

小肠梗阻的诊断和治疗策略

陈汉卿, 吕宾

陈汉卿, 浙江中医药大学第一临床医学院 浙江省杭州市 310053

吕宾, 浙江中医药大学附属第一医院消化科 浙江省杭州市 310006

吕宾, 教授, 主要从事胃食管反流和内镜治疗方面的研究。

作者贡献分布: 本文由陈汉卿综述; 吕宾选题和审校。

通讯作者: 吕宾, 教授, 主任医师, 博士生导师, 310006, 浙江省杭州市, 浙江中医药大学附属第一医院消化科。

lvbin@medmail.com.cn

电话: 0571-87032028

收稿日期: 2010-11-30 修回日期: 2011-01-11

接受日期: 2011-01-26 在线出版日期: 2011-02-28

Strategies for diagnosis and treatment of small bowel obstruction

Han-Qing Chen, Bin Lv

Han-Qing Chen, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, Zhejiang Province, China

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

Correspondence to: Professor Bin Lv, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310006, Zhejiang Province, China. lvbin@medmail.com.cn

Received: 2010-11-30 Revised: 2011-01-11

Accepted: 2011-01-26 Published online: 2011-02-28

Abstract

Small bowel obstruction, which is caused by a variety of etiological factors and mainly manifests as abdominal pain, vomiting and distension, is one of the most common acute abdomens. A rapid and accurate diagnosis of small bowel obstruction is needed to give reasonable and effective treatment to avoid its rapid deterioration. In this paper we discuss the strategies for diagnosis and treatment of small bowel obstruction through comparing different imaging methods for diagnosis of small bowel obstruction and reviewing the current situation of diagnosis and treatment of the disease in terms of pharmacotherapy, gastrointestinal decompression, and surgical intervention.

Key Words: Small bowel obstruction; Diagnosis; Imaging; Gastrointestinal decompression; Nonoperative treatment

Chen HQ, Lv B. Strategies for diagnosis and treatment of small bowel obstruction. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(6): 551-556

摘要

小肠梗阻是由多种病因引起的以腹痛、腹胀、呕吐等为临床常见表现的一种急腹症, 往往病情发展迅速, 需要快速准确地做出诊断并予以合理、有效地治疗。本文围绕小肠梗阻的诊断和治疗策略, 比较不同影像学诊断方法在小肠梗阻中的应用以及从药物治疗、胃肠减压、手术介入的适当时机和方式等多方面论述了目前对于小肠梗阻诊断和治疗的现状, 以期更好地为临床上准确有效地处理该类患者提供一些依据。

关键词: 小肠梗阻; 诊断; 影像学; 胃肠减压; 非手术治疗

陈汉卿, 吕宾. 小肠梗阻的诊断和治疗策略. *世界华人消化杂志* 2011; 19(6): 551-556

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/551.asp>

0 引言

小肠梗阻(small bowel obstruction, SBO)是一种常见的急腹症, 可由肠腔堵塞、肠管受压、肠壁病变等多种病因引起。其中粘连、嵌顿疝和肿瘤是造成梗阻最常见的原因, 可使肠腔狭窄, 肠内容物通过发生障碍, 常伴随局部血液循环严重障碍, 导致剧烈腹痛、呕吐或休克等。本病发展迅速, 需要快速准确地做出诊断并予以合理、有效地治疗。在全球范围内具有较高的发病率, 且是造成急诊外科住院的主要原因, 给社会造成了极大的经济负担^[1,2]。单纯性机械性SBO发展到一定程度时可以引起肠壁血运障碍形成绞窄性肠梗阻, 造成肠壁缺血、坏死和穿孔的发生。因此需要早期准确识别患者是否发生了绞窄, 从而决定给予手术治疗抑或是进行非手术治疗。

1 SBO的诊断

急性SBO最典型的临床表现是“胀、痛、吐、

■背景资料

小肠梗阻是一种常见的急腹症, 可由肠腔堵塞、肠管受压、肠壁病变等多种病因引起。其中粘连、嵌顿疝和肿瘤是造成梗阻最常见的原因, 单纯性机械性小肠梗阻发展到一定程度时可以引起肠壁血运障碍形成绞窄性肠梗阻, 造成肠壁缺血、坏死和穿孔的发生。因此需要早期准确识别患者是否发生了绞窄, 从而决定给予手术治疗抑或是进行非手术治疗。

■同行评议者

陈海龙, 教授, 大连医科大学附属第一医院院办

■相关报道

Beall等对44例可疑SBO进行螺旋CT(口服或静脉注射对比剂)与核磁共振比较的前瞻性研究结果显示,在鉴别有无梗阻方面,CT敏感性71%,特异性71%,核磁共振敏感性95%,特异性100%。

闭”。间歇性或持续性的恶心、呕吐,往往出现早,以十二指肠、SBO多见,胆汁样呕吐物大多提示梗阻为小肠上部,而粪便样呕吐物可以是结肠梗阻的首发症状。间断性绞痛的程度和部位可因梗阻近端扩张肠道的不同而变化。SBO时,脐周剧烈疼痛,间歇期短;大肠梗阻时,疼痛较轻,位置较深,间歇期较长。急性发作的剧烈疼痛,逐渐加重或疼痛部位固定,可能提示穿孔或回、结肠绞窄;腹部触诊时疼痛加重,可能提示腹膜刺激征或肠穿孔。持续腹痛的程度和部位可由腹膨胀、肿瘤或肝脏肿大造成。完全性梗阻时,排便排气消失;不全性梗阻时则间歇出现不排便。Perea等^[3]根据100例粘连性SBO的前瞻性研究发现:呕吐(77%)、腹痛(68%)、停止排便排气(52%)、持续的疼痛(12%)和腹胀(56%)为常见的临床表现。此外,影像技术的发展也为SBO提供了很好的诊断手段。腹部平片对SBO的敏感性为69%(44/64),对区分高位和低位梗阻的敏感性分别为86%(24/28)和56%(20/36)^[4,5]。平片对高位梗阻敏感性较高,对于低位肠梗阻或不全性肠梗阻其敏感性则较低^[6-8]。CT可提供比平片检查更多的信息,更高的准确率,全面地评价腹部情况,形成病因学诊断^[4,6,9]和鉴别低位与高位肠梗阻^[9-11],其诊断SBO敏感性为80%-90%,特异性为70%-90%^[4],通过手术证实CT扫描对缺血和绞窄的敏感性达85%-100%^[12-15]。并且多排螺旋CT较之普通CT可使成像的截面更薄,肠壁和肠腔的强化更加明显^[16,17]。相对于CT对低位和不全性肠梗阻较低的敏感性(<50%),对比造影可以细致地观察肠管的过渡区带和可疑肠袢,而不受轴向位的限制,这一方法包括小肠连续造影或灌肠造影等^[18]。虽然检查所需时间要比CT稍长,但对于肠腔和肠壁病变的敏感性很高,当配合CT检查时,其发现肠道肿瘤的敏感性和特异性接近100%^[19]。CT肠道造影术有良好可靠性,可以发现腔外病变。非急性的低位梗阻的患者应该常规应用。泛影葡胺是一种使用相当广泛的水溶性造影剂,文献报道其对粘连性SBO患者具有诊断和治疗的双重作用,可缩短住院时间,降低手术率^[20]。腹部超声对SBO的诊断、病因和绞窄的判断与平片相当,且可更好地识别游离液区^[9,21-23]。腹部MRI对SBO的诊断敏感性和准确度与CT相当,但其对多病灶、大肠梗阻以及炎症的显示不如CT^[24-26]。Beall等^[25]对44例可疑SBO(1997-1998)进行螺旋CT(口服或静脉注射对比剂)与核磁共振比较的

