论^[46]。

益生元是不被消化的食品成分，通过选择性刺激某些细菌的生长与活性来调节益生菌生长，以间接改善IBS症状。部分益生元可在结肠发酵产气，归入FODMAPs范畴，也可归入膳食纤维范畴，因此在益生元的选择上有必要平衡促益生菌生长作用和发酵产气的不良反应，使患者更好地耐受。在健康志愿者，不同浓度梯度的短链低聚果糖(short chain fructo-oligosaccharides, scFOS)能显著增加双歧杆菌浓度，且7.5 g/d和10 g/d用量的不良反应与安慰剂组无显著性差异^[47]。PHGG作为益生元，能够显著增加粪便中益生菌的代谢产物-短链脂肪酸的含量^[48]。

3.2.3 其他：随机双盲临床试验显示，为期4 wk的薄荷油治疗能够显著缓解IBS患者腹部症状优于安慰剂^[38]。非随机双盲对照临床试验结果显示，姜提取物^[49]和朝鲜蓟叶子提取物^[50]均能够显著缓解IBS整体症状，前者能够显著改善IBS-QOL评分，后者能够显著改善IBS患者排便状况。其疗效和机制需要进一步研究证实。

4 结论

饮食因素在IBS症状的发作和加重中起到一定作用，其作用机制尚未完全阐明且个体差异大。饮食调整治疗能够帮助控制IBS症状，通过食物特异性IgG检测制定的食物剔除方案、低FODMAPs饮食、可溶性纤维和益生菌的添加等均取得了一定的临床证据，为IBS患者的个体化饮食治疗提供了可行性。

5 参考文献

- Drossman DA. 功能性胃肠病和罗马III制定. 北京: 科学出版社, 2008: 456-589
- Liu J, Hou X. A review of the irritable bowel syndrome investigation on epidemiology, pathogenesis and pathophysiology in China. *J Gastroenterol Hepatol* 2011; 26 Suppl 3: 88-93
- Hungin AP, Chang L, Locke GR, Dennis EH, Barghout V. Irritable bowel syndrome in the United States: prevalence, symptom patterns and impact. *Aliment Pharmacol Ther* 2005; 21: 1365-1375
- Ragnarsson G, Bodemar G. Pain is temporally related to eating but not to defaecation in the irritable bowel syndrome (IBS). Patients' description of diarrhea, constipation and symptom variation during a prospective 6-week study. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1998; 10: 415-421
- Heizer WD, Southern S, McGovern S. The role of diet in symptoms of irritable bowel syndrome in adults: a narrative review. *J Am Diet Assoc* 2009; 109: 1204-1214
- Gwee KA, Lu CL, Ghoshal UC. Epidemiology of irritable bowel syndrome in Asia: something old, something new, something borrowed. *J Gastroenterol Hepatol* 2009; 24: 1601-1607

- 7 Halpert A, Dalton CB, Palsson O, Morris C, Hu Y, Bangdiwala S, Hankins J, Norton N, Drossman D. What patients know about irritable bowel syndrome (IBS) and what they would like to know. National Survey on Patient Educational Needs in IBS and development and validation of the Patient Educational Needs Questionnaire (PEQ). *Am J Gastroenterol* 2007; 102: 1972-1982
- 8 Gwee KA, Bak YT, Ghoshal UC, Gonlachanvit S, Lee OY, Fock KM, Chua AS, Lu CL, Goh KL, Kositchaiwat C, Makharia G, Park HJ, Chang FY, Fukudo S, Choi MG, Bhatia S, Ke M, Hou X, Hong M. Asian consensus on irritable bowel syndrome. *J Gastroenterol Hepatol* 2010; 25: 1189-1205
- 9 周昌. 胃肠动力的生理与病理生理. 中国实用儿科杂志 2000; 15: 392-395
- 10 Salvioli B, Serra J, Azpiroz F, Malagelada JR. Impaired small bowel gas propulsion in patients with bloating during intestinal lipid infusion. *Am J Gastroenterol* 2006; 101: 1853-1857
- 11 Simrén M, Abrahamsson H, Björnsson ES. Lipid-induced colonic hypersensitivity in the irritable bowel syndrome: the role of bowel habit, sex, and psychologic factors. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2007; 5: 201-208
- 12 Caldarella MP, Milano A, Laterza F, Sacco F, Balatsinou C, Lapenna D, Pierdomenico SD, Cuccurullo F, Neri M. Visceral sensitivity and symptoms in patients with constipation- or diarrhea-predominant irritable bowel syndrome (IBS): effect of a low-fat intraduodenal infusion. *Am J Gastroenterol* 2005; 100: 383-389
- 13 Elsenbruch S, Orr WC. Diarrhea- and constipation-predominant IBS patients differ in postprandial autonomic and cortisol responses. *Am J Gastroenterol* 2001; 96: 460-466
- 14 Sjölund K, Ekman R, Lindgren S, Rehfeldt JF. Disturbed motilin and cholecystokinin release in the irritable bowel syndrome. *Scand J Gastroenterol* 1996; 31: 1110-1114
- 15 Saito YA, Locke GR, Weaver AL, Zinsmeister AR, Talley NJ. Diet and functional gastrointestinal disorders: a population-based case-control study. *Am J Gastroenterol* 2005; 100: 2743-2748
- 16 Simrén M, Måansson A, Langkilde AM, Svedlund J, Abrahamsson H, Bengtsson U, Björnsson ES. Food-related gastrointestinal symptoms in the irritable bowel syndrome. *Digestion* 2001; 63: 108-115
- 17 Gibson PR. Food intolerance in functional bowel disorders. *J Gastroenterol Hepatol* 2011; 26 Suppl 3: 128-131
- 18 Raithel M, Baenkler HW, Naegel A, Buchwald F, Schultis HW, Backhaus B, Kimpel S, Koch H, Mach K, Hahn EG, Konturek PC. Significance of salicylate intolerance in diseases of the lower gastrointestinal tract. *J Physiol Pharmacol* 2005; 56 Suppl 5: 89-102
- 19 Locke GR, Zinsmeister AR, Talley NJ, Fett SL, Melton LJ. Risk factors for irritable bowel syndrome: role of analgesics and food sensitivities. *Am J Gastroenterol* 2000; 95: 157-165
- 20 Shepherd SJ, Parker FC, Muir JG, Gibson PR. Dietary triggers of abdominal symptoms in patients with irritable bowel syndrome: randomized placebo-controlled evidence. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2008; 6: 765-771
- 21 Farup PG, Monsbakken KW, Vandvik PO. Lactose malabsorption in a population with irritable bowel syndrome: prevalence and symptoms. A case-control study. *Scand J Gastroenterol* 2004; 39: 645-649
- 22 Gupta D, Ghoshal UC, Misra A, Misra A, Choudhuri G, Singh K. Lactose intolerance in patients with irritable bowel syndrome from northern India: a case-control study. *J Gastroenterol Hepatol* 2007; 22: 2261-2265
- 23 Bernardes-Silva CF, Pereira AC, de Fátima Alves da Mota G, Krieger JE, Laudanna AA. Lactase persistence/non-persistence variants, C/T_13910 and G/A_22018, as a diagnostic tool for lactose intolerance in IBS patients. *Clin Chim Acta* 2007; 386: 7-11
- 24 李慕然, 刘艳迪, 李文. 乳糜泻临床研究进展. 世界华人消化杂志 2011; 19: 2053-2057
- 25 Korkut E, Bektaş M, Oztas E, Kurt M, Cetinkaya H, Ozden A. The prevalence of celiac disease in patients fulfilling Rome III criteria for irritable bowel syndrome. *Eur J Intern Med* 2010; 21: 389-392
- 26 Wu J, Xia B, von Blomberg BM, Zhao C, Yang XW, Crusius JB, Peña AS. Coeliac disease in China, a field waiting for exploration. *Rev Esp Enferm Dig* 2010; 102: 472-477
- 27 Wahnschaffe U, Ullrich R, Riecken EO, Schulzke JD. Celiac disease-like abnormalities in a subgroup of patients with irritable bowel syndrome. *Gastroenterology* 2001; 121: 1329-1338
- 28 Biesiekierski JR, Newham ED, Irving PM, Barrett JS, Haines M, Doecke JD, Shepherd SJ, Muir JG, Gibson PR. Gluten causes gastrointestinal symptoms in subjects without celiac disease: a double-blind randomized placebo-controlled trial. *Am J Gastroenterol* 2011; 106: 508-514; quiz 515
- 29 Sicherer SH, Sampson HA. Food allergy: recent advances in pathophysiology and treatment. *Annu Rev Med* 2009; 60: 261-277
- 30 Niec AM, Frankum B, Talley NJ. Are adverse food reactions linked to irritable bowel syndrome? *Am J Gastroenterol* 1998; 93: 2184-2190
- 31 Crowell MD, Cheskin LJ, Musial F. Prevalence of gastrointestinal symptoms in obese and normal weight binge eaters. *Am J Gastroenterol* 1994; 89: 387-391
- 32 Sadik R, Björnsson E, Simrén M. The relationship between symptoms, body mass index, gastrointestinal transit and stool frequency in patients with irritable bowel syndrome. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2010; 22: 102-108
- 33 Atkinson W, Sheldon TA, Shaath N, Whorwell PJ. Food elimination based on IgG antibodies in irritable bowel syndrome: a randomised controlled trial. *Gut* 2004; 53: 1459-1464
- 34 Drisko J, Bischoff B, Hall M, McCallum R. Treating irritable bowel syndrome with a food elimination diet followed by food challenge and probiotics. *J Am Coll Nutr* 2006; 25: 514-522
- 35 Shepherd SJ, Gibson PR. Fructose malabsorption and symptoms of irritable bowel syndrome: guidelines for effective dietary management. *J Am Diet Assoc* 2006; 106: 1631-1639
- 36 Maudgal DP, Ang LT, Maxwell JD. Subclinical protein malnutrition in irritable bowel syndrome: assessment by retinol-binding protein (RBP) and thyroxine-binding pre-albumin (TBPA). *Hum Nutr Clin Nutr* 1983; 37: 37-41
- 37 Singh S, Rao SS. Pharmacologic management of chronic constipation. *Gastroenterol Clin North Am* 2010; 39: 509-527
- 38 Ford AC, Talley NJ, Spiegel BM, Foxx-Orenstein AE, Schiller L, Quigley EM, Moayyedi P. Effect of

■同行评价

本文选题新颖, 贴近临床, 反应了IBS饮食治疗的前沿观点, 对于指导IBS的饮食治疗有很重要的临床意义.

- 39 fibre, antispasmodics, and peppermint oil in the treatment of irritable bowel syndrome: systematic review and meta-analysis. *BMJ* 2008; 337: a2313
- 40 Parisi GC, Zilli M, Miani MP, Carrara M, Bottone E, Verdianelli G, Battaglia G, Desideri S, Faedo A, Marzolini C, Tonon A, Errmani M, Leandro G. High-fiber diet supplementation in patients with irritable bowel syndrome (IBS): a multicenter, randomized, open trial comparison between wheat bran diet and partially hydrolyzed guar gum (PHGG). *Dig Dis Sci* 2002; 47: 1697-1704
- 41 National Collaborating Centre for Nursing and Supportive Care (UK). Irritable Bowel Syndrome in Adults: Diagnosis and Management of Irritable Bowel Syndrome in Primary Care [Internet]. London: Royal College of Nursing (UK); 2008
- 42 Ghoshal UC, Kumar S, Mehrotra M, Lakshmi C, Misra A. Frequency of small intestinal bacterial overgrowth in patients with irritable bowel syndrome and chronic non-specific diarrhea. *J Neurogastroenterol Motil* 2010; 16: 40-46
- 43 Ford AC, Spiegel BM, Talley NJ, Moayyedi P. Small intestinal bacterial overgrowth in irritable bowel syndrome: systematic review and meta-analysis. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2009; 7: 1279-1286
- 44 舒小闯, 王少东, 汪芳裕. 肠易激综合征与肠道细菌关系的研究进展. 世界华人消化杂志 2011; 19: 1808-1812
- 45 Bouhnik Y, Raskine L, Simoneau G, Paineau D, Borneret F. The capacity of short-chain fructo-oligosaccharides to stimulate faecal bifidobacteria: a dose-response relationship study in healthy humans. *Nutr J* 2006; 5: 8
- 46 Tuohy KM, Kolida S, Lustenberger AM, Gibson GR. The prebiotic effects of biscuits containing partially hydrolysed guar gum and fructo-oligosaccharides—a human volunteer study. *Br J Nutr* 2001; 86: 341-348
- 47 Bundy R, Walker AF, Middleton RW, Booth J. Turmeric extract may improve irritable bowel syndrome symptomatology in otherwise healthy adults: a pilot study. *J Altern Complement Med* 2004; 10: 1015-1018
- 48 Bundy R, Walker AF, Middleton RW, Marakis G, Booth JC. Artichoke leaf extract reduces symptoms of irritable bowel syndrome and improves quality of life in otherwise healthy volunteers suffering from concomitant dyspepsia: a subset analysis. *J Altern Complement Med* 2004; 10: 667-669
- 49 消化杂志 2011; 19: 1813-1818
- 50 Moayyedi P, Ford AC, Talley NJ, Cremonini F, Foxx-Orenstein AE, Brandt LJ, Quigley EM. The efficacy of probiotics in the treatment of irritable bowel syndrome: a systematic review. *Gut* 2010; 59: 325-332
- 51 Whorwell PJ. Do probiotics improve symptoms in patients with irritable bowel syndrome? *Therap Adv Gastroenterol* 2009; 2: 37-44
- 52 Bouhnik Y, Raskine L, Simoneau G, Paineau D, Borneret F. The capacity of short-chain fructo-oligosaccharides to stimulate faecal bifidobacteria: a dose-response relationship study in healthy humans. *Nutr J* 2006; 5: 8
- 53 Tuohy KM, Kolida S, Lustenberger AM, Gibson GR. The prebiotic effects of biscuits containing partially hydrolysed guar gum and fructo-oligosaccharides—a human volunteer study. *Br J Nutr* 2001; 86: 341-348
- 54 Bundy R, Walker AF, Middleton RW, Booth J. Turmeric extract may improve irritable bowel syndrome symptomatology in otherwise healthy adults: a pilot study. *J Altern Complement Med* 2004; 10: 1015-1018
- 55 Bundy R, Walker AF, Middleton RW, Marakis G, Booth JC. Artichoke leaf extract reduces symptoms of irritable bowel syndrome and improves quality of life in otherwise healthy volunteers suffering from concomitant dyspepsia: a subset analysis. *J Altern Complement Med* 2004; 10: 667-669

编辑 张姗姗 电编 鲁亚静

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

• 消息 •

《世界华人消化杂志》参考文献要求

本刊讯 本刊采用“顺序编码制”的著录方法, 即以文中出现顺序用阿拉伯数字编号排序。提倡对国内同行近年已发表的相关研究论文给予充分的反映, 并在文内引用处右上角加方括号注明角码。文中如列作者姓名, 则需在“Pang等”的右上角注角码号; 若正文中仅引用某文献中的论述, 则在该论述的句末右上角注码号。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, 出版社, 年, 起页-止页。

As₂O₃联合Aspirin对诱导肝癌细胞凋亡的影响

郝立晓, 刘铁夫

郝立晓, 刘铁夫, 哈尔滨医科大学第四附属医院消化内科 黑龙江省哈尔滨市 150001

作者贡献分布: 实验设计由刘铁夫完成; 肝癌细胞培养、药物干预及细胞周期、凋亡、抑制率的检测由郝立晓操作完成; 数据统计分析由郝立晓完成; 郝立晓与刘铁夫共同完成论文撰写。

通讯作者: 刘铁夫, 主任医师, 150001, 黑龙江省哈尔滨市, 哈尔滨市第四附属医院消化内科. liutiefuydsy@126.com

电话: 0451-82576696

收稿日期: 2012-03-03 修回日期: 2012-04-30

接受日期: 2012-06-01 在线出版日期: 2012-06-18

Aspirin enhances arsenic trioxide-induced apoptosis of hepatocarcinoma cells

Li-Xiao Hao, Tie-Fu Liu

Li-Xiao Hao, Tie-Fu Liu, Department of Gastroenterology, the Fourth Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150001, Heilongjiang Province, China

Correspondence to: Tie-Fu Liu, Chief Physician, Department of Gastroenterology, the Fourth Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150001, Heilongjiang Province, China. liutiefuydsy@126.com

Received: 2012-03-03 Revised: 2012-04-30

Accepted: 2012-06-01 Published online: 2012-06-18

Abstract

AIM: To investigate the effect of aspirin combined with arsenic trioxide (As₂O₃) on human hepatocarcinoma cell line Bel-7402 and to explore the possible mechanisms involved.

METHODS: Cultured Bel-7402 cells were incubated with different concentrations of aspirin and As₂O₃, alone or in combination. After treatment, cell morphology was observed using an inverted microscope, cell proliferation was determined by MTT assay, cell apoptosis was measured by flow cytometry with annexin V/propidium iodide staining, and cell cycle progression was analyzed by fluorescence-activated cell sorting.

RESULTS: As₂O₃ and aspirin showed different degrees of inhibitory effect on the growth of Bel-7402 cells, and both were concentration-dependent. The two drugs had a synergistic effect, and the inhibitory effect in the combination group was more significant than those in the

two monotherapy groups (both $P < 0.05$). Compared to treatment with 2.0 $\mu\text{mol/L}$ As₂O₃ alone, treatment with 2.0 $\mu\text{mol/L}$ As₂O₃ combined with 0.2 mmol/L aspirin significantly increased the apoptosis rate ($5.64\% \pm 0.56\%$ vs $7.35\% \pm 0.62\%$, $P < 0.05$), decreased the percentage of cells in G₁ phase ($0.52\% \pm 0.64\%$ vs $32.03\% \pm 0.97\%$), and increased the percentages of cells in G₂ phase or S phase ($9.57\% \pm 0.82\%$ vs $13.66\% \pm 0.82\%$, $50.41\% \pm 0.32\%$ vs $54.37\% \pm 0.69\%$).

CONCLUSION: Aspirin enhances As₂O₃-induced apoptosis of Bel-7402 cells possibly by altering cell cycle progression.

Key Words: Arsenic trioxide; Aspirin; Hepatocarcinoma; Apoptosis; Cell cycle

Hao LX, Liu TF. Aspirin enhances arsenic trioxide-induced apoptosis of hepatocarcinoma cells. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2012; 20(17): 1537-1541

摘要

目的: 观察As₂O₃与Aspirin联合应用对肝癌细胞Bel-7402的影响, 并探讨其作用机制。

方法: 体外培养肝癌Bel-7402细胞, Aspirin、As₂O₃不同浓度孵育细胞。倒置显微镜观察细胞形态学改变, 四甲基偶氮唑蓝(MTT)法检测As₂O₃和Aspirin单独及联合应用对Bel-7402细胞增殖情况的影响, 流式细胞术观察细胞凋亡情况, 并通过流式软件分析细胞周期变化。

结果: As₂O₃及Aspirin对肝癌Bel-7402细胞生长均呈不同程度的抑制, 且呈浓度依赖性。二者联合具有协同作用, 药物联用组抑制率均显著高于单独应用同等剂量As₂O₃组和Aspirin组($P < 0.05$)。2.0 $\mu\text{mol/L}$ As₂O₃与0.2 mmol/L Aspirin联用组与2.0 $\mu\text{mol/L}$ As₂O₃单药组相比, 凋亡率从 $5.64\% \pm 0.56\%$ 提高到 $7.35\% \pm 0.62\%$, 差异具有统计学意义($P < 0.05$)。且通过对两组细胞周期检测发现, G₁期细胞从 $40.52\% \pm 0.64\%$ 下降到 $32.03\% \pm 0.97\%$, G₂期及S期细胞分别从 $9.57\% \pm 0.82\%$ 、 $50.41\% \pm 0.32\%$ 上升到 $13.66\% \pm 0.82\%$ 、 $54.37\% \pm 0.69\%$, Aspirin能显著增强As₂O₃诱导细胞集中

■背景资料

As₂O₃是中药砒霜的主要成分, 早在20世纪70年代, 哈尔滨医科大学就已用它治疗急性早幼粒性白血病(APL), 并取得可喜成就, 随之关于其治疗实体瘤的研究接踵而至, 然而其有较强的毒性和致畸作用, 本实验旨在为实现As₂O₃低毒高效抗肝癌作用进行研究。

■同行评议者

黄缘, 教授, 南昌大学第二附属医院消化内科, 江西省分子医学重点实验室

■研发前沿

As_2O_3 治疗实体瘤疗效确切,但其抗癌效力呈剂量-时间效应关系,所以如何实现其低毒高效的抗癌效力一直备受关注。近年来联合用药引起关注,包括与常规化疗药、中药等联合,寻求与其具有协同抗癌作用且不良反应小的药物值得深入研究。

于S及G₂期的作用,从而增强其促凋亡作用。

结论: Aspirin能增强 As_2O_3 诱导细胞凋亡的作用,该作用可能与影响细胞周期有关。

关键词: 三氧化二砷; 阿司匹林; 肝癌; 细胞凋亡; 细胞周期

郝立晓, 刘铁夫. As_2O_3 联合Aspirin对诱导肝癌细胞凋亡的影响. 世界华人消化杂志 2012; 20(17): 1537-1541

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/1537.asp>

0 引言

As_2O_3 是中药砒霜的主要成分,早在20世纪70年代,哈尔滨医科大学就已用它治疗急性早幼粒细白血病(*acute promyelocytic leukemia, APL*),取得可喜成就^[1]。这一成就引起世人关注,随之关于其治疗实体瘤的研究接踵而至。秦叔逵等^[2]在国内外最早报道用于临床治疗原发性肝癌,开创了亚砷酸对肝癌治疗研究的先河。随着我们对 As_2O_3 治疗肝癌研究的深入,认识到 As_2O_3 的抗癌效力呈剂量-时间效应关系,Cai等^[3]报道 As_2O_3 10 mg/d治疗肝功能正常的APL复发患者47例,2 wk后1/3的患者出现肝损害,7例表现为肝中毒,说明以 As_2O_3 治疗肝功能已受损的肝癌患者可能需要选择更小剂量。所以,如何应用低剂量的 As_2O_3 达到高效率抗肿瘤的目的成为医学界的一大难题,于是研究者们想到了联合用药。本研究初步探讨 As_2O_3 与Aspirin联合应用在诱导肝癌细胞Bel-7402凋亡的协同作用。

1 材料和方法

1.1 材料 肝癌细胞株Bel-7402由东北师范大学遗传与细胞研究所朱筱娟教授馈赠。 As_2O_3 及Aspirin肠溶片购自本院。

1.2 方法

1.2.1 细胞系及培养: 细胞株置于37 °C、50 mL/L CO₂培养箱中,用含100 mL/L小牛血清DMEM培养液培养,每24 h更换培养液1次,隔天传代1次,取传代后2 d处于对数生长期细胞用于实验。

1.2.2 细胞形态观察: 取对数生长期Bel-7402细胞,0.25%胰酶消化,调整细胞浓度为 $4 \times 10^5/\text{mL}$,接种于灭菌6孔板,每孔2 mL。实验分为空白对照组,0.4 mmol/L Aspirin处理组、4 μmol As_2O_3 处理组。作用24 h后,收集细胞,倒置显微镜观察细胞形态变化。

1.2.3 MTT法测细胞抑制率: 实验设阴性对照

组,不同浓度 As_2O_3 组(终浓度分别为4.0、2.0、1.0 μmol/L)、Aspirin组(终浓度为0.4 mmol/L、0.2 mmol/L、0.1 mmol/L)、药物联用组(As_2O_3 浓度为4.0、2.0、1.0 μmol/L与Aspirin浓度为0.4 mmol/L、0.2 mmol/L、0.1 mmol/L分别组合)。取对数生长期的Bel-7402细胞制成每毫升含 5×10^3 个细胞的悬液,加入96孔培养板中,每孔200 μL,培养24 h后各组分别加入相应药物,每个剂量设3个平行孔。50 mL/L CO₂培养箱中培养至24 h,取出96孔板,吸出液体,在每孔中加入无血清培养基180 μL和0.5%MTT 20 μL后继续培养4 h,弃上清液,再加入二甲亚砜(DMSO)150 μL,微量震荡约10 min,于自动酶标仪490 nm处测定各孔吸光度(A值),重复3次,求平均值。抑制率(%) = (阴性对照组A值-实验组A值)/阴性对照组A值 × 100%。

1.2.4 流式细胞术: 实验设阴性对照组、 As_2O_3 组(4.0 μmol/L、2.0 μmol/L)、Aspirin组(0.4 mmol/L)、联用组(2.0 μmol/L As_2O_3 +0.2 mmol/L Aspirin)。给药培养至24 h,用0.25%胰酶将各组细胞消化下来,用磷酸盐缓冲液(PBS)漂洗2次,调整细胞浓度,加碘化丙啶(PI),暗处作用30 min,用流式细胞仪检测并分析结果。

统计学处理 实验结果采用SPSS13.0统计软件进行分析。计量资料以mean±SD来表示。配对组间比较采用样本t检验,多组件比较采用方差分析。

2 结果

2.1 细胞形态观察 空白对照组细胞呈梭形,形态均一,贴壁良好,透光性强。 As_2O_3 及Aspirin处理组细胞贴壁能力明显减弱,细胞变圆变小,大小不一,数量减少。

2.2 MTT法检测对肝癌细胞的抑制作用 不同浓度的 As_2O_3 组(4.0 μmol/L、2.0 μmol/L、1.0 μmol/L)以及Aspirin组(0.4 mmol/L、0.2 mmol/L、0.1 mmol/L),对细胞生长均呈不同程度的抑制,并且呈浓度依赖性,药物联用组(As_2O_3 浓度为4.0 μmol/L、2.0 μmol/L、1.0 μmol/L与Aspirin浓度为0.4 mmol/L、0.2 mmol/L、0.1 mmol/L)抑制率均显著高于单独应用同等剂量 As_2O_3 组和Aspirin组($P < 0.05$,表1)。

2.3 流式细胞仪检测Annexin-V/PI检测细胞凋亡 细胞膜不对称丧失导致磷脂酰丝氨酸(phosphatidyl serine, PS)外翻发生在细胞凋亡的早期。Annexin-V可以特异地与PS结合,而被用来检测

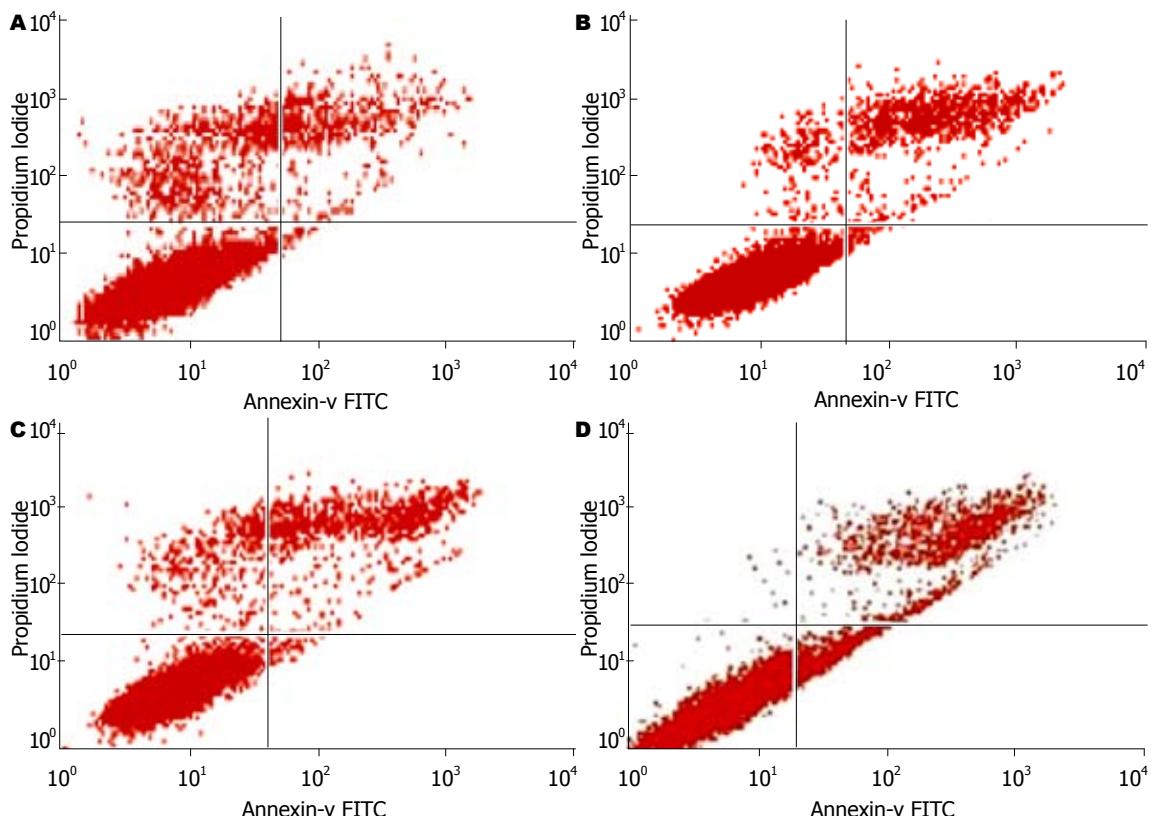
■相关报道
As₂O₃与Aspirin能抑制多系统肿瘤生长,二者单独抗肝癌以及协同抗胃癌疗效已为研究者证实,但二者联合治疗肝癌至今尚未有人研究。

表 1 不同浓度As₂O₃及Aspirin单独及联合应用对肝癌Bel-7402细胞增殖的抑制 (mean ± SD, %)

Aspirin(mmol/L)	As ₂ O ₃ (μmol/L)			
	0	1	2	4
0	4.51 ± 0.02	5.67 ± 0.12	7.68 ± 0.17	11.30 ± 0.31
0.1	4.83 ± 0.01	6.26 ± 0.13	8.37 ± 0.13	12.45 ± 0.31
0.2	5.54 ± 0.10	7.62 ± 0.26	9.48 ± 0.17	14.33 ± 0.90
0.4	6.68 ± 0.13	8.76 ± 0.17	10.30 ± 0.30	16.48 ± 0.36

表 2 不同浓度As₂O₃及Aspirin对Bel-7402细胞凋亡率及细胞周期的影响

分组	凋亡率(%)	细胞周期(%)		
		G ₁	G ₂	S
对照组	3.94 ± 0.40	46.11 ± 0.69	8.44 ± 0.56	45.45 ± 0.834
4 μmol/L As ₂ O ₃	8.32 ± 0.82	29.70 ± 0.86	14.62 ± 0.84	56.68 ± 0.74
0.4 mmol/L Aspirin	6.74 ± 0.786	33.93 ± 1.23	11.64 ± 0.64	53.44 ± 0.36
联合组	7.35 ± 0.62	32.03 ± 0.97	13.66 ± 0.82	54.37 ± 0.69
2 μmol/L As ₂ O ₃	5.64 ± 0.56	40.52 ± 0.64	9.57 ± 0.82	50.41 ± 0.32

图 1 Bel-7402细胞凋亡情况. A: 对照组; B: 联合用药组; C: 0.4 mmol/L Aspirin组; D: 4 μmol/L As₂O₃.

暴露在细胞表面的PS。用PI可以区分膜的完整性。药物联用组(2.0 μmol/L As₂O₃+0.2 mmol/L Aspirin)处理Bel-7402细胞后凋亡细胞群与对照组及单用As₂O₃组(2.0 μmol/L)有显著性差异($P<0.05$, 图1, 表2)。细胞周期分析可知As₂O₃主要诱导细胞的S及G₂期细胞凋亡, Aspirin显著增强了As₂O₃诱导细

胞集中于S及G₂期的作用(图2, 表2)。

3 讨论

As₂O₃中药名砒霜, 最早用于治疗APL, 新近研究发现, 他对其他多系统肿瘤均具有抑制作用, 主要机制集中在诱导肿瘤细胞凋亡^[4,5]。其诱导

■应用要点

本研究发现As₂O₃与Aspirin具有协同抗肝癌作用, 可同时降低两药用量, 实现了As₂O₃的低毒高效抗癌作用, 为临床制定科学有效的化疗方案提供了实验及理论依据。

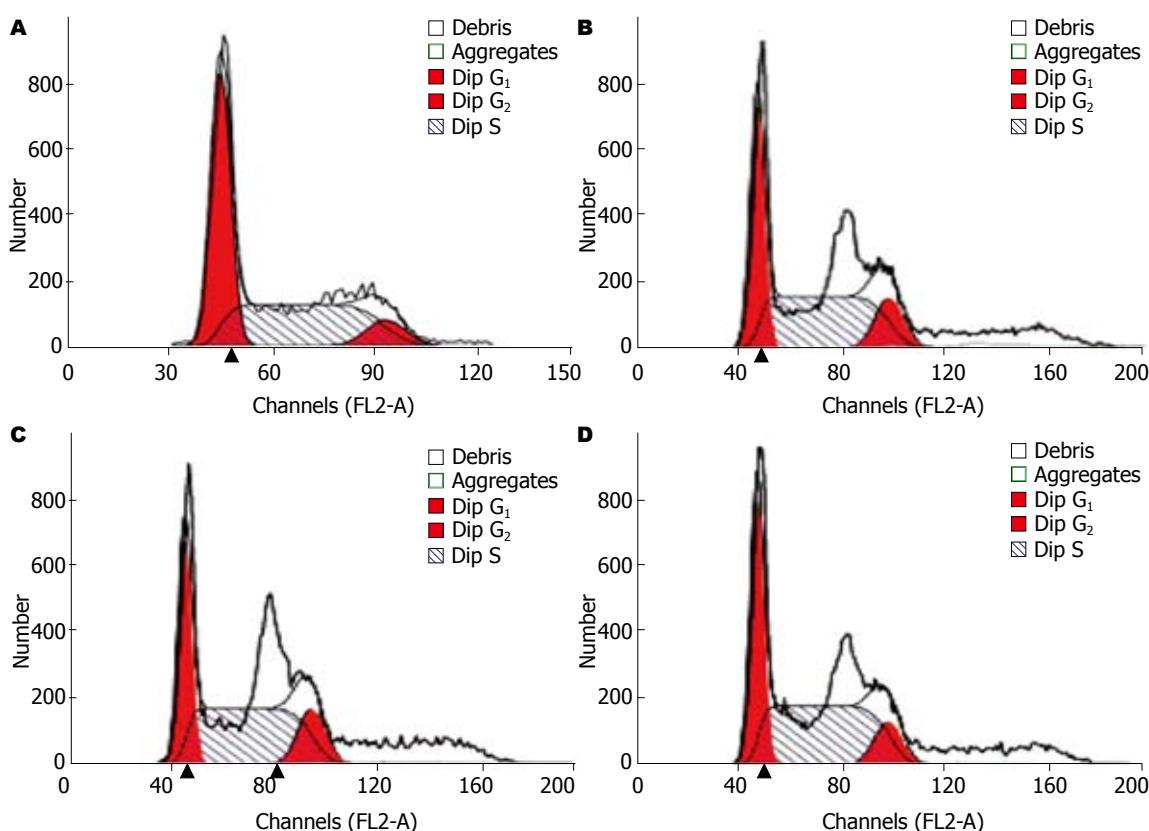


图 2 Bel-7402细胞周期情况. A: 对照组; B: 0.4 mmol/L Aspirin组; C: 4.0 μmol/L As₂O₃组; D: 联合用药组.