前瞻性研究结果显示,在鉴别有无梗阻方面,CT敏感性71%,特异性71%,核磁共振敏感性95%,特异性100%。MRI的局限性包括:对梗阻亚急性期、梗阻病因的检查效率较低,对结肠梗阻的显影较差。总之,不论应用何种诊断措施,都应将目标关注于:(1)鉴别机械性肠梗阻与动力性肠梗阻;(2)形成梗阻的病因学诊断;(3)区分部分(低位)梗阻和完全性(高位)梗阻;(4)明确是否发生了绞窄。

2 药物治疗

药物治疗是SBO的基础治疗,不管患者是否行手术,适度的药物治疗都是必需的。药物治疗目标是纠正水、电解质和酸碱平衡失调,防治感染和中毒,缓解恶心、呕吐、腹痛和腹胀等状况^[27]。药物种类主要有液体、抗生素、营养制剂、抗分泌药、止痛药、止吐药、激素类药等。药物治疗的剂量和给药途径需个体化。大多数肠梗阻患者不能口服给药,静脉给药最好经中心静脉置管给药,另外还可选择皮下注射、经直肠或舌下途径给药。

几乎所有的SBO患者都存在不同程度的体液丢失,故补液应常规应用,但若大量补充液体反而会引起肠腔分泌过多^[28,29]。补液量一般为1-1.5 L/d,成分以5%-10%葡萄糖溶液、生理盐水、林格液等为主,并结合患者呕吐、缺水体征、尿量、血清钠、钾、氯及血气分析结果来选用。补液方法有静脉补液和皮下输液,静脉补液长期应用会给患者带来不适和不便,因此长期静脉补液患者应中心静脉置管,对于静脉条件差或无中心静脉置管的患者,皮下输液是可行的选择。另外,梗阻患者比非梗阻患者更容易在肠系膜淋巴结发现细菌(39.9% vs 7.3%, $P<0.001$),术后脓毒血症更易发生于此类肠系膜淋巴结细菌阳性的梗阻患者(36.1% vs 11.1%, $P<0.05$)^[30]。因此,有效的抗感染治疗可显著减少因肠道菌群移位所致的感染、中毒及多器官功能衰竭。对于晚期恶性梗阻患者应用阿片类镇痛药应遵循WHO癌症疼痛治疗指南,一般均能达到缓解疼痛的目的^[31,32]。镇痛药物的剂量必须仔细斟酌,最好通过非经口途径给药。强阿片类药物治疗时,应注意恶心、呕吐、便秘等药物不良反应。此外,对于未明确病因的SBO患者,应注意使用阿片类药物可能影响病情观察和手术决策。抗胆碱类药物可用于阿片类药物单药控制不佳的腹部绞痛,另一方面可抑制胃肠道腺体分泌,减少

肠液潴留^[33,34]。止吐药物有甲氧氯普胺、多潘立酮、莫沙比利等,适用于SBO早期、不完全性梗阻,但由于其可引起腹部绞痛,故不推荐用于完全性肠梗阻^[31]。生长抑素类药物通过全面抑制胃肠、胰腺及胆汁分泌,使消化液分泌减少,从而减少梗阻以上肠管内液体积聚,有利于肠壁血液循环的恢复,加速炎症消退,促进肠管再通,同时促进肠黏膜对消化液的吸收^[35-37],可降低腹腔内压,防止部分梗阻转为完全梗阻^[38],因此可有效应用于SBO的治疗。

SBO属中医的“肠结”、“关格”范畴,其中对于不完全性SBO的患者,应用中医中药治疗往往取得很好的疗效。这些患者一般受到手术创伤打击,脏腑气滞血瘀,气机运化失调,传化之物停滞,肠腔内容物增多,故见腹胀、腹痛、恶心呕吐,加之数日不能进食,耗伤元气,更无力推动肠管蠕动。因此在常规运用通里攻下法如大、小承气汤^[39,40]治疗时,适量加用活血化瘀中药显得十分必要^[41]。大黄、丹参、桃仁、赤芍等不仅可改善微循环增加血流量,而且对肠黏膜屏障具有直接保护作用,可防止细菌易位、促进肠蠕动、清除氧自由基和降低细胞因子的损伤作用。另外,中药复方疗效广泛,既能促进组织修复、降低组织炎症反应和渗出,又可减少腹腔毛细血管的通透性,可以多靶点、多环节地发挥作用^[42]。

3 胃肠减压

胃肠减压是肠梗阻治疗中十分重要、有效的措施。梗阻近端肠腔内容物(消化液、气体等)的积聚,造成肠管膨胀,肠壁血供障碍、肠屏障功能受损、通透性增加,引发一系列局部和全身的病理生理变化。梗阻不缓解,肠腔内压力进一步升高,甚至导致缺血、坏死或穿孔。有效的胃肠减压可以改善病理生理过程,促进梗阻的解除,减少并发症的发生。

传统的减压管是鼻胃管,但由于幽门的作用,鼻胃管不能有效减压小肠。肠梗阻导管是经内镜或透视下引导,通过幽门置于小肠内。由于头端水囊的特殊结构,肠梗阻导管可在肠蠕动作用下到达梗阻部位的近端,更接近梗阻的部位,因此减压效果优于鼻胃管。对需中转手术的患者,有效地肠管减压和身体状况的改善,也有利于手术操作,提高安全性,减少并发症的发生,而且还可以用来进行实时的造影检查,方便医生调整治疗方案。国内对于SBO,以往常采用单

纯胃管置入行胃、近段小肠减压,禁食水、液体疗法以及应用缓泻药物等,使一部分单纯性SBO得到缓解,不缓解者则需行手术治疗。肠梗阻导管的应用改变了单纯性SBO手术率较高的现状,使大部分单纯性SBO在非手术治疗情况下得到缓解以至治愈。

文献报道^[43-45],普通胃管减压无效后,在排除绞窄性梗阻的前提下使用肠梗阻导管,在减压引流量和腹围缩小程度等方面均明显好于胃管减压,且梗阻缓解率可达100%。牛陆杰等^[44]应用肠梗阻导管治疗38例低位肠梗阻,缓解率为100%,治愈率为84%(32/38),术后梗阻治愈率为94%(32/34),治疗中无急性梗阻病例出现。金殷植等^[45]对15例常规胃管减压无效的粘连性肠梗阻患者应用肠梗阻导管进行减压,置管24-48 h后症状明显减轻,5-7 d后症状消失,并经导管行小肠造影证实肠道无明显狭窄。李德春等^[46]对36例排除绞窄的急性粘连性SBO应用经鼻肠梗阻导管治疗后,发现梗阻解除平均时间为3.6 d±3 d,解除率83.3%(30/36),中转手术6例,为肠梗阻症状减轻但未完全解除,7 d后日引流量仍>500 mL的患者。

4 手术介入的时机

急性SBO的标准治疗是迅速的外科手术介入,目的是为了减少肠绞窄的风险,从而降低死亡率。文献报道根据临床症状和简单的影像学检查即可以识别绝大多数需要外科手术干预的患者^[47,48],这些症状包括发热、白细胞升高、腹膜炎、心动过速、代谢性酸中毒,和持续性的疼痛^[49-51]。发生绞窄是急性SBO患者中转手术的主要原因,当临床上出现下列情况应考虑绞窄的可能:腹痛发作急骤且剧烈,阵发性转为持续性,存在腹膜刺激征;呕吐出现早且剧烈,肠鸣音减弱甚至消失;腹胀不对称,腹部有隆起且触痛的包块;早期出现休克症状,抗休克治疗效果不明显;白细胞计数、血清淀粉酶、血磷、碱性磷酸酶增高;呕吐物、胃肠减压液、肛门排出物为血性;腹腔内短时间出现积液或腹腔穿刺为血性液;影像检查提示有孤立、胀大突出的肠袢,不因时间而改变位置;非手术治疗(12-24 h)症状体征无明显改善或病情进展等。此时,应尽快行手术治疗。另外,老年患者因机体反应差,有些虽然已有腹膜炎存在,但体征却不明显;年幼患儿不会叙述病史,往往病情发展很快,腹部体征却不典型,经常发生误诊。因此,对于老年

■应用要点

生长抑素类药物通过全面抑制胃肠、胰腺及胆汁分泌,使消化液分泌减少,从而减少梗阻以上肠管内液体积聚,有利于肠壁血液循环的恢复,加速炎症消退,促进肠管再通,同时促进肠黏膜对消化液的吸收,可降低腹腔内压,防止部分梗阻转为完全梗阻,因此可有效应用于SBO的治疗。

■同行评价

本文可读性较好,具有一定的临床指导意义和实用价值。

和年幼患者不应过分强调典型的症状和体征,而应采取更为积极的治疗。

此外,根据梗阻病因的不同,对手术时机的选择也不尽相同。相对于嵌顿性疝引起的梗阻,粘连性肠梗阻造成肠壁缺血、坏死和穿孔的风险要低得多。对于粘连性肠梗阻,相当一部分患者(35%-75%),可经非手术方法安全地解除梗阻^[14,52],但对于保守治疗有一定效果而较长时间(>1 wk)不缓解或反复发作的粘连性肠梗阻,也主张手术治疗。腹腔疝造成的SBO占到总数的8%至25%,在另一些文献,这一比例甚至达到30%-55%^[53,54],并且是形成绞窄的主要原因。此类患者需要立即手术治疗,因为其发生肠壁缺血、坏死和穿孔的几率较高,分别可达20%, 8%,和2%^[55],绞窄发生率则从7%到42%不等^[14,56]。另外,对于完全性SBO的患者,手术介入应成为早期治疗的主要方式,研究表明,31%-43%的此类患者仅需手术松解而不需要任何形式的肠道切除即可解除梗阻^[57]。由于目前还没有任何一项指标能够成功地评价手术或非手术处理的预后,所以对于那些继发于腹壁嵌顿疝或存在绞窄症状的患者需要立即予以外科手术介入^[53],而那些粘连性肠梗阻患者,尤其是多次手术后或存在基础疾病的,往往受益于非手术措施^[52]。

5 腹腔镜手术治疗

自从Moure 1972年第一次施行腹腔镜下粘连性SBO松解术以来,这项技术已经越来越多地应用于那些没有肠壁缺血和坏死表现的粘连性肠梗阻,文献报道将近60%的粘连性SBO可应用腹腔镜松解术治疗。通过其与常规开腹手术方式比较,发现腹腔镜手术所需时间较长,但对于不同患者变化较大,如简单粘连仅需约20 min,而复杂病例则需数小时^[58,59],住院时间明显减少^[60-62],肠道运动恢复时间提前,术后并发症发生率降低,然而中转为开腹手术者则有较高的并发症发生率^[63]。虽然腹腔镜手术可以免于开腹,但其本身也是引起术后粘连和梗阻的一个原因,而且发现其引起梗阻复发的几率甚至要高于开腹手术^[58,64]。

急诊腹腔镜手术的实施必须排除那些可能存在绞窄或有多次腹部手术史的患者。实施该技术的医生首先必须要具备娴熟的外科手术技巧,因为术中随时存在开腹探查和中转常规手术的可能性,文献报道这一比率从0%至52%不等^[65],与患者的选择和术者技术相关^[66]。引起中转的原

因主要是粘连带的暴露和处理难度较大^[65],肠管膨胀后使得操作视野减小^[67],多发的粘连^[68],腹膜后等难以暴露的粘连,肠壁坏死需要切除及肠腔意外切开等。那些有多次剖腹手术史的患者在实施腹腔镜下梗阻松解术时更容易发生意外的肠腔切开^[63,69],另外,当Verres针插入时也可损伤肠腔。当上述情况发生时就必须转至开腹手术来缝合或切除再吻合损伤肠袢,以提高安全性,降低难度^[70],若术中处理不及时,则可能在术后引起腹膜炎。选择腹腔镜方式治疗粘连性肠梗阻的适应证包括腹部症状较轻,具备行术前检查条件,近端或不完全性梗阻,单一的梗阻而非多发梗阻。而肠壁的缺血坏死、肠腔扩张(>4 cm)、腹膜炎体征和严重的心、肺疾病则是腹腔镜治疗的绝对禁忌证^[61,67,71]。

6 结论

腹胀、呕吐、停止排便排气是最常见的急性SBO症状。粘连、疝、恶性肿瘤是引起SBO以及肠壁缺血、坏死、穿孔的主要原因。虽然一部分患者,特别是那些粘连性SBO的患者,能安全有效地通过非手术方式治疗,但其中大部分仍需要立即手术。另外,嵌顿疝发生绞窄的风险显著高于其他造成梗阻的病因。诊疗时要特别关注那些有肠壁缺血、坏死、穿孔征象的患者,应采取进一步措施以鉴别绞窄性梗阻从而确定适当的治疗方式。越来越多的SBO患者通过非手术方式得以缓解梗阻症状,同时赢得了宝贵的时间以进行原发病的治疗。随着诊疗技术的进步,SBO的治疗方式-包括手术与非手术治疗,将变得越来越成熟,同时也将更迅速地解除症状,从而更好地造福患者。

7 参考文献

- 1 Miller G, Boman J, Shrier I, Gordon PH. Natural history of patients with adhesive small bowel obstruction. *Br J Surg* 2000; 87: 1240-1247
- 2 Ihedioha U, Alani A, Modak P, Chong P, O'Dwyer PJ. Hernias are the most common cause of strangulation in patients presenting with small bowel obstruction. *Hernia* 2006; 10: 338-340
- 3 Perea García J, Turégano Fuentes T, Quijada García B, Trujillo A, Cereceda P, Díaz Zorita B, Pérez Díaz D, Sanz Sánchez M. Adhesive small bowel obstruction: predictive value of oral contrast administration on the need for surgery. *Rev Esp Enferm Dig* 2004; 96: 191-200
- 4 Maglinte DD, Reyes BL, Harmon BH, Kelvin FM, Turner WW Jr, Hage JE, Ng AC, Chua GT, Gage SN. Reliability and role of plain film radiography and CT in the diagnosis of small-bowel obstruction. *AJR Am J Roentgenol* 1996; 167: 1451-1455