肿瘤细胞凋亡的主要机制有^[6]: (1)改变细胞内氧化还原状态; (2)开放MPT、活化caspase家族; (3)抑制 $bcl-2$ 基因, 抑制NF-κB活化, 使胞质Ca²⁺浓度升高; (4)影响细胞周期。刘湘国等^[4]发现经As₂O₃作用后的Bel-7402细胞, 在琼脂糖电泳中出现了典型的DNA凋亡条带, 用流式细胞仪检测出了典型的凋亡峰, 电镜下观察到了典型的凋亡细胞形态学改变: 如细胞核仁消失, 染色质浓缩、碎裂, 聚于核膜边缘并形成凋亡小体。

Aspirin属于非甾体类抗炎药(non-steroidal anti-inflammatory drugs, NSAIDs), 是临床传统的抗炎镇痛药。近年来也用于某些肿瘤防治及研究, 发现其对多种体内移植瘤或诱发性肿瘤具有一定的抗肿瘤作用^[7,8]。研究表明, 其抗癌机制包括抑制环氧化酶COX-2减少, 抑制前列腺素PGE2生成和抑制NF-κB活性或降低NF-κB结合活性诱导凋亡等^[9-11], 诱导肿瘤细胞凋亡与Bax基因的上调有关^[12,13]等, 但机制尚未完全阐明。本实验主要通过单独及联合应用As₂O₃与Aspirin于肝癌Bel-7402细胞, 通过倒置显微镜观察细胞形态变化, MTT观察药物作用后细胞的抑制率, 流式细胞仪检测细胞凋亡及周期情况明确二者在抗肝癌方面是否具有协同效应以及初步探讨两种药物的协同抗癌机制, 以期为临床制定科

学有效的化疗方案提供理论和实验依据。

研究表明, 倒置显微镜下观察As₂O₃与Aspirin处理细胞, 发现细胞活力下降, 变小变圆, 且形态不均, 贴壁能力下降。我们通过MTT实验得到证实, As₂O₃与Aspirin在抗肝癌效力方面呈浓度依赖性, 随着药物浓度的增加, 抗癌效力越来越强, 与对照组相比, 差异具有统计学意义($P<0.05$), 且联合组与单用As₂O₃组比较, 具有显著性差异($P<0.05$)。通过流式细胞仪检测发现, 阴性对照组Bel-7402凋亡率仅为3.94%±0.40%, 2 μmol/L As₂O₃、4 μmol/L As₂O₃、0.4 mmol/L Aspirin和2 μmol/L As₂O₃+0.2 mmol/L Aspirin联合作用后24 h, Bel-7402细胞凋亡率分别上升至5.64%±0.56%、8.32%±0.822%、6.74%±0.78%和7.35%±0.62%, 与阴性对照组相比, 凋亡率均显著升高($P<0.05$), 而2 μmol/L As₂O₃+0.2 mmol/L Aspirin联合用药组与2 μmol/L As₂O₃单用组相比, 差异仍具统计学意义($P<0.05$), 说明两种药物联合应用, 在诱导Bel-7402细胞凋亡方面具有协同作用。通过对细胞周期的检测我们发现, 在细胞周期方面, As₂O₃与Aspirin作用于Bel-7402细胞后与阴性对照组相比, G₁期细胞明显减少, 而G₂以及S期细胞明显增多, 差异具有统计学意义($P<0.05$)。细胞生长周期有G₁/S和G₂/M

两个转换限制点, 其中G₁/S决定周期时间^[14], 故二者协同诱导细胞凋亡作用可能通过影响这两个转换限制点来影响细胞周期从而达到抑制细胞增长的作用。肿瘤细胞的G₀期细胞是肿瘤复发的根源, 处于DNA复制前期阶段的G₁期细胞的减少会导致细胞增殖的抑制。本实验研究表明, As₂O₃和Aspirin在抗肝癌方面具有协同效应, 二者均可诱导肝癌细胞凋亡, 其作用机制可能与细胞周期有关。至今为止, 不同的NSAIDs可以诱导肺腺癌细胞发生凋亡已有报道但其作用机制仍不明确^[15,16], 同一作者对不同的NSAIDs诱导食管癌细胞凋亡的研究, 也先后得出不同的结论^[17,18]。Aspirin作为临床常用的解热镇痛药, 价格低廉, 易于购买, 不良反应小, 为肝癌联合用药提供了新思路, 但其诱导肝癌细胞凋亡的作用机制有待进一步研究与探讨。

4 参考文献

- 1 张霞, 陶小红, 汤为学. 三氧化二砷联合奥曲肽协同抗肝癌作用的实验研究. 中国药房 2005; 16: 501-504
- 2 秦叔達, 陈洪, 陈惠英, 马军, 潘其声, 刘文虎. 三氧化二砷诱导人肝癌细胞株凋亡的初步研究. 临床肿瘤学杂志 1998; 3: 40
- 3 Cai X, Shen YL, Zhu Q, Jia PM, Yu Y, Zhou L, Huang Y, Zhang JW, Xiong SM, Chen SJ, Wang ZY, Chen Z, Chen GQ. Arsenic trioxide-induced apoptosis and differentiation are associated respectively with mitochondrial transmembrane potential collapse and retinoic acid signaling pathways in acute promyelocytic leukemia. *Leukemia* 2000; 14: 262-270
- 4 刘湘国, 方建珍, 苏先狮. 三氧化二砷诱导人肝癌细胞凋亡的实验研究. 医学临床研究 2003; 20: 252-255
- 5 刘静冰, 秦叔達, 李进. 三氧化二砷诱导胰腺癌细胞系PC-3凋亡及其抑制转移的作用. 世界华人消化杂志 2007; 15: 1952-1955
- 6 Xiao YF, Liu SX, Wu DD, Chen X, Ren LF. Inhibitory effect of arsenic trioxide on angiogenesis and expression of vascular endothelial growth factor in gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 5780-5786
- 7 Duan L, Wu AH, Sullivan-Halley J, Bernstein L. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and risk of esophageal and gastric adenocarcinomas in Los Angeles County. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2008; 17: 126-134
- 8 Fan XM, Wong BC, Lin MC, Cho CH, Wang WP, Kung HF, Lam SK. Interleukin-1beta induces cyclooxygenase-2 expression in gastric cancer cells by the p38 and p44/42 mitogen-activated protein kinase signaling pathways. *J Gastroenterol Hepatol* 2001; 16: 1098-1104
- 9 Qiao L, Hanif R, Sphicas E, Schiff SJ, Rigas B. Effect of aspirin on induction of apoptosis in HT-29 human colon adenocarcinoma cells. *Biochem Pharmacol* 1998; 55: 53-64
- 10 Gradilone A, Silvestri I, Scarpa S, Morrone S, Gandini O, Pulcinelli FM, Gianni W, Frati L, Aglianò AM, Gazzaniga P. Failure of apoptosis and activation on NFkappaB by celecoxib and aspirin in lung cancer cell lines. *Oncol Rep* 2007; 17: 823-828
- 11 Stark LA, Reid K, Sansom OJ, Din FV, Guichard S, Mayer I, Jodrell DI, Clarke AR, Dunlop MG. Aspirin activates the NF-kappaB signalling pathway and induces apoptosis in intestinal neoplasia in two in vivo models of human colorectal cancer. *Carcinogenesis* 2007; 28: 968-976
- 12 Zhou XM, Wong BC, Fan XM, Zhang HB, Lin MC, Kung HF, Fan DM, Lam SK. Non-steroidal anti-inflammatory drugs induce apoptosis in gastric cancer cells through up-regulation of bax and bak. *Carcinogenesis* 2001; 22: 1393-1397
- 13 Gu Q, Wang JD, Xia HH, Lin MC, He H, Zou B, Tu SP, Yang Y, Liu XG, Lam SK, Wong WM, Chan AO, Yuen MF, Kung HF, Wong BC. Activation of the caspase-8/Bid and Bax pathways in aspirin-induced apoptosis in gastric cancer. *Carcinogenesis* 2005; 26: 541-546
- 14 蒋明东, 李少林. 三氧化二砷抗肝癌作用研究进展. 国际消化病杂志 2006; 26: 26-28
- 15 Hanif R, Pittas A, Feng Y, Koutsos MI, Qiao L, Staiano-Coico L, Schiff SJ, Rigas B. Effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on proliferation and on induction of apoptosis in colon cancer cells by a prostaglandin-independent pathway. *Biochem Pharmacol* 1996; 52: 237-245
- 16 Souza RF, Shewmake K, Beer DG, Cryer B, Spechler SJ. Selective inhibition of cyclooxygenase-2 suppresses growth and induces apoptosis in human esophageal adenocarcinoma cells. *Cancer Res* 2000; 60: 5767-5772
- 17 Li M, Wu X, Xu XC. Induction of apoptosis by cyclo-oxygenase-2 inhibitor NS398 through a cytochrome C-dependent pathway in esophageal cancer cells. *Int J Cancer* 2001; 93: 218-223
- 18 Li M, Lotan R, Levin B, Tahara E, Lippman SM, Xu XC. Aspirin induction of apoptosis in esophageal cancer: a potential for chemoprevention. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2000; 9: 545-549

■同行评价

本研究验证了As₂O₃与Aspirin协同抗肝癌作用, 其作用机制可能是通过影响细胞周期从而达到促细胞凋亡, 具有一定的临床应用价值。

编辑 曹丽鸥 电编 鲁亚静

联合丝裂霉素、碘油及肝动脉栓塞对大鼠肝癌的介入治疗

周利华, 彭俊红, 钱坤, 钱骏

■背景资料

60%-70%的肝癌患者临床发现时已进展到中晚期, 失去了手术切除的机会。这部分患者一般采用非手术方法进行治疗, 可获得较好的疗效。其中, 经导管肝动脉化疗栓塞术(TACE)已成为治疗不可切除性肝癌的重要手段。

周利华, 彭俊红, 武汉市普爱医院放射科 湖北省武汉市 430034

钱坤, 钱骏, 华中科技大学同济医学院附属协和医院放射科 湖北省武汉市 430022

周利华, 医学硕士, 医师, 主要从事肿瘤的影像诊断与介入治疗。

作者贡献分布: 周利华与钱骏负责实验设计; 研究过程由周利华与钱坤完成; 数据分析由周利华与彭俊红完成; 论文写作由周利华与钱骏完成。

通讯作者: 钱骏, 副教授, 副主任医师, 硕士生导师, 430022, 湖北省武汉市解放大道1277号, 华中科技大学同济医学院附属同济医院放射科。376786377@qq.com

电话: 027-68831395

收稿日期: 2012-04-03 修回日期: 2012-05-07

接受日期: 2012-05-18 在线出版日期: 2012-06-18

Combined use of mitomycin, lipiodol and hepatic artery ligation for treating liver cancer in rats

Li-Hua Zhou, Jun-Hong Peng, Kun Qian, Jun Qian

Li-Hua Zhou, Jun-Hong Peng, Department of Radiology, Wuhan Puai Hospital, Wuhan 430034, Hubei Province, China

Kun Qian, Jun Qian, Department of Radiology, Union Hospital Affiliated to Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, Hubei Province, China

Correspondence to: Jun Qian, Associate Professor, Associate Chief Physician, Department of Radiology, Union Hospital Affiliated to Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, 1277 Jiefang Road, Wuhan 430022, Hubei Province, China. 376786377@qq.com

Received: 2012-04-03 Revised: 2012-05-07

Accepted: 2012-05-18 Published online: 2012-06-18

Abstract

AIM: To establish a rat model of Walker 256 liver cancer to evaluate the role of embolic agents, lipiodol (LP) and chemotherapeutic agents in transcatheter arterial chemoembolization.

METHODS: Subcapsular implantation of carcinoma tissue of Walker 256 in the liver was carried out in 35 male SD rats. Tumor volume (V_1) was measured by magnetic resonance imaging (MRI) on day 9 after implantation. All rats were randomly divided into experiment groups and control group by the agents which were injected via the gastroduodenal artery to hepatic artery. The experiment groups included group A ($n = 7$),

mitomycin (MMC, 0.1 mg) + LP (0.1 mL) + hepatic artery ligation (HAL); group B ($n = 7$), MMC (0.1 mg) + LP (0.1 mL); group C ($n = 7$), MMC (0.1 mg) + HAL; group D ($n = 7$), LP (0.1 mL) + HAL. The control group (group E, $n = 7$) was given 0.9% NaCl (0.1 mL). Tumor volume (V_2) was assessed by MRI (on day 9 after treatment) and the growth ratio of tumor (V_2/V_1) was calculated.

RESULTS: The mean tumor volume before and after treatment was $0.017 \text{ cm}^3 \pm 0.008 \text{ cm}^3$, $0.038 \text{ cm}^3 \pm 0.017 \text{ cm}^3$; $0.019 \text{ cm}^3 \pm 0.011 \text{ cm}^3$, $0.152 \text{ cm}^3 \pm 0.069 \text{ cm}^3$; $0.022 \text{ cm}^3 \pm 0.010 \text{ cm}^3$, $0.302 \text{ cm}^3 \pm 0.134 \text{ cm}^3$; $0.019 \text{ cm}^3 \pm 0.008 \text{ cm}^3$, $0.382 \text{ cm}^3 \pm 0.049 \text{ cm}^3$; and $0.021 \text{ cm}^3 \pm 0.006 \text{ cm}^3$, $0.715 \text{ cm}^3 \pm 0.307 \text{ cm}^3$ in groups A, B, C, D and E, respectively. The tumor growth ratio (V_2/V_1) was 2.50 ± 1.08 , 8.73 ± 2.38 , 14.66 ± 4.96 , 21.26 ± 5.19 , 33.10 ± 8.17 in groups A, B, C, D and group E, respectively. The tumor growth ratio was significantly lower in the experiment groups than in the control group (all $P < 0.05$). There were significant differences in the tumor growth ratio among groups A, B, C and D (all $P < 0.05$).

CONCLUSION: Combined use of mitomycin, lipiodol and hepatic artery ligation could achieve satisfactory results in the treatment of liver cancer.

Key Words: Mitomycin; Lipiodol; Hepatic artery interventional therapy; Liver cancer

Zhou LH, Peng JH, Qian K, Qian J. Combined use of mitomycin, lipiodol and hepatic artery ligation for treating liver cancer in rats. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2012; 20(17): 1542-1546

摘要

目的: 建立Walker256大鼠肝癌模型, 探讨碘油、栓塞及化疗在肝动脉化疗栓塞术中的作用。

方法: 将皮下种植生长出的Walker256细胞瘤结节切成约 1.5 mm^3 大小的瘤块, 植入35只♂SD大鼠肝包膜下, 植入后9 d用磁共振(magnetic resonance imaging, MRI)测量肿瘤

体积 V_1 , 经胃十二指肠动脉逆行插管至肝动脉注入不同药物, 分为实验组: A组($n = 7$), 0.1 mg丝裂霉素(mitomycin, MMC)+0.1 mL碘油(lipiodol, LP)+肝动脉结扎(hepatic artery ligation, HAL); B组($n = 7$), 0.1 mg MMC+0.1 mL LP; C组($n = 7$), 0.1 mg MMC+HAL; D组($n = 7$), 0.1 mL LP+HAL; 对照组: E组($n = 7$), 0.1 mL 0.9%生理盐水. 介入术后9 d采用MRI测量肿瘤体积 V_2 及肿瘤增长率(V_2/V_1).

结果: 介入治疗术前, A、B、C、D、E各组肿瘤平均体积 V_1 分别为: $0.017 \text{ cm}^3 \pm 0.008 \text{ cm}^3$ 、 $0.019 \text{ cm}^3 \pm 0.011 \text{ cm}^3$ 、 $0.022 \text{ cm}^3 \pm 0.010 \text{ cm}^3$ 、 $0.019 \text{ cm}^3 \pm 0.008 \text{ cm}^3$ 、 $0.021 \text{ cm}^3 \pm 0.006 \text{ cm}^3$, 术后肿瘤平均体积 V_2 分别为: $0.038 \text{ cm}^3 \pm 0.017 \text{ cm}^3$ 、 $0.152 \text{ cm}^3 \pm 0.069 \text{ cm}^3$ 、 $0.302 \text{ cm}^3 \pm 0.134 \text{ cm}^3$ 、 $0.382 \text{ cm}^3 \pm 0.049 \text{ cm}^3$ 、 $0.715 \text{ cm}^3 \pm 0.307 \text{ cm}^3$. 肿瘤平均增长率 V_2/V_1 分别为: 2.50 ± 1.08 、 8.73 ± 2.38 、 14.66 ± 4.96 、 21.26 ± 5.19 、 33.10 ± 8.17 . 治疗后A、B、C、D各实验组肿瘤平均增长率明显低于对照组E组($P < 0.05$); A、B、C、D各组间两两比较肿瘤平均增长率也具有显著性差异($P < 0.05$).

结论: 丝裂霉素与碘油及肝动脉结扎(LP+MMC+HAL)三者联合应用治疗肝癌取得了满意的疗效, 较其中任2种联合应用有明显优势, 有较好的临床应用前景.

关键词: 丝裂霉素; 碘油; 肝动脉介入; 肝癌

周利华, 彭俊红, 钱坤, 钱骏. 联合丝裂霉素、碘油及肝动脉栓塞对大鼠肝癌的介入治疗. 世界华人消化杂志 2012; 20(17): 1542-1546

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/1542.asp>

0 引言

目前, 外科手术包括部分肝切除及肝移植仍然被认为是治愈肝癌最彻底、最有效的治疗手段, 但符合治疗条件的患者不多, 西方国家大概只有30%, 亚洲不到10%^[1,2]. 而非手术疗法多种多样, 如经导管肝动脉化疗栓塞术(transcatheter arterial chemoembolization, TACE)、射频消融术(radio frequency ablation, RFA)、经皮无水酒精瘤内注射(percutaneous ethanol injection, PEI)、微波治疗(microwave coagulation therapy, MCT)、电化学治疗(electrochemotherapy, ECT)、激光诱导热疗(laser-induced thermotherapy, LITT)、冷冻治疗(cryotherapy)、放射治疗(radiotherapy, RT)等. 其中, TACE已成为治疗不

可切除性肝癌的重要手段, 在部分选择性病例中能取得显著疗效, 并能延长患者的生存率.

TACE中化疗药一般与碘油混合形成碘油乳剂使用, 提高瘤内化疗药的浓度, 并减轻全身不良反应. 但近年来碘油作为栓塞剂这一说法存在争议, 有学者认为其不能栓塞动脉, 而且没有数据表明其可以缓慢地释放化疗药, 因此不应被应用. 另外, 比较肝动脉注入化疗药-碘油乳剂和TACE的疗效, 有研究表明两种治疗方法无显著性差异^[3,4], 也有报道^[5]认为采用肝动脉注入化疗药-碘油乳剂治疗肝癌的生存率高于TACE组, 还有研究结果与之完全相反^[6]. 对于化疗药而言, Pleguezuelo等^[7]报道TACE的疗效并不一定优于肝动脉栓塞(transarterial embolization, TAE). 基于以上研究, 本实验主要建立与人类原发性肝癌血供特点和生长方式极其相近的Walker256大鼠肝癌模型, 探讨碘油、栓塞及化疗在TACE术中的作用.

1 材料和方法

1.1 材料 200 g±20 g SD ♂大鼠35只, 100 g±10 g SD ♂幼鼠1只, 由华中科技大学同济医学院动物中心提供. 其中幼鼠皮下种植用, 35只成年大鼠供肿瘤肝脏移植所用. Walker256细胞悬液由上海索研生物科技有限公司.

1.2 方法

1.2.1 Walker256大鼠肝癌模型的建立: 参考文献[8,9]制作肝癌模型: 将Walker256细胞悬液以1 000 r/min离心5 min, 弃上清, 取 0.4×10^7 个Walker256细胞注射于幼鼠背部皮下, 8 d后长出直径约1 cm大小的瘤结节. 将携带母瘤动物处死后取出瘤结节, 选择新鲜活组织部分切取约1.5 mm³大小的瘤块, 植入另外35只大鼠肝左叶包膜下.

1.2.2 介入治疗前磁共振检查: 于瘤块接种9 d后行磁共振扫描. 采用MR仪(Siemens, 3.0T), 选择腕部小线圈, 测量肿瘤体积. 序列参数如下: SE序列, T1WI: TR200 ms, TE3.98 ms; FSE序列, T2WI: TR3373 ms, TE86 ms; 矩阵256×256, 层厚2.0 mm, 无间断横断面扫描. 根据肿瘤体积公式 $V(\text{cm}^3)=ab^2/2$ 计算肿瘤介入术前体积 V_1 (其中a: 肿瘤最大径, b: 与之呈垂直方向的最小径)^[10].

1.2.3 介入治疗: 在完成MRI检查后将35只大鼠随机分为实验组和对照组, 行肝动脉插管介入治疗, 具体治疗方案如下: 实验组: A组($n = 7$): 经肝动脉灌注丝裂霉素(mitomycin, MMC)(0.1 mg)+

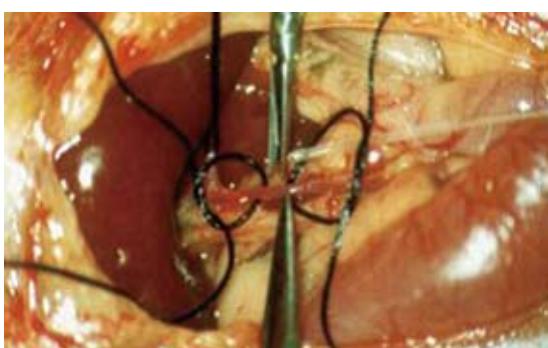
■研发前沿
以TACE为基础的综合治疗方法越来越多地用于临床, 充分了解TACE中各要素的作用, 有助于制定有效的治疗方案, 提高疗效, 延长患者的生存率.

■创新盘点

临 床 上 由 于 肿 瘤 、 病 例 的 多 样 性 因 素 , 通 过 收 集 临 床 病 例 评 价 TACE 有 一 定 难 度 . 本 研 究 主 要 建 立 与 人 类 原 发 性 肝 瘤 血 供 特 点 和 生 长 方 式 极 其 相 近 的 Walker256 大 鼠 肝 癌 模 型 , 采 用 肝 动 脉 结 扎 和 肝 动 脉 插 管 的 方 法 , 评 价 TACE 中 的 三 要 素 : 碘 油 、 栓 塞 及 化 疗 在 TACE 术 中 相 辅 相 成 的 作 用 .

表 1 各组治疗方案治疗前后肿瘤平均体积及增长率比较 (mean ± SD)

分组	n	V ₁ (cm ³)	V ₂ (cm ³)	增长率
A组(MMC+LP+HAL)	6	0.017 ± 0.008	0.038 ± 0.017	2.50 ± 1.08
B组(MMC+LP)	6	0.019 ± 0.011	0.152 ± 0.069	8.73 ± 2.38
C组(MMC+HAL)	7	0.022 ± 0.010	0.302 ± 0.134	14.66 ± 4.96
D组(LP+HAL)	6	0.019 ± 0.008	0.382 ± 0.049	21.26 ± 5.19
E组(生理盐水)	7	0.021 ± 0.006	0.715 ± 0.307	33.10 ± 8.17

**图 1 胃十二指肠动脉逆行插管至肝动脉.**

碘油(lipiodol, LP)(0.1 mL)+肝动脉结扎(hepatic artery ligation, HAL)(HAL替代栓塞术, 即TACE); B组($n = 7$): 经肝动脉灌注MMC(0.1 mg) + LP(0.1 mL); C组($n = 7$): 经肝动脉灌注MMC(0.1 mg)+ HAL; D组($n = 7$): 经肝动脉灌注LP(0.1 mL)+ HAL. 对照组: E组($n = 7$): 经肝动脉灌注0.9%生理盐水(0.1 mL). 根据各组治疗方案缓慢注药. 其中, A、C及D组另外均行肝动脉结扎.

1.2.4 MRI复查: 介入治疗术9 d后对各组大鼠再次行MRI检查, 测得肿瘤体积V₂. 根据介入术前术后体积V₁、V₂计算肿瘤增长率(V₂/V₁ × 100%).

统计学处理 采用SPSS16.0进行统计分析, 数据以mean±SD表示, 计量资料采用单因素方差分析, 两两间比较采用LSD检验; 以P<0.05为差异有统计学意义.

2 结果

插管方法参照文献[8,9], 行胃十二指肠动脉逆行插管(聚乙烯微导管, PortexPE10, 内径0.28 mm, 外径0.61 mm, 德国海德堡Wenzel公司)至肝固有动脉(图1). 所有大鼠均成功制作成肝癌模型, 肝癌移植率100%, 3只大鼠在第2次MRI扫描前抵抗力低下感染死亡. 介入治疗前肝癌移植大鼠行常规MRI扫描, T1WI呈均匀低信号, T2WI呈中-高信号, 边界较为清楚, 周围未见明显子灶, 无腹水形成. 行不同介入治疗方案治疗后, 各组

肿瘤体积均有不同程度增大, MR信号欠均匀, 病灶主体在T1WI上呈低信号, 在T2WI呈中-高信号.

MRI评价各组动物模型肝癌治疗效果如下: MMC+LP+HAL治疗组的T1WI、T2WI图像, 约为术前的2.5倍; MMC+LP治疗组的T1WI、T2WI图像, 约为术前的8.7倍; MMC+HAL治疗组的T1WI、T2WI图像, 约为术前的14.7倍; LP+HAL治疗组, 约为术前的21.3倍; 阴性对照组T1WI、T2WI图像, 约为术前的33.1倍(图2).

经统计学分析, A、B、C、D和E各组在介入治疗前肿瘤体积无显著性差异(P>0.05), 而在介入治疗9 d后LP+MMC+HAL组、LP+MMC组、MMC+HAL组、LP+HAL组与对照组相比, 肿瘤体积及增长率具有显著性差异(P<0.05); LP+MMC+HAL组、LP+MMC组、MMC+HAL组、LP+HAL组两两间进行方差分析比较, 肿瘤增长率具有显著性差异(P<0.05). 治疗前后, A、B、C、D和E组肿瘤平均体积及增长率见表1.

3 讨论

我国是肝癌高发国, 肝癌严重威胁着我国人民的健康, 由于其发病隐匿, 进展迅速, 60%-70%的病例临床发现时已进展到中晚期, 失去了手术切除的机会. 这部分患者一般采用非手术方法进行治疗, 可获得较好的疗效. 其中, TACE已成为治疗不可切除性肝癌的重要手段^[11]. TACE治疗肝癌主要依赖于肝脏的双重血供, 正常肝组织的血供75%来源于门静脉, 25%来自肝动脉. 原发性肝癌大部分属于富血供肿瘤, 其血供正好相反, 90%以上来自于肝动脉, 瘤周由门静脉和肝动脉双重供血. TACE通过栓塞剂在不影响正常肝组织血液灌注的情况下阻断肝癌的血供, 引发肝癌组织缺血、缺氧, 促使癌细胞坏死.

本实验用HAL替代栓塞术^[12,13], MMC+LP+ HAL疗效优于MMC+LP, 通过肝动脉结扎阻断肝动脉血流, 造成肿瘤组织局部缺血缺氧坏死, 并且减少血流对碘油乳剂的冲洗, 使化疗药物

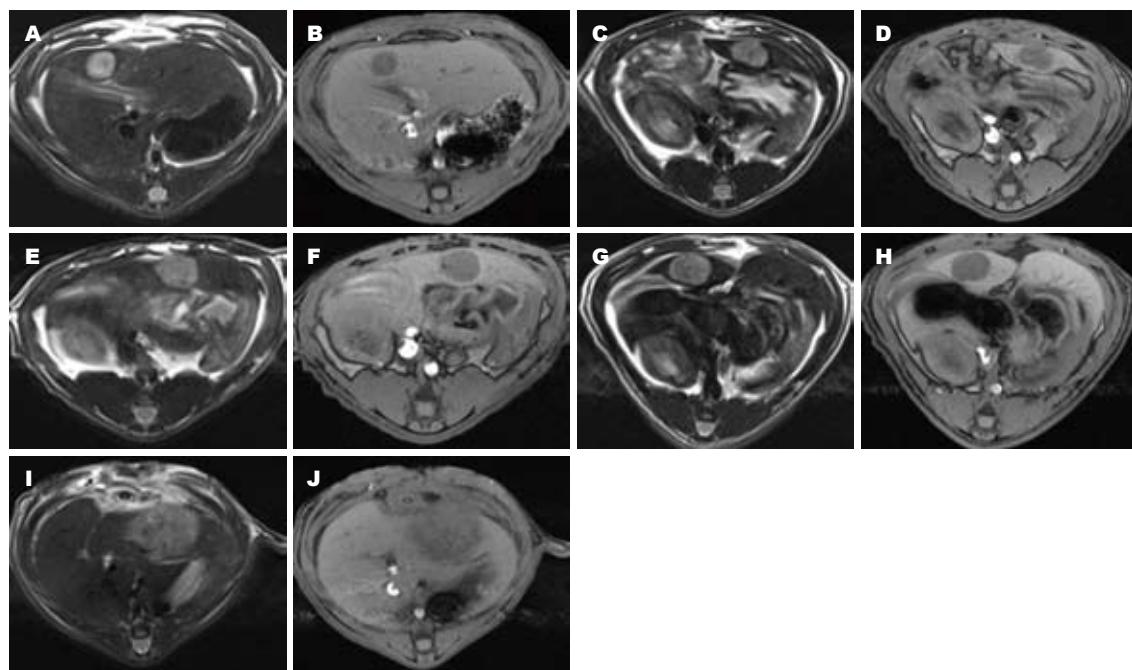


图 2 MRI评价各组动物模型肝癌治疗效果. A, B: MMC+LP+HAL治疗组的T1WI、T2WI图像, 约为术前的2.5倍; C, D: MMC+LP治疗组的T1WI、T2WI图像, 约为术前的8.7倍; E, F: MMC+HAL治疗组的T1WI、T2WI图像, 约为术前的14.7倍; G, H: LP+HAL治疗组, 约为术前的21.3倍; I, J: 阴性对照组T1WI、T2WI图像, 约为术前的33.1倍.

高浓度积聚于肿瘤组织, 高效杀伤肿瘤细胞. 该结果与Hatanaka等^[6]的报道相符: 应用碘油-化疗药混合乳剂加明胶海绵的患者1、3、5年生存率分别为86.3%、34.8%、26.1%, 而应用单纯碘油-化疗药混合乳剂的分别为65.9%、36.2%、18.1%. Takayasu等^[14]也认为TACE组疗效优于没有栓塞剂的碘油-化疗药组, TACE组1、3、5年生存率分别为81%、46%、25%; 无栓塞剂治疗组的分别为71%、33%、16%. 但也有研究表明两种治疗方法无显著性差异^[3,4], 还有报道^[5]认为采用肝动脉注入化疗药-碘油乳剂治疗肝癌的生存率高于TACE组. 分析其原因可能与使用的栓塞剂类型有关, 研究中没有统一永久性栓塞剂和短暂性栓塞剂, 不能达到相同的效果.

TACE中的化疗药一般与碘油混合, 以乳剂的形式应用于进展性肝癌的治疗. 由于肝癌富血供以及肝癌组织缺乏正常肝组织的Kupffer细胞系统的特点, 碘油可以破坏毛细血管床, 通过导向“虹吸”的作用, 携带化疗药物沉积于肿瘤组织中, 延长化疗药与肿瘤组织的作用时间, 诱导肿瘤细胞广泛坏死, 同时减轻全身不良反应. 碘油可在肿瘤组织中沉积数星期甚至数月, 鞍向提高局部化疗药物的浓度. Nakamura等^[15]比较肝动脉注射阿霉素与阿霉素-碘油乳剂2种治疗方法, 发现后者阿霉素可以从碘油乳剂中缓慢释放, 集中于肿瘤组织中, 而血液中阿霉素

浓度很低. 这充分表明了碘油的携带作用. 本实验中MMC+LP+HAL组疗效优于MMC+HAL组体现了碘油的用处. 但单独使用碘油的意义不大, 所以MMC+HAL组疗效优于LP+HAL组, 正如Takayasu等^[16]报道, 单纯的碘油是没有实在的治疗作用的.

碘油除了携带剂的作用外, 还具有栓塞功能, 他可以栓塞肿瘤周边供血门静脉分支^[17]. 有研究表明^[18], 与无碘油的化疗栓塞相比, TACE中的碘油沉积于肿瘤周边的门静脉分支, 有加强抗肿瘤的作用, 被认为是抗肿瘤的增强因子. 而且碘油大量沉积于门静脉可以使局部肿瘤的复发率大大降低^[19].

TACE和TAE在肝脏恶性肿瘤中经常应用, TACE是TAE与化疗药物联合使用的综合治疗方法. Takayasu等^[16]阐明经肝动脉注射阿霉素-碘油乳剂, 随后栓塞疗效优于单纯栓塞. 本实验中肝动脉结扎替代栓塞术, MMC+LP+HAL疗效优于LP+HAL, 与报道相符. Llovet等^[20]也通过临床病例证实TACE的疗效优于TAE, 统计TACE患者1、2年生存率分别为82%、63%, TAE的分别为75%、50%. 但也有研究表明, TACE疗效并不一定优于TAE^[9]. 追其原因可能与肝癌对化疗药的敏感性、单一用药和联合用药以及TACE的技术问题以致化疗药未产生作用等有关.

临幊上由于肿瘤、病例的多样性因素, 通

■同行评价
本文实验设计思路很好, 有很好的创新性, 并有较好的临床研究和应用价值.

过收集临床病例评价TACE有一定难度。本研究主要建立与人类原发性肝癌血供特点和生长方式极其相近的Walker256大鼠肝癌模型，采用肝动脉结扎和肝动脉插管的方法，评价TACE中的3要素(碘油、栓塞及化疗)在TACE术中相辅相成的作用。但是仍存在一些问题：Walker256大鼠肝癌模型没有经过自然条件下肝炎、肝硬化的过程，不能完全等同于人类原发性肝癌，选取更好的肝癌模型还有待进一步研究。目前国际上对栓塞剂的种类、标准大小、剂量尚没有统一标准方案，以致同种治疗方案的治疗效果可能存在差异。碘油与化疗药结合形成油包水型制剂、水包油型制剂、三明治式法注入肝动脉，哪种更能缓慢释放化疗药；化疗药如何选择疗效更好；化疗药-碘油与栓塞剂何时注入肝动脉可以充分发挥各自的作用等还有待进一步研究。

4 参考文献

- 1 Samuel M, Chow PK, Chan Shih-Yen E, Machin D, Soo KC. Neoadjuvant and adjuvant therapy for surgical resection of hepatocellular carcinoma. *Cochrane Database Syst Rev* 2009; (1): CD001199
- 2 Llovet JM, Bruix J. Systematic review of randomized trials for unresectable hepatocellular carcinoma: Chemoembolization improves survival. *Hepatology* 2003; 37: 429-442
- 3 Maeda S, Fujiyama S, Tanaka M, Ashihara H, Hirata R, Tomita K. Survival and local recurrence rates of hepatocellular carcinoma patients treated by transarterial chemolipiodolization with and without embolization. *Hepatol Res* 2002; 23: 202-210
- 4 Ikeda M, Maeda S, Shibata J, Muta R, Ashihara H, Tanaka M, Fujiyama S, Tomita K. Transcatheter arterial chemotherapy with and without embolization in patients with hepatocellular carcinoma. *Oncology* 2004; 66: 24-31
- 5 Lu CD, Qi YG, Peng SY. Lipiodolization with or without gelatin sponge in hepatic arterial chemoembolization for hepatocellular carcinoma. *Chin Med J (Engl)* 1994; 107: 209-215
- 6 Hatanaka Y, Yamashita Y, Takahashi M, Koga Y, Saito R, Nakashima K, Urata J, Miyao M. Unresectable hepatocellular carcinoma: analysis of prognostic factors in transcatheter management. *Radiology* 1995; 195: 747-752
- 7 Pleguezuelo M, Marelli L, Misseri M, Germani G, Calvaruso V, Xirouchakis E, Pinelopi M, Burroughs AK. TACE versus TAE as therapy for hepatocellular carcinoma. *Expert Rev Anticancer Ther* 2008; 8: 1623-1641
- 8 Yang R, Rescorla FJ, Reilly CR, Faught PR, Sanghvi NT, Lumeng L, Franklin TD, Grosfeld JL. A reproducible rat liver cancer model for experimental therapy: introducing a technique of intrahepatic tumor implantation. *J Surg Res* 1992; 52: 193-198
- 9 钱骏, Truebenbach J, Eul T, Graepler F, Pereira P, Huppert P, 冯敢生, Claussen C. ACI大鼠肝细胞癌模型在介入治疗实验中的初步应用. 中华放射学杂志 2003; 37: 16-19
- 10 Carlsson G, Gullberg B, Hafström L. Estimation of liver tumor volume using different formulas - an experimental study in rats. *J Cancer Res Clin Oncol* 1983; 105: 20-23
- 11 郑石磊, 张祥林, 董福仁, 雷振, 王刚, 李国策, 徐娜. 强力霉素与碘油栓塞对兔VX2肝肿瘤移植瘤VEGF、MMP-2表达的影响. 世界华人消化杂志 2010; 18: 3338-3342
- 12 Ekelund L, Stigsson L, Jonsson N, Sjögren HO. Transcatheter arterial embolization of normal livers and experimental hepatic tumours in the rat. *Acta Radiol Diagn (Stockh)* 1977; 18: 641-651
- 13 Tanaka N, Okamoto E, Toyosaka A, Nakao N. [Pathohistological evaluation of hepatic artery ligation (HAL) or transcatheter arterial embolization (TAE) on primary carcinoma of the liver]. *Nihon Geka Gakkai Zasshi* 1983; 84: 518-528
- 14 Takayasu K, Arii S, Ikai I, Kudo M, Matsuyama Y, Kojiro M, Makuuchi M. Overall survival after transarterial lipiodol infusion chemotherapy with or without embolization for unresectable hepatocellular carcinoma: propensity score analysis. *AJR Am J Roentgenol* 2010; 194: 830-837
- 15 Nakamura H, Hashimoto T, Oi H, Sawada S. Transcatheter oily chemoembolization of hepatocellular carcinoma. *Radiology* 1989; 170: 783-786
- 16 Takayasu K, Shima Y, Muramatsu Y, Moriyama N, Yamada T, Makuuchi M, Hasegawa H, Hirohashi S. Hepatocellular carcinoma: treatment with intraarterial iodized oil with and without chemotherapeutic agents. *Radiology* 1987; 163: 345-351
- 17 Kan Z, Sato M, Ivancev K, Uchida B, Hedgpeth P, Lunderquist A, Rosch J, Yamada R. Distribution and effect of iodized poppyseed oil in the liver after hepatic artery embolization: experimental study in several animal species. *Radiology* 1993; 186: 861-866
- 18 Sasaki Y, Imaoka S, Kasugai H, Fujita M, Kawamoto S, Ishiguro S, Kojima J, Ishikawa O, Ohigashi H, Furukawa H. A new approach to chemoembolization therapy for hepatoma using ethiodized oil, cisplatin, and gelatin sponge. *Cancer* 1987; 60: 1194-1203
- 19 Miyayama S, Matsui O, Yamashiro M, Ryu Y, Kaito K, Ozaki K, Takeda T, Yoneda N, Notsumata K, Toya D, Tanaka N, Mitsui T. Ultraselective transcatheter arterial chemoembolization with a 2-f tip microcatheter for small hepatocellular carcinomas: relationship between local tumor recurrence and visualization of the portal vein with iodized oil. *J Vasc Interv Radiol* 2007; 18: 365-376
- 20 Llovet JM, Real MI, Montaña X, Planas R, Coll S, Aponte J, Ayuso C, Sala M, Muchart J, Solà R, Rodés J, Bruix J. Arterial embolisation or chemoembolisation versus symptomatic treatment in patients with unresectable hepatocellular carcinoma: a randomised controlled trial. *Lancet* 2002; 359: 1734-1739

藤梨根提取物对HT-29荷瘤裸鼠的抑制及诱导凋亡作用的影响

陈永杰, 史仁杰

陈永杰, 南京中医药大学 江苏省南京市 210046
史仁杰, 江苏省中医院肛肠科 江苏省南京市 210029
陈永杰, 在读博士, 主要从事中医药治疗肛肠疾病的研究。
江苏省2011年度研究生创新计划立项基金资助项目, No. C
XZZ11_0769
作者贡献分布: 此课题由陈永杰与史仁杰设计; 研究过程由陈永杰操作完成; 数据分析由陈永杰与史仁杰完成; 本论文写作由陈永杰完成, 史仁杰审核。
通讯作者: 史仁杰, 主任医师, 博士研究生导师, 210029, 江苏省南京市, 江苏省中医院肛肠科. shirenjetcm@yahoo.com.cn
收稿日期: 2012-04-18 **修回日期:** 2012-05-18
接受日期: 2012-05-31 **在线出版日期:** 2012-06-18

Effect of ethanol extract from radix of Actinidia chinensis on tumor growth and cell apoptosis in HT-29 human colon cancer xenografts in nude mice

Yong-Jie Chen, Ren-Jie Shi

Yong-Jie Chen, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210046, Jiangsu Province, China
Ren-Jie Shi, Department of Coloproctology, Jiangsu Provincial Hospital of TCM, Nanjing 210029, Jiangsu Province, China
Supported by: the 2011 Graduate Innovation Program of Jiangsu Province, No. CXZZ11_0769
Correspondence to: Ren-Jie Shi, Chief Physician, Department of Coloproctology, Jiangsu Provincial Hospital of TCM, Nanjing 210029, Jiangsu Province, China. shirenjetcm@yahoo.com.cn
Received: 2012-04-18 Revised: 2012-05-18 Accepted: 2012-05-31 Published online: 2012-06-18

Abstract

AIM: To explore the regulatory effect of ethanol extract from radix of Actinidia chinensis (EERAC) on tumor growth and cell apoptosis in HT-29 human colon cancer xenografts in nude mice.

METHODS: Forty Balb/c-*nu*/*nu* nude mice were used to prepare xenograft models of HT-29 human colon cancer, and model mice were randomly divided into five groups ($n = 8$), including three treatment groups (treated with 5, 10 and 20 mg/kg of EERAC, respectively), normal control group (treated with normal saline) and positive

control group (treated with 5-FU, 25 mg/kg). After 8 d of treatment, spleen index and tumor inhibition rate were determined; the degree of NK cell activity was measured by culturing spleen effector cells; and the expression of apoptosis-related proteins Bcl-2, Bax and Caspase-3 in tumor tissue was determined by immunohistochemistry.

RESULTS: Compared to the control group, EERAC treatment had obvious inhibition on the growth of HT-29 xenograft tumor. The inhibition rate for each dose group was 9.12%, 20.13% and 37.81%, and there is a positive correlation between tumor growth inhibition and drug dose. Compared to the saline group and 5-FU group, EERAC treatment significantly increased the spleen index (all $P < 0.05$) and the activity of NK cells (all $P < 0.05$), decreased the expression of Bcl-2 and Bcl-2/Bax ratio, and up-regulated the expression of Bax and Caspase-3 in a dose-dependent manner.

CONCLUSION: EERAC inhibits tumor growth and induces cell apoptosis in HT-29 human colon cancer xenografts in nude mice possibly via mechanisms associated with the inhibition of Bcl-2 expression, lowering of Bcl-2/Bax ratio, and up-regulation of Bax and Caspase-3 expression.