- 5 Maglinte DD, Heitkamp DE, Howard TJ, Kelvin FM, Lappas JC. Current concepts in imaging of small bowel obstruction. *Radiol Clin North Am* 2003; 41: 263-283, vi
- 6 Lappas JC, Reyes BL, Maglinte DD. Abdominal radiography findings in small-bowel obstruction: relevance to triage for additional diagnostic imaging. *AJR Am J Roentgenol* 2001; 176: 167-174
- 7 Nicolau S, Kai B, Ho S, Su J, Ahamed K. Imaging of acute small-bowel obstruction. *AJR Am J Roentgenol* 2005; 185: 1036-1044
- 8 Thompson WM, Kilani RK, Smith BB, Thomas J, Jaffe TA, Delong DM, Paulson EK. Accuracy of abdominal radiography in acute small-bowel obstruction: does reviewer experience matter? *AJR Am J Roentgenol* 2007; 188: W233-W238
- 9 Suri S, Gupta S, Sudhakar PJ, Venkataramu NK, Sood B, Wig JD. Comparative evaluation of plain films, ultrasound and CT in the diagnosis of intestinal obstruction. *Acta Radiol* 1999; 40: 422-428
- 10 Daneshmand S, Hedley CG, Stain SC. The utility and reliability of computed tomography scan in the diagnosis of small bowel obstruction. *Am Surg* 1999; 65: 922-926
- 11 Taourel PG, Fabre JM, Pradel JA, Seneterre EJ, Megibow AJ, Bruel JM. Value of CT in the diagnosis and management of patients with suspected acute small-bowel obstruction. *AJR Am J Roentgenol* 1995; 165: 1187-1192
- 12 Obuz F, Terzi C, Sökmen S, Yilmaz E, Yildiz D, Füzün M. The efficacy of helical CT in the diagnosis of small bowel obstruction. *Eur J Radiol* 2003; 48: 299-304
- 13 Zalcman M, Sy M, Donckier V, Closset J, Gansbeke DV. Helical CT signs in the diagnosis of intestinal ischemia in small-bowel obstruction. *AJR Am J Roentgenol* 2000; 175: 1601-1607
- 14 Kuremu RT, Jumbi G. Adhesive intestinal obstruction. *East Afr Med J* 2006; 83: 333-336
- 15 Jang KM, Min K, Kim MJ, Koh SH, Jeon EY, Kim IG, Choi D. Diagnostic performance of CT in the detection of intestinal ischemia associated with small-bowel obstruction using maximal attenuation of region of interest. *AJR Am J Roentgenol* 2010; 194: 957-963
- 16 Bodily KD, Fletcher JG, Solem CA, Johnson CD, Fidler JL, Barlow JM, Bruesewitz MR, McCollough CH, Sandborn WJ, Loftus EV Jr, Harmsen WS, Crownhart BS. Crohn Disease: mural attenuation and thickness at contrast-enhanced CT Enterography--correlation with endoscopic and histologic findings of inflammation. *Radiology* 2006; 238: 505-516
- 17 Gollub MJ. Multidetector computed tomography enteroclysis of patients with small bowel obstruction: a volume-rendered "surgical perspective". *J Comput Assist Tomogr* 2005; 29: 401-407
- 18 Sandikcioglu TG, Torp-Madsen S, Pedersen IK, Raaschou K, Mygind T, Thomsen HS. Contrast radiography in small bowel obstruction. A randomized trial of barium sulfate and a nonionic low-osmolar contrast medium. *Acta Radiol* 1994; 35: 62-64
- 19 Boudiaf M, Jaff A, Soyer P, Bouhnik Y, Hamzi L, Rymer R. Small-bowel diseases: prospective evaluation of multi-detector row helical CT enteroclysis in 107 consecutive patients. *Radiology* 2004; 233: 338-344
- 20 Choi HK, Chu KW, Law WL. Therapeutic value of gastrografen in adhesive small bowel obstruction after unsuccessful conservative treatment: a prospective randomized trial. *Ann Surg* 2002; 236: 1-6
- 21 Czechowski J. Conventional radiography and ultrasonography in the diagnosis of small bowel obstruction and strangulation. *Acta Radiol* 1996; 37: 186-189
- 22 Grassi R, Romano S, D'Amario F, Giorgio Rossi A, Romano L, Pinto F, Di Mizio R. The relevance of free fluid between intestinal loops detected by sonography in the clinical assessment of small bowel obstruction in adults. *Eur J Radiol* 2004; 50: 5-14
- 23 Schmutz GR, Benko A, Fournier L, Peron JM, Morel E, Chiche L. Small bowel obstruction: role and contribution of sonography. *Eur Radiol* 1997; 7: 1054-1058
- 24 Kim JH, Ha HK, Sohn MJ, Shin BS, Lee YS, Chung SY, Kim PN, Lee MG, Auh YH. Usefulness of MR imaging for diseases of the small intestine: comparison with CT. *Korean J Radiol* 2000; 1: 43-50
- 25 Beall DP, Fortman BJ, Lawler BC, Regan F. Imaging bowel obstruction: a comparison between fast magnetic resonance imaging and helical computed tomography. *Clin Radiol* 2002; 57: 719-724
- 26 Regan F, Beall DP, Bohlman ME, Khazan R, Sufi A, Schaefer DC. Fast MR imaging and the detection of small-bowel obstruction. *AJR Am J Roentgenol* 1998; 170: 1465-1469
- 27 Ripamonti C, Fagnoni E, Magni A. Management of symptoms due to inoperable bowel obstruction. *Tumori* 2005; 91: 233-236
- 28 Ripamonti C, Mercadante S, Groff L, Zecca E, De Conno F, Casuccio A. Role of octreotide, scopolamine butylbromide, and hydration in symptom control of patients with inoperable bowel obstruction and nasogastric tubes: a prospective randomized trial. *J Pain Symptom Manage* 2000; 19: 23-34
- 29 Mercadante S, Ripamonti C, Casuccio A, Zecca E, Groff L. Comparison of octreotide and hyoscine butylbromide in controlling gastrointestinal symptoms due to malignant inoperable bowel obstruction. *Support Care Cancer* 2000; 8: 188-191
- 30 Sagar PM, MacFie J, Sedman P, May J, Mancey-Jones B, Johnstone D. Intestinal obstruction promotes gut translocation of bacteria. *Dis Colon Rectum* 1995; 38: 640-644
- 31 Ripamonti C, Twycross R, Baines M, Bozzetti F, Capri S, De Conno F, Gemlo B, Hunt TM, Krebs HB, Mercadante S, Schaefer R, Wilkinson P. Clinical-practice recommendations for the management of bowel obstruction in patients with end-stage cancer. *Support Care Cancer* 2001; 9: 223-233
- 32 Mercadante S, Sapio M, Serretta R. Treatment of pain in chronic bowel subobstruction with self-administration of methadone. *Support Care Cancer* 1997; 5: 327-329
- 33 Fainsinger RL, Spachynski K, Hanson J, Bruera E. Symptom control in terminally ill patients with malignant bowel obstruction (MBO). *J Pain Symptom Manage* 1994; 9: 12-18
- 34 Hofmann B, Håheim LL, Søreide JA. Ethics of palliative surgery in patients with cancer. *Br J Surg* 2005; 92: 802-809
- 35 Anthone GJ, Bastidas JA, Orandle MS, Yeo CJ. Direct proabsorptive effect of octreotide on ionic transport in the small intestine. *Surgery* 1990; 108: 1136-1141; discussion 1141-1142
- 36 Ripamonti C, Panzeri C, Groff L, Galeazzi G, Boffi