Key Words: Ethanol extract from radix of Actinidia chinensis; HT-29 cells; Transplanted tumors; Proliferation; Apoptosis

Chen YJ, Shi RJ. Effect of ethanol extract from radix of Actinidia chinensis on tumor growth and cell apoptosis in HT-29 human colon cancer xenografts in nude mice. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2012; 20(17): 1547-1552

摘要

目的: 研究藤梨根提取物(ethanol extract from radix of Actinidia chinensis, EERAC)对人大肠癌HT-29荷瘤裸鼠移植瘤的抑制和诱导凋亡作用。

方法: 提取EERAC, 以大肠癌HT-29细胞对40只Balb/c-*nu*/*nu*裸鼠进行荷瘤造模, 并随机将分

■背景资料

大肠癌是最常见的消化系肿瘤之一, 对人类健康的威胁性极大, 中药藤梨根是大肠癌术后常用的有效药物, 其抗癌的机制尚未完全明确, Bcl-2、Bax、Caspase-3调控肿瘤增殖与凋亡的重要调控基因, 可在一定程度上反应抗肿瘤药物的内在机制。

■同行评议者
牛英才, 研究员,
齐齐哈尔医学院
医药科学研究所

■研发前沿

肛肠科常用中药藤梨根, 经临床实践证明, 有着较好的抗肿瘤作用, 其疗效确切, 越来越受到人们关注藤梨根抗肿瘤的化学成分和药理作用虽已有初步的研究, 但其有效部位、作用机制缺乏系统的药理跟踪研究。

为3个EERAC处理组(低剂量组5 mg/kg、中剂量组10 mg/kg、高剂量组20 mg/kg), 空白对照组(生理盐水)和阳性对照组(5-Fu, 25 mg/kg), 每组8只, 连续用药8 d后, 测定各实验组的肿瘤抑制率、脾脏指数。通过脾脏效应细胞培养, 测定NK细胞的活性度。免疫组织化学法测定各组荷瘤裸鼠体内凋亡相关基因Bcl-2、Bax、Caspase-3的蛋白表达水平。

结果: 与空白对照组相比, EERAC对HT-29移植瘤均有明显的抑制作用, 各剂量组的抑瘤率为9.12%、20.13%、37.81%, 与药物剂量呈正比; EERAC各剂量组对荷瘤裸鼠脾脏指数较生理盐水组和5-Fu组有显著增加($P<0.05$); 不同剂量的EERAC均可使NK细胞活性度增加($P<0.05$); EERAC作用后, HT-29荷瘤裸鼠体内的Bcl-2表达减弱, Bax、Caspase-3表达水平增高, Bcl-2/Bax比值下降, 其作用也呈剂量相关性。

结论: EERAC对大肠癌细胞HT-29荷瘤裸鼠具有抑制瘤体生长和诱导癌细胞凋亡的作用, 其作用机制可能为抑制荷瘤裸鼠体内Bcl-2的表达, 提高Bax、Caspase-3表达水平, 下调Bcl-2/Bax。EERAC对荷瘤裸鼠免疫系统无不良影响, 且能一定程度上提高机体的免疫功能。

关键词: 藤梨根提取物; HT-29细胞; 移植瘤; 增殖; 凋亡

陈永杰, 史仁杰. 藤梨根提取物对HT-29荷瘤裸鼠的抑制及诱导凋亡作用的影响. 世界华人消化杂志 2012; 20(17): 1547-1552
<http://www.wjnet.com/1009-3079/20/1547.asp>

0 引言

藤梨根是植物猕猴桃科猕猴桃属中华猕猴桃(*actinidia chinensis planch*)的根, 又名阳桃根。其味咸、酸、涩, 性凉, 无毒, 主要功效为清热解毒、祛风除湿、利尿止血, 是常用的治疗大肠癌的中草药之一。其抗癌作用符合的中医有关大肠发病的“癌毒”^[1]和“湿热致病”学说的相关治则。临幊上, 朱秀山等^[2]用昭黄散(藤梨根为主药)治疗不能手术胃癌患者72例, 疗效与5-Fu相当, 能明显提高生存质量和延长生存时间, 不良反应明显小于西药对照组。薛瑞等^[3]将体外培养的人胃腺癌SGC-7901细胞接种于Balb/c裸鼠的皮下, 建立人胃癌移植瘤模型, 以藤梨根醇提物大、中、小剂量组、阴性对照组、康力欣胶囊对照组进行疗效对比观察, 提示藤梨根乙酸乙酯提取物具有抑瘤作用, 其机制可能与

提高机体的免疫功能有关。基于上述的研究基础, 本实验将观察藤梨根提取物(ethanol extract from radix of *Actinidia chinensis*, EERAC)对大肠癌细胞HT-29荷瘤裸鼠的肿瘤抑制作用和诱导凋亡的影响, 并探讨其可能的作用机制。

1 材料和方法

1.1 材料 藤梨根提取物根据中国科学院化学研究所公布的藤梨根抗癌有效活性成分醇提取工艺(专利公开号: CN1977869A), 由中国药科大学生命科学院实验中心制备; 胎牛血清为上海尚宝产品; RPMI 1640培养基为Hyclone公司产品; 0.25%胰酶为天津吉诺生物公司产品; DAB显色试剂盒; Bcl-2、Bax、Caspase-3抗体(鼠抗人多抗, 稀释度1:80)、生物素IgG为南京凯基产品; MTT、BIOSHARP、Amresco0793; 5-氟尿嘧啶(5-Fu)注射液为北京舟鼎国公司产品; 倒置显微镜(LeicaDMIL, Germany); 24孔/96孔培养板及细胞培养瓶为美国Corning/costar公司产品; Elx800多功能酶标仪为美国Bioelisa reader公司产品; Balb/c-nu/nu裸鼠, ♂, 7周龄, 40只, 体质量18-22 g, 购自上海克莱斯动物公司, 许可证号: SCXK(沪)2003-0003; 裸鼠在中国药科大学中心实验室, 无特定病原体SPF级动物房饲养, 温度21 °C-25 °C, 湿度45%-55%。人大肠癌细胞株HT-29购自中国科学院上海细胞库。

1.2 方法

1.2.1 藤梨根抗癌有效活性成分的制取: (1)称取藤梨根1 000 g, 溶于5 000 mL乙醇, 回流10 h, 提取3次, 合并提取液后蒸发, 干燥后进行硅胶柱色谱分离并利用二氯甲烷、甲醇和乙酸溶液进行梯度洗脱, 在400 °C除去溶剂, 收集粉状物, 真空干燥24 h; (2)蒸馏水100 mL, 加入步骤(1)所制作的干燥品100 g, 原液稀释成50 mg/L、100 mg/L、200 mg/L药物浓度, 所得溶液用0.22 μm微孔滤膜无菌过滤, 分装, 置4 °C冰箱备用。

1.2.2 藤梨根有效活性成分醇提取物的质量控制: (1)EERAC主要成分的鉴定: EERAC的主要活性化学成分为三萜皂苷类, 对所提取的EERAC采用醋酐浓硫酸反应和泡沫实验加以鉴定: 醋酐浓硫酸反应(Liebrmann Burchard反应)呈现红紫色并接着变成污色绿色。可考虑样品中含三萜类、皂苷或甾类。泡沫实验, 若显示两管中泡沫高度相等, 证实其主要成份为三萜皂苷。

1.2.3 HPLC(高效液相色谱)指纹图谱鉴定: 药藤梨根由南京中医药大学中药与生药重点实验室

物进行测定, 标本存放于南京中医药大学标本馆。在测定中, 运用HPLC-DAD对10批次的藤梨根样品进行了分析研究。结果显示, HPLC-DAD获得的指纹图谱, 显示本实验使用的中药藤梨根各批次化学成分稳定均一, 具有可重复性。

1.2.4 HT-29荷瘤裸鼠造模: (1)分组: 随机将40只Balb/c♂裸鼠, 分为5组: 生理盐水组(空白对照组)、5-Fu组(阳性对照组)、EERAC高剂量组20 mg/kg、EERAC中剂量组10 mg/kg、EERAC低剂量组5 mg/kg, 每组8只; (2)造模: 在无菌操作环境下, 将HT-29传代后, 稳定培养24 h, 在指数生长期, 调整细胞浓度至 1×10^7 个/mL。加入适量的生理盐水, 以200 μL/只的细胞悬液浓度, 注射器接种于裸鼠右腋皮下, 操作在1 h内完成; (3)给药: 分组后, 5-Fu组按25 mg/kg体质量, 腹腔注射; EERAC组, 按0.2 mL/10 g等容量不等浓度(分别为EERAC 20 mg/kg、10 mg/kg、5 mg/kg^[4,5]), 灌胃给药, 每天1次, 连续8 d。生理盐水组灌服相同体积的生理盐水。

1.2.5 EERAC对荷瘤裸鼠体质量的影响: 造模后、取材前测量实验裸鼠体质量, 记录差值。

1.2.6 EERAC对裸鼠种植瘤的生长抑制作用: 裸鼠颈椎脱臼处死, 750 mL/L乙醇浸泡3 min, 取出裸鼠置于无菌纸上, 取出瘤体和脾脏并称质量。瘤质量(g)。抑瘤率 = (C-T)/C × 100%, T为各处理组平均瘤质量, C为生理盐水组平均瘤质量。

1.2.7 EERAC对荷瘤裸鼠免疫功能的影响: 前期处理同实验2.4, 摘取裸鼠脾脏并测量, 脾指数 = 脾脏质量(mg)/裸鼠体质量(g)。

1.2.8 MTT法测定NK细胞活性度: (1)HT-29细胞传代并用RPMI 1640培养液调配细胞终浓度为 4×10^5 个/mL; (2)脾细胞悬液的制备: 无菌取脾, 在完成脾脏测量后, 移入的培养皿中, 进行沉降, 高速离心, 裂解红细胞后, 用RPMI 1640培养液调整细胞浓度为 2×10^7 个/mL; (3)NK细胞(效应细胞)分离: 步骤(2)所得溶液取1 mL用RPMI 1640稀释至 2×10^6 /mL, 分别按5 mg/L的终浓度加入ConA, 于37 °C、50 mL/L CO₂孵箱中培养24 h, 利用贴壁效应去除成纤维细胞、单核巨噬细胞等基质细胞, 通过尼龙毛柱过滤去除B细胞, 余液加入rhIL-2, 令NK细胞贴壁生长, 收集NK细胞; (4)NK细胞活性检测: 取靶细胞和效应细胞各50 μL(效靶比50:1), 置37 °C、50 mL/L CO₂培养箱中培养4 h, 在酶标仪490 nm处测定各孔吸光度(A)值, 以各组A值代表NK细胞活力。

1.2.9 免疫组织化学法测定凋亡相关基因Bax、

Bcl-2、Caspase-3的蛋白表达变化: (1)组织处理: 取厚度<0.2 cm的组织块, 10%的中性缓冲甲醛液固定10-12 h; (2)组织脱水、透明、浸蜡: 组织经固定后进行无水酒精脱水1 h × 3次、二甲苯透明化处理1 h × 2次, 65 °C以下进行浸蜡及包埋; (3)切片: 切片厚度为5 μm, 切片在60 °C温箱中60 min, 垂直烤片; (4)免疫组织化学染色: 切片常规脱蜡至水; 加入3%H₂O₂于室温下10 min灭活内源性酶; 0.01 mol/L枸橼酸盐缓冲液(pH 6.0)进行热修复抗原; 5%BSA封闭液; 滴加Caspase-3、Bcl-2、Bax抗体, 用PBS(pH 7.4)洗2 min × 3次; 滴加IgG, PBS(pH 7.4)洗2 min × 3次; 再滴加SABC, 37 °C 20 min. PBS(pH 7.4)洗5 min × 4次; DAB显色: 室温显色, 时间为5-30 min; HE染色, 脱水, 透明, 封片。显微镜观察, 摄片。采用Image-Pro Plus 6.0图像分析系统, 计算积分吸光度(IA)值。

统计学处理 SPSS17.0分析, 数据以mean ± SD表示, 计量资料用t检验, 计数资料用χ²检验分析, 多组间比较用方差分析, 百分数用U检验。

2 结果

2.1 EERAC对荷瘤裸鼠体质量的影响 实验进行过程到第4天, 5-Fu组出现1只裸鼠死亡, 症状表现为极度瘦弱, 其原因可能与5-Fu所导致的不良反应有关。与生理盐水组比较, 除EERAC低剂量组能明显增加荷瘤裸鼠的体质量($P<0.05$)外, EERAC中、高剂量组对荷瘤裸鼠的体质量均无明显影响, 而5-Fu组裸鼠体质量明显下降($P<0.05$, 表1)。

2.2 EERAC对裸鼠种植瘤生长抑制作用 与生理盐水组比较, EERAC中、高剂量组和5-Fu组能显著降低荷瘤裸鼠的瘤体质量($P<0.05$ vs 中剂量组, $P<0.01$ vs 高剂量组和5-Fu组), 与5-Fu组比较, 而EERAC高剂量组无明显差异($P>0.05$); 在肿瘤抑制率上, EERAC实验组随着剂量的增加, 抑瘤率不断上升, 而EERAC各剂量组均与5-Fu组有明显差异(高剂量组为 $P<0.05$, 中、低剂量组为 $P<0.01$, 表1)。

2.3 EERAC对荷瘤裸鼠免疫器官的影响 脾脏指数高剂量组为 6.14 ± 0.42 、中剂量组为 6.67 ± 0.59 、低剂量组为 3.98 ± 0.45 、5-Fu组为 3.98 ± 0.45 、生理盐水组为 4.91 ± 0.38 。与生理盐水组比较, EERAC各剂量组均能非常显著增加荷瘤裸鼠的脾脏指数($P<0.01$), 而5-Fu组则非常显著降低荷瘤裸鼠的脾脏指数($P<0.01$)。

2.4 EERAC对NK细胞活性的影响 NK细胞活

■ 相关报道

朱秀山等用昭黄散(藤梨根为主药)治疗不能手术胃癌患者72例, 疗效与5-Fu相当, 能明显提高生存质量和延长生存时间, 不良反应明显小于西药对照组, 证实昭黄散能明显抑制胃癌患者的病情进展。

■应用要点

本研究为中药藤梨根治疗大肠癌的临床应用和新剂型的开发, 提供客观的实验依据。

表1 EERAC对HT-29裸鼠体质量、平均瘤重和肿瘤抑制率的影响

分组	剂量 [mg/(kg·d)]	n		体质量(g)		平均瘤质量(g)	肿瘤抑制率(%)
		始	末	始	末		
高剂量组	20	8	8	19.53±1.08	22.73±0.52	1.02±0.10 ^b	37.81 ^d
中剂量组	10	8	8	19.97±1.10	23.21±0.46	1.31±0.12 ^a	20.13 ^c
低剂量组	5	8	8	20.04±1.21	25.87±1.16 ^a	1.53±0.25	9.12 ^c
5-Fu组	25	8	7	19.82±1.12	21.68±1.33 ^a	0.86±0.14 ^b	46.84
生理盐水组		8	8	19.73±1.03	24.21±0.29	1.71±0.18	

^aP<0.05, ^bP<0.01 vs 生理盐水组; ^cP<0.05, ^dP<0.01 vs 5-Fu组.

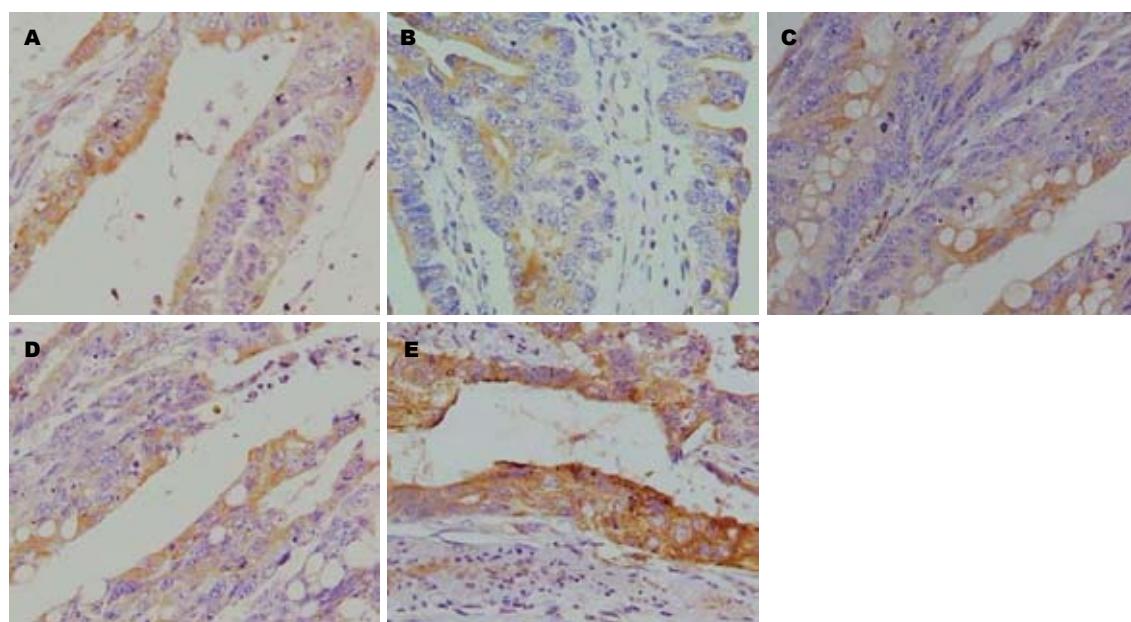


图1 Balb/c裸鼠瘤组织在不同剂量EERAC作用下Bax的表达($\times 200$). A: 生理盐水组; B: 5-Fu组; C: EERAC高剂量组; D: EERAC中剂量组; E: EERAC低剂量组.

性高剂量组为 0.924 ± 0.041 、中剂量组为 1.067 ± 0.082 、低剂量组为 0.958 ± 0.129 、5-Fu组为 0.642 ± 0.061 、生理盐水组为 0.812 ± 0.027 . 与生理盐水组比较, EERAC各剂量组均能明显增加荷瘤裸鼠体内NK细胞的活性度($P<0.05$ 或 0.01), 而5-Fu组则显著降低荷瘤裸鼠的NK细胞的活性($P<0.05$).

2.5 HT-29荷瘤裸鼠体内Bcl-2、Bax、Caspase-3的表达变化 经过HE染色后, 吸光度测量的IA值显示, EERAC高剂量组为Bcl-2: 0.308 ± 0.024 , Bax: 0.341 ± 0.006 , Caspase-3: 0.331 ± 0.008 ; EERAC中剂量组为Bcl-2: 0.319 ± 0.011 , Bax: 0.322 ± 0.008 , Caspase-3: 0.325 ± 0.014 ; EERAC低剂量组为Bcl-2: 0.329 ± 0.021 , Bax: 0.314 ± 0.037 , Caspase-3: 0.308 ± 0.048 ; 5-Fu组为Bcl-2: 0.255 ± 0.097 , Bax: 0.353 ± 0.012 , Caspase-3: 0.338 ± 0.031 ; 生理盐水组为Bcl-2: 0.354 ± 0.018 , Bax:

0.309 ± 0.023 , Caspase-3: 0.309 ± 0.023 ; 与生理盐水组比较, 5-Fu组、EERAC高剂量组的Bax、Caspase-3的表达水平均有明显升高($P<0.01$, 其中EERAC中剂量组也能显著增强Caspase-3的表达, $P<0.01$), 从Bax表达图像可见, 随着EERAC剂量的增加, 蓝染颜色变深, 蓝染细胞的数量增多; 而5-Fu组、EERAC高剂量组均能明显降低Bcl-2的表达($P<0.05$). EERAC对Bcl-2、Bax、Caspase-3蛋白表达的影响呈剂量相关性(图1).

3 讨论

肿瘤的发生是一个多因素、整体病变的过程, 其过程涉及机体多方面的改变^[6], 其中免疫监控的失效或功能状态的低下是其重要的发病因素. 既往研究表明^[7], 癌细胞移植造模后, 能引起裸鼠脾脏指数下降, NK细胞活性度低下, 免疫功能抑制的紊乱状态. 机体内的NK细胞是早期肿瘤

免疫的重要效应细胞, 具有广谱的抗肿瘤性, 既能直接杀伤肿瘤细胞, 又可以通过细胞毒性作用间接抑制癌细胞增殖^[8,9]。本研究结果显示, 荷瘤裸鼠NK细胞的活性处于明显低下的状态, 脾指数降低, 表明其免疫功能紊乱, 而EERAC实验组荷瘤裸鼠的脾脏, NK细胞的活性度明显升高, 提示EERAC能在一定程度纠正荷瘤裸鼠免疫失衡状态, 提高免疫功能, 从而实现肿瘤生长的调控。在实验过程中发现, EERAC对大肠癌细胞荷瘤裸鼠的瘤体生长具有明显抑制作用, 与剂量呈正相关作用, 虽然EERAC实验组的抗肿瘤作用要弱于5-Fu组, 但5-Fu组荷瘤裸鼠脾脏指数和NK细胞活性度显著下降, 对免疫系统有较强的不良反应, 而EERAC无免疫抑制作用, 还能一定程度地增加裸鼠的免疫力, 体现出其药物的安全性。在EERAC低剂量时, 有明显增加荷瘤裸鼠瘤体质量的作用($P<0.05$), 该现象的原因初步估计为低剂量EERAC作用时, 与诱导肿瘤细胞的分化有关, 有待今后的实验进一步验证。

细胞凋亡是在凋亡刺激信号作用下, 激活细胞内部的程序变性和死亡机制, 并经过各种凋亡信号和转导途径协同完成, 而细胞表面死亡受体通路和线粒体通路是目前公认的两条重要的调节细胞凋亡的途径^[10]。Bcl-2家族蛋白在细胞凋亡中具有重要作用, 其主要功能为调控线粒体凋亡途径。Bcl-2属于Bcl-2家族中抑制细胞凋亡的重要基因, 在大肠癌的发生发展中具有重要意义^[11,12], Bax是Bcl-2家族中最重要的凋亡促进基因, 同时也对凋亡抑制基因Bcl-2起着主要调控作用^[13,14], 其表达水平的变化, 能反映肿瘤的发生发展和预后及肿瘤细胞对治疗药物的敏感性^[15]。在线粒体凋亡途径中, Caspase蛋白家族处于细胞凋亡信号转导的中心位置, 而Caspase-3是信号转导通路中的核心效应分子, 他能导致细胞发生一系列凋亡形态和生化改变^[16,17]。

本研究发现, 经EERAC作用后, 裸鼠肿瘤组织中Bax蛋白表达水平较空白对照组增高, 而Bcl-2蛋白的表达降低, Bcl-2/Bax比值显著低于对照组($P<0.05$), 其中以增强Bax的表达为主; 在Caspase-3的表达上也显著高于空白对照组($P<0.01$), 提示EERAC的抗癌机制可能是通过抑制Bcl-2的表达, 下调Bcl-2/Bax的比值, 增强Bax、Caspase-3的表达, 从而激活线粒体凋亡途径来实现的。从EERAC对HT-29荷瘤裸鼠机体免疫功能的提高, 抑制肿瘤增殖和诱导肿瘤细胞凋亡方面, 说明中药藤梨根的抗肿瘤作用具

有多靶点、多中心的效应, 其应用和开发前景良好。

■同行评价

本研究选题新颖, 结论可靠, 具有一定的学术价值。

4 参考文献

- 程海波, 吴勉华. 周仲瑛教授从癌毒辨治恶性肿瘤病机要素分析. 中华中医药学刊 2010; 28: 313-315
- 朱秀山, 许继平, 黄德辉, 黄国荣, 应树华. 壁虎藤梨根治疗胃癌临床及实验研究. 中国民间疗法 1999; 7: 43-44
- 薛瑞, 王小平. 藤梨根提取物对裸鼠移植瘤的抑制作用研究. 陕西中医 2008; 29: 632-633
- 郑树. 结直肠肿瘤-基础研究与临床实践. 北京: 人民卫生出版社, 2006: 3-4
- Chung-Faye GA, Kerr DJ, Young LS, Searle PF. Gene therapy strategies for colon cancer. *Mol Med Today* 2000; 6: 82-87
- 董张丽, 杨丽娟, 赖东梅. 免疫对肿瘤的负向调控. 现代免疫学 2011; 31: 428-431
- Jachimowicz RD, Fracasso G, Yazaki PJ, Power BE, Borchmann P, Engert A, Hansen HP, Reiners KS, Marie M, von Strandmann EP, Rothe A. Induction of in vitro and in vivo NK cell cytotoxicity using high-avidity immunoligands targeting prostate-specific membrane antigen in prostate carcinoma. *Mol Cancer Ther* 2011; 10: 1036-1045
- Mondal B, Saha S. Inhibition of subcutaneous growth of Ehrlich ascites carcinoma (EAC) tumor by post-immunization with EAC-cell gangliosides and its anti-idiotype antibody in relation to tumor angiogenesis, apoptosis, cell cycle and infiltration of CD4+, CD8+ lymphocytes, NK cells, suppressor cells and APC-cells in tumor. *Indian J Exp Biol* 2011; 49: 574-584
- Dowell AC, Oldham KA, Bhatt RI, Lee SP, Searle PF. Long-term proliferation of functional human NK cells, with conversion of CD56(dim) NK cells to a CD56 (bright) phenotype, induced by carcinoma cells co-expressing 4-1BB and IL-12. *Cancer Immunol Immunother* 2012; 61: 615-628
- Xu YZ, Zheng RL, Zhou Y, Peng F, Lin HJ, Bu Q, Mao YQ, Yu LT, Yang L, Yang SY, Zhao YL. Small molecular anticancer agent SKLB703 induces apoptosis in human hepatocellular carcinoma cells via the mitochondrial apoptotic pathway invitro and inhibits tumor growth invivo. *Cancer Lett* 2011; 313: 44-53
- Zhang H, Li Y, Huang Q, Ren X, Hu H, Sheng H, Lai M. MiR-148a promotes apoptosis by targeting Bcl-2 in colorectal cancer. *Cell Death Differ* 2011; 18: 1702-1710
- Zhang MS, Hu AH, Qiu H, Xiong HH, Chen Y. The correlation between IGF-II and Bcl-2 expression in colorectal adenocarcinoma. *Med Oncol* 2012; 29: 928-932
- Anvari K, Seilanian Toussi M, Kalantari M, Naseri S, Karimi Shahri M, Ahmadnia H, Katebi M, Sedighi Pashaki A, Dayani M, Broumand M. Expression of Bcl-2 and Bax in advanced or metastatic prostate carcinoma. *Urol J* 2012; 9: 381-388
- Zhong ZG, Wu DP, Huang JL, Liang H, Pan ZH, Zhang WY, Lu HM. Progallin A isolated from the acetic ether part of the leaves of Phyllanthus emblica L. induces apoptosis of human hepatocellular carcinoma BEL-7404 cells by up-regulation of Bax expression and down-regulation of Bcl-2 expression. *J Ethnopharmacol* 2011; 133: 765-772
- Wang W, Lu J, Zhu F, Wei J, Jia C, Zhang Y, Zhou L, Xie H, Zheng S. Pro-apoptotic and anti-proliferative effects of mitofusin-2 via Bax signaling in hepat-

- cellular carcinoma cells. *Med Oncol* 2012; 29: 70-76
- 16 Sabine VS, Faratian D, Kirkegaard-Clausen T, Bartlett JM. Validation of activated caspase-3 antibody staining as a marker of apoptosis in breast cancer. *Histopathology* 2012; 60: 369-371
- 17 Li S, Tian D, Fei P, Gao Y, Chen Z, Wang Q, Tong Q. A cyclooxygenase-2 inhibitor NS-398-enhanced apoptosis of esophageal carcinoma cell EC9706 by adjusting expression of survivin and caspase-3. *Cancer Invest* 2011; 29: 102-106

编辑 李军亮 电编 鲁亚静

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

• 消息 •

《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利益冲突; (3)所有作者均审读过该文并同意发表, 所有作者均符合作者条件, 所有作者均同意该文代表其真实研究成果, 保证文责自负; (4)列出通讯作者的姓名、地址、电话、传真和电子邮件; 通讯作者应负责与其他作者联系, 修改并最终审核复核稿; (5)列出作者贡献分布; (6)来稿应附有作者工作单位的推荐信, 保证无泄密, 如果是几个单位合作的论文, 则需要提供所有参与单位的推荐信; (7)愿将印刷版和电子版出版权转让给本刊编辑部。

2 稿件修改

来稿经同行专家审查后, 认为内容需要修改、补充或删节时, 本刊编辑部将把原稿连同审稿意见、编辑意见寄回给作者修改, 而作者必须于15 d内将单位介绍信、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。

肠上皮细胞来源整合素 $\alpha V\beta 6$ 对树突状细胞功能的影响

李晓蕾, 郑鹏远, 李付广, 刘志强

李晓蕾, 郑鹏远, 刘志强, 郑州大学第二附属医院消化内科
郑州大学医学微生态学研究所 河南省郑州市 450014
李付广, 郑州大学基础医学院微生物与免疫教研室 河南省
郑州市 450052
李晓蕾, 在读硕士, 主要从事消化系统疾病研究。
国家自然科学基金资助项目, No. 31070799
作者贡献分布: 李晓蕾与郑鹏远对此文贡献均等; 此课题由李晓蕾与郑鹏远设计; 研究过程由李晓蕾完成; 研究所用新试剂和分析工具由郑鹏远与李付广提供; 数据分析由李晓蕾完成; 本论文写作由李晓蕾、郑鹏远及刘志强完成。
通讯作者: 郑鹏远, 教授, 主任医师, 博士生导师, 450014, 河南省郑州市经八路2号, 郑州大学第二附属医院消化内科, 郑州大学医学微生态学研究所. medp7123@126.com
电话: 0371-63921467 传真: 0371-63934118
收稿日期: 2011-12-06 修回日期: 2012-04-26
接受日期: 2012-05-18 在线出版日期: 2012-06-18

Intestinal epithelial cell-derived integrin $\alpha V\beta 6$ affects the function of dendritic cells

Xiao-Lei Li, Peng-Yuan Zheng, Fu-Guang Li, Zhi-Qiang Liu

Xiao-Lei Li, Peng-Yuan Zheng, Zhi-Qiang Liu, Department of Gastroenterology, the Second Affiliated Hospital of Zhengzhou University; Institute of Medical Microecology, Zhengzhou University, Zhengzhou 450014, Henan Province, China
Fu-Guang Li, Department of Microbiology and Immunology, Basic Medical College, Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, Henan Province, China
Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 31070799

Correspondence to: Peng-Yuan Zheng, Professor, Chief Physician, Department of Gastroenterology, the Second Affiliated Hospital of Zhengzhou University; Institute of Medical Microecology, Zhengzhou University, 2 Jingba Road, Zhengzhou 450014, Henan Province, China. medp7123@126.com

Received: 2011-12-06 Revised: 2012-04-26

Accepted: 2012-05-18 Published online: 2012-06-18

Abstract

AIM: To investigate the effect of intestinal epithelial cell (IEC)-derived integrin $\alpha V\beta 6$ on the biological characteristics of bone marrow-derived dendritic cells (BMDCs).

METHODS: IECs and BMDCs were separated from BALB/c mice and cultured. After IECs were stimulated with ovalbumin (OVA), exosomes were prepared by multiple-step centrifugation. The expression of integrin $\alpha V\beta 6$ in exosomes was examined by using the immune colloidal gold

technique. Dendritic cells (DCs) were separated using immunomagnetic beads, and the concentration of DCs was determined by flow cytometry. DCs were then divided into five groups: blank group, OVA group, exosomes group, exosomes plus anti- $\alpha V\beta 6$ antibody group, and exosomes plus goat anti-mouse IgG group. After these groups of DCs were treated with LPS, the expression of IL-12p70 was detected. In addition, the expression of active and total TGF- $\beta 1$ was detected before LPS stimulation.

RESULTS: Compared to the blank group, the expression levels of total TGF- $\beta 1$ increased (both $P < 0.05$) and those of active TGF- $\beta 1$ showed no significant changes (both $P > 0.05$) in the OVA group and exosomes plus anti- $\alpha V\beta 6$ antibody group; and the expression levels of both active and total TGF- $\beta 1$ increased in the exosomes group and exosomes plus goat anti-mouse IgG group (both $P < 0.05$). Compared to the blank group, the expression of IL-12p70 was significantly reduced (both $P < 0.05$) in the exosomes group and exosomes plus goat anti-mouse IgG group, but showed no significant changes in the OVA group and exosomes plus anti- $\alpha V\beta 6$ antibody group (both $P > 0.05$) 48 h after stimulation with LPS.

CONCLUSION: Intestinal epithelial cell-derived integrin $\alpha V\beta 6$ can increase the expression of active TGF- $\beta 1$ and total TGF- $\beta 1$ in DCs and antagonize LPS-induced BMDC maturation.

Key Words: Exosome; Integrin $\alpha V\beta 6$; Dendritic cells; Transforming growth factor- $\beta 1$

Li XL, Zheng PY, Li FG, Liu ZQ. Intestinal epithelial cell-derived integrin $\alpha V\beta 6$ affects the function of dendritic cells. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2012; 20(17): 1553-1558

摘要

目的: 研究肠上皮细胞(intestinal epithelial cells, IEC)来源的整合素 $\alpha V\beta 6$ 对骨髓来源树突状细胞(bone marrow-derived dendritic cells, BMDCs)功能的影响。

方法: 分离、培养小鼠IEC和DC, IEC经卵清

■背景资料

食物过敏在世界上广泛存在, 最近几年发病率在全球范围内提高, 然而食物过敏的病因和发病机制尚不清楚。

■同行评议者
陈敬贤, 教授, 安徽医科大学微生物学教研室

■研发前沿

最新研究发现, IEC 来源的整合素 $\alpha V\beta 6$ 在肠道耐受型树突状细胞(TolDC)产生中可能具有关键作用, 成为研究热点。

蛋白(ovalbumin, OVA)刺激后, 多步离心法制备外泌体(exosome)。应用免疫胶体金对外泌体中的整合素 $\alpha V\beta 6$ 进行定性, 通过免疫磁珠技术, 分离获取DC, 流式细胞仪检测分离后DC纯度。然后将分离后的DC分5组, 分别为空白组、OVA组、外泌体组、外泌体+抗整合素 $\alpha V\beta 6$ 抗体组、外泌体+羊抗小鼠IgG组, 观察各组对脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)刺激的反应。ELISA法检测DC在LPS刺激前后IL-12p70的表达。LPS刺激前活性转化生长因子 $\beta 1$ (transforming growth factor- $\beta 1$, TGF- $\beta 1$)以及总TGF- $\beta 1$ 的表达。

结果: OVA组与空白组相比, 总TGF- $\beta 1$ 表达明显增高(226.636 ± 40.355 vs 176.947 ± 23.072 , $P < 0.05$), 但活化TGF- $\beta 1$ 表达无明显变化($P > 0.05$)。空白组与外泌体+抗整合素 $\alpha V\beta 6$ 抗体组相比, 活化TGF- $\beta 1$ 表达无明显变化($P > 0.05$), 但总TGF- $\beta 1$ 表达明显增高($P < 0.05$)。外泌体组和外泌体+羊抗小鼠IgG组与空白组相比, 活化TGF- $\beta 1$ 和总TGF- $\beta 1$ 表达均明显增高($P < 0.05$)。相比空白对照组, LPS刺激48 h后外泌体组和外泌体+羊抗小鼠IgG组IL-12p70表达明显降低($P < 0.05$), OVA组及外泌体+抗整合素 $\alpha V\beta 6$ 抗体组IL-12p70表达无明显差异($P > 0.05$)。

结论: IEC来源整合素 $\alpha V\beta 6$ 能增加DC活性, 以及TGF- $\beta 1$ 和总TGF- $\beta 1$ 的表达量, 并拮抗LPS对BMDC的促成熟作用。

关键词: 外泌体; 整合素 $\alpha V\beta 6$; 树突状细胞; 转化生长因子 $\beta 1$

李晓蕾, 郑鹏远, 李付广, 刘志强. 肠上皮细胞来源整合素 $\alpha V\beta 6$ 对树突状细胞功能的影响. 世界华人消化杂志 2012; 20(17): 1553-1558
<http://www.wjnet.com/1009-3079/20/1553.asp>

0 引言

随着新型抗生素和疫苗的发展及其在临床上的应用, 感染性疾病的治疗已取得巨大成功, 但是在过去的几十年中, 过敏性疾病却呈现出明显上升趋势^[1]。食物过敏(food allergy, FA)和相关疾病在全球范围内迅速增加, 大约4%-8%的儿童和1%-2%的成年人对食物抗原具有IgE介导的高反应性^[2]。FA是以肠道口服耐受受损和Th2极化为特征的免疫反应, Treg功能失常将导致过敏性疾病的发生^[3,4], 导致口服耐受(oral tolerance)受损和以Th2细胞为主的免疫反应。耐受型树突状细胞(tolerogenic dendritic cell, TolDC)^[5,6]是一类

未成熟DC亚型, 高表达TGF- β 或/和IL-10, 但表达低水平共刺激分子, TolDC在Treg产生和口服耐受中起关键作用。

肠道黏膜细胞特别是肠上皮细胞(intestinal epithelial cells, IEC), 能够促进TolDC的分化^[7-9]。正常IEC能够增加DC细胞表达TGF- β , 而TGF- β 在维持DC耐受表型中起重要作用^[10]。TGF- β 主要通过与TGF- β 受体结合来调节免疫功能, 可通过凋亡方式诱导细胞死亡^[11]。整合素 $\alpha V\beta 6$ (integrin $\alpha V\beta 6$)可结合在非活性(latent form)TGF- β 的羧基末端的精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸(arginine-glycine-aspartic acid)RGD序列上^[12], 从而使TGF- β 更易于与其受体结合并进一步形成活化TGF- β 。外泌体是由一些细胞分泌的直径在30-100 nm的小囊泡, 由多囊泡体膜与细胞膜融合而生成^[13,14], 他可作为细胞间信息传递、转运的载体。IEC来源的外泌体能够携带细胞成分和摄入的蛋白质成分, 从而诱导肠道免疫反应^[15,16]。

卵清蛋白(OVA)因具有可靠的抗原性而被认为是一种理想的食物抗原模型。脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)是内毒素, 可引起强烈免疫反应, 促进炎性细胞分泌多种细胞因子。由于肠道组织分离的DC数量少, 无法满足实验需求, 所以本研究是通过体外培养小鼠IEC和骨髓来源DC, 用OVA刺激IEC后来源的外泌体与DC共同培养, 用来研究整合素 $\alpha V\beta 6$ 对TolDC产生的影响, 从而进一步了解食物过敏发生的分子机制, 并为临床治疗提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料 Balb/c小鼠购自河南省实验动物中心。明胶、胶原酶XI、中性蛋白酶I、LPS、OVA均购自北京鼎国公司; 高糖DMEM完全培养基由高糖DMEM培养液(Gibco公司)、HEPES 2×10^{-2} mol/L、L-谷氨酰胺 2×10^{-3} mol/L、青霉素100 kU/L、链霉素0.1 g/L和100 mL/L胎牛血清(杭州四季青公司)构成; RPMI 1640完全培养基由RPMI 1640培养液(Gibco公司)、HEPES 2×10^{-2} mol/L、L-谷氨酰胺 2×10^{-3} mol/L、青霉素100 kU/L、链霉素0.1 g/L和100 mL/L胎牛血清(杭州四季青公司)构成。重组小鼠表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)、重组小鼠GM-CSF(rmGM-CSF)、重组小鼠IL-4(rmIL-4)均购自Peprotech公司。PE-抗小鼠CD11c(美国BioLegend公司), 抗整合素 $\alpha V\beta 6$ 的单克隆抗体2G2(Biogen

公司, 美国), 小鼠IL-12p70、TGF- $\beta 1$ ELISA定量试剂盒(武汉博士德生物科技有限公司), 胶体金标记马抗小鼠IgG(华美公司), 羊抗小鼠IgG(上海工硕生物技术有限公司).

1.2 方法

1.2.1 小鼠肠上皮细胞的分离培养: 小鼠IEC分离培养参照文献[17]: 孕17-19 d Balb/c小鼠, 颈椎脱臼法处死, 浸入750 mL/L乙醇中5-7 min, 无菌条件下取胎鼠肠组织, PBS液冲洗多次, 眼科剪将肠组织剪碎至1 mm³, 用胶原酶XI和中性蛋白酶I消化肠组织, 滤网过滤后离心洗涤4次, 将沉淀物用含有EGF 10 μ g/L的高糖DMEM培养基重悬后转移至铺有2%明胶的细胞培养板上, 置于37 °C、50 mL/L CO₂培养箱中常规培养, 48 h后换液. 以后每72 h换液1次, 细胞为贴壁细胞, 培育14 d收取细胞. 参照文献[17], 用HE染色进行细胞形态学检查, 细胞呈圆形或多角形, 细胞核为圆形或卵圆形, 核周可见空泡结构. 免疫组织化学染色, 用抗小鼠CK-18抗体来定性小鼠肠上皮细胞, 可见细胞质中出现棕黄色颗粒, 染色细胞占细胞总数90%以上, 满足实验的要求.

1.2.2 外泌体的制备: IEC在培养液中加入OVA 20 mg/L刺激4 h后, 收集IEC, PBS液冲洗细胞3次, 以去除多余的OVA, 再重新置于不含胎牛血清的培养基过夜. 4 °C 300 r/min离心10 min, 4 °C 1 200 r/min离心20 min, 4 °C 10 000 r/min离心30 min, 以去除细胞碎片, 然后将上清液4 °C 100 000 r/min超速离心1 h后, 收集外泌体, 重悬于PBS液备用. 用紫外分光光度计对外泌体进行定量, 最后用RPMI 1640完全细胞营养液调整其浓度为1 g/L, Western blot和胶体金检测参照试剂说明书进行操作. 每孔加入外泌体30 μ L, 6%PAGE分离胶进行SDS-PAGE电泳分离, 电转移至醋酸纤维膜上, 加入一抗4 °C结合10 h, 加入胶体金标记的二抗孵育2 h, 观察染色结果.

1.2.3 小鼠骨髓来源树突细胞的分离培养: 取Balb/c小鼠, 颈椎脱臼法处死, 浸入750 mL/L乙醇中5-7 min, 无菌取出股骨和胫骨, 用灭菌注射器抽取PBS液, 将针头从两端插入骨髓腔, 反复冲洗出骨髓, 收入离心管中, 以1 500 r/min离心6 min, 弃上清, 加入红细胞裂解液, 移液管吹打2-3 min, 离心洗涤后, 用RPMI 1640完全培养液调整细胞浓度为2×10⁸/L, 接种于6孔培养板, 每孔3 mL, 加入添加20 μ g/L的rmGM-CSF和10 μ g/L的rmIL-4的培养基, 置于37 °C、50 mL/L CO₂培养箱中培养. 48 h后全量换液, 之后隔天半量换

液. 收集培养7 d后的悬浮细胞, PBS液重悬细胞, 轻轻吹打混匀. 取200 μ L链霉亲和素标记磁珠与CD11c抗体混匀, 磁条上过柱, 然后将含有DC细胞PBS液在磁条上过柱, 磁珠抗体与DC复合物滞留于柱内, 样品滴加完毕后, 将分选柱从磁分离器上取下, 再向柱内滴加PBS液洗涤磁珠, 收集冲洗液, 用PBS液重悬细胞, 调整细胞浓度至1×10⁶/L, 1 mL PBS重悬细胞, 流式细胞仪检测CD11c阳性细胞达到90%以上, 达到实验要求.

1.2.4 DC细胞和外泌体的共培养: 培养7 d的DC分为5组: 分别为OVA组(加入OVA 20 mg/L)、空白对照组(不加任何刺激物质)、外泌体组(加入外泌体10 μ L)、外泌体+抗整合素 $\alpha V\beta 6$ 抗体组(加入外泌体10 μ L和抗整合素 $\alpha V\beta 6$ 抗体10 mg/L)、外泌体+羊抗小鼠IgG组(加入外泌体10 μ L+羊抗小鼠IgG 10 mg/L), 各组分别加入1 mg/L LPS共培养, 收集LPS加入前后的上清液冻存待测.

1.2.5 活性TGF- $\beta 1$ 和总TGF- $\beta 1$ 的检测: 收集各组LPS刺激前的上清液, 分成2份, 一份加入2 mol/L盐酸10 μ L, 反应10 s后, 再加入2 mol/L的碳酸氢钠10 μ L; 另一份加入2 mol/L盐酸10 μ L和2 mol/L的碳酸氢钠10 μ L发生化学反应后的混合液. 按ELISA试剂盒说明书进行操作, 未经过盐酸酸化的为活化TGF- $\beta 1$ 量, 经盐酸酸化的为总TGF- $\beta 1$ 量.

1.2.6 IL-12p70的检测: 收集各组LPS刺激前后的上清液, 检测各组LPS刺激前后IL-12p70的表达量, 按ELISA试剂盒说明书进行操作.

统计学处理 结果以mean±SD表示, 实验结果采用SPSS17.0统计软件包分析, 用单因素方差分析比较各组间的统计学差异, 采用 $\alpha = 0.05$ 为假设检验标准.

2 结果

分离培养后的小鼠IEC的HE和CK-18免疫组织化学染色如图1. 整合素 $\alpha V\beta 6$ 的免疫胶体金标注如图2, 流式细胞仪筛选分析DC的结果如图3.

2.1 细胞因子TGF- $\beta 1$ 量的变化 OVA刺激DC后, 与空白组对比, 总TGF- $\beta 1$ 表达(226.636±40.355 vs 176.947±23.072, $P<0.05$)明显增加, 而活化的TGF- $\beta 1$ 表达(43.322±13.479 vs 35.930±10.108, $P>0.05$)无明显变化. 外泌体组与空白组相比, 活化TGF- $\beta 1$ 表达(80.532±26.167 vs 35.930±10.108, $P<0.05$)和总TGF- $\beta 1$ 表达(210.749±31.509 vs 176.947±23.072, $P<0.05$)均明显增加. 与空白组对比, 抗整合素 $\alpha V\beta 6$ 抗体组总TGF- $\beta 1$

■相关报道
Yang等研究表明, 体外培养IEC, 经食物抗原刺激后, IEC中整合素 $\alpha V\beta 6$ 的表达量增加; 体外得到的外泌体经食物抗原刺激后, 能够携带整合素 $\alpha V\beta 6$ 和抗原, 并可被树突状细胞(DC)捕获.

■应用要点

本研究结果显示, IEC 来源的整合素 $\alpha V\beta 6$ 可以使转化生长因子(TGF)发生活化, 并能够有效抑制脂多糖(LPS)对DC的催熟作用, 提示 IEC 来源的整合素 $\alpha V\beta 6$ 在TolDC产生中具有重要作用, 为后期研究提供理论依据。

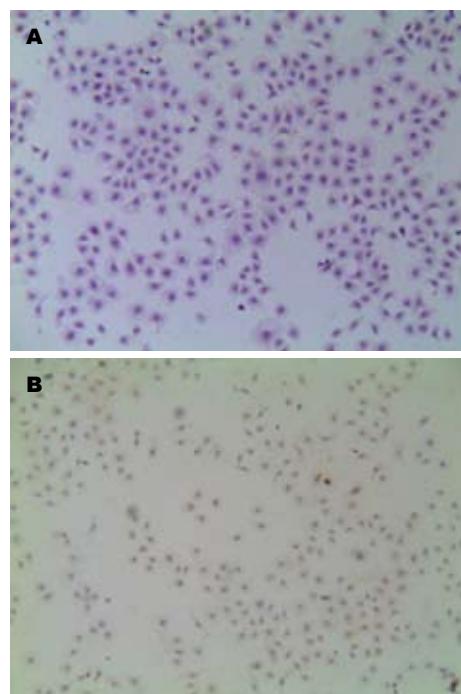


图 1 肠上皮细胞的HE以及CK-18免疫组织化学染色(×200). A: HE染色; B: CK-18免疫组织化学染色.

表达明显增加($P<0.05$), 而活化TGF- $\beta 1$ 表达无明显变化($P>0.05$), 作为对照抗体羊抗小鼠IgG组活化TGF- $\beta 1$ 和总TGF- $\beta 1$ 表达均明显上升($P<0.05$, 图4A, 表1). 结果提示IEC来源的 $\alpha V\beta 6$ 可以使非活性的TGF- $\beta 1$ 转换成活化状态.

2.2 细胞因子IL-12p70量的变化 LPS刺激前, 各组IL-12p70表达无明显的差异. LPS刺激后, 与空白组对比, 外泌体组和对照抗体羊抗小鼠IgG组IL-12p70表达明显降低($P<0.05$), OVA组和抗整合素 $\alpha V\beta 6$ 抗体组与空白组对比表达无明显差异($P>0.05$). 外泌体组有效地抵抗了LPS的促成熟作用(图4B, 表2).

3 讨论

FA和相关疾病在世界上广泛存在, 但其发病机制仍不清楚. 一般认为Th2细胞极化、DC激活、Treg、微生物产物及食物蛋白等参与FA的发生发展^[18,19]. 口服耐受是指通过口服途径接触抗原后, 机体免疫系统对该抗原表现为低反应状态, 即免疫抑制状态. 口服免疫耐受功能受损或诱导口服耐受的失败将导致肠道对食物抗原的高反应性^[20]. 口服耐受表现为肠道免疫环境的一种特殊状态, 是多种免疫细胞参与的复杂网路^[20], 其机制可能包括克隆无反应力或克隆清除, 或Treg产生及其调节作用, 活化的Treg能够表达调节性分子TGF- β 、IL-10, 从而抑制其他T

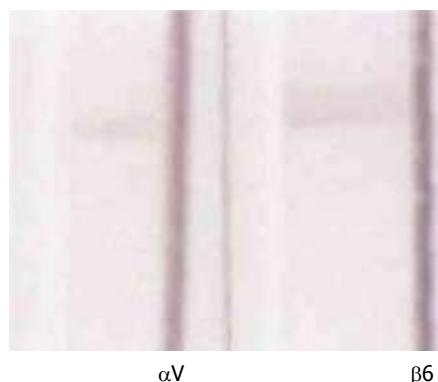


图 2 整合素 $\alpha V\beta 6$ 的免疫胶体金标注.

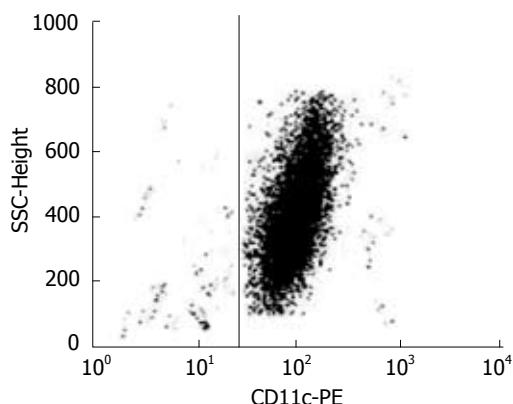


图 3 树突状细胞流式细胞分析图.

细胞(如Th1和Th2细胞)的功能. Treg活性丧失很可能在打破口服耐受和食物过敏发生中起重要作用^[21,22], 而TolDC在Treg产生和口服耐受中起关键作用. 肠道固有层拥有更多的TolDC, IEC在该细胞产生过程中具有重要作用, 而TolDC能够使肠道针对食物抗原保持免疫耐受状态.

$\alpha V\beta 6$ 是整合素 αV 亚家族的一种(包括: $\alpha V\beta 1$ 、 $\alpha V\beta 3$ 、 $\alpha V\beta 5$ 、 $\alpha V\beta 6$ 和 $\alpha V\beta 8$), 只在肠道、呼吸道上皮细胞中表达. 他在正常上皮细胞中表达量很少或难以检测, 但其表达量随着上皮细胞的激活而迅速增加^[23]. 我们前期研究结果显示: 体外培养IEC, 经食物抗原刺激后, IEC中 $\alpha V\beta 6$ 的表达量增加; 体外得到的外泌体经食物抗原刺激后, 能够携带 $\alpha V\beta 6$ 和抗原, 并可被DC捕获. DC可表达具有生物活性的IL-12p70, 他是启动Th1反应的关键细胞因子, 可诱导Th0向Th1分化, 启动细胞免疫, 决定免疫激活还是免疫耐受. 基于前期研究基础, 我们推测: IEC来源的 $\alpha V\beta 6$ 在肠道TolDC产生中可能具有关键作用, 本实验表明经OVA刺激的IEC来源外泌体含有 $\alpha V\beta 6$, 外泌体使DC表达活性TGF- $\beta 1$ 的量明显增加. TolDC高表达TGF- β , TGF- $\beta 1$ 不影响DC

■同行评价

本文通过体外实验, 研究肠上皮来源的整合素 α V β 6对DC功能的影响, 这对剖析口服耐受形成的分子机制, 做了有意义的探索。

表 1 不同组的DC培养上清液中活化TGF- β 1和总TGF- β 1的浓度 ($n = 6$, mean \pm SD, ng/L)

分组	活化TGF- β 1	总TGF- β 1
空白对照组	35.930 \pm 10.108 ^c	176.947 \pm 23.071 ^{ce}
OVA组	43.323 \pm 13.479 ^c	226.636 \pm 40.355 ^a
外泌体组	80.532 \pm 26.167 ^{ae}	210.749 \pm 31.509 ^a
外泌体+抗整合素 α V β 6组	44.943 \pm 3.777 ^c	216.765 \pm 51.663 ^a
外泌体+羊抗小鼠IgG组	86.698 \pm 23.221 ^{ae}	237.157 \pm 27.207 ^a

^aP<0.05 vs 空白对照组; ^bP<0.05 vs 外泌体组; ^cP<0.05 vs OVA组.

表 2 不同组的DC培养上清液中IL-12p70在LPS刺激前后的量 ($n = 6$, mean \pm SD, ng/L)

分组	LPS刺激前	LPS刺激后
空白对照组	49.487 \pm 4.355	327.388 \pm 25.005 ^c
OVA组	47.984 \pm 2.265	348.015 \pm 17.272 ^c
外泌体组	51.721 \pm 3.335	145.804 \pm 11.690 ^{ae}
外泌体+抗整合素 α V β 6组	50.265 \pm 3.732	350.581 \pm 68.645 ^c
外泌体+羊抗小鼠IgG组	53.512 \pm 3.390	167.422 \pm 18.366 ^{ae}

^aP<0.05 vs 空白对照组; ^bP<0.05 vs 外泌体组; ^cP<0.05 vs OVA组.

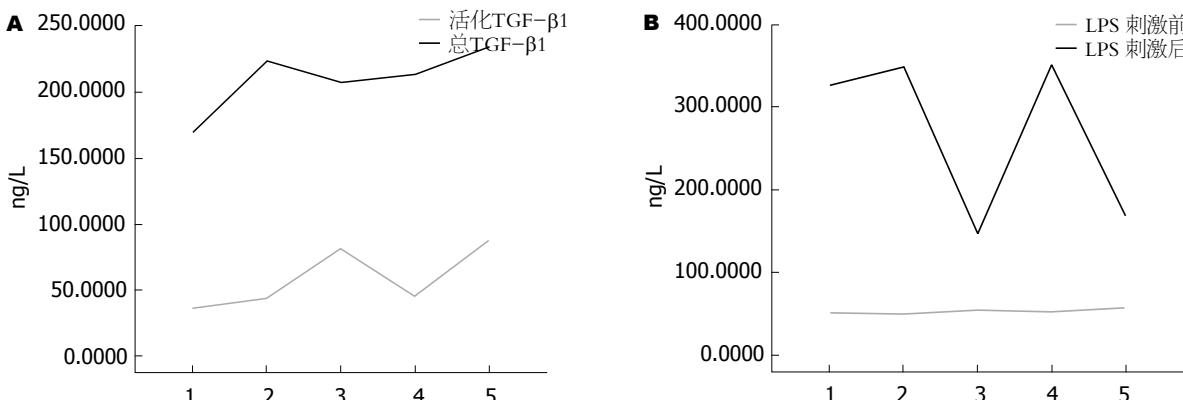


图 4 TGF- β 1以及IL-12p70的剂量曲线图。A: TGF- β 1; B: IL-12p70; 1: 空白组; 2: OVA组; 3: 外分泌组; 4: 外分泌+抗整合素 α V β 6; 5: 外分泌组+羊抗小鼠IgG组。

的分化, 因此也不影响DC的特异性标志CD11c的表达, 但他抑制DC的成熟和IL-12p70的表达。研究发现, 当肠黏膜屏障被破坏, 上皮通透性增高时, 食物抗原的经上皮转运会明显加强, 肠道免疫系统对微生物产物和食物大分子抗原摄取增多, 这样会加剧机体对食物抗原的Th2极化, 发生食物过敏^[24]。

总之, 本实验证明, 完整的IEC经OVA刺激后形成的含有 α V β 6的外泌体对DC的成熟、功能以及细胞因子的表达均有抑制作用。在DC的培养体系中加入IEC来源的 α V β 6能够培养出更为幼稚的DC, 且对外源性的刺激(LPS)呈低反应性, 所以IEC来源的 α V β 6在诱导免疫耐受上可

能更有优势, 对TolDC的产生具有关键作用。

4 参考文献

- Sicherer SH, Leung DY. Advances in allergic skin disease, anaphylaxis, and hypersensitivity reactions to foods, drugs, and insects in 2008. *J Allergy Clin Immunol* 2009; 123: 319-327
- Vierk KA, Koehler KM, Fein SB, Street DA. Prevalence of self-reported food allergy in American adults and use of food labels. *J Allergy Clin Immunol* 2007; 119: 1504-1510
- Mizrahi M, Ilan Y. The gut mucosa as a site for induction of regulatory T-cells. *Curr Pharm Des* 2009; 15: 1191-1202
- Shreffler WG, Wanich N, Moloney M, Nowak-Wegrzyn A, Sampson HA. Association of allergen-specific regulatory T cells with the onset of clinical tolerance to milk protein. *J Allergy Clin Immunol*

- 2009; 123: 43-52. e7
- 5 Lagaraine C, Lemoine R, Baron C, Nivet H, Velge-Roussel F, Lebranchu Y. Induction of human CD4+ regulatory T cells by mycophenolic acid-treated dendritic cells. *J Leukoc Biol* 2008; 84: 1057-1064
- 6 Massacand JC, Kaiser P, Ernst B, Tardivel A, Bürki K, Schneider P, Harris NL. Intestinal bacteria condition dendritic cells to promote IgA production. *PLoS One* 2008; 3: e2588
- 7 Bozza S, Montagnoli C, Gaziano R, Rossi G, Nkwanyuo G, Bellocchio S, Romani L. Dendritic cell-based vaccination against opportunistic fungi. *Vaccine* 2004; 22: 857-864
- 8 Watanabe T, Higuchi K, Kobata A, Nishio H, Tanigawa T, Shiba M, Tominaga K, Fujiwara Y, Oshitani N, Asahara T, Nomoto K, Takeuchi K, Arakawa T. Non-steroidal anti-inflammatory drug-induced small intestinal damage is Toll-like receptor 4 dependent. *Gut* 2008; 57: 181-187
- 9 Ehlers M, Ravetch JV. Opposing effects of Toll-like receptor stimulation induce autoimmunity or tolerance. *Trends Immunol* 2007; 28: 74-79
- 10 Butler M, Ng CY, van Heel DA, Lombardi G, Lechler R, Playford RJ, Ghosh S. Modulation of dendritic cell phenotype and function in an in vitro model of the intestinal epithelium. *Eur J Immunol* 2006; 36: 864-874
- 11 Godlewski MM, Hallay N, Bierla JB, Zabielski R. Molecular mechanism of programmed cell death in the gut epithelium of neonatal piglets. *J Physiol Pharmacol* 2007; 58 Suppl 3: 97-113
- 12 Munger JS, Huang X, Kawakatsu H, Griffiths MJ, Dalton SL, Wu J, Pittet JF, Kaminski N, Garat C, Matthay MA, Rifkin DB, Sheppard D. The integrin alpha v beta 6 binds and activates latent TGF beta 1: a mechanism for regulating pulmonary inflammation and fibrosis. *Cell* 1999; 96: 319-328
- 13 Luketic L, Delanghe J, Sobol PT, Yang P, Frotten E, Mossman KL, Gauldie J, Bramson J, Wan Y. Antigen presentation by exosomes released from peptide-pulsed dendritic cells is not suppressed by the presence of active CTL. *J Immunol* 2007; 179: 5024-5032
- 14 Théry C, Ostrowski M, Segura E. Membrane vesicles as conveyors of immune responses. *Nat Rev Immunol* 2009; 9: 581-593
- 15 Mallegol J, Van Niel G, Lebreton C, Lepelletier Y, Candall C, Dugave C, Heath JK, Raposo G, Cerf-Bensussan N, Heyman M. T84-intestinal epithelial exosomes bear MHC class II/peptide complexes potentiating antigen presentation by dendritic cells. *Gastroenterology* 2007; 132: 1866-1876
- 16 Ghannad F, Nica D, Fulle MI, Grenier D, Putnins EE, Johnston S, Eslami A, Koivisto L, Jiang G, McKee MD, Häkkinen L, Larjava H. Absence of alphavbeta6 integrin is linked to initiation and progression of periodontal disease. *Am J Pathol* 2008; 172: 1271-1286
- 17 纪华英, 陈其奎, 曾晖. 小鼠小肠上皮细胞的体外原代培养. 医学综述 2010; 16: 1417-1418
- 18 Ramirez-Espain X, Ruiz L, Martin-Malpartida P, Oschkinat H, Macias MJ. Structural characterization of a new binding motif and a novel binding mode in group 2 WW domains. *J Mol Biol* 2007; 373: 1255-1268
- 19 Mandron M, Ariès MF, Brehm RD, Tranter HS, Acharya KR, Charveron M, Davrinche C. Human dendritic cells conditioned with *Staphylococcus aureus* enterotoxin B promote TH2 cell polarization. *J Allergy Clin Immunol* 2006; 117: 1141-1147
- 20 Sicherer SH, Leung DY. Advances in allergic skin disease, anaphylaxis, and hypersensitivity reactions to foods, drugs, and insects in 2009. *J Allergy Clin Immunol* 2010; 125: 85-97
- 21 Huter EN, Punkosdy GA, Glass DD, Cheng LI, Ward JM, Shevach EM. TGF-beta-induced Foxp3+ regulatory T cells rescue scurfy mice. *Eur J Immunol* 2008; 38: 1814-1821
- 22 Khattri R, Cox T, Yasayko SA, Ramsdell F. An essential role for Scurfin in CD4+CD25+ T regulatory cells. *Nat Immunol* 2003; 4: 337-342
- 23 DiCara D, Rapisarda C, Sutcliffe JL, Violette SM, Weinreb PH, Hart IR, Howard MJ, Marshall JF. Structure-function analysis of Arg-Gly-Asp helix motifs in alpha v beta 6 integrin ligands. *J Biol Chem* 2007; 282: 9657-9665
- 24 张利利, 郑鹏远, 罗予, 王新亭, 刘志强, 黄煌. 双歧杆菌对食物过敏小鼠肠道屏障功能及Th1/Th2细胞因子的影响. 世界华人消化杂志 2009; 17: 1091-1097

编辑 张姗姗 电编 鲁亚静

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

• 消息 •

《世界华人消化杂志》被评为中国精品科技期刊

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

Ezrin和HER2在胃癌组织芯片中的表达及意义

郭云娣, 李小宁, 白光辉

郭云娣, 李小宁, 苏州卫生职业技术学院 苏州检验医学生物技术重点实验室 江苏省苏州市 215009
白光辉, 苏州市立医院 江苏省苏州市 215008

郭云娣, 主任医师, 副教授, 主要从事肿瘤病理的研究.

作者贡献分布: 此研究由郭云娣、李小宁及白光辉共同设计; 实验部分由郭云娣与李小宁完成; 数据整理分析由郭云娣与白光辉完成; 论文写作由郭云娣、李小宁及白光辉共同完成.

通讯作者: 郭云娣, 主任医师, 副教授, 215009, 江苏省苏州市国际教育园北区科华路28号, 苏州卫生职业技术学院, 苏州检验医学生物技术重点实验室. gyd1964@163.com

电话: 0512-62690187

收稿日期: 2011-12-05 修回日期: 2012-04-20

接受日期: 2012-05-18 在线出版日期: 2012-06-18

Clinical significance of expression of Ezrin and HER2 proteins in gastric cancer

Yun-Di Guo, Xiao-Ning Li, Guang-Hui Bai

Yun-Di Guo, Xiao-Ning Li, Health College of Suzhou; Suzhou Key Laboratory of Biotechnology For Laboratory Medicine, Suzhou 215009, Jiangsu Province, China
Guang-Hui Bai, Suzhou Municipal Hospital, Suzhou 215008, Jiangsu Province, China

Correspondence to: Yun-Di Guo, Chief Physician, Associate Professor, Health College of Suzhou; Suzhou Key Laboratory of Biotechnology For Laboratory Medicine, 28 Kehua Road, International Education Park, Suzhou 215009, Jiangsu Province, China. gyd1964@163.com

Received: 2011-12-05 Revised: 2012-04-20

Accepted: 2012-05-18 Published online: 2012-06-18

Abstract

AIM: To investigate the expression of Ezrin and human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) proteins in normal gastric mucosa and gastric cancer tissues and to analyze their correlation with tumor invasion and metastasis.

METHODS: Immunohistochemistry was performed to detect Ezrin and HER2 protein expression using tissue microarray (TMA) containing paraffin-embedded normal gastric mucosa and gastric cancer tissue samples. Of 485 primary gastric adenocarcinoma samples detected, 19 had well differentiated cancer, 235 had moderately differentiated cancer, and 231 had poorly differentiated cancer; 353 had lymph node metastasis; 166 had TNM stage I to II cancer, 319 had stage III to IV cancer. Forty paraffin-embedded

tissue blocks of normal gastric epithelium were used as controls.

RESULTS: Ezrin and HER2 protein expression in gastric cancer was significantly higher than in normal gastric mucosa. Ezrin and HER2 protein expression was closely associated with Lauren's histological type and tumor differentiation ($\chi^2 = 17.625, 20.386$, both $P = 0.000$; $\chi^2 = 9.474, P = 0.009$, $\chi^2 = 13.377, P = 0.010$). Ezrin protein expression was also closely associated with Japanese histological type, TNM stage, depth of invasion and lymph node metastasis ($\chi^2 = 37.542, 12.237, 21.194, 9.868; P = 0.000, 0.002, 0.002, 0.007$). The expression of Ezrin was positively correlated to that of HER2 in gastric cancer ($r = 0.129, P = 0.004$).

■背景资料

近年来, Ezrin蛋白在肿瘤的浸润和转移中的作用逐渐受到重视, 但研究结果不尽相同.

CONCLUSION: Ezrin protein may be a useful marker for predicting the invasion and metastasis of gastric cancer. Combined detection of expression of Ezrin and HER2 proteins can help predict prognosis and devise individualized treatment in patients with gastric cancer.

Key Words: Gastric cancer; Ezrin; Human epidermal growth factor receptor 2; Tissue microarray

Guo YD, Li XN, Bai GH. Clinical significance of expression of Ezrin and HER2 proteins in gastric cancer. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2012; 20(17): 1559-1563

摘要

目的: 探讨Ezrin蛋白在胃癌组织中的表达, 与肿瘤浸润、转移的关系及与HER2的相互作用.

方法: 485例原发性胃癌组织中高、中、低分化胃癌分别为19例、235例和231例; 有淋巴结转移者353例; TNM分期I、II期166例, III、IV期319例. 另外取距肿瘤7 cm的正常胃黏膜组织40例. 制成8个组织芯片蜡块, 用免疫组织化学方法检测石蜡包埋的胃及胃癌组织中的Ezrin和人类表皮生长因子受体2(human epidermal growth factor receptor 2, HER2)蛋白表达. 所有患者均经外科手术治疗, 病理诊断明确, 术前未经放、化疗.

结果: Ezrin和HER2在胃癌组织中高表达, 二

■同行评议者

刘冰熔, 教授, 哈尔滨医科大学附属第二临床医院消化内科

■ 相关报道

Li等在2011年的研究提示Ezrin蛋白的高表达与胃癌组织的侵袭与转移相关, 而同年, 牛嫣阳的研究结果却与之相反; 另一些研究发现: Ezrin蛋白在高度恶性肿瘤中的表达比低度恶性肿瘤高3倍。

者均与肿瘤Lauren's分型和肿瘤分化程度相关($\chi^2 = 17.625, P = 0.000$; $\chi^2 = 9.474, P = 0.009$, $\chi^2 = 13.377, P = 0.010$); Ezrin同时还与组织学(日本分型)、TNM分期、浸润深度和淋巴结转移相关($\chi^2 = 37.542, P = 0.000$; $\chi^2 = 12.237, P = 0.002$; $\chi^2 = 21.194, P = 0.002$; $\chi^2 = 9.868, P = 0.007$)。Ezrin和HER2蛋白表达呈正相关($r = 0.129, P = 0.004$)。

结论: Ezrin可能是预测胃癌组织浸润、转移有用的指标; 联合检测Ezrin和HER2可作为判断胃癌预后、筛选高危转移患者的有效指标并有可能用于指导胃癌的个体化治疗。

关键词: 胃癌; Ezrin; 人类表皮生长因子受体2; 组织芯片

郭云娣, 李小宁, 白光辉. Ezrin和HER2在胃癌组织芯片中的表达及意义. 世界华人消化杂志 2012; 20(17): 1559-1563
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/1559.asp>

0 引言

胃癌是发病率较高的胃肠道恶性肿瘤, 其早期症状不明显但病情发展迅速并易转移, 而淋巴结转移给临床治疗和预后带来巨大影响。胃癌发生发展的分子机制尚不十分清楚, 人们一直在致力寻找胃癌恶性程度、侵袭转移的预测及靶向治疗的指标。近年来的研究^[1-4]发现肿瘤转移相关基因Ezrin蛋白的表达可以促进多种肿瘤的浸润和转移, 在胃癌^[5]组织中的高表达也与其恶性进展和不良预后相关。人类表皮生长因子受体2(human epidermal growth factor receptor 2, HER2)目前已经在卵巢癌、子宫内膜癌等多种人类肿瘤中检测到, HER2基因的扩增及其蛋白的阳性表达, 尤其在乳腺癌中已得到深入地研究。以HER2为靶点的人源化单克隆抗体曲妥珠单抗, 可以抑制HER2相关肿瘤的增殖, 并用于临床乳腺癌的靶向治疗, 而在胃癌中存在HER2的过表达是Sakai等^[6]于1986年首次报道。现在已经有前期临床试验证实曲妥珠单抗对HER2阳性的裸鼠胃癌模型有显著的抗肿瘤作用^[7], 而符合怎样条件的胃癌患者能受益于曲妥珠单抗的治疗尚未研究清楚, 对于不能接受曲妥珠单抗的部分患者是否可以考虑以Ezrin为靶点的治疗? 本实验通过免疫组织化学方法并结合组织芯片技术对Ezrin和HER2蛋白在胃癌组织中的表达情况进行检测, 分析其与不同的临床病理指标的关系, 旨在探讨二者在胃癌发生、侵袭

和转移过程中可能发挥的作用及二者表达之间的相关关系, 从而为胃癌的浸润、转移、预后及可能的个体化治疗提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料 收集苏州市立医院手术切除胃癌标本490例, 为病理科2004-01/2010-12的存档蜡块, 均为住院患者, 均有详细的临床资料, 年龄22-85岁, 中位年龄63.1岁; 取同期患者胃癌旁7 cm正常黏膜组织40例为对照组织。全部患者术前均未接受放疗或化疗, 所有标本均经2位病理专家进行组织病理证实。

1.2 方法

1.2.1 组织芯片制备: 490例胃癌组织标本经4%甲醛固定、常规石蜡包埋制片, HE染色后, 在显微镜下标记定位、找出石蜡块上标记的对应肿瘤组织, 自制成10×14组织阵列(每1标本取2块组织芯, 其直径1.6 mm)蜡块7块(有定位用芯点)。其中5例由于未取到肿瘤或染色后掉片予以剔除, 本实验有效组织485例。正常组织取自手术残端(选取距肿瘤7 cm以上的胃黏膜组织)共40例, 并做成一个独立的组织芯片蜡块1块(芯片技术的专利号为: 200920350099.2)。

1.2.2 免疫组织化学染色: Ezrin为鼠抗人单克隆浓缩型抗体, 采用1:100比例稀释, 用柠檬酸盐缓冲液修复, HER2为兔抗人多克隆抗体(福州迈新公司)。常规石蜡包埋, 4 μm厚连续切片。采用Envision免疫组织化学法, 以PBS液代替一抗作为阴性对照; 以试剂公司提供的阳性对照片作为阳性对照。

1.2.3 结果判定: 采用Olympus光学显微镜观察。Ezrin阳性表达定位于细胞浆, 呈现棕黄色颗粒为阳性信号, 结果判定方法按照Fromowitz等^[8]方法: 表达强度由染色深度(A)及阳性细胞百分比(B)共同评分, A: 阳性细胞染色深度按无着色、淡黄色、棕黄色、棕褐色分别计0、1、2、3分; B: 阳性细胞所占百分比按阳性细胞数≤5%、6%-25%、26%-50%、51%-75%、>76%分别计0、1、2、3、4分, A+B即为免疫组织化学评分。评分≥4者为阳性高表达, 2-4者低表达, ≤1为阴性。HER2阳性表达于胃癌肿瘤细胞膜, 呈黄褐色细颗粒状。其评分标准按照施达仁^[9]胃癌中HER2的检测评分标准。分为: 0, +为阴性; ++为低表达或不明确; +++为阳性或高表达。

统计学处理 应用SPSS13.0软件进行统计分析, 定性资料的统计学分析应用 χ^2 检验; 采用

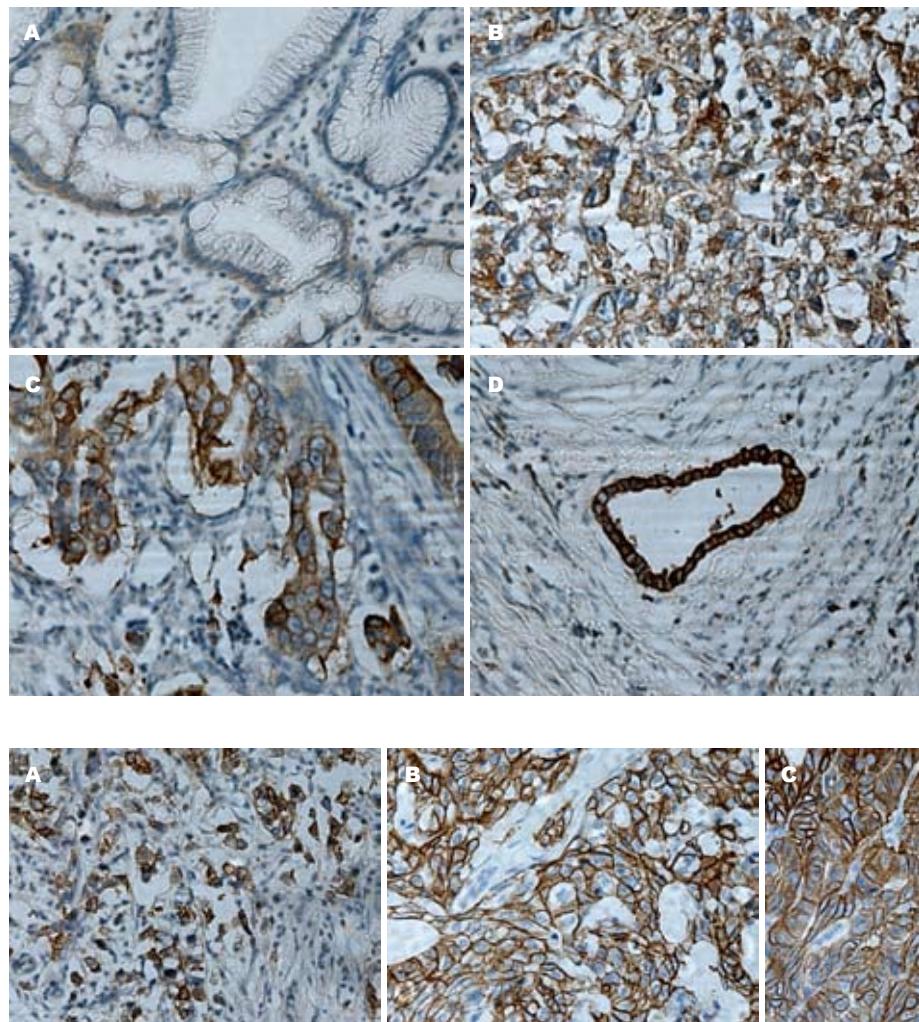


图1 Envision免疫组织化学染色法检测Ezrin在正常胃黏膜和胃癌组织中的表达($\times 400$). A: 低表达, 正常胃黏膜; B: 高表达, 低分化腺癌; C: 高表达, 中分化腺癌; D: 高表达, 高分化腺癌.

■应用要点
联合检测Ezrin和HER2可作为判断胃癌预后、筛选高危转移患者的有效指标, 并有可能用于指导胃癌的个体化治疗.

图2 Envision免疫组织化学染色法检测HER2在胃癌组织中的表达($\times 400$). A: 高表达, 低分化腺癌; B: 高表达, 中分化腺癌; C: 高表达, 乳头状腺癌.

Spearman等级相关性分析Ezrin和HER2蛋白表达的相互关系, 以 $\alpha = 0.05$ 为检验水准, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义.

2 结果

2.1 Ezrin、HER2在正常胃黏膜及胃癌组织中的表达 40例正常胃黏膜组织中Ezrin的表达率为5.0%(2/40)且均为弱阳性; Ezrin(图1)和HER2(图2)在485例胃癌中的阳性表达率分别为64.90%(271+44/485)和16.9%(40+42/485). Ezrin的表达在胃癌组织和正常胃黏膜组织中的阳性表达情况间差异有统计学意义($P < 0.01$).

2.2 Ezrin和HER2表达与胃癌组织临床病理特征的关系 在485例胃癌中, Ezrin蛋白的表达与患者年龄、性别无关($P > 0.05$)、但与肿瘤组织学Lauren's分型^[10]、日本分型^[11]、肿瘤分化程度、TNM分期、浸润深度^[12]、淋巴结转移相关($P < 0.05$); HER2的表达仅与胃癌组织分化程

度、组织学Lauren's分型相关($P < 0.05$, 表1).

2.3 胃癌组织中Ezrin和HER2的相关性 Spearman等级相关性分析结果显示Ezrin和HER2呈正相关($r = 0.129, P = 0.004$, 表2).