- R. The role of somatostatin and octreotide in bowel obstruction: pre-clinical and clinical results. *Tumori* 2001; 87: 1-9
- 37 Shimizu Y, Ohtsu A, Shirao K, Sasaki Y. Clinical efficacy and safety of octreotide (SMS201-995) in terminally ill Japanese cancer patients with malignant bowel obstruction. *Jpn J Clin Oncol* 2008; 38: 354-359
- 38 Mercadante S, Ferrera P, Villari P, Marrazzo A. Aggressive pharmacological treatment for reversing malignant bowel obstruction. *J Pain Symptom Manage* 2004; 28: 412-416
- 39 张宇, 刘晓红, 蒋敦厚, 黄艳. 复方大承气汤治疗粘连性肠梗阻54例疗效观察. *新中医* 2007; 39: 13
- 40 徐绍敏, 郑保国. 小承气汤加减治疗术后早期炎性肠梗阻114例体会. *中国现代医生* 2008; 46: 85
- 41 郭娟, 寇壬花, 闫谨, 吴成中, 崔志清. 复方丹参剂与大承气汤合用对小肠梗阻肠黏膜屏障的协同保护作用. *天津医科大学学报* 2009; 15: 180-183
- 42 嵇晓东, 潘辛, 武传慧, 赵志顺, 吴新军. 活血化瘀通腑理气法治疗粘连性小肠梗阻93例. *陕西中医* 2006; 26: 1054-1055
- 43 林琪, 洪捷敏, 何祎, 林海君. 内镜肠梗阻导管置入术在急性肠梗阻治疗中的应用. *中华消化内镜杂志* 2008; 25: 540-541
- 44 牛陆杰, 孙立波, 张斌, 金股植, 马冲, 盖宝东, 冯野, 赵吉生, 王巍, 郑泽霖. 应用肠梗阻导管治疗低位肠梗阻38例临床分析. *中华普通外科杂志* 2010; 25: 79-80
- 45 金股植, 孙立波, 宋彬. 肠梗阻导管对粘连性肠梗阻的治疗作用. *中华胃肠外科杂志* 2009; 12: 580
- 46 李德春, 李瑞红, 王守军, 张昕辉. 经鼻型肠梗阻导管在急性粘连性小肠梗阻诊治中的应用. *中华急诊医学杂志* 2010; 19: 423-425
- 47 Bogusevicius A, Maleckas A, Pundzius J, Skaidickas D. Prospective randomised trial of computer-aided diagnosis and contrast radiography in acute small bowel obstruction. *Eur J Surg* 2002; 168: 78-83
- 48 Kim JH, Ha HK, Kim JK, Eun HW, Park KB, Kim BS, Kim TK, Kim JC, Auh YH. Usefulness of known computed tomography and clinical criteria for diagnosing strangulation in small-bowel obstruction: analysis of true and false interpretation groups in computed tomography. *World J Surg* 2004; 28: 63-68
- 49 Fevang BT, Jensen D, Svanes K, Viste A. Early operation or conservative management of patients with small bowel obstruction? *Eur J Surg* 2002; 168: 475-481
- 50 Takeuchi K, Tsuzuki Y, Ando T, Sekihara M, Hara T, Yoshikawa M, Kuwano H. Clinical studies of strangulating small bowel obstruction. *Am Surg* 2004; 70: 40-44
- 51 Tsumura H, Ichikawa T, Hiyama E, Murakami Y, Sueda T. Systemic inflammatory response syndrome (SIRS) as a predictor of strangulated small bowel obstruction. *Hepatogastroenterology* 2004; 51: 1393-1396
- 52 Foster NM, McGory ML, Zingmond DS, Ko CY. Small bowel obstruction: a population-based appraisal. *J Am Coll Surg* 2006; 203: 170-176
- 53 Tamijmarane A, Chandra S, Smile SR. Clinical aspects of adhesive intestinal obstruction. *Trop Gastroenterol* 2000; 21: 141-143
- 54 Wysocki A, Krzywoń J. [Causes of intestinal obstruction]. *Przegl Lek* 2001; 58: 507-508
- 55 Kössi J, Salminen P, Laato M. The epidemiology and treatment patterns of postoperative adhesion induced intestinal obstruction in Varsinais-Suomi Hospital District. *Scand J Surg* 2004; 93: 68-72
- 56 Lawal OO, Olayinka OS, Bankole JO. Spectrum of causes of intestinal obstruction in adult Nigerian patients. *S Afr J Surg* 2005; 43: 34, 36
- 57 Nauta RJ. Advanced abdominal imaging is not required to exclude strangulation if complete small bowel obstructions undergo prompt laparotomy. *J Am Coll Surg* 2005; 200: 904-911
- 58 Franklin ME Jr, Gonzalez JJ Jr, Miter DB, Glass JL, Paulson D. Laparoscopic diagnosis and treatment of intestinal obstruction. *Surg Endosc* 2004; 18: 26-30
- 59 Franklin ME Jr, Dorman JP, Pharend D. Laparoscopic surgery in acute small bowel obstruction. *Surg Laparosc Endosc* 1994; 4: 289-296
- 60 Peschard F, Alves A, Berdah S, Kianmanesh R, Laurent C, Mabrut JY, Mariette C, Meurette G, Pirro N, Veyrie N, Slim K. [Indications of laparoscopic general and digestive surgery. Evidence based guidelines of the French society of digestive surgery]. *Ann Chir* 2006; 131: 125-148
- 61 Sauerland S, Agresta F, Bergamaschi R, Borzellino G, Budzynski A, Champault G, Fingerhut A, Isla A, Johansson M, Lunderoff P, Navez B, Saad S, Neugebauer EA. Laparoscopy for abdominal emergencies: evidence-based guidelines of the European Association for Endoscopic Surgery. *Surg Endosc* 2006; 20: 14-29
- 62 Khaikin M, Schneidereit N, Cera S, Sands D, Efron J, Weiss EG, Nogueras JJ, Vernava AM 3rd, Wexner SD. Laparoscopic vs. open surgery for acute adhesive small-bowel obstruction: patients' outcome and cost-effectiveness. *Surg Endosc* 2007; 21: 742-746
- 63 Wullstein C, Gross E. Laparoscopic compared with conventional treatment of acute adhesive small bowel obstruction. *Br J Surg* 2003; 90: 1147-1151
- 64 Levard H, Boudet MJ, Msika S, Molkhov JM, Hay JM, Laborde Y, Gillet M, Fingerhut A. Laparoscopic treatment of acute small bowel obstruction: a multicentre retrospective study. *ANZ J Surg* 2001; 71: 641-646
- 65 Farinella E, Cirocchi R, La Mura F, Morelli U, Cattorini L, Delmonaco P, Migliaccio C, De Sol AA, Cozzaglio L, Sciannameo F. Feasibility of laparoscopy for small bowel obstruction. *World J Emerg Surg* 2009; 4: 3
- 66 Slim K. [Laparoscopic treatment of small intestine obstruction]. *Chirurgie* 1999; 124: 177-181
- 67 Borzellino G, Tasselli S, Zerman G, Pedrazzani C, Manzoni G. Laparoscopic approach to postoperative adhesive obstruction. *Surg Endosc* 2004; 18: 686-690
- 68 Kirshtein B, Roy-Shapira A, Lantsberg L, Avinoach E, Mizrahi S. Laparoscopic management of acute small bowel obstruction. *Surg Endosc* 2005; 19: 464-467
- 69 Peschard F, Alves A, Berdah S, Kianmanesh R, Laurent C, Mabrut JY, Mariette C, Meurette G, Pirro N, Veyrie N, Slim K. [Indications for laparoscopy in general and gastrointestinal surgery. Evidence-based recommendations of the French Society of Digestive Surgery]. *J Chir (Paris)* 2006; 143: 15-36
- 70 Balén E, Herrera J, Miranda C, Tarifa A, Zazpe C, Lera JM. [The role of laparoscopy in emergency abdominal surgery]. *An Sist Sanit Navar* 2005; 28 Suppl 3: 81-92
- 71 Szomstein S, Lo Menzo E, Simpfendorfer C, Zundel N, Rosenthal RJ. Laparoscopic lysis of adhesions. *World J Surg* 2006; 30: 535-540

Src激酶在胃癌细胞来源的exosome促进肿瘤细胞增殖中的作用

曲晶磊, 曲秀娟, 刘云鹏, 赵明芳, 侯科佐, 姜又红, 杨向红

曲晶磊, 曲秀娟, 刘云鹏, 赵明芳, 侯科佐, 中国医科大学附属第一医院肿瘤内科 辽宁省沈阳市 110001
姜又红, 中国医科大学附属第一医院肿瘤研究所 辽宁省沈阳市 110001
杨向红, 中国医科大学附属盛京医院病理科 辽宁省沈阳市 110004
曲晶磊, 讲师, 主要从事消化系统肿瘤的基础与临床研究.
国家自然科学基金资助项目, No. 31000607
作者贡献分布: 此课题由曲晶磊、刘云鹏、姜又红及杨向红设计; 研究过程由曲晶磊、曲秀娟、赵明芳及侯科佐完成; 数据分析和论文写作由曲晶磊与刘云鹏完成.
通讯作者: 刘云鹏, 教授, 110001, 辽宁省沈阳市, 中国医科大学附属第一医院肿瘤内科. cmuliuyunpeng@yahoo.cn
电话: 024-83282312
收稿日期: 2010-11-29 修回日期: 2010-12-28
接受日期: 2011-01-06 在线出版日期: 2011-02-28