3 讨论

Ezrin是ERM(Ezrin, radixin, moesin)家族中研究较深入的细胞内骨架蛋白, 通过其C-、N-末端分别与细胞骨架和细胞膜蛋白结合, 其结合不仅具有结构功能而且对细胞的分化、形态、迁移性等有重要的调节作用. 研究^[5]显示: Ezrin蛋白家族在控制癌细胞分化、浸润、转移的生物学特性上显得尤为重要. 翟建文等^[13]检测Ezrin在食管癌及癌旁正常组织中的表达, 表明Ezrin在食管鳞状细胞癌中的表达率明显高于癌旁正常组织, 提示Ezrin可能在食管癌的发生、发展过程中发挥着重要作用; 更有意义的是, 其表达与肿瘤的浸润深度和淋巴结转移密切相关, 说

■名词解释

Ezrin: ERM细胞骨架相关蛋白家族成员之一, 参与细胞骨架组建; Ezrin亦是酪氨酸激酶底物, 可能诱导肿瘤细胞侵袭表型发生, 参与细胞迁移和转移。

表1 胃癌组织中Ezrin和HER2蛋白表达与临床特征间的关系^{n (%)}

临床特征	n	Ezrin			P值	HER2			P值
		阴性	低	高		阴性	低	高	
年龄(岁)					0.533				0.787
<65	267	89(33.3)	27(10.1)	151(56.6)		224(83.9)	21(7.9)	22(8.2)	
≥65	218	81(37.2)	17(7.8)	120(55.0)		179(82.1)	21(9.6)	18(8.3)	
性别					0.672				0.842
男	375	121(33.9)	33(9.2)	203(56.9)		295(82.6)	31(8.7)	31(8.7)	
女	128	81(37.2)	11(8.6)	68(53.1)		108(84.4)	11(8.6)	9(7.0)	
Lauren分型					0.000				0.009
肠型	254	67(26.4)	26(10.2)	116(63.4)		199(78.3)	26(10.2)	29(11.4)	
弥散型	231	103(44.6)	18(7.8)	110(47.6)		204(88.3)	16(6.9)	11(4.8)	
组织学					0.000				0.084
Pap	4	2(50.0)	0	2(50.0)		3(75.0)	1(25.0)	0	
Tub1	17	4(23.5)	0	13(76.5)		13(76.5)	3(17.6)	1(5.9)	
Tub2	234	60(25.6)	24(10.3)	150(64.1)		182(77.8)	26(11.1)	26(11.1)	
Por1	165	65(39.4)	16(9.7)	84(50.9)		144(87.3)	11(6.7)	10(6.1)	
Por2	2	1(50.0)	0	1(50.0)		2(100)	0	0	
Muc	11	4(36.4)	2(18.2)	5(45.5)		9(81.8)	0	2(18.2)	
Sig	52	34(65.4)	2(3.8)	16(30.8)		50(96.2)	1(1.9)	1(1.9)	
组织分化					0.000				0.010
高	19	5(26.3)	0	14(73.7)		14(73.7)	4(21.1)	1(5.3)	
中	235	62(26.4)	26(11.1)	147(62.6)		184(78.3)	24(10.2)	27(11.5)	
低	231	103(44.6)	18(7.8)	110(47.6)		205(88.7)	14(6.1)	12(5.2)	
浸润深度					0.002				0.870
T1	12	11(91.7)	0	1(8.3)		11(91.7)	1(8.3)	0	
T2	74	28(37.8)	6(8.1)	40(54.1)		61(82.4)	7(9.5)	6(8.1)	
T3	386	128(33.2)	35(9.1)	223(57.8)		319(82.6)	34(8.8)	33(8.5)	
T4	13	3(23.1)	3(23.1)	7(53.8)		12(92.3)	0	1(7.7)	
TNM分期					0.002				0.342
I and II	166	75(45.2)	10(6.0)	81(48.8)		139(83.7)	17(10.2)	10(6.0)	
III and IV	319	95(29.8)	34(10.7)	190(59.6)		264(82.8)	25(7.8)	30(9.4)	
淋巴结转移					0.007				0.397
是	132	60(45.5)	7(5.3)	65(49.2)		110(83.3)	14(10.65)	8(6.1)	
否	353	110(31.2)	37(10.5)	206(58.4)		293(83.0)	28(7.9)	32(9.1)	

Tub1: 高分化管状腺癌; Tub2: 中分化管状腺癌; Por1: 实体低分化腺癌; Por2: 非实体低分化腺癌; Pap: 乳头状腺癌; Muc: 黏液腺癌; Sig: 印戒细胞癌。

表2 胃癌组织中Ezrin和HER2蛋白表达的相关性(n)

HER2	Ezrin			总计	P值	值
	阴性	低	高			
阴性	154	10	6	170		
低	33	4	7	44	0.004	0.129
高	216	28	27	271		
总计	403	42	40	485		

明Ezrin的高表达预示着肿瘤患者浸润深度及淋巴结转移率高, Ezrin的高表达也就预示着患者预后不佳。Shi等^[14]的研究结果与我们的研究结

果相同, 485例胃癌组织中Ezrin的阳性表达率为64.90%, 与Li等^[5]报道的59.2%相似; 而在正常胃黏膜组织中为5%且均表达弱阳性, 提示Ezrin可能同样在胃癌的发生、发展过程中发挥着重要作用; Ezrin蛋白的高表达还与淋巴结转移、浸润深度和TNM分期相关, 即随着TNM分期的增高、肿瘤浸润达肌层后, 淋巴结癌转移者Ezrin蛋白的表达增强, 提示预后不良。

HER2/erbB2属Her/erbB家族, 受体二聚体化是Her/erbB家族活化的重要方式, 胞外信号诱导二聚体形成, 活化胞内段酪氨酸激酶, 使自身酪氨酸位点磷酸化, 并通过募集各种接头蛋白, 依

次激活下游信号通路并参与肿瘤细胞的增殖、分化、迁移、黏附、抗凋亡和细胞转化^[15,16]。迄今, 对胃癌组织的HER2检测尚未像乳腺癌一样做到标准化, 评价标准亦未能达成共识。用免疫组织化学方法检测HER2在胃癌组织中表达的异质性很高, 文献报道约5%-30%^[16,17], 本组实验HER2在胃癌组织中阳性表达为16.9%, HER2蛋白的阳性表达与肿瘤分化、Lauren's分型相关, 而与年龄、性别、浸润深度、TNM分期、淋巴结转移不相关。胃癌患者是否能受益于曲妥珠单抗的治疗是至关重要的, Bang等^[18]研究结果令人振奋, 曲妥珠单抗联合化疗较单纯化疗可延长胃癌患者中位生存时间2.7 mo。但又引发了诸多有待进一步研究的问题, 单一靶向HER2在胃癌治疗中价值仍属有限: HER2过表达在胃癌患者中所占比例有限, 即使是HER2过表达患者, 仍有超过50%患者未获治疗反应, 有可能是在细胞内信号转导过程中存在其他通路或通路之间的相互作用影响其疗效^[19]。

对于HER2不表达和HER2虽表达但未获治疗反应者, 急需另外的靶向分子。而胃癌的发生发展是一个多因素、多阶段的复杂过程, 在癌细胞增殖过程中, 需要不同的生长因子信号通路的参与, 单独分析一个信号转导通路对肿瘤的影响可能只会得出片面的结论。因此, 联合分析肿瘤细胞增殖和转移过程信号转导通路中关键蛋白的表达特征及其对肿瘤的影响, 有重要临床意义。虽然Ezrin和HER2相关的分子机制尚不清楚, 但本组实验中Ezrin和HER2蛋白表达呈正相关, 而且二者均高表达于肠型和中分化胃癌中, 推测二者可能均参与了胃癌的发生、发展。相信随着对Ezrin和HER2研究的深入, 对二者进行联合检测将可作为判断胃癌预后、筛选高危转移患者的有效指标, 并有可能为胃癌的临床治疗开辟一条新的路径而用于指导胃癌的个体化治疗。

4 参考文献

- 1 Koon N, Schneider-Stock R, Sarlomo-Rikala M, Lasota J, Smolkin M, Petroni G, Zaika A, Boltze C, Meyer F, Andersson L, Knuutila S, Miettinen M, El-Rifai W. Molecular targets for tumour progression in gastrointestinal stromal tumours. *Gut* 2004; 53: 235-240
- 2 Pang ST, Fang X, Valdman A, Norstedt G, Pousette A, Egevad L, Ekman P. Expression of ezrin in prostatic intraepithelial neoplasia. *Urology* 2004; 63: 609-612
- 3 Lamb RF, Ozanne BW, Roy C, McGarry L, Stipp C, Mangeat P, Jay DG. Essential functions of ezrin in maintenance of cell shape and lamellipodial extension in normal and transformed fibroblasts. *Curr Biol* 1997; 7: 682-688
- 4 Fais S. A role for ezrin in a neglected metastatic tumor function. *Trends Mol Med* 2004; 10: 249-250
- 5 Li L, Wang YY, Zhao ZS, Ma J. Ezrin is associated with gastric cancer progression and prognosis. *Pathol Oncol Res* 2011; 17: 909-915
- 6 Sakai K, Mori S, Kawamoto T, Taniguchi S, Kobori O, Morioka Y, Kuroki T, Kano K. Expression of epidermal growth factor receptors on normal human gastric epithelia and gastric carcinomas. *J Natl Cancer Inst* 1986; 77: 1047-1052
- 7 Fujimoto-Ouchi K, Sekiguchi F, Yasuno H, Moriya Y, Mori K, Tanaka Y. Antitumor activity of trastuzumab in combination with chemotherapy in human gastric cancer xenograft models. *Cancer Chemother Pharmacol* 2007; 59: 795-805
- 8 Fromowitz FB, Viola MV, Chao S, Oravez S, Mishrikli Y, Finkel G, Grimson R, Lundy J. ras p21 expression in the progression of breast cancer. *Hum Pathol* 1987; 18: 1268-1275
- 9 施达仁. 胃癌中HER2的检测. 中华病理学杂志 2010; 39: 501-502
- 10 Lauren P. The two histological main types of gastric carcinoma: diffuse and so-called intestinal-type carcinoma. An attempt at a histo-clinical classification. *Acta Pathol Microbiol Scand* 1965; 64: 31-49
- 11 Japanese Gastric Cancer Association. Japanese Classification of Gastric Carcinoma - 2nd English Edition -. *Gastric Cancer* 1998; 1: 10-24
- 12 国家“重大项目”“胃癌分子分型与个体化诊疗”课题组. 胃癌病理分型和诊断标准的建议. 中华病理学杂志 2010; 39: 266-269
- 13 翟建文, 王巧梅, 王延臣, 杨海平. 埃兹蛋白的表达在食管鳞癌中的诊断价值. 中国实验诊断学 2008; 12: 1014-1017
- 14 Shi RL, Li JF, Qu Y, Chen XH, Gu QL, Zhu ZG, Liu BY. [Expression of Ezrin in gastric carcinoma and its significance]. *Zhonghua Weichang Waike Zazhi* 2006; 9: 433-435
- 15 Meric-Bernstam F, Hung MC. Advances in targeting human epidermal growth factor receptor-2 signaling for cancer therapy. *Clin Cancer Res* 2006; 12: 6326-6330
- 16 Korkaya H, Paulson A, Iovino F, Wicha MS. HER2 regulates the mammary stem/progenitor cell population driving tumorigenesis and invasion. *Oncogene* 2008; 27: 6120-6130
- 17 Rüschoff J, Dietel M, Baretton G, Arbogast S, Walch A, Monges G, Chenard MP, Penault-Llorca F, Nagelmeier I, Schlake W, Höfler H, Kreipe HH. HER2 diagnostics in gastric cancer-guideline validation and development of standardized immunohistochemical testing. *Virchows Arch* 2010; 457: 299-307
- 18 Bang YJ, Van Cutsem E, Feyereislova A, Chung HC, Shen L, Sawaki A, Lordick F, Ohtsu A, Omuro Y, Satoh T, Aprile G, Kulikov E, Hill J, Lehle M, Rüschoff J, Kang YK. Trastuzumab in combination with chemotherapy versus chemotherapy alone for treatment of HER2-positive advanced gastric or gastro-oesophageal junction cancer (ToGA): a phase 3, open-label, randomised controlled trial. *Lancet* 2010; 376: 687-697
- 19 周尘飞, 张俊, 朱正纲. 靶向抑制Her2在胃癌治疗中的应用. 世界华人消化杂志 2010; 18: 3648-3655

■同行评价
本研究课题设计简单合理, 有一定学术价值。

黏胆症临床文献复习及诊治分析80例

禹正杨, 郭涛, 李汉贤, 王婷安, 邓国庆, 朱钢

■背景资料

黏胆症在临幊上较为“罕见”，误诊率很高、预后较差，临幊医生对此病症认识又相対不足，目前对黏胆症尚缺乏系统性文献回顾。

禹正杨, 郭涛, 李汉贤, 王婷安, 邓国庆, 朱钢, 南华大学附属第一医院肿瘤外科 湖南省衡阳市 421001

禹正杨, 副教授, 硕士生导师, 主要从事胃肠肿瘤外科及外科器械辅助设计的研究。

国家自然科学基金资助项目, No. 30901913

湖南省自然科学基金资助项目, No. 11JJ9021

湖南省中医药管理局基金资助项目, No. 2009104

作者贡献分布: 本文写作由禹正杨、郭涛及朱钢完成; 郭涛、王婷安及邓国庆查阅相关资料; 李汉贤进行修改指导。

通讯作者: 禹正杨, 副主任医师, 副教授, 421001, 湖南省衡阳市船山路69号, 南华大学附属第一医院肿瘤外科。
yulinlin@sohu.com

收稿日期: 2012-01-10 修回日期: 2012-03-20

接受日期: 2012-04-25 在线出版日期: 2012-06-18

Diagnosis and treatment of mucobilia: A review and analysis of 80 cases

Zheng-Yang Yu, Tao Guo, Han-Xian Li, Ting-An Wang, Guo-Qing Deng, Gang Zhu

Zheng-Yang Yu, Tao Guo, Han-Xian Li, Ting-An Wang, Guo-Qing Deng, Gang Zhu, Department of Surgical Oncology, the First Affiliated Hospital of University of South China, Hengyang 421001, Hunan Province, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30901913; the Natural Science Foundation of Hunan Province, No. 11JJ9021; the Foundation of Traditional Medicine Department of Hunan Province, No. 2009104

Correspondence to: Zheng-Yang Yu, Associate Professor, Department of Surgical Oncology, the First Affiliated Hospital of University of South China, 69 Chuanshan Road, Hengyang 421001, Hunan Province, China. yulinlin@sohu.com

Received: 2012-01-10 Revised: 2012-03-20

Accepted: 2012-04-25 Published online: 2012-06-18

Abstract

AIM: To discuss the epidemiology, diagnosis, and treatment of mucobilia in China to provide a reference for clinicians.

METHODS: All statistical data were obtained from the available literature. Non-overlapping cases were all selected, while cases with the longest time span or with the largest number were selected when overlapping cases existed. A total of 12 papers were included, and 4 of them reported more than 5 cases. The largest number of cases in a single paper is 22.

RESULTS: A total of 12 qualified papers re-

porting 80 cases of mucobilia were included. Preoperative diagnosis of mucobilia is difficult. The rate of misdiagnosis reached 48%, and mucobilia has no significant specificity compared with some diseases presenting with benign and malignant obstructive jaundice. The annual mortality rate was 16.44%. Preoperative diagnosis mainly depends on clinical presentation and ultrasound, CT, ERCP, PTC and other auxiliary examinations. If intraoperative bile duct exploration reveals a large amount of jelly-like mucus in the cavity, a diagnosis of mucobilia can be established.

CONCLUSION: Mucobilia is a rare biliary disease having many causes such as inflammation of the bile duct and carcinoma of the bile duct. The location, extent and nature of the primary disease can be confirmed by choledochoscopy and biopsy. Preferred treatment is a complete resection of primary lesions to ensure both good and smooth drainage of the bile duct.

Key Words: Mucobilia; Diagnosis; Treatment; Biliary surgery; Retrospective analysis

Yu ZY, Guo T, Li HX, Wang TA, Deng GQ, Zhu G. Diagnosis and treatment of mucobilia: A review and analysis of 80 cases. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2012; 20(17): 1564-1569

摘要

目的: 探讨国内黏胆症的流行病学、诊断、治疗等情况, 为临幊医生提供借鉴。

方法: 将文献数据全部统计后, 无重叠病例者全部选用; 重叠病例选用时间跨度最长、病例数最多的文献。共查到有效统计文献12篇, 加上我院病例, 一共80例。其中报告5例以上的文献4篇, 病例数最多的为22例。

结果: 黏胆症术前诊断困难, 临幊误诊率高达48%, 与一般外科性质梗阻性黄疸相比, 并无显著特异性, 但其预后欠佳, 1年死亡率为16.44%。术前诊断主要依靠临幊表现及超声、CT、ERCP、PTC等辅助检查, 术中胆道探查发现胆管腔内大量胶冻样黏液, 则黏胆症

诊断成立。

结论: 黏胆症临幊上少见, 但其有着较广的病因分布, 纤维胆道镜和活体组织检查可明确诊断原发病变的部位、范围和性质。黏胆症预后欠佳, 彻底切除原发病灶、保证胆道通畅引流是首选的治疗方法。

关键词: 黏胆症; 诊断; 治疗; 外科手术; 回顾分析

禹正杨, 郭涛, 李汉贤, 王婷安, 邓国庆, 朱钢. 黏胆症临幊文献复习及诊治分析80例. 世界华人消化杂志 2012; 20(17): 1564-1569

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/1564.asp>

0 引言

黏胆症^[1](Mucobilia)是一种罕见病症, 其特征为大量胶冻样黏液淤积于肝内外胆道, 形成“黏液栓”, 使胆管梗阻、扩张, 引起梗阻性黄疸和反复发作的胆管炎。黏胆症可由多种病因导致, 故称其为一种“症”, 其病因包括可产生黏液的各种肝内胆管疾病如胆管乳头状瘤病、肝内胆管黏液腺瘤、产黏液胆管癌、胆管囊腺瘤恶变、肝内胆管囊肿恶变或胆管细胞性肝癌^[2]等。由于临幊医生对此种合并症情况认识不足, 我们通常无法将黏胆症作为一种单独的疾病来进行详细调查统计, 因此国内黏胆症具体发病情况, 目前尚无完整资料。对此, 本文将近年来国内(含台湾地区)公开发表的部分黏胆症文献并结合我院的病例进行了总结分析, 以期为各位同仁提供一些有益的借鉴。现将结果报道如下。

1 材料和方法

1.1 材料 文献信息来源及筛选: 以“粘胆(症)”、“黏胆(症)”、“胆栓”、“胆道栓子”、“粘液栓塞”为关键词检索中国期刊网全文期刊数据库(CNKI)、维普中文科技期刊数据库、万方数据等资源系统。去除无关文献, 去除内部刊物文献, 去除综述性文献。共得到文献12篇^[3-14], 全部得到原文。

1.2 方法 将文献数据全部统计后, 首先去除病例一稿多投的文献, 无重叠病例者全部选用; 重叠病例选用时间跨度最长、病例数最多的文献。共查到有效统计文献12篇, 加上我院病例, 一共80例。其中报告5例以上的文献4篇, 病例数最多的是台湾地区Chen等报告22例, 此外大陆黄颖鹏报告18例。

2 结果

2.1 一般资料 12篇文献加我院病例共报道黏胆症80例: (1)性别: 男24例, 女56例, 男女比例为1:2.33; (2)年龄: 有明确年龄报告的69例中, 发病年龄最小者35岁, 最大者78岁, 平均年龄为56.5岁; (3)既往病史: 80例病例中, 有肝胆胰病史者31例, 占38.8%(44/80)。

2.2 诊断 黏胆症术前诊断困难, 与一般外科性质梗阻性黄疸相比, 并无显著特异性。其术前诊断主要依靠临幊表现及超声、CT、ERCP、PTC等辅助检查; 术中胆道探查发现胆管腔内大量胶冻样黏液, 则黏胆症诊断成立。结合6篇文献数据及我院病例初略统计, 临幊医生对黏胆症缺乏认识, 误诊率高达48%(12/25)。

2.2.1 临幊表现: 黏胆症的临幊表现主要是右上腹痛、发热、肝脏肿大、黄疸。从报道的病例来看, 患者腹痛主要表现为隐痛或钝痛, 均无剧烈疼痛病史, 发热主要为间歇性, 以中低热为主, 偶尔有高热、寒战, 肝肿大也以轻中度为主。黄疸为所有患者最显著的表现。80例患者中, 其中首发症状为腹痛的有51例(63.75%), 黄疸63例(87.75%), 发热34例(42.50%), 肝肿大35例(43.75%)。

2.2.2 辅助检查: 80例患者均行B超检查, 行CT检查的有63例(87.75%), 行MRI检查的有49例(61.25%)。腹部B超、CT、MRI往往只有肝内外胆管扩张等间接表现。经皮肝胆管造影(percutaneous transhepatic cholangionraphy drainage, PTCD)引流出大量的黏液或内镜下逆行性胰胆管造影(endoscopic retrograde cholangiopancreatography, ERCP)发现十二指肠腔内大量的黏液, 均有助于黏胆症的诊断。术中胆道探查发现胆管腔内大量的胶冻样黏液, 是诊断黏胆症最确切的证据。病理报告: 肝内胆管乳头状瘤病29例(36.25%), 肝内胆管恶性肿瘤31例(38.75%), 肝叶纤维化、肝内胆管囊状扩张伴黏膜上皮增生15例(18.75%), 不详5例(6.25%)。

2.3 治疗 黏胆症的治疗首选外科手术, 良性病变可局部切除产黏液病灶, 恶性肿瘤应根治性切除, 清除胆道系统内黏液胶冻样物质, 通畅胆道引流。80例患者中, 行手术治疗的有73例(91.25%), 其治疗主要包括胆囊切除、相应肝叶切除、胆总管切开取石、“T”管引流术等。非手术治疗主要应用于晚期远处转移、不能切除的局部病灶以及伴随急慢性消耗性疾病的患者。其主要包括尝试取得组织病理学诊断和缓解胆道感染、胆道阻塞的症状。一般可以采用内镜

■研究前沿

传统手术探查经验往往片面强调保持胆管物理流出口通道的通畅, 认为扩张的胆道下端必有物理狭窄, 而忽视了胆道流动力学的重要性。受临幊惯性思维和传统经验的影响, 医生通常对大量“果冻状”黏液视而不见, 因而延误了黏胆症的诊治。

■应用要点

本文通过文献复习及结合具体临床病例分析, 希望能引起广大医师对黏胆症的重视。

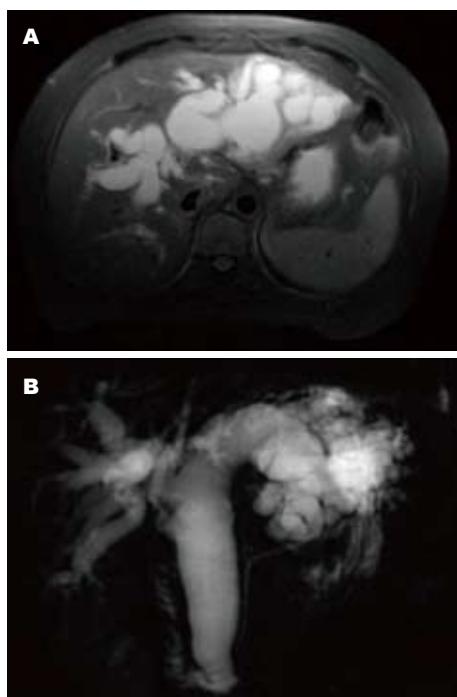


图1 MRI及MRCP观察患者胆管病变。A: MRI示肝内外胆管极度扩张; B: MRCP示胆道下端梗阻。

下鼻胆管引流(endoscopic nasobiliary drainage, ENBD)或PTCD。但由于引流液黏稠, 经常致管腔阻塞, 需要及时冲洗甚至更换置管。但如果能通畅进行胆道引流, 也能减轻症状并延长患者生存时间。

2.4 预后 结合12篇文献数据及我院病例初略统计, 73例患者术后1年死亡率为16.44%(12/73), 2例围手术期(1 mo内)死亡, 总体预后欠佳。由于黏胆症病因复杂, 且常伴有胆管结石或胆总管囊肿, 常因不能明确病因, 又或因病灶广泛、涉及双侧胆管, 或肿瘤位置不能确定, 或由于内科情况不允许(败血症休克、化脓性胆管炎等), 有相当病例无法接受肝切除术, 仅行姑息性手术, 如胆总管切开T管引流术。这些姑息性手术后患者常因原发病灶持续再次产生黏液阻塞胆管而出现胆管炎症状, 故T管不能早期拔除, 建议定时冲洗T管, 或用胆道镜清除黏液物质, 一部分患者可以期待再次手术以根治性切除产黏液病灶。

2.5 我院黏胆症典型病例临床诊治体会 女, 49岁, 因上腹胀痛、全身黄染、发热半月于2010-10-18入院。11年前曾因“胆囊结石、胆总管结石、胆道蛔虫”行“胆囊切除、胆总管探查取石术”。查体: T 37.6 °C, 急性痛苦面容, 皮肤巩膜中度黄染, 肝脏肋下、剑突下三横指, 质韧有轻度压痛, 无反跳痛。WBC $11 \times 10^9/L$, N 71.6%, TB 233.6 μmol/L, DB 182.6 μmol/L, ALT 311 U/L, AST 217

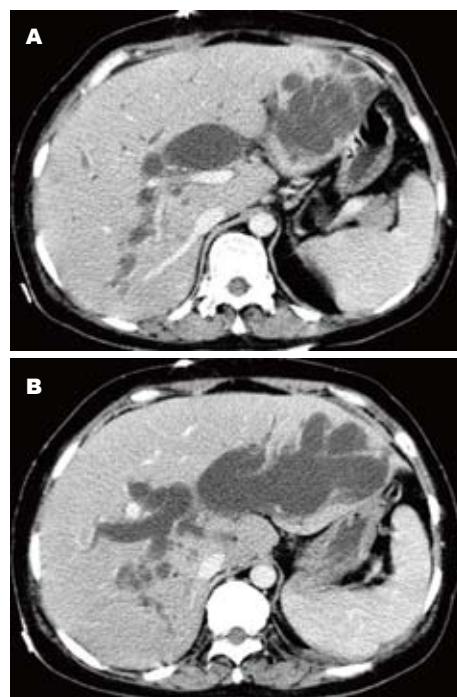


图2 第一次术后64排CT扫描图。A: 肝内外胆管扩张; B: 肝左外叶呈囊状扩张病改变。

U/L。B超: 肝内外胆管囊状扩张, 多考虑胆道下段梗阻。ERCP: Vater壶腹部通畅, 可见大量胆汁及少量脓性分泌物流出, 反复网套亦未网到结石, 逆行造影未成功, 疑为胆管外肿瘤压迫所致梗阻, 留置鼻胆管未引出胆汁。MRI及MRCP示: 肝内外胆管极度扩张, 多考虑胆道下段梗阻及壶腹部肿瘤(图1)。内科行保守治疗9 d无好转, 转肿瘤外科继续治疗。2010-10-31行胆道探查术, 发现全肝肿大变硬, 呈淤胆样表现, 肝总管胆总管均明显增粗, 直径约2.5-3 cm, 肝胆各部均未扪及肿瘤或结节, 肝外胆道全程通畅, 充满大量黏稠呈胶冻样液体, 未见结石, 吸净黏稠液体后有少量白胆汁和黄绿色胆汁流出, 留置开多个侧孔的直径1 cm橡胶引流管自肝门处经Oddis氏括约肌、十二指肠降部引出。术后经胆道引流管共引出黄绿色胆汁约600 mL, 黄疸一度减退至TB 179.99 μmol/L, DB 136.1 μmol/L。术后第3天起胆道引流管引流液以肠液为主, 黄疸再次逐渐加重, 经加压冲洗等措施无改善, 行增强薄层CT检查, 提示胆道再次梗阻、肝内外胆管扩张, 其中肝左外叶有囊状扩张病灶。ERCP再次提示Vater壶腹部通畅, 但T管逆行造影未成功(图2, 3)。在胆道完全梗阻的情况下, 于2010-11-14再次手术探查, 发现肝外胆道全程及胆道引流管内充满大量黏稠呈胶冻样液体, 行“肝左外叶切除, 肝总管空肠引流术”, 切除主要病灶-呈囊状扩张的肝左外叶

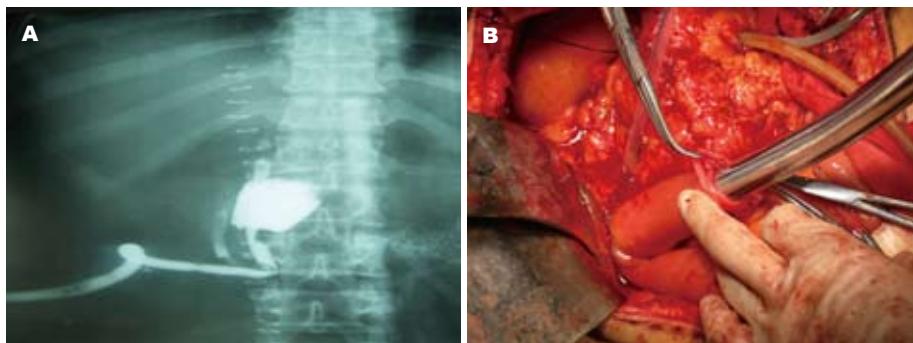


图 3 术后ERCP造影和二次手术. A: 第一次术后T管逆行造影提示胆道梗阻; **B:** 第二次手术行肝总管空肠端侧吻合.

■名词解释
黏胆症：一种由多种病因导致的较为少见的病症，其特征为大量胶冻样黏液淤积于肝内外胆道，形成“黏液栓”使胆管梗阻、扩张，引起梗阻性黄疸和反复发作的胆管炎。



图 4 切除主要病灶-呈囊状扩张的肝左外叶图. A: 胆道大量粘稠液体; **B:** 胆道大量胶冻样液体; **C:** 液体含有少量血性成分; **D:** 肝左外叶胆管呈囊状扩张; **E:** 病灶切开剖面观; **F:** 局部胆道黏膜下呈粘液瘤样改变.

(图4). 术后4 d患者死于多器官功能衰竭，病理检查报告显示为肝内胆管黏液性癌(图5)。

3 讨论

黏胆症是相对少见疾病，详细发病率尚未知，据文献报道以我国台湾较多^[14,15]，欧美地区^[16]和大陆地区^[3-13]也有个案报道。由于缺少黏胆症的疾病诊治概念，即使是患者的症状、体征和影像学资料已在术前和术中充分展示，因临床各科医生对其认识与重视程度常常不足，致其诊断困难或漏诊。

黏胆症主要临床表现主要为腹痛、黄疸和肝肿大^[14,17]，与一般外科性质梗阻性黄疸相比，并无显著特异性。辅助检查MRI和CT可发现肝内和肝外胆管呈树枝样极度扩张，且胆总管下端并无狭窄；ERCP发现胆管内有大量胶冻样黏液，部分合并有胆道结石。以上检查均有助于术前诊断。另外要着重指出的是，对于该病的正确认识，也同样是术前正确诊断的重要因素。

病因及病理生理^[18]: 正常时胆管内压力表现为胆汁的分泌压15-25 cmH₂O，在此压力下，胆汁成分顺利地由肝细胞及毛细胆管向远侧胆管分泌。胆道发生梗阻时，胆道内压力增高，当其超过30-35 cmH₂O时，则可使胆汁停止分泌并返流入血，形成黄疸；同时导致梗阻近侧的胆管扩张。肝管和胆总管是输送胆汁的通道，但也具有重吸收与分泌的功能。其管壁由黏膜、纤维基层和外膜构成。黏膜中的疏松结缔组织固有层内含分支管状黏液腺，外膜富含血管、神经，同时含有分泌浆-黏液的复管泡状腺。正常情况下，肝内胆管的容量约是数十毫升，肝外胆道的容量(含胆囊)约为100-120 mL。在梗阻性黄疸的情况下，肝内外胆管极度扩张，容量可增至正常的2-3倍。黏液为胶体，流动性较差，当部分胶体缓慢流至胆总管下端狭窄区，形成完全的充盈性阻塞。在病理情况下，如胆管结石和炎症的长期刺激可以导致胆管上皮增生，组织易位，可进一步引起乳头状增生甚至乳头状瘤。胆管细胞呈高

■ 同行评价

黏胆症少见，极易误诊，病理及临床又有其特殊性，需要深入探讨。本文的病例图片及文献总结有一定的临床意义，可供广大医师借鉴和学习。

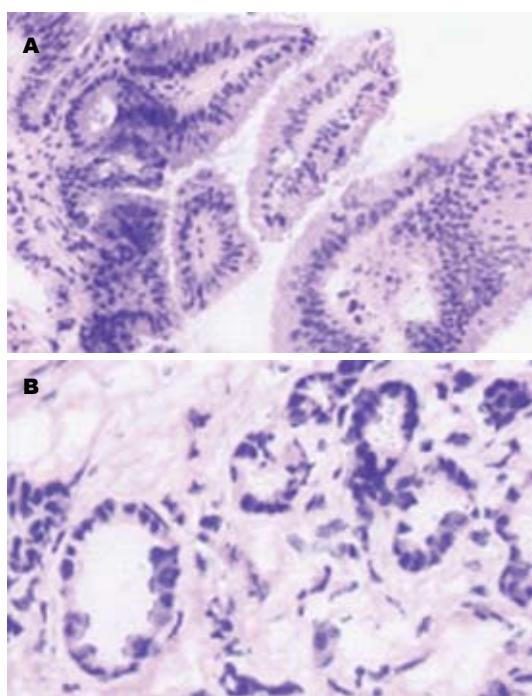


图 5 胆管黏液腺癌的组织切片观察. A: 胆管黏液腺癌HE染色($\times 100$); B: 黏膜呈弥漫性内皮增生、高分泌状态($\times 400$)。

分泌状态，大量分泌的黏液占据胆道，完全阻碍了肝细胞分泌的胆汁的流出。当其管腔内压力过大时，肝内胆汁分泌被抑制甚至停止，造成梗阻性黄疸。与胆石症和肿瘤所形成的梗阻性黄疸相比，黏胆症形成梗阻的过程较为“柔和”，是一个胶冻样黏液逐渐累积，胆汁流出道扩张与梗阻并存的过程。其梗阻的部位，推测是由第3、2级胆管顺行蔓延至胆总管。胆道的扩张是由距肝门远端至近端，逐步波及胆道树中大的分支。而与常见的原因如胆道结石或肿瘤所致的胆道梗阻，胆道扩张由肝门近端至远端不同。在黏胆症梗阻的终末端，并没有一个明显的物理狭窄或实性的栓塞。从目前文献报道所见，胆管结石、肿瘤和炎症因素是黏胆症的可能诱因之一。

病理学：胆管管腔充分扩张，上皮组织易于脱落，管腔内有较多的胶冻状黏液；镜下可见肿瘤呈乳头状增生，间有纤维血管结缔组织，表面覆盖规则柱状上皮，一般不向胆管壁深层和肝实质浸润，部分患者可见细胞异型增生和恶变。**临床：**主要表现为黄疸和胆管炎反复发作，黄疸呈波动性，与胆管癌和胰头癌所造成的进行性持续黄疸和全身情况迅速恶化不同。本病容易与黄疸型肝炎和胆石症混淆。**影像学：**B超检查通常提示肝内外胆管扩张，而ERCP是有创检查方法且成功率不高，ERCP和B超检查对本病的

诊断价值有限；利用CT和MRI是比较理想的检查方法，自从MRI尤其是MRCP应用于胆道检查，其理想程度已远远超过以往的所有方法，诊断准确性高而且无创。

由于本病相对“少见”，临床医生对黏胆症多认识不足，黏胆症术前多被误诊为胆道下段梗阻或壶腹部肿瘤等外科性黄疸。黏胆症术中探查可发现胆道树全程扩张，极度扩张的胆道内充满大量“果冻状”黏液，当吸尽胶冻样黏液后，“正常”胆汁随即流出。

传统手术探查经验往往片面强调保持胆管物理流出通道的通畅，认为扩张的胆道下端必有物理狭窄，而忽视了胆道流动力学的重要性。受临床惯性思维和传统经验的影响，医生通常对大量“果冻状”黏液视而不见，而对探查“阴性”(即未发现胆道结石、胆道下段狭窄、肿瘤等)的意外情况感到困惑不解，当术中探查发现胆道全程通畅并且扩张时，常常对本病难以诊断，仅仅行胆道探查T管引流或胆肠内引流术，易导致术后“黏液栓”再次形成，阻塞胆道致使症状复发和再次手术。应当警惕的是，对于胆道而言，手指或胆道探子能通过，并不意味着胆汁就能流过。面对扩张但不通畅的胆道，应当高度警惕本病的可能。

我们认为，对该病症的正确认识是诊断该病的重要前提条件。另外，在病例调查的过程中，手术室洗手护士及ERCP医生曾多次告知作者，既往胆道手术及胆道镜探查时也曾发现过数例“果冻状”黏液样胆汁的情况，但未予重视并深究。所以本文认为，黏胆症可能并不象既往所认为的那样少见，只是由于缺乏对本病的足够认识，未提出本病的独立诊断，造成了病例的漏诊和报道的减少。

4 参考文献

- 1 Hadjis NS, Slater RN, Blumgart LH. Mucobilia: an unusual cause of jaundice. *Br J Surg* 1987; 74: 48-49
- 2 Chamberlain RS, Blumgart LH. Mucobilia in association with a biliary cystadenocarcinoma of the caudate duct: a rare cause of malignant biliary obstruction. *HPB Surg* 2000; 11: 345-351
- 3 张蕃昌, 骆柘璜, 刘九保, 邬远志, 金爱芳, 钟礼胜, 肖晖. 黏胆症: 附7例. 中华肝胆外科杂志 2009; 15: 391-392
- 4 谭黄业, 樊献军. 粘胆症1例报告. 中国医师杂志 2006; 8: 530
- 5 韩克强, 赵弘智, 李靖, 杨彤翰. 黏胆症一例. 中华消化杂志 2009; 29: 730
- 6 姚清深, 李致文, 陈春媚. 粘胆症2例报告. 肝胆外科杂志 2003; 11: 320

- 7 张炯炯. 黏胆症2例诊治分析. 浙江大学, 2009; 9-16
- 8 屠金夫, 朱冠保, 蒋飞照, 张启瑜. 黏胆症的诊断和治疗. 中华肝胆外科杂志 2002; 8: 222-223
- 9 谭黄业, 樊献军, 张力峰. 胆管结石、胆管肿瘤并黏胆症临床分析. 西南军医 2007; 9: 53
- 10 黄新鹏, 屠金夫, 朱冠保. 黏胆症的临床诊治. 肝胆胰外科杂志 2006; 18: 307-308
- 11 朱坪, 朱万喜, 曾宗炎, 熊辉, 李世刚, 万强, 徐建军. 黏胆症的诊断和治疗. 现代医药卫生 2009; 25: 1632-1633
- 12 李春生, 王立新, 张同琳, 张能维, 周孝思. 肝内胆管粘液腺癌致反复发作急性胆管炎1例. 肝胆外科杂志 2000; 8: 409
- 13 王坚, 吴志勇, 施维锦, 季福, 孙建华, 陈涛. 肝内胆管黏液腺癌的诊治分析(附5例报告). 外科理论与实践杂志 2005; 10: 335-337
- 14 Chen MF, Jan YY, Chen TC. Clinical studies of mu-
- cin-producing cholangiocellular carcinoma: a study of 22 histopathology-proven cases. *Ann Surg* 1998; 227: 63-69
- 15 Lam CM, Yuen ST, Yuen WK, Fan ST. Biliary papillomatosis. *Br J Surg* 1996; 83: 1712-1715
- 16 Styne P, Warren GH, Kumpe DA, Halgrimson C, Kern F. Obstructive cholangitis secondary to mucus secreted by a solitary papillary bile duct tumor. *Gastroenterology* 1986; 90: 748-753
- 17 Sakamoto E, Hayakawa N, Kamiya J, Kondo S, Nagino M, Kanai M, Miyachi M, Uesaka K, Nimura Y. Treatment strategy for mucin-producing intrahepatic cholangiocarcinoma: value of percutaneous transhepatic biliary drainage and cholangioscopy. *World J Surg* 1999; 23: 1038-1043; discussion 1038-1043
- 18 黄志强. 当代胆道外科学. 第1版. 上海: 上海科学技术文献出版社, 1998: 68-85

编辑 张姗姗 电编 鲁亚静

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

• 消息 •

《世界华人消化杂志》再次入选《中文核心期刊要目总览》 (2011年版)

本刊讯 依据文献计量学的原理和方法, 经研究人员对相关文献的检索、计算和分析, 以及学科专家评审, 《世界华人消化杂志》再次入选《中文核心期刊要目总览》2011年版(即第六版)核心期刊。

对于核心期刊的评价仍采用定量评价和定性评审相结合的方法。定量评价指标体系采用了被索量、被摘量、被引量、他引量、被摘率、影响因子、被国内外重要检索工具收录、基金论文比、Web下载量等9个评价指标, 选作评价指标统计源的数据库及文摘刊物达到60余种, 统计到的文献数量共计221177余万篇次, 涉及期刊14400余种。参加核心期刊评审的学科专家达8200多位。经过定量筛选和专家定性评审, 从我国正在出版的中文期刊中评选出1982种核心期刊。

《世界华人消化杂志》在编委、作者和读者的支持下, 期刊学术水平稳步提升, 编校质量稳定, 再次被北京大学图书馆《中文核心期刊要目总览》(2011年版)收录。在此, 向关心、支持《世界华人消化杂志》的编委、作者和读者, 表示衷心的感谢! (编辑部主任: 李军亮 2012-03-08)。

口服硫酸镁对ERCP术后胰腺炎发生和血淀粉酶水平的影响

丁国乾, 秦鸣放, 邹富胜, 赵宏志

■背景资料

内镜后胰腺炎是内镜逆行胰胆管造影术(ERCP)术后最常见的并发症之一, 有少数可发展为重症胰腺炎, 会给患者带来很大痛苦, 同时也给临床医生带来一定的麻烦, 如何减少和预防ERCP术后高淀粉酶血症和急性胰腺炎已成为广大内镜工作者关注的焦点。

丁国乾, 秦鸣放, 邹富胜, 赵宏志, 天津市南开医院微创外科
天津市 300100

作者贡献分布: 此文资料总结及论文撰写由丁国乾完成; 内镜操作由秦鸣放、邹富胜及赵宏志完成; 秦鸣放负责全文理论指导。

通讯作者: 秦鸣放, 主任医师, 教授, 300100, 天津市南开区三纬路122号, 天津市南开医院微创外科中心。qins88@sina.com
电话: 022-27435268

收稿日期: 2011-11-16 修回日期: 2012-05-03

接受日期: 2012-06-02 在线出版日期: 2012-06-18

Oral magnesium prevents the development of pancreatitis and hyperamylasemia in patients after ERCP

Guo-Qian Ding, Ming-Fang Qin, Fu-Sheng Zou,
Hong-Zhi Zhao

Guo-Qian Ding, Ming-Fang Qin, Fu-Sheng Zou, Hong-Zhi Zhao, Department of Minimally Invasive Surgery, Tianjin Nankai Hospital, Tianjin 300100, China

Correspondence to: Ming-Fang Qin, Professor, Department of Minimally Invasive Surgery, Tianjin Nankai Hospital, 122 Sanwei Road, Nankai District, Tianjin 300100, China. qins88@sina.com

Received: 2011-11-16 Revised: 2012-05-03

Accepted: 2012-06-02 Published online: 2012-06-18

Abstract

AIM: To investigate the effect of oral magnesium on the development of post-endoscopic retrograde cholangiopancreatography (ERCP) pancreatitis (PEP) and hyperamylasemia.

METHODS: One hundred and twenty patients with cholelithiasis were randomly divided into two groups: magnesium group ($n = 60$), in which 50% magnesium was given 30 min before ERCP, and control group ($n = 60$), in which no magnesium was given. Serum levels of amylase were measured in all the patients before ERCP and at 3 and 24 h after ERCP. The incidences of hyperamylasemia and PEP were also observed.

RESULTS: Serum levels of amylase did not differ significantly before ERCP between the two groups ($P > 0.05$), but were higher in both groups at 3 and 24 h after ERCP than before ERCP, and were lower in the magnesium group than in the control group at 3 and 24 h after ERCP. The incidences of hyperamylasemia and PEP in magne-

sium group were significantly lower than those in the control group (both $P < 0.05$).

CONCLUSION: Oral magnesium may decrease serum levels of amylase and prevent the occurrence of PEP and hyperamylasemia in patients after ERCP.

Key Words: Magnesium; Endoscopic retrograde cholangiopancreatography; Hyperamylasemia; Severe acute pancreatitis

Ding GQ, Qin MF, Zou FS, Zhao HZ. Oral magnesium prevents the development of pancreatitis and hyperamylasemia in patients after ERCP. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2012; 20(17): 1570-1573

摘要

目的: 探讨口服硫酸镁对预防经内镜逆行胰胆管造影术(encoscopic retrograde cholangiopancreatography, ERCP)后胰腺炎发生和血淀粉酶水平的影响。

方法: 将120例拟行ERCP的胆总管结石患者随机分为观察组和对照组各60例, 观察组ERCP前30 min口服50%硫酸镁100 mL, 对照组不予硫酸镁, 观察两组术前及术后3、24 h血清淀粉酶水平及术后高淀粉酶血症和胰腺炎发生情况。

结果: 两组患者术前血清淀粉酶水平的差异无统计学意义($P>0.05$), 观察组术后3、24 h血清淀粉酶水平均显著低于对照组3、24 h血清淀粉酶水平($P<0.05$)。观察组ERCP术后的高淀粉酶血症和胰腺炎发生率均分别显著低于对照组($P<0.05$)。

结论: 口服硫酸镁在一定程度上可降低ERCP术后血清淀粉酶水平, 对预防ERCP术后高淀粉酶血症及胰腺炎可能有一定积极作用, 当需大样本证实。

关键词: 硫酸镁; 内镜逆行胰胆管造影术; 血清淀粉酶; 重症胰腺炎

丁国乾, 秦鸣放, 邹富胜, 赵宏志. 口服硫酸镁对ERCP术后胰

胰炎发生和血淀粉酶水平的影响. 世界华人消化杂志 2012; 20(17): 1570–1573
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/1570.asp>

0 引言

内镜逆行胰胆管造影术(ercoscopy retrograde cholangiopancreatography, ERCP)是广泛用于肝胆胰疾病的重要诊治手段, 内镜后胰腺炎(post-ERCP pancreatitis, PEP)是ERCP术后最常见的并发症, 文献报道发生率为1%-40%, 在多数前瞻性研究中, 其发生率在5%-10%^[1]. 有少数PEP患者可发展为重症胰腺炎(severe acute pancreatitis, SAP), 其发生率为0.3%-0.6%^[2]. 2009-06/12, 我们观察了口服硫酸镁对ERCP术后血清淀粉酶及术后高淀粉酶血症和PEP发生情况, 探讨口服硫酸镁预防ERCP术后高淀粉酶血症及PEP的可行性.

1 材料和方法

1.1 材料 选择2009-06/12我院胆总管结石患者120例, 男59例, 女61例; 年龄39-87岁, 平均年龄58岁, 两组患者性别及年龄的差异无统计学意义($P>0.05$). 内镜前均经CT或磁共振证实胆管结石. 术前血清淀粉酶正常, 排除急慢性胰腺炎、糖尿病及心肺、肝肾功能、凝血机制不全患者. 将120例患者随机分为观察组和对照组各60例, 两组一般资料具有可比性, 所有ERCP治疗均由同一固定操作者及护士协助完成. 两组均采用日本Fujinon EPX-2200电子十二指肠镜, ERBE ICC80高频电刀, 美国BOSTON公司生产的斑马导丝和造影管, 造影剂为复方泛影葡胺注射液(湖南汉森制药有限公司), 按1:1比例与0.9%氯化钠稀释. 乳头切开刀为聪明刀及针状切开刀, 机械碎石网篮, 普通取石网篮、取石气囊及美国COOK9-12Fr 1.7 m鼻胆管.

1.2 方法

1.2.1 治疗: 常规内镜准备, 术前空腹8-12 h, 术前30 min肌注山莨菪碱10 mg、地西泮10 mg、哌替啶50 mg. 观察组ERCP前30 min口服50%硫酸镁100 mL, 对照组不予硫酸镁. 患者取左侧卧位, 插入内镜至十二指肠降部, 提拉法寻找十二指肠乳头并调整好乳头位置找到十二指肠乳头, 通过监视器直视下观察十二指肠乳头及周围情况: 乳头及开口形状、有无胆汁流出及颜色、有无憩室、有无结石嵌顿. 经内镜逆行性胆管插管成功后, 先行诊断性ERCP, 在X线下以明确胆总管结石的存在及结石的位置、大小和数量, 然后行

EST, 综合乳头情况及结石的特点, 选择性行乳头切开术, 常用的切开方法有电针开窗、拉式切开刀退刀切开、推进刀推进切开等. 乳头切开均为中到大切开, 切开长度均较为充分, 如果切开长度小, 在取石过程中将加大结石对切开缘摩擦的机会, 结石直径<1.0 cm时直接用网篮或气囊从胆管内把结石取出, 以减少结石嵌顿、胆道感染发生的危险性. 插入网篮于胆管内, 并抖动网篮把结石网入篮内, 在网篮完全张开的情形下拉出胆管. 对于泥沙样结石可应用气囊取石, 将气囊置于结石上方, 充气后边下拉边适当注入造影剂, 将结石带出乳头外, 气囊造影有无残余结石, 可行多次取石. 当EST后, 胆管内结石较大, 直径>1.0 cm临床评估难以用普通取石网篮及气囊取石时, 则用机械碎石器碎石治疗, 最后插入气囊对胆道结石彻底清理, 并确认结石已取净. 所有操作者均为相对固定、有经验的医生和护士. 两组术后均禁食水24 h, 常规补充水、电解质, 静滴三代头孢类抗生素.

1.2.2 ERCP难易程度: ERCP过程中十二指肠乳头插管难易程度的判断十二指肠乳头插管难易程度主要依据插管次数来决定^[3]. 插管次数是指任何一次胰管或胆管的插入次数之和. 插管容易: 插管次数<5次; 插管中等困难: 插管次数5-10次; 插管困难: 插管次数>10次.

1.2.3 观察指标: 两组患者均于术前、术后3 h和24 h检测血清淀粉酶, ERCP术后淀粉酶高于正常上限(620 U/L, 速率法)即定义为高淀粉酶血症^[4]. 同时观察ERCP术后腹痛、呕吐、发热等症状及腹部体征, ERCP术后出现持续性的胰腺炎相关性疼痛, 并持续至术后24 h以上, 且血清淀粉酶超过正常上限的3倍即定义为PEP^[5].

统计学处理 使用SPSS13.0统计软件进行统计学处理. 对两组患者胰腺炎及高淀粉酶血症发生率比较采用 χ^2 检验或Fisher的精确检验. 两组患者术前、术后淀粉酶以mean±SD表示, 组间比较采用完全随机化t检验比较组间差异. $P<0.05$ 为差异有统计学意义.

2 结果

2.1 两组十二指肠乳头插管难易程度的比较 所有患者十二指肠乳头插管均成功, 口服硫酸镁组与对照组相比, 插管难易程度差异无统计学意义($P>0.05$), 说明口服硫酸镁并不能降低插管的难度(表1).

2.2 两组血清淀粉酶术前、术后检测 两组患

■相关报道
避免内镜后胰腺炎可以通过提高内镜操作、药物等方法来预防, 当操作经验丰富时, 药物预防就显得尤为重要. 2004年李兆申教授发表了奥曲肽预防ERCP术后胰腺炎及高淀粉酶血症的多中心随机对照临床研究, 开创了药物预防之先河.

■创新盘点

本文提出术前口服硫酸镁对高淀粉酶血症和内镜后胰腺炎均有一定的预防作用, 可以降低内镜后胰腺炎和高淀粉酶血症的发生率, 具有重要的临床指导意义。

表1 十二指肠乳头插管数据 ($n = 60, n(\%)$)

分组	插管容易	插管中等困难	插管困难
口服硫酸镁组	37(61.67)	18(30.00)	5(8.33)
对照组	36(60.00)	17(28.33)	7(11.67)

表2 两组血清淀粉酶术前、术后检测 ($n = 60$)

分组	术前	术后	
		3h	24h
口服硫酸镁组	58.29 ± 25.36	118.35 ± 141.07	89.63 ± 110.92
对照组	54.64 ± 21.19	198.30 ± 231.28	238.64 ± 411.36

血清淀粉酶正常上限111 U/L。

表3 两组高淀粉酶血症及PEP发生情况($\eta(\%)$)

	口服硫酸镁组	对照组	χ^2	P值
高淀粉酶血症	7(11.67)	18(30.00)	6.25	< 0.05
PEP	1(1.67)	8(13.33)	7.06	< 0.05

者术前血清淀粉酶水平的差异无统计学意义 ($P>0.05$), 两组术后3 h和24 h的血清淀粉酶水平均高于术前水平($P<0.05$), 但口服硫酸镁组又明显低于对照组相对应时相的血清淀粉酶水平 ($P<0.05$, 表2)。

2.3 两组高淀粉酶血症及PEP发生情况 口服硫酸镁组ERCP术后的高淀粉酶血症发生率(11.67%, 7/60)和PEP发生率(1.67%, 1/60)均分别显著低于对照组高淀粉酶血症30%(18/60), PEP 13.33%(8/60), 两组间比较差异有统计学意义(均 $P<0.05$, 表3)。在25例发生高淀粉酶血症的患者中, 均给予禁食、水, 常规抗炎补液、抑酸抑酶等治疗, 于术后3-4 d内血、尿淀粉酶均恢复正常。9例PEP患者中, 7例患者在上述治疗基础上行中西医结合治疗(清胰汤或清胰腺胸汤200 mL胃注, 400 mL灌肠), 血、尿淀粉酶于3-4 d恢复正常, 临床症状基本消失, 行CT复查均提示胰腺形态略饱满, 胰腺周围无明显渗出; 对照组有1例患者, 血淀粉酶7 d恢复正常, 尿淀粉酶10 d恢复正常, 但上腹疼痛、腹胀持续约2 wk, 经B超证实出现胰腺假性囊肿。

3 讨论

ERCP是广泛用于肝胆胰疾病的重要诊治手段, 在国、内外已广泛应用, 由于其创伤小、恢复快而越来越多地受到广大患者及医务工作者欢

迎^[6]。但是他也存在相当多的并发症^[7], 如穿孔、出血、胰腺炎等, 而高淀粉酶血症和PEP就是最常见且难以避免的重要并发症^[8], 其发生率占5%左右^[9], 在高危人群中发生率高达30%-40%, 严重时可危及生命。ERCP术后发生胰腺炎, 其机制目前尚未完全明确, 分析可能与下列因素有关: 胰管的机械损伤、胰腺的压力损伤, 过度注射或高压注射、造影剂的化学或过敏反应引起的损伤、肠道内容物使胰酶激活后引起的损伤、内镜和配件的污染引起感染导致的损伤、热损伤导致胰管入口水肿、胰管梗阻和胰液流出受阻引起的损伤等。他是包含机械因素、化学因素、感染性因素、细胞因子等多因素造成的病理结果^[10]。

ERCP术后胰腺炎在一些危险因素存在的条件下有时很难避免, 一旦出现并发症会给患者带来痛苦, 同时也给临床医生带来一定的麻烦。ERCP术后急性胰腺炎和高淀粉酶血症增加痛苦, 增加患者住院时间和治疗费用, 甚至危及患者生命。如何减少和预防ERCP术后高淀粉酶血症和急性胰腺炎已成为广大内镜工作者关注的焦点。因此, 能否通过一定方法来预防ERCP术后胰腺炎的发生, 则具有重要意义, 相关的基础及临床研究已有所报道^[11-13]。目前的研究主要通过如何避免出现操作性危险因素、通过药物和内镜介入等方法来预防, 当操作经验丰富时, 药物预防就显得尤为重要。

硫酸镁能刺激十二指肠黏膜, 反射性地引起总胆管括约肌松弛^[14], 钙离子的跨膜流动和细胞内钙离子的浓度变化对炎性因子的合成和释放是必不可少的, 镁剂是钙离子的拮抗剂, 对炎性因子的产生有抑制作用。同时, 镁离子还可减少

自由基的生成, 防止脂质过氧化反应引起的细胞损害, 这些作用可能是硫酸镁预防ERCP术后胰腺炎的药理学基础, 其机制可能为松弛Oddi括约肌; 降低胆道和胰管压力, 使胆汁排出迅速, 缓解胆管内压力, 防止胆汁反流; 同时使胰液流出更通畅, 从而减轻胰腺炎性反应, 降低术后血清淀粉酶水平。另外, 高浓度硫酸镁使肠道内处于高渗状态, 可降低肠道毛细血管通透性, 迅速阻止或减轻肠壁水肿, 促进肠道蠕动, 促使患者早日排便, 迅速排出肠道内过度繁殖的细菌和毒素, 起肠道去污和肠道透析的作用, 从而阻止肠道细菌移位以及全身炎性反应综合征的发生, 有效降低二次打击的可能性。

本研究表明: 两组患者术前血清淀粉酶差异无统计学意义, 但在处理因素基本相同的情况下, 口服硫酸镁组术后3 h和24 h血清淀粉酶水平明显低于对照组, 提示ERCP术前30 min口服硫酸镁可显著降低ERCP术后血清淀粉酶的水平; 同时我们也发现口服硫酸镁组患者ERCP术后高淀粉酶血症和PEP的发生率亦明显低于对照组, 两组差异有统计学意义, 提示术前口服硫酸镁对高淀粉酶血症和PEP均有一定的预防作用, 可以降低PEP和高淀粉酶血症的发生率。

PEP的预防应是综合性预防, 从现有资料看, 对PEP的预防并不十分理想。虽抗胰酶分泌及抗胰蛋白酶活性药物多数临床试验证明能有效治疗ERCP术后胰腺炎, 但是我们还需严格掌握ERCP的适应症, 在ERCP前充分评估风险, 在ERCP操作时尽量避免胰管的损伤。由于ERCP后大部分是轻度胰腺炎, 且有效的药物或支架预防都比较昂贵, 而口服硫酸镁简便易行, 疗效可靠, 物美价廉, 值得临床推广使用。然而本文病例相对较少, 有待进一步积累更多资料, 还需做进一步多中心、大样本研究。

4 参考文献

1 Freeman ML, Nelson DB, Sherman S, Haber GB,

Herman ME, Dorsher PJ, Moore JP, Fennerty MB, Ryan ME, Shaw MJ, Lande JD, Phleley AM. Complications of endoscopic biliary sphincterotomy. *N Engl J Med* 1996; 335: 909-918

- 2 Freeman ML, DiSario JA, Nelson DB, Fennerty MB, Lee JG, Bjorkman DJ, Overby CS, Aas J, Ryan ME, Bochna GS, Shaw MJ, Snady HW, Erickson RV, Moore JP, Roel JP. Risk factors for post-ERCP pancreatitis: a prospective, multicenter study. *Gastrointest Endosc* 2001; 54: 425-434
- 3 Friedland S, Soetikno RM, Vandervoort J, Montes H, Tham T, Carr-Locke DL. Bedside scoring system to predict the risk of developing pancreatitis following ERCP. *Endoscopy* 2002; 34: 483-488
- 4 李兆申, 张文俊, 潘雪, 龚彪, 智发朝, 郭学刚, 李培明, 范志宁, 孙文生, 沈云志, 麻树人, 谢渭芬, 陈旻湖, 李延青. 奥曲肽预防ERCP术后胰腺炎及高淀粉酶血症的多中心随机对照临床研究. 中华消化内镜杂志 2004; 21: 301-305
- 5 Cotton PB, Lehman G, Vennes J, Geenen JE, Russell RC, Meyers WC, Liguory C, Nickl N. Endoscopic sphincterotomy complications and their management: an attempt at consensus. *Gastrointest Endosc* 1991; 37: 383-393
- 6 柴深, 曹农, 李强, 杨克虎. 内镜治疗急性胆源性胰腺炎的系统评价. 世界华人消化杂志 2010; 18: 404-408
- 7 Ohashi A, Tamada K, Wada S, Hatanaka H, Tomiyama T, Tano S, Nakazawa K, Sugano K. Risk factors for recurrent bile duct stones after endoscopic papillary balloon dilation: long-term follow-up study. *Dig Endosc* 2009; 21: 73-77
- 8 陈圣开, 王济明, 郑朋友. ERCP后胰腺炎危险因素分析与预防. 内分泌外科杂志 2008; 2: 312-315
- 9 Vandervoort J, Soetikno RM, Tham TC, Wong RC, Ferrari AP, Montes H, Roston AD, Slivka A, Lichtenstein DR, Ruymann FW, Van Dam J, Hughes M, Carr-Locke DL. Risk factors for complications after performance of ERCP. *Gastrointest Endosc* 2002; 56: 652-656
- 10 Badalov N, Tenner S, Baillie J. The Prevention, recognition and treatment of post-ERCP pancreatitis. *JOP* 2009; 10: 88-97
- 11 张波, 刘燕燕, 刘丛丛, 武华. 鱼油对重症急性胰腺炎大鼠肠黏膜屏障的影响. 世界华人消化杂志 2011; 19: 1067-1070
- 12 张秀平, 曹立瀛, 刘四清, 付庆江, 郭振武. 金黄益胆颗粒对重症急性胰腺炎大鼠胰腺组织中ICAM-1、TGF-β1表达的影响. 世界华人消化杂志 2011; 19: 1880-1885
- 13 林道庞, 邓志云, 何效东, 崔泉, 赵晓雷, 杨毅, 罗土寿. 乌司他丁联合丙氨酰谷氨酰胺对重症急性胰腺炎患者细胞因子的影响. 世界华人消化杂志 2011; 19: 1946-1949
- 14 黄玉海, 杨萍, 张奎林, 丁义. 硫酸镁治疗重症急性胰腺炎临床分析. 江西医药 2009; 44: 970-972

■同行评价

本文有一定新意, 统计正确, 研究内容贴近临床, 有一定的实用价值。

感染对IBS患者肠黏膜细胞因子表达的影响

鞠辉, 刘希双, 魏良洲, 刘华, 尹继平

■背景资料

肠易激综合征(IBS)的病因和发病机制迄今还不完全清楚。免疫-神经-内分泌网络机制是最近提出的观点之一。

鞠辉, 刘希双, 魏良洲, 刘华, 尹继平, 青岛大学医学院附属医院消化内科 山东省青岛市 266003

鞠辉, 主治医师, 主要从事消化内科临床研究。

作者贡献分布: 鞠辉对本文所作贡献较多; 此课题由鞠辉、刘希双及魏良洲设计; 研究过程由鞠辉、刘华及尹继平操作完成; 研究所用新试剂及分析工具由刘希双提供; 数据分析由鞠辉、刘华及尹继平完成; 写作由鞠辉与刘华完成。

通讯作者: 鞠辉, 主治医师, 266003, 山东省青岛市, 青岛大学医学院附属医院消化内科. huiju197@163.com

电话: 0532-82911525

收稿日期: 2012-03-15 修回日期: 2012-04-25

接受日期: 2012-06-02 在线出版日期: 2012-06-18

Effect of infection on cytokine expression in the colon mucosa of patients with irritable bowel syndrome

Hui Ju, Xi-Shuang Liu, Liang-Zhou Wei, Hua Liu, Ji-Ping Yin

Hui Ju, Xi-Shuang Liu, Liang-Zhou Wei, Hua Liu, Ji-Ping Yin, Department of Gastroenterology, Affiliated Hospital of Medical School of Qingdao University, Qingdao 266003, Shandong Province, China

Correspondence to: Hui Ju, Attending Physician, Department of Gastroenterology, Affiliated Hospital of Medical School of Qingdao University, Qingdao 266003, Shandong Province, China. huiju197@163.com

Received: 2012-03-15 Revised: 2012-04-25

Accepted: 2012-06-02 Published online: 2012-06-18

Abstract

AIM: To explore the impact of infection on the immune-nervous-endocrine network in patients with irritable bowel syndrome (IBS).

METHODS: Forty-five patients with postinfectious IBS (PI-IBS), 60 patients with non-postinfectious IBS (non-PI-IBS), and 30 healthy controls were included. Immunohistochemical staining was performed to analyze the expression of substance P (SP), interleukin (IL)-2, 5-hydroxytryptamine (5-HT), interferon (IFN)- γ , substance P receptor (SPR) in the colon mucosa of these subjects. Mast cells (MCs) were stained with toluidine blue.

RESULTS: The expression of SP, MCs, 5-HT, SP-R, IFN- γ , and IL-2 in PI-IBS patients was higher than that in non-PI-IBS patients and

controls ($t = 2.5, 2.8$, both $P < 0.01$; $t = 11.5, 12.1$, both $P < 0.01$; $t = 13.6, 14.1$, both $P < 0.01$; $t = 3.8, 6.1$, both $P < 0.05$; $t = 13.8, 15.2$, both $P < 0.05$; $t = 12.6, 14.7$, both $P < 0.05$). The expression of ileocecal mucosal MCs was positively correlated with that of SP in PI-IBS patients ($r = 0.71$, $P < 0.01$). The expression of ileocecal mucosal 5-HT was closely associated with that of SPR in PI-IBS patients ($r = 0.18$, $P < 0.05$). SP expression in PI-IBS patients who were positive for IFN- γ or IL-2 was higher than that in non-PI-IBS patients ($t = 2.22, 2.3$, $P < 0.05$) and controls ($t = 2.3, 2.4$, $P < 0.05$).

CONCLUSION: Nerve fibers are critical for the immune-nervous-endocrine network in IBS patients after intestinal infection.

Key Words: Irritable bowel syndrome; Infection; Cytokine

Ju H, Liu XS, Wei LZ, Liu H, Yin JP. Effect of infection on cytokine expression in the colon mucosa of patients with irritable bowel syndrome. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2012; 20(17): 1574-1578

摘要

目的: 探讨感染对肠易激综合征(irritable bowel syndrome, IBS)患者神经-免疫-内分泌网络的影响。

方法: 感染后肠易激综合征(postinfectious irritable bowel syndrome, PI-IBS)患者45例, non-PI-IBS患者60例及30例对照者, 结肠镜下活检回盲部黏膜标本, 采用免疫组织化学法检测其肠黏膜SP、IL-2、IFN- γ 、SPR与5-HT的表达, 肥大细胞(mast cells, MC)采用甲苯胺蓝染色。

结果: PI-IBS患者的SP表达分别高于non-PI-IBS与对照组($t = 2.5, 2.8$, $P < 0.01$); PI-IBS患者的MC表达分别高于non-PI-IBS与对照组($t = 11.5, 12.1$, $P < 0.01$); PI-IBS患者的5-HT表达分别高于non-PI-IBS与对照组($t = 13.6, 14.1$, $P < 0.01$); PI-IBS患者的SPR表达分别高于non-PI-IBS与对照组($t = 3.8, 6.1$, $P < 0.05$); PI-IBS患者的IFN- γ 表达分别高于non-PI-IBS与对照组

($t = 13.8, 15.2, P < 0.05$); PI-IBS患者的IL-2表达分别高于non-PI-IBS与对照组($t = 12.6, 14.7, P < 0.05$)。PI-IBS患者回盲部黏膜MC和SP的表达呈高度正相关($r = 0.71, P < 0.01$)。PI-IBS患者回盲部黏膜5-HT和SPR的表达呈密切相关($r = 0.18, P < 0.05$)。IFN- γ 、IL-2阳性表达的PI-IBS患者, SP表达高于非PI-IBS组($r = 2.2, 2.3, P < 0.05$)和对照组($t = 2.3, 2.4, P < 0.05$)。

结论: 肠道感染后, 神经纤维在IBS的免疫-神经-内分泌发生机制中的作用至关重要。

关键词: 肠易激综合征; 感染; 细胞因子

鞠辉, 刘希双, 魏良洲, 刘华, 尹继平. 感染对IBS患者肠黏膜细胞因子表达的影响. 世界华人消化杂志 2012; 20(17): 1574-1578

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/1574.asp>

0 引言

临床发现约1/3肠易激综合征(irritable bowel syndrome, IBS)患者在其患病前曾有急性胃肠道感染史; 部分被肠道病毒、细菌或寄生虫感染的患者, 在病原体已清除及黏膜炎症消退后, 可发生IBS样的症状, 称之为感染后肠易激综合征(postinfectious irritable bowel syndrome, PI-IBS)^[1]。本研究分析了PI-IBS患者回盲部肠黏膜SP、SP受体-1(SPR-1, 又称NK-1, 以下简称SPR)、肥大细胞(mast cells, MC)、5-羟色胺(5-hydroxytryptamine, 5-HT)、IFN- γ 与IL-2的表达, 探讨感染对IBS患者免疫-神经-内分泌网络机制的影响。

1 材料和方法

1.1 材料 随机选取2007-10/2008-06青岛大学医学院附属医院消化内科门诊IBS患者105例, 其中PI-IBS患者45例, 男20例, 女25例, 平均年龄39.2岁±10.9岁, PI-IBS纳入标准: (1)罗马III诊断标准; (2)既往有胃肠道急性感染病史, 在急性感染后至少伴有以下2种症状或检查: 发烧、呕吐、急性腹泻、大便培养阳性, 经治疗后痊愈, 而以后出现腹部不适、腹胀、腹痛或大便性状改变等IBS症状。non-PI-IBS患者60例, 男25例, 女35例, 平均年龄37.2岁±10.6岁。对照组30例, 男12例, 女18例, 平均年龄38.5岁±10.9岁, 纳入标准: 为结肠息肉电切除术后复查无异常发现者(术后至少半年)或因大便带少量鲜血行结肠镜检查诊断为痔疮者, 无其他消化系症状与体

征, 无免疫疾病、感染病史, 无近期服药史。兔抗人IL-2抗体、兔抗人IFN- γ 抗体及SABC试剂盒均购自武汉博士德生物工程公司, 抗人P物质多克隆抗体(ZA-0235, 北京中杉金桥生物技术有限公司提供), 兔抗人5-HT多克隆抗体(中杉金桥生物技术有限公司提供ZA-0231), SPR兔抗人多克隆抗体(北京博奥森生物技术有限公司提供), 甲苯胺蓝和PV-9000二步法免疫组织化学检测试剂盒(北京中杉公司提供)。

1.2 方法 分别取回盲部黏膜2块, 所有蜡块均行4 μm连续切片, 每例各取一张切片HE染色, 进行常规病理组织学诊断。切片常规脱蜡, 梯度乙醇水洗, 双氧水室温孵育10 min, 放入枸橼酸钾缓冲液(pH 7.0)中5 min, 后进行微波修复10 min, PBS缓冲液冲洗15 min, 水洗去PBS, 分别滴加抗体(兔抗人P物质多克隆抗体、兔抗人IL-2抗体、兔抗人IFN- γ 抗体、兔抗人5-HT多克隆抗体与SPR兔抗人多克隆抗体)。行SABC法免疫组织化学染色: PBS缓冲液冲洗15 min, 滴加通用型IgG抗体(Fab段)-HRP多聚体, 37 °C孵育20 min, PBS缓冲液冲洗5 min×3次, 水洗去PBS, 滴加新鲜配置的DAB显色剂。采用双盲法判断结果, 每张切片观察5个不重复视野, 取每个视野的平均数。对SP行定量分析用VIDAS图像分析系统, 检测其吸光度(A)值。

MC采用甲苯胺蓝染色染成紫蓝色, 在400放大倍数下观察5个不重复视野, 取每个视野的平均数。采用SPSS11.0统计软件包进行处理, 应用t检验与回归性分析。

2 结果

2.1 电子镜下结肠黏膜的观察 电子结肠镜下观察105例IBS患者与对照组的结肠黏膜均无充血、水肿、渗出等炎症改变。肠道组织经HE染色, 显微镜下观察见黏膜上皮完整, 黏膜下及固有腺体之间可见少量淋巴细胞及浆细胞浸润, 个别可见少量中性粒细胞浸润, 组间及各组与对照组相比, 无显著性差异。

2.2 免疫组织化学染色观察 肠道组织经HE染色, 显微镜下观察见黏膜上皮完整, 黏膜下及固有腺体之间可见少量淋巴细胞及浆细胞浸润, 个别可见少量中性粒细胞浸润。SP分布于腺体周围的固有层中, 呈散在点状或簇状分布。5-HT阳性细胞分布于肠黏膜上皮基部及腺泡上皮细胞之间, 细胞呈圆形/椭圆形。免疫反应阳性细胞的胞质被染成黄褐色或褐色, 细胞核无色或为浅

■ 相关报道
李延青等研究表明IBS患者存在Th1/Th2细胞因子的漂移。

■应用要点

本文研究了SP神经纤维与其他细胞因子的表达,认为神经纤维在IBS的免疫-神经-内分泌发生机制中的作用至关重要,进一步研究其他神经纤维与MC、EC的相关性,可能对今后IBS的治疗起指导作用。

表1 各组回盲部细胞因子的表达 (mean ± SD)

细胞因子	PI-IBS组	non-PI-IBS组	对照组
SP强度	14.7 ± 2.3 ^{bd}	12.3 ± 2.7	8.8 ± 2.2
MC	30.8 ± 3.1 ^{bd}	19.5 ± 2.0	18.3 ± 1.7
5-HT	34.2 ± 2.8 ^{bd}	17.4 ± 1.8	15.0 ± 1.2
SPR	7.6 ± 1.6 ^{ac}	5.3 ± 1.4	3.2 ± 1.0
IFN-γ	33.2 ± 2.7 ^{ac}	16.7 ± 1.8	13.8 ± 1.1
IL-2	32.9 ± 2.7 ^{ac}	15.6 ± 1.7	13.1 ± 1.1

^aP<0.05, ^bP<0.01 vs 对照组; ^cP<0.05, ^dP<0.01 vs non-PI-IBS组.

黄色。SPR免疫反应阳性细胞分布于肠黏膜上皮基部和黏膜固有层,免疫阳性细胞胞质被染成黄褐色或褐色,胞核细胞多为圆形、椭圆形、梭形和不规则形。IFN-γ、IL-2的表达在肠黏膜固有膜,呈现棕黄色,分布于腺体周围。肥大细胞呈现紫蓝色,胞核呈蓝色,散布于黏膜固有层,细胞大小不等。

2.3 细胞因子的表达及相关性 PI-IBS患者的SP表达分别高于non-PI-IBS与对照组($t = 2.5, 2.8, P<0.01$); PI-IBS患者的MC表达分别高于non-PI-IBS与对照组($t = 11.5, 12.1, P<0.01$); non-PI-IBS与对照组的MC表达差异无统计学意义($t = 1.3, P>0.05$)。PI-IBS患者的5-HT表达分别高于non-PI-IBS与对照组($t = 13.6, 14.1, P<0.01$); PI-IBS患者的SP-R表达分别高于non-PI-IBS与对照组($t = 3.8, 6.1, P<0.05$); PI-IBS患者的IFN-γ表达分别高于non-PI-IBS与对照组($t = 13.8, 15.2, P<0.05$); PI-IBS患者的IL-2表达分别高于non-PI-IBS与对照组($t = 12.6, 14.7, P<0.05$, 表1)。PI-IBS患者回盲部黏膜MC和SP的表达呈高度正相关($r = 0.71, P<0.01$, 表2)。PI-IBS患者回盲部黏膜5-HT和SPR的表达呈密切相关($r = 0.18, P<0.05$, 表3)。IFN-γ、IL-2阳性表达的PI-IBS患者,SP阳性表达高于非PI-IBS组($t = 2.2, 2.3, P<0.05$)和对照组($t = 2.3, 2.4, P<0.05$, 表4)。

3 讨论

IBS的病因和发病机制迄今还不完全清楚。目前认为其病因与精神心理因素、胃肠动力异常、内脏感觉过敏、脑-肠轴的改变和炎症免疫等有关^[2]。免疫-神经-内分泌网络机制是新近提出的观点之一。

Koon等^[3]报道肠道炎症可致使SP表达增加。SP是在脑和肠道中均存在的肽,在肠道内主要存

在于肠神经系统的内源性神经元。本实验发现,PI-IBS的SP表达高于non-PI-IBS与对照组。我们认为,肠道发生感染后,炎症可致使SP表达增加。SP表达增加后,通过与非胆碱能的传递促进肠道的蠕动;通过特异性受体活化内皮细胞钙离子依赖性NO合酶,促进NO合成,增加血管通透性;刺激黏膜下分泌运动神经以增加黏膜离子的转运,从而发生腹泻。SP表达的增加还可以通过刺激胆碱能神经和依赖NO的抑制性神经系统,引起肠道压力的升高^[4],诱发痛觉过敏的发生。

通过检测IBS患者外周血T淋巴细胞亚群水平的变化,发现IBS患者存在T淋巴细胞功能减弱和调节紊乱,细胞免疫异常可能参与IBS的发病。李延青等^[5]研究发现IBS患者存在Th1/Th2细胞因子的漂移。IBS患者肠黏膜IFN-γ、IL-2表达增加,二者可以促进血管通透性增加;促使组织胺、花生四烯酸代谢产物(PGD2、LTC4、LTD4、TXE4)、血小板活化因子(platelet activating factor, PAF)表达增多,使平滑肌收缩增强,肠道蠕动增加^[6],导致腹泻;可以介导局限于黏膜的轻微炎症反应,干扰胃肠反射,活化内脏感觉系统,出现腹痛和直肠敏感性增加。

在培养的细胞系中,加入SP就可以使IL-2 mRNA的表达增加,若加入SP拮抗剂后,则抑制其表达^[7]。我们的研究表明,PI-IBS患者IFN-γ、IL-2阳性的SP表达明显高于non-PI-IBS与对照组,PI-IBS的SPR表达高于non-PI-IBS与对照组。我们分析,感染可能促使SP表达增加,SP与Th1细胞膜表面的SPR结合,促使Th1细胞释放IFN-γ、IL-2等因子,诱发Th1反应,激活免疫细胞如T细胞、NK细胞等,促进炎症因子的释放如IL-1β、TNF-α、PGE2、IL-6等^[8],破坏肠黏膜上皮屏障功能。Th1反应增强还可能导致机体打破对肠道常住细菌的耐受状态,使抗原微生物免疫和异物排斥反应增强。感染的持续时间与IBS的发生风险有关,感染持续2 wk或以上者发生IBS的OR值明显高于1 wk者,且回肠末端和直肠乙状结肠的IL-1β mRNA表达也明显增加^[3]。

MC是一种具有免疫活性,又能分泌多种介质的重要免疫细胞,可以引起生物活性介质(生物胺、酶、花生四烯酸、腺苷、神经肽等)的释放,使微血管平滑肌和通透性增加,也可致肠道平滑肌蠕动加快,导致腹泻。研究表明IBS患者的结肠黏膜免疫反应阳性神经纤维(SP与血管活性肠肽等)与MC有“膜膜”接触^[9]。我们的结果表明,PI-IBS患者肠黏膜的MC与SPR表达明

表 2 PI-IBS患者回盲部MC和SP的回归分析 (x,y)

编号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
MC(x)	28	24	25	27	23	25	27	24	23	22	23	25	20	21	22
SP(y)	11	8	9	8	7	8	9	8	7	6	8	9	8	7	8

$r = 0.71, P < 0.01$.

表 3 PI-IBS患者回盲部SPR和5-HT的回归分析 (x,y)

编号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
5-HT(x)	35	34	34	38	32	41	38	27	47	40	31	39	36	35	28
SPR(y)	16	17	15	18	14	23	17	18	27	22	19	17	18	17	25

$r = 0.18, P < 0.05$.