Role of tyrosine kinase Src in gastric cancer exosome-mediated promotion of tumor cell proliferation

Jing-Lei Qu, Xiu-Juan Qu, Yun-Peng Liu,
Ming-Fang Zhao, Ke-Zuo Hou, You-Hong Jiang,
Xiang-Hong Yang

Jing-Lei Qu, Xiu-Juan Qu, Yun-Peng Liu, Ming-Fang Zhao, Ke-Zuo, Department of Medical Oncology, the First Hospital of China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China
You-Hong Jiang, Institute of Cancer Research, the First Hospital of China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China
Xiang-Hong Yang, Department of Pathology, Shengjing Hospital, China Medical University, Shenyang 110004, Liaoning Province, China
Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 31000607
Correspondence to: Professor Yun-Peng Liu, Department of Medical Oncology, the First Hospital of China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China. cmuliuyunpeng@yahoo.cn
Received: 2010-11-29 Revised: 2010-12-28
Accepted: 2011-01-06 Published online: 2011-02-28

Abstract

AIM: To investigate the effect of gastric cancer exosomes on tumor cell proliferation and to evaluate the role of tyrosine kinase Src in this process.

METHODS: Exosomes were isolated and purified

from gastric cancer SGC7901 cells by serial centrifugation and sucrose gradient ultracentrifugation and observed by electron microscopy. Cell proliferation was measured by MTT assay. Protein expression was assayed by Western blot.

RESULTS: Gastric cancer exosomes had a characteristic saucer-like shape that was limited by a lipid bilayer, and their diameter ranged from 30 to 100 nm. CD9 and TSG101 were abundant on the surface of exosomes. Gastric cancer exosomes significantly increased SGC7901 cell proliferation in a time- and dose-dependent manner. Compared with control cells, the proliferation of cells treated with 200 and 400 mg/L exosomes for 72 h were increased to 138% and 144%, respectively (both $P < 0.01$). The expression of phosphorylated Src in SGC7901 cells was up-regulated in a time- and dose-dependent manner after treatment with exosomes.

CONCLUSION: Gastric cancer exosomes promote tumor cell proliferation possibly by activating tyrosine kinase Src.

Key Words: Exosomes; Src; Proliferation; Gastric cancer

Qu JL, Qu XJ, Liu YP, Zhao MF, Hou KZ, Jiang YH, Yang XH. Role of tyrosine kinase Src in gastric cancer exosome-mediated promotion of tumor cell proliferation. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(6): 557-561

摘要

目的: 研究胃癌细胞来源的外泌体(exosome)对肿瘤细胞增殖的影响, 初步探讨Src蛋白激酶在此过程中的作用.

方法: 采用离心超滤和蔗糖密度梯度超速离心的方法从胃癌SGC7901细胞的上清液中分离出胃癌细胞来源的exosome. 透射电子显微镜下观察exosome形态, MTT法检测细胞增殖能力, Western blot检测蛋白的表达.

结果: 透射电子显微镜下观察胃癌SGC7901细

■背景资料

目前研究发现, 肿瘤细胞能释放大量的外泌体(exosome), 作为细胞功能的使者, 参与多种病理生理过程. exosome是由细胞分泌至胞外的膜性小囊泡, 起源于内吞途径中的多泡体, 通过多泡体与质膜融合释放至细胞外. exosome含有大量与其来源和功能密切相关的蛋白质和脂质成分.

■同行评议者

刘连新, 教授, 哈尔滨医科大学第一临床医学院普通外科三病房

■相关报道

Skog等报道原代培养的恶性胶质瘤细胞释放的exosome能促进人胶质瘤细胞系的增殖。

胞来源的exosome具有特征性的盘状结构,由双层膜构成,他们的直径30-100 nm. Western blot结果显示exosome表面富含CD9和TSG101分子. MTT结果显示exosome能以时间和剂量依赖性的方式促进SGC7901细胞的增殖,200 mg/L和400 mg/L的exosome处理SGC7901细胞72 h,细胞的增殖比率分别是对照组的138%($P<0.001$)和144%($P<0.001$),在此过程中伴随有p-Src表达的上调。

结论: 胃癌细胞来源的exosome能促进肿瘤细胞的增殖,其机制可能与激活Src蛋白激酶有关。

关键词: 外泌体; Src; 增殖; 胃癌

曲磊磊, 曲秀娟, 刘云鹏, 赵明芳, 侯科佐, 姜又红, 杨向红. Src激酶在胃癌细胞来源的exosome促进肿瘤细胞增殖中的作用. 世界华人消化杂志 2011; 19(6): 557-561

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/557.asp>

0 引言

我国是世界上胃癌发病最高的国家之一,每年新发病例近40万,约占全世界的42%,并且多数患者在诊断时已属晚期^[1,2]。尽管手术和放化疗在一定水平改善了患者的生存,但5年生存率仍低于15%^[3],其预后不良的重要原因是肿瘤复发和转移。因此深入探讨胃癌细胞自我调控的增殖机制,对提高胃癌疗效具有重要意义。目前研究发现,肿瘤细胞能释放大量的外泌体(exosome),作为细胞功能的使者,参与多种病理生理过程^[4-6]。exosome是由细胞分泌至胞外的膜性小囊泡,起源于内吞途径中的多泡体,通过多泡体与质膜融合释放至细胞外^[7]。exosome含有大量与其来源和功能密切相关的蛋白质和脂质成分^[8,9]。由于exosome的膜性结构能阻止血清中的蛋白酶对其携带的蛋白分子的降解,所以exosome可作为体内细胞之间信息传递的重要载体,可通过自分泌或旁分泌的方式作用于自身或远隔的靶细胞并调节其功能^[10,11]。我们之前的研究发现肿瘤来源的exosome能通过激活PI3K/Akt和MAPK/ERK信号转导通路促进肿瘤细胞的增殖^[12,13],但Src蛋白激酶在此过程中的作用不清楚。本研究分离纯化了胃癌SGC7901细胞来源的exosome,评价了Src蛋白激酶在胃癌细胞来源的exosome促进胃癌细胞增殖中的作用,为进一步理解胃癌的恶性增殖机制提供了理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料 RPMI 1640培养基购自Gibco公司,胎

牛血清购自天津血液病研究所。100 000 Da MWCO Amicon超滤管购自美国Millipore公司,重水购自美国Sigma公司。鼠抗人CD9抗体和TSG101抗体购自Santa Cruz公司,鼠抗人Src和p-Src抗体购自Cell Signaling公司。辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠二抗购自北京中杉金桥生物技术有限公司, ECL试剂盒购自PIERCE公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养: 人低分化胃腺癌细胞株SGC7901细胞为本实验室常规传代培养,生长于含有100 mL/L灭活胎牛血清、12 kU/L庆大霉素的RPMI 1640培养液中,于37℃、50 mL/L CO₂、饱和湿度的培养箱内培养,2.5 g/L胰酶消化液消化传代,2-3 d传代1次。所有实验均采用对数生长期细胞。血清来源的exosome的去除采用两步法分离,即10 000 g×30 min, 100 000 g×1 h。