表 4 各组肠黏膜IFN- γ 、IL-2阳性表达与SP强度均值的关系 (mean \pm SD)

细胞因子	PI-IBS组	non-PI-IBS组	对照组
IFN- γ 阳性	15.0 \pm 3.2 ^a	11.2 \pm 3.1	9.8 \pm 2.9
IL-2阳性	14.9 \pm 3.2 ^a	11.7 \pm 3.3	9.6 \pm 3.1

^a $P < 0.05$ vs non-PI-IBS组; ^b $P < 0.01$ vs 对照组.

显高于non-PI-IBS与对照组, 差异有统计学意义; PI-IBS患者回盲部MC和SP的回归分析表明, MC和SP存在高度相关性. 我们分析, IBS患者发生肠道感染后, 诱发肠黏膜局部抗原抗体反应, 引起MC致敏后, 激活SP神经纤维, 使SP表达增加, 诱发一系列IBS症状的发生; 另一方面, 由于MC表面有SPR^[7], 在PI-IBS患者肠黏膜SP表达增加后, 又可能形成正反馈导致MC表达上调, 导致IBS症状出现或加重. 另外, 部分PI-IBS患者可能存在不同程度的焦虑和抑郁, 可导致自主神经系统活动增加, 而这种神经活动可导致MC脱颗粒, 释放炎性介质, 使肠分泌型神经元兴奋性增加, 出现腹泻.

5-HT是一种广泛存在于中枢神经系统和胃肠道的神经递质^[10], 主要由肠嗜铬细胞(enterochromaffin cells, EC)合成和储存, 可以导致肠道动力紊乱. 各种肠道刺激包括肠腔压力增加、迷走神经刺激、过敏反应、多种化学物质等均能刺激EC细胞释放大量的5-HT. 本研究发现PI-IBS的5-HT表达高于non-PI-IBS与对照组, 且PI-IBS患者回盲部5-HT和SPR存在相关性, 考虑PI-IBS患者肠黏膜SP表达上调, SP与SPR结合后可激活胆碱能神经元, 并且促使结肠黏膜的淋巴细

胞和内分泌细胞(主要是EC)明显增多, 5-HT表达增加, 促使结肠蠕动增强, 排便次数增加^[11]; 另一方面, 5-HT在肠道可以兴奋肠囊腺细胞和促分泌神经细胞上的5-HT4受体^[12], 从而增加肠腔内液体的容量, 致腹泻和稀便. 有研究支持我们的实验, Lacoste等^[13]通过透射电镜观察到5-HT神经元上有SP的主要受体NK-1, 加入NK-1拮抗剂可使5-HT释放减少.

PI-IBS患者存在局限于黏膜的轻微炎症反应, 而这种炎症可引起包括PG、缓激肽、神经生长因子等炎性介质增加^[14,15], 我们认为这些介质可以直接作用于初级传入纤维或间接经由MC, 启动活化和致敏机制的级联效应, 使附近的神经纤维(SP与降钙素基因相关肽等)与他们的受体激活, 这些神经纤维与其受体结合后, 可以激活胆碱能神经元及EC(致使5-HT表达增加), 导致腹泻; 另一方面SP又可导致炎性细胞因子(IL-2与IFN- γ 等)表达增加, 促进Th1反应增强, 出现IBS症状.

因此, 我们认为肠道感染后, 神经纤维在IBS的免疫-神经-内分泌发生机制中的作用至关重要, 进一步研究其他神经纤维与MC、EC的相关关系, 可能会对今后IBS的治疗起指导作用.

4 参考文献

- DuPont AW. Postinfectious irritable bowel syndrome. *Clin Infect Dis* 2008; 46: 594-599
- 李定国, 周惠清. 重视肠易激综合征的流行病学调查. 世界华人消化杂志 2008; 16: 3591-3593
- Koon HW, Zhao D, Zhan Y, Simeonidis S, Moyer MP, Pothoulakis C. Substance P-stimulated interleukin-8 expression in human colonic epithelial cells involves protein kinase Cdelta activation. *J Pharmacol Exp Ther* 2005; 314: 1393-1400
- 董文珠, 李兆申, 邹多武, 许国铭, 邹晓平, 朱爱勇, 尹

■名词解释

感染后肠易激综合征: 临床发现约1/3 IBS患者在其患病前曾有急性胃肠道感染史; 部分被肠道病毒、细菌或寄生虫感染的患者, 在病原体已清除及黏膜炎症消退后, 可发生IBS样的症状, 成为感染后肠易激综合征.

■同行评价

本研究结果提示肠道感染后, 神经纤维在IBS的免疫-神经-内分泌发生机制中的作用至关重要, 具有一定的临床研究价值。

- 宁, 龚燕芳. 肠易激综合征患者肠黏膜肥大细胞与P物质的相关性. 中华内科杂志 2003; 42: 611-614
- 5 李延青, 张海燕, 左秀丽, 袁海鹏, 卢雪峰, 李君曼. 肠易激综合征患者肠黏膜Th1/Th2漂移的研究. 中华消化杂志 2004; 24: 728-731
- 6 Qian BF, El-Salhy M, Melgar S, Hammarström ML, Danielsson A. Neuroendocrine changes in colon of mice with a disrupted IL-2 gene. *Clin Exp Immunol* 2000; 120: 424-433
- 7 Pothoulakis C, Castagliuolo I, Leeman SE, Wang CC, Li H, Hoffman BJ, Mezey E. Substance P receptor expression in intestinal epithelium in clostridium difficile toxin A enteritis in rats. *Am J Physiol* 1998; 275: G68-G75
- 8 刘修波, 张巍巍, 解祥军, 王青. 肠黏膜细胞因子在肠易激综合征患者回肠及升结肠组织中的表达. 世界华人消化杂志 2011; 19: 1085-1088
- 9 Piche T, Saint-Paul MC, Dainese R, Marine-Barjoan E, Iannelli A, Montoya ML, Peyron JF, Czerucka D, Cherikh F, Filippi J, Tran A, Hébuterne X. Mast cells and cellularity of the colonic mucosa correlated with fatigue and depression in irritable bowel syndrome. *Gut* 2008; 57: 468-473
- 10 Tack J, Coulie B, Wilmer A, Andrioli A, Janssens J. Influence of sumatriptan on gastric fundus tone and on the perception of gastric distension in man. *Gut* 2000; 46: 468-473
- 11 De Ponti F, Tonini M. Irritable bowel syndrome: new agents targeting serotonin receptor subtypes. *Drugs* 2001; 61: 317-332
- 12 Nishiyama H, Mizuta Y, Isomoto H, Takeshima F, Omagari K, Miyahara Y, Murata I, Kohno S. Chronic visceral hypersensitivity renders defecation more susceptible to stress via a serotonergic pathway in rats. *Dig Dis Sci* 2004; 49: 763-769
- 13 Lacoste B, Riad M, Descarries L. Immunocytochemical evidence for the existence of substance P receptor (NK1) in serotonin neurons of rat and mouse dorsal raphe nucleus. *Eur J Neurosci* 2006; 23: 2947-2958
- 14 Gwee KA, Collins SM, Read NW, Rajnakova A, Deng Y, Graham JC, McKendrick MW, Moothala SM. Increased rectal mucosal expression of interleukin 1beta in recently acquired post-infectious irritable bowel syndrome. *Gut* 2003; 52: 523-526
- 15 王承党, 郑雪雁, 郑玮玲. 结肠黏膜低度炎症对大鼠内脏感觉的影响. 世界华人消化杂志 2009; 17: 1621-1625

编辑 曹丽鸥 电编 鲁亚静

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

• 消息 •

WJG 总被引频次排名位于第 174 名

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

环氧化酶-2基因启动子区多态性与结直肠癌的易感性

张颖, 刘长明, 彭惠平, 张剑治, 蔡晓琴, 冯全林

张颖, 刘长明, 张剑治, 蔡晓琴, 南京中医药大学昆山附属医院检验科 江苏省昆山市 215300

彭惠平, 南京中医药大学昆山附属医院消化科 江苏省昆山市 215300

冯全林, 南京中医药大学昆山附属医院外科 江苏省昆山市 215300

张颖, 主任技师, 主要从事临床检验工作。

江苏省昆山市社会发展科技基金资助项目, No. KS1013

作者贡献分布: 张颖负责本研究的实验方案设计、样本基因型分析及论文撰写; 临床资料收集工作由刘长明与彭惠平完成; 张剑治与蔡晓琴负责临床样本收集; 冯全林负责本项研究的组织、质量控制及论文审核。

通讯作者: 冯全林, 主任医师, 215300, 江苏省昆山市朝阳路189号, 南京中医药大学昆山附属医院。ksfql@126.com

电话: 0512-57310000-8008

收稿日期: 2012-02-13 修回日期: 2012-03-14

接受日期: 2012-03-28 在线出版日期: 2012-06-18

Relationship between polymorphisms in the promoter region of the COX-2 gene and susceptibility to colorectal cancer

Ying Zhang, Chang-Ming Liu, Hui-Ping Peng, Jian-Zhi Zhang, Xiao-Qin Cai, Quan-Lin Feng

Ying Zhang, Chang-Ming Liu, Jian-Zhi Zhang, Xiao-Qin Cai, Department of Laboratory Medicine, Kunshan Hospital Affiliated to Nanjing University of Traditional Chinese Medicine, Kunshan 215300, Jiangsu Province, China

Hui-Ping Peng, Department of Digestive Disease, Kunshan Hospital Affiliated to Nanjing University of Traditional Chinese Medicine, Kunshan 215300, Jiangsu Province, China

Quan-Lin Feng, Department of Surgical Oncology, Kunshan Hospital Affiliated to Nanjing University of Traditional Chinese Medicine, Kunshan 215300, Jiangsu Province, China

Supported by: the Social Development Technology Project of Kunshan, No. KS1013

Correspondence to: Quan-Lin Feng, Chief Physician, Kunshan Hospital Affiliated to Nanjing University of Traditional Chinese Medicine, 189 Chaoyang Road, Kunshan 215300, Jiangsu Province, China. ksfql@126.com

Received: 2012-02-13 Revised: 2012-03-14

Accepted: 2012-03-28 Published online: 2012-06-18

Abstract

AIM: To investigate the correlation between polymorphisms in the promoter region (-1195G/A, rs689466) and 3'-untranslated region (8473T/C, rs5275) of the cyclooxygenase-2 (COX-2) gene and risk of colorectal cancer (CRC).

METHODS: A case-control study was performed

in 343 patients with CRC and 340 healthy individuals. The polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) method was used to genotype the COX-2-1195G/A and COX-2-8473T/C polymorphisms. The SPSS 10.0 software was used to analyze genotypic and allelic frequencies.

RESULTS: We found no differences in allele or genotype distributions of COX-2-8473T/C between cases and controls (all $P > 0.05$). However, there was an obvious difference in the polymorphism distribution of COX-2-1195G/A between the CRC group and control group ($P < 0.001$). Stratification analysis revealed a significantly increased risk in CRC patients carrying the AG genotype (adjusted OR = 2.23; 95% CI 1.50-3.32), AA genotype (adjusted OR = 2.46; 95% CI 1.51-4.02) or (AG/AA) genotype (adjusted OR = 2.27; 95% CI 1.55-3.34) compared to the control group. There was no difference in the distribution of each COX-2 genotype between colon and rectal cancer. Patients carrying the COX-2-1195A allele had a higher risk of lymph node metastasis and CRC progression.

CONCLUSION: COX-2-1195AG/AA genotype is associated with a higher risk of CRC, lymph node metastasis and CRC progression.

Key Words: Colorectal cancer; Polymorphism; Cyclooxygenase-2

Zhang Y, Liu CM, Peng HP, Zhang JZ, Cai XQ, Feng QL. Relationship between polymorphisms in the promoter region of the COX-2 gene and susceptibility to colorectal cancer. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2012; 20(17): 1579-1584

摘要

目的: 探讨环氧化酶-2(cyclooxygenase-2, COX-2)基因启动子区的-1195(G/A, rs689466)及3'非翻译区的8473(T/C, rs5275)2个位点的基因多态性与结直肠癌(colorectal cancer, CRC)发病风险的相关性。

方法: 采用病例-对照研究, 利用聚合酶链式

■背景资料

随着我国生活水平的不断提高, 人们的生活方式也有了很大变化, 结直肠癌(CRC)发病率呈明显上升趋势。其中, 90% CRC的发生是环境因素与遗传因素交互作用的结果。

■研发前沿

环氧化酶-2(COX-2)在一些肿瘤中存在的过度表达现象与肿瘤的发生发展密切相关, COX-2基因多态性因影响其功能与多种肿瘤相关。

反应和限制性片段长度多态性(polymerase chain reaction-restrictive fragment length polymorphism, PCR-RFLP)分析方法, 对343例CRC患者和340例健康人的COX-2基因的2个位点的多态性进行检测, 采用SPSS11.0软件包统计分析各位点的基因型分布和等位基因频率。

结果: COX-2-8473位点多态性的各基因型频率在病例组及对照组中分布均无显著差异($P>0.05$), 但COX-2-1195位点多态性的基因型频率在二组中分布有显著性差异($P<0.001$), 结果显示CRC患者COX-2-1195AG基因型在病例组的频率较对照组显著增高(校正后OR = 2.23; 95%CI: 1.50-3.32), AA基因型在病例组中的频率亦较对照组高(校正后OR = 2.46; 95%CI: 1.51-4.02), A等位基因携带者在病例组中的频率高于对照组(校正后OR = 2.27; 95%CI: 1.55-3.34). 各基因型分布在结肠癌及直肠癌中的分布无显著性差异($P>0.05$). COX-2-1195A等位基因与淋巴结转移及TNM分期有显著相关性。

结论: COX-2-1195位点AG/AA基因型是CRC的风险因素, 且与CRC的淋巴结转移及TNM分期相关。

关键词: 结直肠癌; 多态性; 环氧化酶-2

张颖, 刘长明, 彭惠平, 张剑治, 蔡晓琴, 冯全林. 环氧化酶-2基因启动子区多态性与结直肠癌的易感性. 世界华人消化杂志 2012; 20(17): 1579-1584

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/1579.asp>

0 引言

结直肠癌(colorectal cancer, CRC)是常见的消化系恶性肿瘤, 发生率仅次于胃癌和食管癌。在我国常见恶性肿瘤死亡中CRC在男性占第5位, 女性占第6位。随着我国生活水平的不断提高, 人们的生活方式也有了很大变化, CRC发病率呈明显上升趋势。分子流行病学证实肿瘤发生与个体的遗传背景及环境的交互作用关系密切, 90%CRC的发生是环境因素与遗传因素交互作用的结果。近年来研究显示, 环氧化酶-2(cyclooxygenase-2, COX-2)在一些肿瘤中存在过度表达现象, 提示COX-2可能与肿瘤的发生发展密切相关^[1]。COX-2位于染色体1q25.2-q25.3, 包括10个内含子和9个外显子。位于COX-2 3'非翻译区的8473T>C(rs5275)位点可影响调节蛋白的结果进而对COX-2 mRNA的稳定性及表达产生影响^[2]。亦有研究显示, COX-2启动子区

的-1195G>A(rs689466)变异形成1个转录因子c-Myb结合位点, 且A等位基因与COX-2的高表达相关^[3]。因此探讨COX-2启动子区的基因多态性与CRC发生的相关性有着重要的理论意义。本研究拟采用病例-对照的分子流行病学方法, 用聚合酶链式反应和限制性片段长度多态性(polymerase chain reaction-restrictive fragment length polymorphism, PCR-RFLP)技术对COX-2基因-8473和-1195位点的基因多态性与CRC发生的相关性进行研究, 并旨在探讨COX-2基因多态性与CRC发生的关系。

1 材料和方法

1.1 材料 2007-08/2011-03收集于江苏省昆山市中医院的进行手术并经病理确诊的CRC患者343例设为病例组, 最大年龄为93岁, 最小年龄为30岁, 平均年龄为63.22岁±12.29岁, 男女性别比为230:113。选取同期到医院参加体检健康的340名志愿者设为健康对照组, 最大年龄为91岁, 最小年龄为44岁, 年龄平均为62.47岁±11.20岁, 男女性别比为212:128。收集研究人群的基本资料, 包括吸烟、饮酒及CRC组的病理资料, 临床分期采用国际抗癌协会UICC 1987年的TNM分期法。DNA提取试剂盒购自美国Gentra公司; DNA聚合酶由大连Takara公司提供; 限制性内切酶Pvu II和Bcl I购自Ferments Life Sciences公司; 引物由上海Invitrogen有限公司合成; Mastercycler gradient PCR购自德国Eppendorf公司; UVP EC3 Imaging System购自美国UVP公司。

1.2 方法

1.2.1 标本采集及基因组DNA提取: 经研究对象知情同意后, 采集静脉血置于3 mL EDTA抗凝管中, 离心去血清后在剩下的细胞中加入300 mL人红细胞裂解液, 混匀震荡3 min溶解红细胞, 10 000 g离心30 s, 沉淀白细胞, 加入细胞裂解液后按Gentra公司说明书提取DNA。

1.2.2 COX-2基因多态性检测: 采用PCR-RFLP技术分析COX-2基因启动子区的-1195G>A位点及3'非翻译区8473T>C位点的基因多态性。PCR扩增的引物序列依次为: COX-2 1195G>A F: 5'TCTCACCCCTCACATGCTCCT3', R: 5'TCTTTCT-GTCCACTTTCCA3'; COX-2 8473T>C F: 5'AGAATTAAAGTACTTTAGT3', R: 5'CTTTACAGGTAGTTCTACCC3'. 2个PCR反应体系均为50 μL, 包括以下组分: 10×Buffer 5.0 μL, MgCl₂ 3.0 μL, dNTPs 4.0 μL, 上下游引物

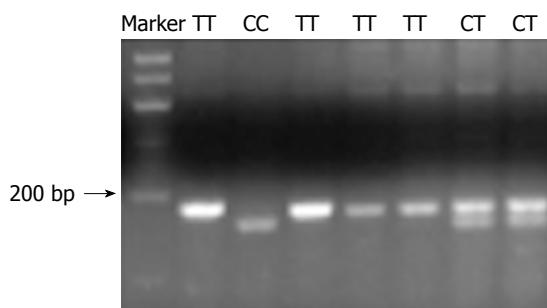


图 1 COX-2-8473位点基因多态性RFLP分析.

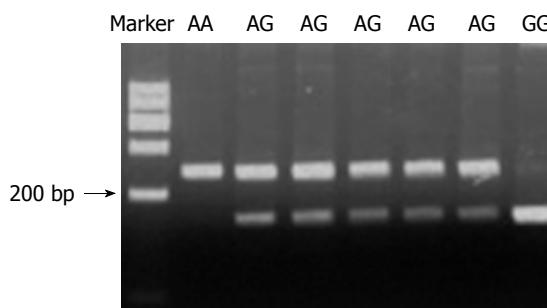


图 2 COX-2-1195位点基因多态性RFLP分析.

各1.0 μL, DNA聚合酶1.25 U, 模板50 ng, 灭菌双蒸馏水补足反应体积至50 μL. 扩增条件为94 °C 45 s, 54 °C(COX-2-8473)或55 °C(COX-2-1195)45 s, 72 °C 45 s, 共40个循环. PCR产物分别用 *Pvu* II 和 *Bcl* I 酶切, 体系均为PCR产物10 μL, 酶10 U, 10×Buffer Tango 3.0 μL, 灭菌双蒸馏水补足反应体积至30 μL, 水浴37 °C过夜. 3%琼脂糖凝胶电泳鉴定结果, 同时选取10%样本进行重复检测.

统计学处理 用SPSS11.0软件包进行统计学分析. 计算各组等位基因和基因型频率的分布, χ^2 检验分析各组等位基因和基因型频率分布的差异, 并通过比数比(OR)计算进行相关性分析.

2 结果

2.1 COX-2基因启动子区-8473及-1195位点的PCR扩增及酶切分析 COX-2-8473位点的PCR产物为177 bp, 经 *Bcl* I 酶切电泳后产生156 bp、21 bp 2个片段为CC型, 产生177 bp、156 bp、21 bp 3个片段为TC型(图1); COX-2-1195位点的PCR产物为237 bp, 经 *Pvu* II 酶切后仅有237 bp为AA基因型, 含有237 bp、164 bp、73 bp 3个片段为AG基因型, 而含有164 bp、73 bp 2个片段为GG基因型(图2); 计算以上位点的多态性基因型分布, 经检验对照组基因型分布符合Hardy-Weinberg遗传平衡, 可认为研究人群来自于平衡

表 1 CRC组及对照组样本的基本情况n(%)

	CRC组	对照组	P值
年龄(岁)	63.22 ± 12.29	62.47 ± 11.20	0.408
性别			
男	230(67.06)	212(62.35)	0.198
女	113(32.94)	128(37.65)	
吸烟情况			0.535
不吸烟	247(72.01)	252(74.12)	
吸烟	96(27.99)	88(25.88)	
饮酒情况			0.463
不饮酒	276(80.47)	281(82.65)	
饮酒	67(19.53)	59(17.35)	
分化程度			
高、中	212(61.81)		
低	131(38.19)		
淋巴结转移			
无转移	182(53.06)		
有转移	161(46.94)		
TNM分期			
I	76(22.16)		
II	73(21.28)		
III	89(25.95)		
IV	105(30.61)		

■创新点

本研究拟采用病例-对照的分子流行病学方法, 用PCR-RFLP技术对COX-2基因多态性与CRC发生的相关性进行研究, 具有一定创新性.

群体, 具有群体代表性.

2.2 CRC组与对照组的人群的基本特征 研究人群基本特征所示, 在性别、年龄、吸烟、饮酒特征上没有显著性差异(表1). CRC组的病理特征如表1所示.

2.3 COX-2基因-8473及-1195位点的基因型分布与CRC的危险性分析 COX-2-8473的各基因型频率在对照组与病例组之间均无显著差异($P>0.05$). 但COX-2-1195 AG基因型在病例组中的分布频率显著高于对照组(校正后OR = 2.23; 95%CI 1.50-3.32), AA基因型在病例组中的频率亦较对照组高(校正后OR = 2.46; 95%CI 1.51-4.02), A等位基因携带者在病例组中的频率高于对照组(校正后OR = 2.27; 95%CI 1.55-3.34, 表2).

2.4 COX-2-8473及-1195位点的多态性基因频率与结肠癌和直肠癌的相对风险性分析 COX-2-8473的各基因型频率在病例组及对照组中的频率分布没有显著性差异($P>0.05$), 且在结肠癌及直肠癌中分布也没有显著性差异($P>0.05$); COX-2-1195 AG及AA基因型在结肠癌及直肠癌中的频率均高于对照组, 在结肠癌及直肠癌中分布频率没有显著性差异(表3).

2.5 COX-2-1195位点的多态性基因频率与CRC病理特征 COX-2-1195各基因型在高、中分化

■应用要点

本研究分析COX-2的基因多态性与CRC发生风险及肿瘤的生物学特征,有助于阐明结肠癌易感性的分子基础,为结肠癌的预防提供了实验依据。

表2 COX-2-8473及-1195 SNP在病例组及对照组中的分布

基因型	病例组n(%)	对照组n(%)	OR(95%CI)	OR(95%CI) ¹	P值
COX-2-8473					
TT	218(63.56)	202(59.41)	1.00	1.00	0.533
TC	105(30.61)	115(33.82)	0.85(0.61,1.17)	0.84(0.60,1.16)	
CC	20(5.83)	23(6.76)	0.81(0.43,1.51)	1.35(0.63,2.90)	
TC/CC	125(36.44)	138(40.59)	0.83(0.62,1.14)	0.82(0.43,1.57)	
COX-2-1195					
GG	50(14.58)	94(27.65)	1.00	1.00	0.000
AG	216(62.97)	184(54.12)	2.21(1.49,3.28)	2.23(1.50,3.32)	
AA	77(22.45)	62(18.24)	2.33(1.45,3.77)	2.46(1.51,4.02)	
AG/AA	293(85.42)	246(72.35)	2.24(1.53,3.28)	2.27(1.55,3.34)	

¹经性别、年龄、吸烟、饮酒校正后。

表3 COX-2-8473、COX-2-1195基因多态性与结肠癌和直肠癌发生的分层分析

基因型	对照组n(%)	结肠癌		直肠癌	
		n(%)	OR(95%CI) ¹	n(%)	OR(95%CI) ¹
COX-2-8473					
TT	202(59.41)	136(64.15)	1.00	82(62.60)	1.00
TC	115(33.82)	68(32.08)	0.83(0.57,1.21)	37(28.24)	0.80(0.50,1.26)
CC	23(6.76)	8(3.77)	0.52(0.22,1.22)	12(9.16)	1.12(0.43,2.95)
TC /CC	138(40.59)	76(35.85)	0.77(0.54,1.10)	49(37.40)	1.41(0.65,3.07)
COX-2-1195					
GG	94(27.65)	30(14.15)	1.00	20(15.27)	1.00
AG	184(54.12)	134(63.21)	2.28(1.43,3.65)	82(62.59)	2.11(1.22,3.67)
AA	62(18.24)	48(22.64)	2.63(1.49,4.67)	29(22.13)	2.23(1.15,4.34)
AG/AA	246(72.35)	182(85.85)	2.34(1.48,3.69)	111(84.73)	2.13(1.25,3.64)

¹经性别、年龄、吸烟、饮酒校正后。

及低分化CRC组与对照组的分布频率均有显著性差异($P<0.05$),高、中分化程度与低分化程度组间没有显著性差异($P=0.360$);COX-2-1195各基因型在淋巴结转移组与对照组的分布有显著性差异($P<0.001$),而在无淋巴结转移组与对照组中的分布频率没有显著性差异($P=0.061$);基因型分布在淋巴结转移组及无转移组间有显著性差异($P=0.015$)。在与TNM分期的分组比较中结果显示,COX-2-1195基因型在I-II期组与对照组的分布没有显著性差异($P=0.260$),而在III-IV组中各基因型与对照组中的分布频率有显著性差异($P<0.001$);且COX-2-1195各基因型在I-II期及III-IV期组间分布有显著性差异($P<0.001$,表4)。

3 讨论

COX-2是催化花生四烯酸产生前列腺素族的关

键限速酶之一,正常生理状态下表达甚少,而在各种刺激因子存在时表达增加^[4]。近年来研究显示COX-2在包括CRC在内的一些肿瘤中存在过度表达现象,提示COX-2在CRC的发生过程中起着重要作用。研究显示COX-2的基因多态性与多肿瘤发生相关^[5-7],本文采用PCR-RFLP技术对343例CRC患者和340例健康人进行病例-对照研究,探讨COX-2基因多态性与CRC的易感性关系,并分析其与CRC患者病理特点相关性。结果显示COX-2启动子区-1195位点的基因多态性与CRC的发病风险相关,A等位基因是CRC的风险因素,且A等位基因与淋巴结转移和TNM分期有显著相关性。

COX-2基因多态性有种族差异,不同种族中基因型的频率不同,本研究的COX-2-1195基因型在对照组中的分布与Zhang等^[3]在中国汉族人群中开展的食管癌研究中的对照组结果相一致

表 4 COX-2 SNP-1195G>A与结直肠癌生物学行为的关系

病理特征	n	COX-2-1195 G>A基因型分布			P值
		GG	AG/AA	OR(95% CI) ¹	
对照组	94	246	1.00		
分化程度				0.360	
高、中	212	28	184	2.50(1.56, 4.02)	<0.001
低	131	22	109	1.92(1.35, 3.25)	0.020
淋巴结转移				0.015	
无转移	182	36	146	0.99(0.99, 2.41)	0.061
有转移	161	14	147	6.25(3.48, 11.30)	<0.001
TNM分期				<0.001	
I - II	149	33	115	1.35(0.82, 2.12)	0.260
III - IV	194	17	177	2.65(1.48, 4.62)	<0.001

¹经性别、年龄、吸烟、饮酒校正后。

(GG: 22.5%, AG: 53.4%, AA: 24.1%). COX-2-1195 A等位基因是肿瘤发生的危险因素, 在包括胃癌^[8]、食管癌^[9]、胰腺癌^[10]及胆囊癌^[11]中都得到了证实。COX-2启动子含有多个转录因子的结合位点, 有研究报道COX-2-1195的G>A突变形成了1个c-Myb转录因子结合位点, 增强了COX-2的启动子活性, 进而提高了其转录活性, A等位基因与高水平的COX-2转录相关^[3]。而其高表达可以通过多种途径促进肿瘤的形成, 其中最为关注的是COX-2高表达可使金属蛋白酶-2活性增加, 膜金属蛋白酶表达增多, 有利于癌肿侵袭淋巴结而发生转移。本研究也显示高表达基因型(AG/AA)与CRC的淋巴结转移及TNM分期相关, 可能与这一机制相关。陈志刚等^[12]对118例CRC样本进行分析, 结果显示COX-2高表达与淋巴结转移及肿瘤的分期相关, 本研究结果与之相一致。本研究对3'非翻译区的8473 T>C基因多态性与CRC的发病风险性分析结果表明, 该基因多态性与CRC的发病风险无相关性, 结果与Siezen等^[13]及Cox等^[14]报道相一致。

之前研究学者始终将结肠癌与直肠癌统一为CRC, 然而结肠和直肠不管是在胚胎学、解剖学, 生理学还是在遗传学上都有不同^[15], 研究表明结肠癌和直肠癌的发病机制尚存在差异。本研究还对病例组针对CRC的不同部位进行了分层分析, 此前我们开展的一项研究亦显示CRC与基因多态性的发生有部位的特异性^[16], 但在此研究中我们没有发现结肠癌与直肠癌对于COX-2基因多态性存在显著性差异, 提示COX-2的表达对于CRC的发生没有部位特异性, 现有研究未见相关的报道, 有待于进一步证实。

本研究对COX-2基因启动子区多态性与CRC发病风险进行了探讨, 但仍存在有一些不足的地方, 首先是研究虽然纳入了CRC患者343例, 但进行分层分析来说样本量相对较少, 可能会对研究结果产生影响。总之, 本研究结果表明, COX-2-1195AG/AA基因型是CRC的风险因素, 且与CRC的淋巴结转移及TNM分期有显著相关性, 此研究有助于阐明CRC易感性的分子基础, 为CRC的预防提供了实验依据。

■同行评价

本文有较好的创新性, 方法先进, 得出很有意义的结论, 为结肠癌的预防提供了实验依据。

4 参考文献

- Romano M, Claria J. Cyclooxygenase-2 and 5-lipoxygenase converging functions on cell proliferation and tumor angiogenesis: implications for cancer therapy. *FASEB J* 2003; 17: 1986-1995
- Dixon DA. Dysregulated post-transcriptional control of COX-2 gene expression in cancer. *Curr Pharm Des* 2004; 10: 635-646
- Zhang X, Miao X, Tan W, Ning B, Liu Z, Hong Y, Song W, Guo Y, Zhang X, Shen Y, Qiang B, Kadlubar FF, Lin D. Identification of functional genetic variants in cyclooxygenase-2 and their association with risk of esophageal cancer. *Gastroenterology* 2005; 129: 565-576
- Gasparini G, Longo R, Sarmiento R, Morabito A. Inhibitors of cyclo-oxygenase 2: a new class of anti-cancer agents? *Lancet Oncol* 2003; 4: 605-615
- Liang Y, Liu JL, Wu Y, Zhang ZY, Wu R. Cyclooxygenase-2 polymorphisms and susceptibility to esophageal cancer: a meta-analysis. *Tohoku J Exp Med* 2011; 223: 137-144
- Liu F, He Y, Peng X, Wang W, Yang X. Association of the 8473T > C cyclooxygenase-2 (COX-2) gene polymorphism with lung cancer risk in Asians. *Asian Pac J Cancer Prev* 2010; 11: 1257-1262
- Liu JL, Liang Y, Wang ZN, Zhou X, Xing LL. Cyclooxygenase-2 polymorphisms and susceptibility to gastric carcinoma: a meta-analysis. *World J Gastroenterol* 2010; 16: 5510-5517
- Liu F, Pan K, Zhang X, Zhang Y, Zhang L, Ma J, Dong C, Shen L, Li J, Deng D, Lin D, You W. Genetic variants in cyclooxygenase-2: Expression and risk of gastric cancer and its precursors in a Chinese population. *Gastroenterology* 2006; 130: 1975-1984
- Guo Y, Zhang X, Tan W, Miao X, Sun T, Zhao D, Lin D. Platelet 12-lipoxygenase Arg261Gln polymorphism: functional characterization and association with risk of esophageal squamous cell carcinoma in combination with COX-2 polymorphisms. *Pharmacogenet Genomics* 2007; 17: 197-205
- Zhao D, Xu D, Zhang X, Wang L, Tan W, Guo Y, Yu D, Li H, Zhao P, Lin D. Interaction of cyclooxygenase-2 variants and smoking in pancreatic cancer: a possible role of nucleophosmin. *Gastroenterology* 2009; 136: 1659-1668
- Srivastava K, Srivastava A, Pandey SN, Kumar A, Mittal B. Functional polymorphisms of the cyclooxygenase (PTGS2) gene and risk for gallbladder cancer in a North Indian population. *J Gastroenterol* 2009; 44: 774-780
- 陈志刚, 魏嘉, 禹立霞, 钱晓萍, 刘宝瑞. 环氧化酶-2单核苷酸多态性与结直肠癌生物学行为的相关性研究. *南京医科大学学报(自然科学版)* 2009; 29: 963-966

- 13 Siezen CL, Bueno-de-Mesquita HB, Peeters PH, Kram NR, van Doeselaar M, van Kranen HJ. Polymorphisms in the genes involved in the arachidonic acid-pathway, fish consumption and the risk of colorectal cancer. *Int J Cancer* 2006; 119: 297-303
- 14 Cox DG, Pontes C, Guino E, Navarro M, Osorio A, Canzian F, Moreno V. Polymorphisms in prostaglandin synthase 2/cyclooxygenase 2 (PTGS2/COX2) and risk of colorectal cancer. *Br J Cancer* 2004; 91: 339-343
- 15 宋武, 何裕隆, 蔡世荣, 张常华, 陈创奇, 张信华, 彭建军, 詹文华. 结直肠腺癌病理分型的临床预后分析意义及分析. 中华消化杂志 2009; 29: 249-253
- 16 朱婵, 张颖, 鲍倩, 徐勇飞, 渠利利, 唐志鹏, 田福亮, 王书奎. X线损伤交叉互补基因1多态性与结直肠癌易感性研究. 中华消化杂志 2011; 31: 39-43

编辑 张姗姗 电编 鲁亚静

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

• 消息 •

《世界华人消化杂志》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/wcj/ch/index.aspx>), 提交稿件中出现问题可以发送E-mail至submission@wjnet.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核对, 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》保证每篇文章四月内完成. (编辑部主任: 李军亮 2010-01-18)

自身免疫性肝炎合并干燥综合征、桥本甲状腺炎伴白细胞减少1例

戴敏, 赵鹏, 贝明龙, 张国强

戴敏, 赵鹏, 贝明龙, 张国强, 南京医科大学附属无锡人民医院消化科 江苏省无锡市 214000

戴敏, 硕士, 主要从事消化领域方面的研究.

作者贡献分布: 本文资料分析和论文撰写由戴敏完成; 临床资料收集由戴敏、赵鹏及贝明龙完成; 文献检索有赵鹏与贝明龙完成; 审校由张国强完成.

通讯作者: 张国强, 主治医师, 214000, 江苏省无锡市, 南京医科大学附属无锡人民医院消化科. daimin12@126.com

电话: 0510-85350121

收稿日期: 2012-01-04 修回日期: 2012-02-07

接受日期: 2012-04-17 在线出版日期: 2012-06-18

Huaren Xiaohua Zazhi 2012; 20(17): 1585-1587

■背景资料

自身免疫性肝炎(AIH)是临幊上较常见的非病毒性肝炎类型, 干燥综合征、桥本甲状腺炎也是常见的自身免疫性疾病, 但合并以上3种自身免疫性疾病的病例较为少见. 该文报道和回顾了1例以白细胞减少起病的AIH合并干燥综合征、桥本甲状腺炎的临幊表现、诊断治疗过程, 在临幊工作过程中应注意非病毒性肝炎合并其他自免疾病的可能, 提高诊疗质量.

摘要

自身免疫性肝炎(autoimmune hepatitis, AIH)是临幊上较常见的非病毒性肝炎类型, 干燥综合征、桥本甲状腺炎也是常见的自身免疫性疾病, 但合并以上3种自身免疫性疾病的病例较为少见. 该文报道和回顾了1例以白细胞减少起病的AIH合并干燥综合征、桥本甲状腺炎的临幊表现、诊断治疗过程, 在临幊工作过程中应注意非病毒性肝炎合并其他自免疾病的可能, 提高诊疗质量.

关键词: 自身免疫性肝炎; 干燥综合症; 桥本甲状腺炎

Autoimmune hepatitis complicated by Sjogren syndrome and Hashimoto thyroiditis with leukopenia: A report of one case

Min Dai, Peng Zhao, Ming-Long Bei, Guo-Qiang Zhang

Min Dai, Peng Zhao, Ming-Long Bei, Guo-Qiang Zhang, Department of Digestive Diseases, Wuxi People's Hospital, Affiliated to Nanjing Medical University, Wuxi 214000, Jiangsu Province, China

Correspondence to: Guo-Qiang Zhang, Attending Physician, Department of Digestive Diseases, Wuxi People's Hospital, Affiliated to Nanjing Medical University, Wuxi 214000, Jiangsu Province, China. daimin12@126.com

Received: 2012-01-04 Revised: 2012-02-07

Accepted: 2012-04-17 Published online: 2012-06-18

戴敏, 赵鹏, 贝明龙, 张国强. 自身免疫性肝炎合并干燥综合征、桥本甲状腺炎伴白细胞减少1例. 世界华人消化杂志 2012; 20(17): 1585-1587

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/1585.asp>

0 引言

自身免疫性肝炎(autoimmune hepatitis, AIH)是临幊上较常见的非病毒性肝炎类型, 其总发病率占世界人口的3%-5%. AIH通常可以伴随着肝外表现, 如关节炎、自身免疫性甲状腺炎等. 干燥综合征、桥本甲状腺炎也是常见的自身免疫性疾病, 但合并以上3种自身免疫性疾病的病例较为少见. 该文报道和回顾了1例以白细胞减少起病的AIH合并干燥综合征、桥本甲状腺炎的临幊表现、诊断治疗过程, 旨在为临幊上相关疾病的诊疗提供一些依据和参考.

1 病例报告

女, 45岁, 因发现白细胞减少2年, 乏力、纳差、尿黄1 mo, 入院. 患者于2009年发热、咳嗽, 被诊断为“肺炎”住院治疗, 查白细胞(white blood cells, WBC) $2.8 \times 10^9/L$, 2010年单位体检WBC $2.9 \times 10^9/L$, 肝功能正常. 1 mo前出现乏

Abstract

Autoimmune hepatitis (AIH) is a clinically common type of non-viral hepatitis. Sjogren syndrome (SS) and Hashimoto's thyroiditis (HT) are common autoimmune diseases. However, AIH complicated by SS and HT, which starts with leucopenia, rarely occurs. Here we report such a case and performed a literature review to summarize its clinical manifestations, diagnosis and treatment. Attention should be paid to the possibility of AIH complicated by other autoimmune diseases.

Key Words: Autoimmune hepatitis; Sjogren syndrome; Hashimoto thyroiditis

Dai M, Zhao P, Bei ML, Zhang GQ. Autoimmune hepatitis complicated by Sjogren syndrome and Hashimoto thyroiditis with leukopenia: A report of one case. Shijie

■同行评议者
宣世英, 教授, 山东省青岛市市立医院肝病内科

■ 相关报道

文献报道, 干燥综合征在世界不同人群中的发病率介于0.5%至3%, 可累及其他组织器官如肝。

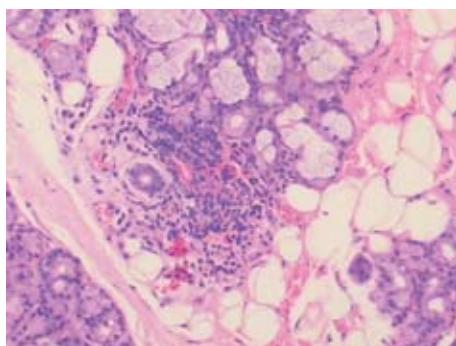


图1 唇腺病理学检查(HE, $\times 200$). 唇腺小叶内见淋巴细胞团浸润.

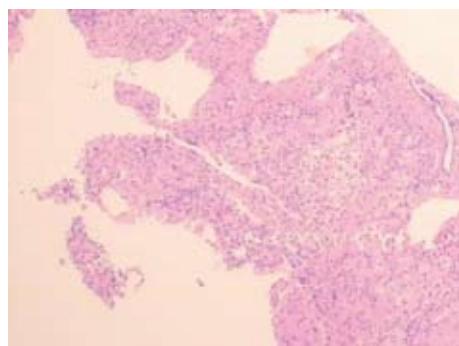


图2 肝组织活检病理学检查(HE, $\times 200$). 肝板周围小汇管区淋巴浆细胞浸润.

力、纳差、尿黄。于外院查血常规: WBC $2.94 \times 10^9/L$, 中性粒细胞(neutrophils, N)48.7%, 淋巴细胞(lymphocyte, L)33.3%, 血红蛋白(hemoglobin, HB)106 g/L, 血小板(platelet, PLT) $108 \times 10^9/L$; 功能: 总胆红素(total bilirubin, TBIL) $109.8 \mu\text{mol}/L$, 直接胆红色素(DBIL) $77.4 \mu\text{mol}/L$, 丙氨酸氨基转移酶(alanine aminotransferase, ALT) $433.6 \text{ IU}/L$, 天门冬氨酸氨基转移酶(aspartate aminotransferase, AST) $693.3 \text{ IU}/L$, 白蛋白(albumin, ALB) $43.4 \text{ g}/L$, 球蛋白(globulin, GLB) $40.9 \text{ g}/L$; 尿分析: 胆红素 $17 \mu\text{mol}/L$. 甲乙丙丁戊肝炎病毒抗体阴性, 考虑“肝炎”予保肝退黄治疗, 乏力、尿黄稍有改善, 纳差依旧, 3 d前出现发热, 双下肢出现大小不等红斑伴瘙痒, 全身其他处散在分布, 转入我院。追问病史患者有口干、眼干史半年, 否认病毒性肝炎史, 家族中无类似患者。

查体: T 37.6°C , BP $128/84 \text{ mmHg}$, 神志清, 皮肤巩膜中度黄染, 双肺未闻及干湿啰音. 心率70次/分, 律齐. 腹平坦, 无压痛, 肝肋下未及, 剑突下3 cm, 质软, 表面光滑, 边缘钝, 无压痛. 脾脏肋下未扪及, Murphy征阴性, 移动性浊音阴性, 双下肢大小不等斑丘疹.

辅助检查: 查WBC $3.04 \times 10^9/L$, L 51.3%, HB $109 \text{ g}/L$, PLT $117 \times 10^9/L$. TBIL $78.1 \mu\text{mol}/L$, DBIL $42.5 \mu\text{mol}/L$, ALT $120 \text{ IU}/L$, AST $140 \text{ IU}/L$, GLB $44.8 \text{ g}/L$, ALB $25.6 \text{ g}/L$, γ -谷氨酰基转移酶(γ -GT) $95 \text{ IU}/L$. IgG $34.2 \text{ g}/L$, IgA $4.44 \text{ g}/L$, 补体C3 $653 \text{ mg}/L$, C4正常. 抗HAV-IgM阴性, 甲乙丙丁戊肝炎病毒抗体均阴性. 纤维5项: 透明质酸酶(hyaluronidase, HA) $128.61 \mu\text{g}/L$, 层粘连蛋白(laminin, LN) $77.04 \mu\text{g}/L$, IV型胶原 $77.91 \mu\text{g}/L$, III型X胶原 $209.54 \mu\text{g}/L$. 抗核抗体(ANA): 1:320阳性, 核浆颗粒型. 抗平滑肌抗体均阴性. Coomb's试验弱阳性; 血小板抗体IgA弱阳性. 凝血6项: 凝

血酶原时间(prothrombin time, PT)16.0 s, 国际标准化比值(international normalized ratio, INR)1.39, 部分凝血活酶时间(partial thromboplastin time, APTT)46.8 s, 凝血酶时间(thrombin time, TT)20.1 s. 甲状腺功能7项测定: 甲状腺过氧化物酶抗体(AntiTPO)424.91 IU/mL, 血清总甲状腺素(total thyroxine, TT4)9.17 $\mu\text{g}/dL$, 血清总三碘甲状腺原氨酸(TT3)0.96 ng/dL, 游离三碘甲状腺原氨酸(FT3)2.06 pg/L, 游离甲状腺素(FT4)0.93 ng/dL, 甲状腺球蛋白抗体(Anti Tg) 139.71 IU/mL, 促甲状腺激素(thyroid stimulating hormone, TSH)15.2446 IU/mL. 甲状腺彩超: 甲状腺弥漫性改变伴左叶小结节. SS-A阳性, SS-B阳性, Ro-S2阳性. 干眼症3项: BUT、Shirmer's试验阳性; 唇腺病理: 唇腺小叶内见淋巴细胞团浸润, 符合干燥综合征(II级, 图1). MRCP: 肝硬化可能, 肝右叶异常信号, 轻度脾肿大. 上腹增强CT: 轻度肝硬化、脾肿大、肝脏异常强化. 胸部CT: 右肺中下叶小结节, 两侧腋窝多发小淋巴结. 骨髓涂片: 基本正常. B超下行肝右叶穿刺病理: 肝板周围小汇管区淋巴浆细胞浸润(图2).

入院诊断: AIH合并干燥综合征、桥本甲状腺炎. 给予甲泼尼龙 $40 \text{ mg}/d$ 、还原型谷胱甘肽 $2.4 \text{ g}/d$ 静脉滴注, 熊去氧胆酸胶囊 $0.25 \text{ g} \text{ Tid}$, 口服, 补充甲状腺素、白蛋白和补钙对症治疗. 2 wk后患者体温正常, 无明显乏力、纳差, 尿色正常. 查体: 巩膜轻度黄染, 全身红斑消退, 呼吸音清, 心律齐, 肝区无叩痛, 肝脾肋下未触及. 复查血常规: WBC $5.2 \times 10^9/L$, N 66.2%, L 25.6%, Hb $115 \text{ g}/L$, PLT $126 \times 10^9/L$. 肝功能: TBIL $43.3 \mu\text{mol}/L$, DBIL $24.5 \mu\text{mol}/L$, ALT $55 \text{ IU}/L$, AST $46 \text{ IU}/L$, GLB $41.8 \text{ g}/L$, ALB $24.5 \text{ g}/L$, γ -GT $91 \text{ IU}/L$. 出院口服泼尼松龙片, 早30 mg, 晚10 mg/d.

出院2 wk后随访调整为甲泼尼龙片, 早

24 mg, 晚8 mg/d, 逐渐减量. 4 mo后复查血常规正常, 肝功能: TBIL 10.1 μmol/L, DBIL 5.3 μmol/L, AST 26 g/L, ALB 29.3 g/L, GLB 29.9 g/L, γ-GT 21 IU/L, 血常规正常. 加用免疫抑制剂硫唑嘌呤维持治疗.

2 讨论

根据2008年Hennes等^[1]对AIH确诊的简化评分系统评分: ANA≥1:80(2分), IgG≥1.1倍正常上限(2分), 病理肝板周围小汇管区淋巴细胞浸润(1分), 排除病毒性肝炎(2分), 总分7分, AIH确诊. 根据干燥综合征(Sjogren syndrome, SS)、桥本甲状腺炎(Hashimoto's thyroiditis, HT)诊断标准, 结合上述临床资料, SS、HT诊断明确. 此3种自身免疫病(autoimmune disease, AID)首选肾上腺皮质激素, HT需加甲状腺素替代治疗. AIH症状缓解后需减量, 必要时加用免疫抑制剂硫唑嘌呤, 与SS、HT的治疗不矛盾.

随着对AID认识的提高, 临床经验积累和实验室技术的进步, AID的发病率明显上升, 其总发病率占世界人口的3%-5%. AIH通常可以伴随着肝外表现, 如关节炎、自身免疫性甲状腺炎等. 干燥综合征是一种主要侵犯外分泌腺的慢性自身免疫性疾病^[2], 女性多见, 其可累及其他组织器官如肝、肾、肺、血液、关节等.

上述3种AID同时合并较为罕见, 王娜等^[3]曾有1例报道. 本例伴白细胞减少、双下肢皮疹, 更为罕见. 临幊上可能由于对其缺乏认识而导致无法确诊甚至误诊误治, 早期诊断治疗有助于病情缓解. 结合本例我们有如下体会: (1)临幊中青年女性出现白细胞减少伴肝功能异常, 也需考虑自身免疫性疾病可能; (2)干燥综合征对造血系统有影响, 表现为白细胞减少或(和)血小板减少, 激素使用后可缓解. 本例双下肢出现皮疹伴瘙痒、发热, 考虑干燥综合征伴过敏性紫癜可能; (3)在临幊工作中, 我们应注意AIH合并其他多种自身免疫性疾病的可能, 病理检查可对其进行确诊. 本例患者白细胞减少2年后确诊, 予激素治疗, 预后良好, 故提供此病例, 引起重视, 以望提高诊疗质量.

3 参考文献

- Hennes EM, Zeniya M, Czaja AJ, Parés A, Dalekos GN, Krawitt EL, Bittencourt PL, Porta G, Boberg KM, Hofer H, Bianchi FB, Shibata M, Schramm C, Eisenmann de Torres B, Galle PR, McFarlane I, Dienes HP, Lohse AW; International Autoimmune Hepatitis Group. Simplified criteria for the diagnosis of autoimmune hepatitis. *Hepatology* 2008; 48: 169-176
- Thanou-Stavraki A, James JA. Primary Sjogren's syndrome: current and prospective therapies. *Semin Arthritis Rheum* 2008; 37: 273-292
- 王娜, 蒋树林, 白文元. 自身免疫性肝炎并桥本甲状腺炎、干燥综合征一例. 中华消化杂志 2006; 26: 170

编辑 张姗姗 电编 鲁亚静

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

• 消息 •

中国科技信息研究所发布《世界华人消化杂志》 影响因子 0.694

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

■同行评价
鉴于AIH等相关疾病越来越常见, 本研究选择典型意义的病例进行报道, 对临幊有重要的指导意义.

《世界华人消化杂志》投稿须知

《世界华人消化杂志》为保证期刊的学术质量, 对所有来稿均进行同行评议, 是一份被中国科技论文统计源核心期刊、中文核心期刊要目总览收录的学术类期刊。

1 投稿总则

1.1 性质 《世界华人消化杂志》[ISSN 1009-3079 (print), ISSN 2219-2859 (online), CN 14-1260/R]是一份同行评议性和开放获取(open access, OA)的旬刊。OA最大的优点是面向全国本领域专家及公众开放无需注册, 免费获取PDF等格式的全文, 切实破除了传统性期刊阻碍科学研究成果快速传播的障碍。OA是一项真正意义上的公益性科学传播工具, 编委、作者和读者利益的最大化的目标, 努力推进本学科的繁荣和发展。

《世界华人消化杂志》定价68.00元, 全年2448.00元, 邮发代号82-262, 由世界华人消化杂志编辑部出版。《世界华人消化杂志》主要报道胃肠病学、肝胆病学、胰腺病学、内镜介入与消化外科等多学科的评论及基础研究和临床实践等各类文章, 具体内容涉及: 食管疾病, 如反流性食管炎、Barret's食管、食管静脉曲张和食管癌等; 胃部疾病, 胃食管反流性疾病、胃炎、胃动力障碍、胃出血、胃癌和幽门螺杆菌感染等; 肠道疾病, 如肠道出血、肠穿孔、肠梗阻、肠道炎症(如IBD/CD等)、肠道感染、大肠癌和大肠腺瘤等; 肝胆部疾病如病毒性肝炎、肝硬化、脂肪肝、肝纤维化、肝衰竭、胆石病、胆汁郁积、梗阻性黄疸、肝癌、胆囊癌、胆管癌和门静脉高压等; 胰腺疾病, 如胰腺炎和胰腺癌等; 全身性疾病涉及消化系统, 如自身免疫性及瘀性疾病、腹腔疾病、消化不良和代谢性疾病等; 以及与以上疾病相关的基因及基因组学、微生物及分子生物学、病因学、流行病学、免疫学、临床内外科诊断与治疗(如影像、化疗、移植、营养等); 除以上外, 本刊也报道诊断与筛选、内窥镜检查法、影像及先进技术。

《世界华人消化杂志》被国际检索系统美国《化学文摘》(Chemical Abstracts, CA)、荷兰《医学文摘库/医学文摘(EMBase/Excerpta Medica, EM)》和俄罗斯《文摘杂志(Abstract Journal, AJ)》收录。国内为中国科技论文统计与分析期刊(科技部列选为中国科技论文统计源期刊)、《中文核心期刊要目总览》(2011年版)内科学类的核心期刊、《中国学术期刊评价研究报告-RCCS权威、核心期刊排行榜与指南》

和中国知识资源总库收录。《中国科技期刊引证报告(核心版)》统计显示, 2010年《世界华人消化杂志》总被引频次3 458次, 影响因子0.694, 综合评价总分60.6分, 分别位居内科学类49种期刊的第5位、第7位、第6位, 分别位居1 998种中国科技论文统计源期刊(中国科技核心期刊)的第79位、第320位、第190位; 其他指标: 他引率0.83, 被引半衰期4.9, 来源文献量712, 文献选出率0.90, 参考文献量17 963, 平均引文数25.23, 平均作者数4.35, 地区分布数29, 机构分布数349, 基金论文比0.45, 海外论文比0.01。

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

2 撰稿要求

2.1 总体标准 文稿撰写应遵照国家标准GB7713科学技术报告、学位论文和学术论文的编写格式, GB6447文摘编规则, GB7714文后参考文献著录规则, GB/T 3179科学技术期刊编排格式等要求; 同时遵照国际医学期刊编辑委员会(International Committee of Medical Journal Editors)制定的《生物医学期刊投稿的统一要求(第5版)》(Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals). 见: *Ann Intern Med* 1997; 126: 36-47.

2.2 名词术语 应标准化, 前后统一, 如原词过长且多次出现者, 可于首次出现时写出全称加括号内注简称, 以后直接用简称。医学名词以全国自然科学名词审定委员会公布的《生理学名词》、《生物化学名词与生物物理学名词》、《化学名词》、《植物学名词》、《人体解剖学名词》、《细胞生物学名词》及《医学名词》系列为准, 药名以《中华人民共和国药典》和卫生部药典委员会编的《药名词汇》为准, 国家食品药品监督管理局批准的新药, 采用批准的药名; 创新性新药, 请参照我国药典委员会的“命名原则”, 新译名词应附外文。公认习用缩略语可直接应用(建议第一次也写出全称), 如ALT, AST, mAb, WBC, RBC, Hb, T, P, R, BP,

PU, GU, DU, ACTH, DNA, LD50, HBsAg, HCV RNA, AFP, CEA, ECG, IgG, IgA, IgM, TCM, RIA, ELISA, PCR, CT, MRI等。为减少排印错误, 外文、阿拉伯数字、标点符号必须正确打印在A4纸上。中医药名词英译要遵循以下原则: (1)有对等词者, 直接采用原有英语词, 如中风stroke, 发热fever; (2)有对应词者应根据上下文合理选用原英语词, 如八法eight principal methods; (3)英语中没有对等词或相应词者, 宜用汉语拼音, 如阴yin, 阳yang, 阴阳学说yinyangology, 人中renzhong, 气功qigong; 汉语拼音要以词为单位分写, 如weixibao nizhuanwan(胃细胞逆转丸), guizhitang(桂枝汤)。通常应小写。

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

2.4 计量单位 采用国际单位制并遵照有关国家

标准, GB3100-3102-93量和单位。原来的“分子量”应改为物质的相对分子质量。如30 kD改为M_r 30 000或30 kDa(M大写斜体, r小写正体, 下角标); “原子量”应改为相对原子质量, 即A_r(A大写斜体, r小写正体, 下角标); 也可采用原子质量, 其单位是u(小写正体)。计量单位在+、一及后列出。在±前后均要列出, 如37.6 °C ± 1.2 °C, 45.6岁±24岁, 56.4 d±0.5 d, 3.56±0.27 pg/ml应为3.56 ng/L±0.27 ng/L。BP用kPa(mmHg), RBC数用1×10¹²/L, WBC数用1×10⁹/L, WBC构成比用0.00表示, Hb用g/L, M_r明确的体内物质以nmol/L或mmol/L表示, 不明确者用g/L表示。1 M硫酸, 改为1 mol/L硫酸, 1 N硫酸, 改为0.5 mol/L硫酸。长10 cm, 宽6 cm, 高4 cm, 应写成10 cm×6 cm×4 cm。生化指标一律采用法定计量单位表示, 例如, 血液中的总蛋白、清蛋白、球蛋白、脂蛋白、血红蛋白、总脂用g/L, 免疫球蛋白用mg/L; 葡萄糖、钾、尿素、尿素氮、CO₂结合力、乳酸、磷酸、胆固醇、胆固醇酯、三酰甘油、钠、钙、镁、非蛋白氮、氯化物; 胆红素、蛋白结合碘、肌酸、肌酐、铁、铅、抗坏血酸、尿胆元、氨、维生素A、维生素E、维生素B1、维生素B2、维生素B6、尿酸; 氢化可的松(皮质醇)、肾上腺素、汞、孕酮、甲状腺素、睾酮、叶酸用nmol/L; 胰岛素、雌二醇、促肾上腺皮质激素、维生素B12用pmol/L。年龄的单位有日龄、周龄、月龄和岁。例如, 1秒, 1 s; 2分钟, 2 min; 3小时, 3 h; 4天, 4 d; 5周, 5 wk; 6月, 6 mo; 雌性♀, 雄性♂, 酶活性国际单位IU = 16.67 nkat, 对数log, 紫外uv, 百分比%, 升L, 尽量把1×10⁻³ g与5×10⁻⁷ g之类改成1 mg与0.5 mg, hr改成h, 重量γ改成mg, 长度m改成mm。国际代号不用于无数字的文句中, 例如每天不写每d, 但每天8 mg可写8 mg/d。在一个组合单位符号内不得有1条以上的斜线, 例如不能写成mg/kg/d, 而应写成mg/(kg•d), 且在整篇文章内应统一。单位符号没有单、复数的区别, 例如, 2 min不是2 mins, 3 h不是3 hs, 4 d不是4 ds, 8 mg不是8 mgs。半个月, 15 d; 15克, 15 g; 10%福尔马林, 40 g/L甲醛; 95%酒精, 950 mL/L乙醇; 5% CO₂, 50 mL/L CO₂; 1:1 000肾上腺素, 1 g/L肾上腺素; 胃黏膜含促胃液素36.8 pg/mg, 改为胃黏膜蛋白含促胃液素36.8 ng/g; 10%葡萄糖改为560 mmol/L或100 g/L葡萄糖; 45 ppm = 45×10⁻⁶; 离心的旋转频率(原称转速)用r/min, 超速者用g; 药物剂量若按体质量计算, 一律以“/kg”表示。

2.5 统计学符号 (1)t检验用小写t; (2)F检验用英

《世界华人消化杂志》为中国科技论文统计源核心期刊(2010年)和中文核心期刊要目总览(北京大学图书馆, 2011年版)收录的学术期刊。

《世界华人消化杂志》编辑部, 100025, 北京市朝阳区, 东四环中路62号, 远洋国际中心D座903室, 电话: 010-5908-0035, 传真: 010-8538-1893, Email: wcd@wjgnet.com; http://www.wjgnet.com

文大写 F ; (3)卡方检验用希文小写 χ^2 ; (4)样本的相关系数用英文小写 r ; (5)自由度用希文小写 v ; (6)样本数用英文小写 n ; (7)概率用英文斜体大写 P . 在统计学处理中在文字叙述时平均数±标准差表示为mean±SD, 平均数±标准误为mean±SE. 统计学显著性用 ${}^aP<0.05$, ${}^bP<0.01(P>0.05$ 不注). 如同一表中另有一套 P 值, 则 ${}^cP<0.05$, ${}^dP<0.01$; 第三套为 ${}^eP<0.05$, ${}^fP<0.01$ 等.

2.6 数字用法 遵照国家标准GB/T 15835-1995出版物上数字用法的规定, 作为汉语词素者采用汉字数字, 如二氧化碳、十二指肠、三倍体、四联球菌、五四运动、星期六等. 统计学数字采用阿拉伯数字, 如1 000-1 500 kg, 3.5 mmol/L ± 0.5 mmol/L等. 测量的数据不能超过其测量仪器的精密度, 例如6347意指6000分之一的精密度. 任何一个数字, 只允许最后一位有误差, 前面的位数不应有误差. 在一组数字中的mean±SD应考虑到个体的变差, 一般以SD的1/3来定位数, 例如3 614.5 g±420.8 g, SD的1/3达一百多g, 平均数波动在百位数, 故应写成3.6 kg±0.4 kg, 过多的位数并无意义. 又如8.4 cm±0.27 cm, 其SD/3 = 0.09 cm, 达小数点后第2位, 故平均数也应补到小数点后第2位. 有效位数以后的数字是无效的, 应该舍. 末尾数字, 小于5则舍, 大于5则进, 如恰等于5, 则前一位数逢奇则进, 逢偶(包括“0”)且5之后全为0则舍. 末尾时只可1次完成, 不得多次完成. 例如23.48, 若不要小数点, 则应成23, 而不应该23.48→23.5→24. 年月日采用全数字表达法, 请按国家标准GB/T 7408-94书写. 如1985年4月12日, 可写作1985-04-12; 1985年4月, 写作1985-04; 从1985年4月12日23时20分50秒起至1985年6月25日10时30分止, 写作1985-04-12 T23:20:50/1985-06-25 T10:30:00; 从1985年4月12日起至1985年6月15日止, 写作1985-04-12/06-16, 上午8时写作08:00, 下午4时半写作16:30. 百分数的有效位数根据分母来定: 分母≤100, 百分数到个位; 101≤分母≤1 000, 百分数到小数点后1位; 余类推. 小数点前后的阿拉伯数字, 每3位间空1/4阿拉伯数字距离, 如1 486 800.475 65. 完整的阿拉伯数字不移行!

2.7 标点符号 遵照国家标准GB/T 15834-1995标点符号用法的要求, 本刊论文中的句号都采用黑圆点; 数字间的起止号采用“-”字线, 并列的汉语词间用顿号分开, 而并列的外文词、阿拉伯数字、外文缩略词及汉语拼音字母拼写词间改用逗号分开, 参考文献中作者间一律用逗号分开; 表示终了的标点符号, 如句号、逗号、顿

号、分号、括号及书名号的后一半, 通常不用于一行之首; 而表示开头的标点符号, 如括号及书名号的前一半, 不宜用于一行之末. 标点符号通常占一格, 如顿号、逗号、分号、句号等; 破折号应占两格; 英文连字符只占一个英文字符的宽度, 不宜过长, 如5-FU. 外文字符下划一横线表示用斜体, 两横线表示用小写, 三横线表示用大写, 波纹线表示用黑体.

3 稿件格式

3.1 题名 简明确切地反映论文的特定内容, 鲜明而有特色, 阿拉伯数字不宜开头, 不用副题名, 一般20个字. 避免用“的研究”或“的观察”等非特定词.

3.2 作者 论文作者的署名, 按照国际医学杂志编辑委员会(ICMJE, International Committee of Medical Journal Editors)作者资格标准执行. 作者标准为: (1)对研究的理念和设计、数据的获得、分析和解读做出重大贡献; (2)起草文章, 并对文章的重要的知识内容进行批评性修改; (3)接受对准备发表文章的最后一稿. 作者应符合条件1, 2, 3, 对研究工作有贡献的其他人可放入志谢中. 作者署名的次序按贡献大小排列, 多作者时姓名间用逗号, 如是单名, 则在姓与名之间空1格(正文和参考文献中不空格). 《世界华人消化杂志》要求所有署名人写清楚自己对文章的贡献. 世界华人消化杂志不设置共同第一作者和共同通信作者.

3.3 单位 作者后写单位的全称空1格后再写省市及邮政编码. 格式如: 张旭晨, 梅立新, 承德医学院病理教研室 河北省承德市 067000

3.4 第一作者简介 格式如: 张旭晨, 1994年北京中医药大学硕士, 讲师. 主要从事消化系统疾病的病理研究.

3.5 作者贡献分布 格式如: 陈湘川与庞丽娟对本文所作贡献均等; 此课题由陈湘川、庞丽娟、陈玲、杨兰、张金芳、齐妍及李洪安设计; 研究过程由陈玲、杨兰、张金芳、蒋金芳、杨磊、李锋及曹秀峰操作完成; 研究所用新试剂及分析工具由曹秀峰提供; 数据分析由陈湘川、杨兰及庞丽娟完成; 本论文写作由陈湘川、庞丽娟及李洪安完成.

3.6 同行评议者 为了确保刊出文章的质量, 本刊即将开始实行接受稿件的同行评议公开策略, 将同行评议者姓名, 职称, 机构的名称与文章一同在脚注出版. 格式如: 房静远, 教授, 上海交通大学医学院附属医院仁济医院, 上海市消化疾

病研究所.

3.7 基金资助项目 格式如: 国家自然科学基金资助项目, No. 30224801

3.8 通讯作者 格式如: 通讯作者: 黄缘, 教授, 330006, 江西省南昌市民德路1号, 南昌大学第二附属医院消化内科, 江西省分子医学重点实验室. huang9815@yahoo.com

电话: 0351-4078656 传真: 0351-4086337

收稿日期: 修回日期:

3.9 英文摘要

题名 文章的题名应言简意赅, 方便检索, 英文题名以不超过10个实词为宜, 应与中文题名一致.

作者 作者姓名汉语拼音拼写法规定为: 先名, 后姓; 首字母大写, 双名之间用半字线“-”分开, 多作者时姓名间加逗号. 格式如: “潘伯荣”的汉语拼写法为“Bo-Rong Pan”.

单位 先写作者, 后写单位的全称及省市邮政编码. 例如: Xu-Chen Zhang, Li-Xin Mei, Department of Pathology, Chengde Medical College, Chengde 067000, Hebei Province, China

基金资助项目 格式如: Supported by National Natural Science Foundation of China, No.30224801

通讯作者 格式如: Correspondence to: Dr. Lian-Sheng Ma, Taiyuan Research and Treatment Center for Digestive Diseases, 77 Shuangta Xijie, Taiyuan 030001, Shanxi Province, China. wcjd@wjgnet.com

收稿及修回日期 格式如: Received: Revised:

摘要 包括目的、方法、结果、结论, 书写要求与中文摘要一致.

3.10 中文摘要 必须在300字左右, 内容应包括目的(应阐明研究的背景和设想、目的), 方法(必须包括材料或对象. 应描述课题的基本设计, 双盲、单盲还是开放性, 使用什么方法, 如何进行分组和对照, 数据的精确程度. 研究对象选择条件与标准是否遵循随机化、齐同化的原则, 对照组匹配的特征. 如研究对象是患者, 应阐明其临床表现, 诊断标准. 如何筛选分组, 有多少例进行过随访, 有多少例因出现不良反应而中途停止研究), 结果(应列出主要结果, 包括主要数据, 有什么新发现, 说明其价值和局限, 叙述要真实、准确、具体, 所列数据经用何种统计学方法处理; 应给出结果的置信区间和统计学显著性检验的确切值; 概率写P, 后应写出相应显著性检验值), 结论(全文总结, 准确无误的观点及价值).

3.11 正文标题层次 0 引言; 1 材料和方法, 1.1 材料, 1.2 方法; 2 结果; 3 讨论; 4 参考文献. 序号一

律左顶格写, 后空1格写标题; 2级标题后空1格接正文. 正文内序号连排用(1), (2), (3). 以下逐条陈述.

0 引言 应包括该研究的目的和该研究与其他相关研究的关系.

1 材料和方法 应尽量简短, 但应让其他有经验的研究者能够重复该实验. 对新的方法应该详细描述, 以前发表过的方法引用参考文献即可, 有关文献中或试剂手册中的方法的改进仅描述改进之处即可.

2 结果 实验结果应合理采用图表和文字表示, 在结果中应避免讨论.

3 讨论 要简明, 应集中对所得的结果做出解释而不是重复叙述, 也不应是大量文献的回顾.

图表的数量要精选. 表应有表序和表题, 并有足够的具有自明性的信息, 使读者不查阅正文即可理解该表的内容. 表内每一栏均应有表头, 表内非公知通用缩写应在表注中说明, 表格一律使用三线表(不用竖线), 在正文中该出现的地方应注出. 图应有图序、图题和图注, 以使其容易被读者理解, 所有的图应在正文中该出现的地方注出. 同一个主题内容的彩色图、黑白图、线条图, 统一用一个注解分别叙述. 如: 图1 萎缩性胃炎治疗前后病理变化. A: …; B: …; C: …; D: …; E: …; F: …; G: … . 曲线图可按●、○、■、□、▲、△顺序使用标准的符号. 统计学显著性用: ^aP<0.05, ^bP<0.01(^cP>0.05 不注). 如同一表中另有一套P值, 则^dP<0.05, ^eP<0.01; 第3套为^fP<0.05, ^gP<0.01. P值后注明何种检验及其具体数字, 如P<0.01, t = 4.56 vs 对照组等, 注在表的左下方. 表内采用阿拉伯数字, 共同的计量单位符号应注在表的右上方, 表内个位数、小数点、±、-应上下对齐. “空白”表示无此项或未测, “-”代表阴性未发现, 不能用同左、同上等. 表图勿与正文内容重复. 表图的标目尽量用t/min, c/(mol/L), p/kPa, V/mL, t/℃表达.

志谢 后加冒号, 排在讨论后及参考文献前, 左齐.

4 参考文献 本刊采用“顺序编码制”的著录方法, 即以文中出现顺序用阿拉伯数字编号排序. 提倡对国内同行近年已发表的相关研究论文给予充分的反映, 并在文内引用处右上角加方括号注明角码. 文中如列作者姓名, 则需在“Pang等”的右上角注角码号; 若正文中仅引用某文献中的论述, 则在该论述的句末右上角注码号. 如马连生^[1]报告……, 潘伯荣等^[2-5]认为……; PCR方法敏感性高^[6-7]. 文献序号作正

《世界华人消化杂志》自2006-01-01起改为旬刊发行, 每月8、18、28日出版. 北京报刊发行局发行, 邮发代号: 82-262.

《世界华人消化杂志》坚持开放获取(open access, OA)的出版模式, 编辑出版高质量文章, 努力实现编委、作者和读者利益的最大化, 努力推进本学科的繁荣和发展, 向专业化、特色化和品牌化方向迈进。

文叙述时, 用与正文同号的数字并排, 如本实验方法见文献[8]. 所引参考文献必须以近2-3年SCIE, PubMed, 《中国科技论文统计源期刊》和《中文核心期刊要目总览》收录的学术类期刊为准, 通常应只引用与其观点或数据密切相关的国内外期刊中的最新文献。期刊: 序号, 作者(列出全体作者). 文题, 刊名, 年, 卷, 起页-止页, PMID和DOI编号; 书籍: 序号, 作者(列出全部), 书名, 卷次, 版次, 出版地, 出版社, 年, 起页-止页。

5 网络版的发表前链接 本刊即将开始实行网络版的每篇文章上都有该文发表前纪录的链接, 包括首次提交的稿件, 同行评议人报告, 作者给审稿人回信和作者修回稿, 以PDF格式上传。读者可以针对论文、审稿意见和作者的修改情况发表意见, 指出问题与不足; 作者也可以随时修改完善自己发表的论文, 使文章的发表成为一个编者、同行评议者、读者、作者互动的动态过程。

4 写作格式实例

4.1 述评写作格式实例

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

4.2 研究原著写作格式实例

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

4.3 焦点论坛写作格式实例

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

4.4 文献综述写作格式实例

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

4.5 研究快报写作格式实例

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

4.6 临床经验写作格式实例

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

4.7 病例报告写作格式实例

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

5 投稿方式

接受在线投稿, 不接受其他方式的投稿, 如E-mail、打印稿。在线投稿网址: <http://www.baishideng.com/wcjd/ch/index.aspx>。无法在线提交的通过submission@wjgnet.com, 电话: 010-8538-1892, 传真: 010-8538-1893寻求帮助。投稿须知下载网址<http://www.wjgnet.com/1009-3079/tgxz.pdf>。审稿过程平均时间需要14-28 d。所有的来

稿均经2-3位同行专家严格评审, 2位或以上通过为录用, 否则将退稿或修改后再审。接受后的稿件作者需缴纳稿件发表费, 文章发表后可获得1本样刊及10套单行本(稿酬)。

6 修回稿须知

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

6.2 稿件修改 来稿经同行专家审查后, 认为内容需要修改、补充或删节时, 本刊编辑部将把原稿连同审稿意见、编辑意见寄回给作者修改, 而作者必须于15 d内将单位介绍信、作者符合要点承诺书、版权转让信等书面材料寄回编辑部, 同时将修改后的电子稿件上传至在线办公系统; 逾期寄回, 所造成的问题由作者承担责任。

6.3 版权 本论文发表后作者享有非专有权, 文责由作者自负。作者可在本单位或本人著作集中汇编出版以及用于宣讲和交流, 但应注明发表于《世界华人消化杂志》××年; 卷(期): 起止页码。如有国内外其他单位和个人复制、翻译出版等商业活动, 须征得《世界华人消化杂志》编辑部书面同意, 其编辑版权属本刊所有。

《世界华人消化杂志》编辑部

北京百世登生物医学科技有限公司

100025, 北京市朝阳区东四环中路62号

远洋国际中心D座903室

电话: 010-5908-0035

传真: 010-8538-1893

E-mail: wcjd@wjgnet.com

<http://www.wjgnet.com>

2012年国内国际会议预告

2012-05-26/31

2012年世界医学物理与生物医学工程大会

会议地点: 北京市

联系方式: info@wc2012.org

2012-06-01/03

2012中国北京超声医师学术大会

会议地点: 北京市

联系方式: zhumin301@163.com

2012-06-15/17

第一届糖尿病大会、第二届内分泌与代谢大会

会议地点: 北京市

联系方式: medical585@163.com

2012-06-15/17

第九届全国抗菌药物临床药理学术会议

会议地点: 北京市

联系方式: doctorzhengbo@163.com; liyun1907@sina.com

2012-06-29/07-01

第二十四次全国中西医结合消化学术会议

会议地点: 宁波市

联系方式: qgzxyjhxh@163.com

2012-06-30/07-01

中华医学学会肝病与代谢学术研讨会

会议地点: 哈尔滨市

联系方式: lilyjia@163.com

2012-07-01/31

第一届全国普通外科青年医师学术论坛

会议地点: 北京市

联系方式: cmacjs@cma.org.cn

2012-07-01/31

第二届全国普通外科手术技术学术会议

会议地点: 青岛市

联系方式: lining@126.com

2012-07-27/29

第十届全国胃病学术大会

会议地点: 哈尔滨市

联系方式: xiaohuahuiyi2012@163.com

2012-08-08/10

第五届全国生物信息学与系统生物学学术大会暨国际生

物信息学前沿研讨会

会议地点: 哈尔滨市

联系方式: bioinfo@hrbmu.edu.cn

2012-08-25/29

第八届世界华人药物化学研讨会暨第九届IUPAC化学生物学国际研讨会

会议地点: 北京市

联系方式: liangren@bjmu.edu.cn

2012-08-29/09-01

中华医学会第十一次全国内分泌学学术会议

会议地点: 广州市

联系方式: lilyjia@163.com

2012-09-01/30

中华医学会第三次全国肝纤维化、肝硬化学术会议

会议地点: 郑州市

联系方式: lijiuyi@cma.org.cn

2012-09-01/30

第十五届全国中西医结合大肠肛门病学术交流会

会议地点: 济南市

联系方式: doclf@163.com

2012-09-14/16

中华医学会第十二次全国超声医学学术会议

会议地点: 青岛市

联系方式: lilyjia@163.com

2012-09-21/30

2012中华影像技术第20次全国学术大会暨国际影像技术论坛

会议地点: 长春市

联系方式: ting@dxyer.com

2012-09-23/27

第九届海峡两岸细胞生物学研讨会

会议地点: 丽江市

联系方式: cscb@sibs.ac.cn

2012-10-21/11-10

第十四次全国中医肛肠学术交流大会

会议地点: 长沙市

联系方式: gcfh2012@163.com

2012-10-25/28

第13届亚太临床微生物暨感染病会议(APCCMI)

会议地点: 北京市

联系方式: bianxiaoxue@mpco.cn

2012-12-21/23

2012生物医学工程生物信息学国际会议

会议地点: 昆明市

联系方式: beb2012@126.com

• 谢谢 •

志谢世界华人消化杂志编委

本期文章审稿中(包括退稿),我刊编委付出了宝贵的时间和大量的精力,提高了《世界华人消化杂志》的学术质量,在此表示衷心感谢!

范学工 教授

中南大学湘雅医院感染病科

颜宏利 教授

中国人民解放军第二军医大学医学遗传学教研室

李勇 副教授

上海中医药大学附属市中医医院消化科

梁力建 教授

中山大学附属第一医院肝胆外科

刘丽江 教授

江汉大学医学院病理学

刘占举 教授

同济大学附属上海市第十人民医院

沈薇 教授

重庆医科大学附属第二医院消化内科

谭德明 教授

中南大学湘雅医院感染病科

王凤山 教授

中国医科大学附属第一医院普外一科

王江滨 教授

吉林大学中日联谊医院

王俊平 教授

山西省人民医院消化科

王蒙 副教授

中国人民解放军第二军医大学附属东方肝胆外科医院肝外综合治疗一科

王娅兰 教授

重庆医科大学基础医学院病理学教研室

王悦华 副主任医师

首都医科大学附属宣武医院外科

吴俊华 副主任医师

南京大学功能生物分子研究所

夏时海 副教授

中国人民解放军武警后勤学院附属医院肝胆胰脾科(中心)

向德兵 副教授

中国人民解放军第三军医大学大坪医院野战外科研究所肿瘤中心

谢丹 教授

中山大学肿瘤防治中心-华南肿瘤学国家重点实验室

徐列明 教授

上海中医药大学附属曙光医院(东部)肝二科

许剑民 教授

上海市复旦大学附属中山医院普外科

许文燮 教授

上海交通大学基础医学院, 病理、生理与病理生理系

严惟力 副教授

上海交通大学医学院附属仁济医院

于颖彦 教授

上海市瑞金医院消化外科研究所与器官移植中心

禹正杨 副教授

南华大学附属第一医院

张俊 副研究员

上海交通大学医学院附属瑞金医院普外科

张小晋 主任医师

北京积水潭医院

郑培永 副教授

上海中医药大学脾胃病研究所 上海中医药大学附属龙华医院消化内科

周晓武 副主任医师

中国人民解放军空军总医院普外科

朱传武 主任医师

江苏省苏州市第五人民医院传染科