1.2.2 exosome的制备: 胃癌SGC7901细胞培养48 h后收集细胞上清液用于exosome的制备。首先,收集的上清液通过一系列离心去除细胞及碎片: 4℃, 300 g×10 min、1 200 g×30 min、10 000 g×30 min。然后将上清液移入100 000 Da MWCO Amicon 50 mL超滤离心管中,4℃离心,1 000 g×30 min,取浓缩液。将超滤后液体移至含有30%蔗糖/重水垫的15 mL超速离心管中,4℃100 000 g超速离心1 h。收集底部含有exosome的缓冲垫,用至少5倍体积的PBS稀释后,置于100 000 Da MWCO Amicon超滤离心管中,4℃1 000 g离心30 min,重复3次。得到的浓缩液即为exosome,0.22 μm滤膜过滤除菌, Bardford法检测蛋白浓度,分装备用,-80℃保存。

1.2.3 电镜: 将exosome超速离心成沉淀后,经固定液(2%多聚甲醛,0.25%戊二醛)4℃固定1 h, PBS洗涤3次(15 min/次),1%锇酸固定1.5 h, PBS洗涤3次(15 min/次),梯度酒精脱水,环氧树脂浸透过夜、包埋,于35℃、45℃、60℃聚合24 h,经超薄切片、铅铀染色后透射电镜下观察摄片。

1.2.4 MTT法检测细胞活力: 取对数生长期的SGC7901细胞,常规胰酶消化制成单细胞悬液,将细胞浓度调至 2.5×10^7 /L接种于96孔板,每孔180 μL,培养12 h后分别加入终浓度为50、100、200和400 mg/L的exosome。设置空白、正常对照组(空白组除不加细胞外,正常对照组除不加exosome外,其余均与exosome实验组同样处理),每组设4个复孔,每孔终体积为200 μL。分别培养48和72 h后每孔加入MTT溶液(5 g/L)20 μL,继续孵育4 h后吸弃上清,每孔加入200 μL

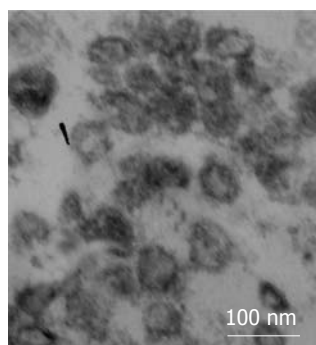


图1 胃癌SGC7901细胞来源的exosomes的电镜下形态。

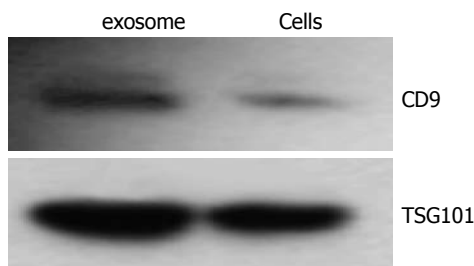


图2 Western blot检测exosome蛋白表达。

DMSO, 振荡摇匀。用酶标仪于570 nm波长条件下测定吸光度(A)值。按下列公式计算细胞增殖率: 增殖率(%) = (处理组平均A值-空白组平均A值)/(正常对照组平均A值-空白组平均A值) × 100%。

1.2.5 Western blot检测蛋白表达: 分别收集对照组及处理组细胞, 将其裂解于200 μL含有蛋白酶抑制剂(100 mg/L PMSF, 2 mg/L Aprotinin)的裂解液中[1% Triton X-100, 50 mmol/L Tris-HCl(pH 7.4), 150 mmol/L NaCl, 10 mmol/L EDTA, 100 mmol/L NaF, 1 mmol/L Na₃VO₄], 4 °C裂解40 min, 15 000 r/min离心20 min, 取上清, 用Bardford法进行蛋白定量。与3×样品缓冲液混合后, 煮沸5 min。将样品在10%的SDS-聚丙烯酰胺胶中进行电泳3 h, 然后转印至硝酸纤维素膜上。用5%脱脂牛奶封闭1 h后, 分别加入一抗, 4 °C过夜。TTBS洗4次后加入辣根过氧化物酶标记的二抗, 室温作用30 min, ECL法显色, GIS凝胶图像分析系统照相并分析处理。

统计学处理 所有数据均为3次独立实验结果, 以mean ± SD表示。采用SPSS13.0统计软件进行统计学分析。两组之间比较采用t检验, $P < 0.05$ 有统计学意义。

2 结果

2.1 exosome的形态观察 透射电子显微镜下观察exosome具有特征性的盘状结构, 由双层膜构成, 他们的直径为30-100 nm(图1)。

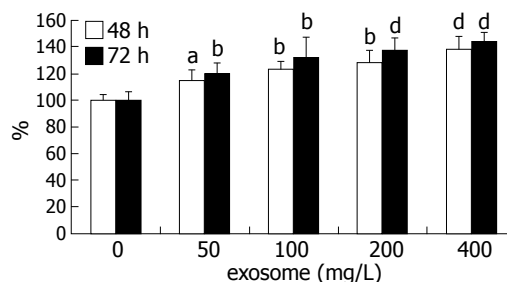


图3 SGC7901细胞来源的exosome促进SGC7901细胞增殖。
^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$, ^d $P < 0.001$ vs 正常对照组。

■应用要点
胃癌细胞来源的exosome能促进肿瘤细胞的增殖, 其机制可能与激活Src蛋白激酶有关。

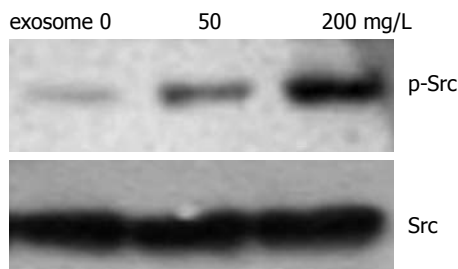


图4 不同浓度的exosome作用于SGC7901细胞72 h后对Src活性的影响。

2.2 exosomes的蛋白成分分析 Western blot结果显示与等量的SGC7901细胞裂解物相比, exosome表面富含四次跨膜分子CD9和多泡体标志物TSG101分子(图2)。

2.3 SGC7901细胞来源的exosome对SGC7901细胞增殖的影响 MTT结果显示exosome以时间和剂量依赖性的方式促进SGC7901细胞增殖, 200 mg/L和400 mg/L的exosome处理SGC7901细胞72 h, 细胞的增殖比率分别是正常对照组的138%($P < 0.001$)和144%($P < 0.001$, 图3)。

2.4 肿瘤来源的exosome对Src蛋白激酶活性的影响 Western blot结果显示, exosome以剂量依赖性的方式上调p-Src的表达(图4)。进一步的实验发现200 mg/L的exosome处理细胞不同时间后, p-Src的表达成时间依赖性的上调(图5)。

3 讨论

肿瘤能在人体内发生并长期生存, 一方面是肿瘤细胞获得了一定水平的自主性生长信号, 使其不受体内生长调节系统的控制而持续增殖^[14]; 另一方面是由于肿瘤细胞在生长过程中形成了多重免疫逃逸机制, 使机体的免疫系统无法对肿瘤细胞进行识别和杀伤^[15]。目前越来越多的证据表明肿瘤来源的exosome在肿瘤细胞的恶性增殖和免疫逃逸等方面发挥着重要的作用^[16-18]。Skog等^[19]报道原代培养的恶性胶质瘤细胞释放

■同行评价

本文选题合理, 结果可靠, 具有较好的科学性和创新性。

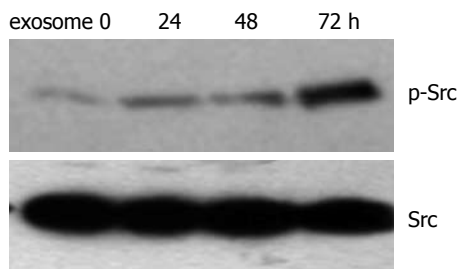


图5 200 mg/L的exosome作用于SGC7901细胞不同时间对Src活性的影响。

的exosome能促进人胶质瘤细胞系的增殖。Koga等^[20]报道人乳腺癌BT-474细胞分泌的exosome和BT-474细胞共同培养时, exosome能附着在细胞表面并能促进BT-474细胞的增殖。也有体内研究证实小鼠乳腺癌细胞来源的exosome能通过抑制NK细胞的功能而促进肿瘤的生长^[21]。

基于上述研究结果, 我们以胃癌SGC7901细胞为模型, 采用离心超滤和蔗糖密度梯度离心的方法分离中肿瘤细胞来源的exosome, 并从形态学和分子表达两方面进行了鉴定。Exosome携带的蛋白质根据其分布大致分为两大类^[22,23], 一类是普通蛋白质(如四次跨膜蛋白家族成员), 在所有的exosome上都有分布; 一类是细胞特异性蛋白质, 只存在于特定细胞来源的exosome。本研究显示SGC7901细胞来源的exosome表面富含四次跨膜蛋白CD9和多泡体标志TSG101分子, 这些蛋白质的表达可能与exosome的生物起源有关, 进一步证实了SGC7901细胞培养液经离心超滤和蔗糖密度梯度离心得到的微囊小体即为exosome。进一步的研究发现SGC7901来源的exosome能以时间和剂量依赖性的方式促进SGC7901细胞的增殖。国外最新研究显示^[24], 表达EGFRvIII的神经胶质瘤细胞能通过分泌的exosome把自身携带的EGFRvIII转运给不表达EGFRvIII的胶质瘤细胞并促进其恶性增殖。这些结果提示exosome可能是肿瘤细胞之间传递恶性增殖信号的重要载体。

本研究发现SGC7901来源的exosome在促进胃癌细胞增殖过程中存在Src激酶的持续活化。Src基因是第1个被发现的有内在酪氨酸激酶活性的人类癌基因^[25]。在人类许多肿瘤中, 如胃癌、结肠癌、乳腺癌和胰腺癌都存在Src蛋白的过度表达和活化^[26-29]。于虹等^[30]报道胃癌SGC7901细胞中Src激酶处于高活性状态, 抑制Src激酶的活性能抑制SGC7901细胞的增殖、迁移、基质侵袭和体外诱导血管形成的能力。研

究提示Src激酶可能在胃癌细胞的恶性增殖和转移过程中起到促进作用。但目前尚没有肿瘤来源的exosome对Src活性的影响的报道。本研究首次报道了肿瘤来源的exosome在促进肿瘤细胞增殖过程中激活了Src蛋白激酶, 提示Src激酶的活化可能是exosome促进肿瘤细胞增殖的机制之一。

尽管肿瘤细胞来源的exosome的生理作用还不十分清楚, 但可以肯定的是exosomes在体内细胞之间的信息传递方面发挥着重要的作用。本研究结果显示胃癌细胞来源的exosome体外能促进肿瘤细胞的增殖, 其机制可能与Src激酶的活化有关。进一步研究胃癌细胞来源的exosome促进肿瘤细胞增殖的机制, 对深入理解胃癌的生物学行为和寻找治疗胃癌的新的靶分子具有重要的科学意义和实际价值。

4 参考文献

- 1 龚继芳, 沈琳. 老年胃癌药物治疗对策. 世界华人消化杂志 2008; 16: 2443-2447
- 2 吴春晓, 郑莹, 鲍萍萍, 顾凯, 王春芳, 向泳梅, 彭鹏, 邱永莉, 龚杨明, 卢伟. 上海市胃癌发病流行现状与时间趋势分析. 外科理论与实践 2008; 13: 24-29
- 3 Cunningham D, Starling N, Rao S, Iveson T, Nicolson M, Coxon F, Middleton G, Daniel F, Oates J, Norman AR. Capecitabine and oxaliplatin for advanced esophagogastric cancer. *N Engl J Med* 2008; 358: 36-46
- 4 Nazarenko I, Rana S, Baumann A, McAlear J, Hellwig A, Trendelenburg M, Lochnit G, Preissner KT, Zöller M. Cell surface tetraspanin Tspan8 contributes to molecular pathways of exosome-induced endothelial cell activation. *Cancer Res* 2010; 70: 1668-1678
- 5 Ashiru O, Boutet P, Fernández-Messina L, Agüera-González S, Skepper JN, Valés-Gómez M, Reyburn HT. Natural killer cell cytotoxicity is suppressed by exposure to the human NKG2D ligand MICA*008 that is shed by tumor cells in exosomes. *Cancer Res* 2010; 70: 481-489
- 6 曲磊磊, 赵明芳, 曲秀娟, 侯科佐, 姜义红, 杨向红, 刘云鹏. MAPK/ERK信号通路在胃癌细胞来源的外来体诱导Jurkat T细胞凋亡中的作用. 世界华人消化杂志 2010; 18: 1969-1973
- 7 Lykke-Andersen S, Brodersen DE, Jensen TH. Origins and activities of the eukaryotic exosome. *J Cell Sci* 2009; 122: 1487-1494
- 8 Théry C, Zitvogel L, Amigorena S. Exosomes: composition, biogenesis and function. *Nat Rev Immunol* 2002; 2: 569-579
- 9 Simpson RJ, Lim JW, Moritz RL, Mathivanan S. Exosomes: proteomic insights and diagnostic potential. *Expert Rev Proteomics* 2009; 6: 267-283
- 10 Eldh M, Ekström K, Valadi H, Sjöstrand M, Olsson B, Jernås M, Lötvall J. Exosomes communicate protective messages during oxidative stress; possible role of exosomal shuttle RNA. *PLoS One* 2010; 5: e15353
- 11 Meckes DG Jr, Shair KH, Marquitz AR, Kung CP, Edwards RH, Raab-Traub N. Human tumor virus utilizes exosomes for intercellular communication.

- Proc Natl Acad Sci U S A* 2010; 107: 20370-20375
- 12 曲磊磊, 曲秀娟, 赵明芳, 侯科佐, 姜又红, 杨向红, 刘云鹏. 胃癌细胞来源的exosomes对肿瘤细胞增殖的影响. *现代肿瘤医学* 2010; 18: 2315-2318
 - 13 Qu JL, Qu XJ, Zhao MF, Teng YE, Zhang Y, Hou KZ, Jiang YH, Yang XH, Liu YP. Gastric cancer exosomes promote tumour cell proliferation through PI3K/Akt and MAPK/ERK activation. *Dig Liver Dis* 2009; 41: 875-880
 - 14 Taby R, Issa JP. Cancer epigenetics. *CA Cancer J Clin* 2010; 60: 376-392
 - 15 Han W, Pan H, Jiang L, Wei K, Zou D, Zhang Z. A novel approach to rescue immune escape in oral squamous cell carcinoma: Combined use of interferon- γ and LY294002. *Oncol Rep* 2011; 25: 181-187
 - 16 Hendrix A, Westbroek W, Bracke M, De Wever O. An ex(o) citing machinery for invasive tumor growth. *Cancer Res* 2010; 70: 9533-9537
 - 17 Hong BS, Cho JH, Kim H, Choi EJ, Rho S, Kim J, Kim JH, Choi DS, Kim YK, Hwang D, Gho YS. Colorectal cancer cell-derived microvesicles are enriched in cell cycle-related mRNAs that promote proliferation of endothelial cells. *BMC Genomics* 2009; 10: 556
 - 18 Valenti R, Huber V, Iero M, Filipazzi P, Parmiani G, Rivoltini L. Tumor-released microvesicles as vehicles of immunosuppression. *Cancer Res* 2007; 67: 2912-2915
 - 19 Skog J, Würdinger T, van Rijn S, Meijer DH, Gainche L, Sena-Esteves M, Curry WT Jr, Carter BS, Krichevsky AM, Breakefield XO. Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers. *Nat Cell Biol* 2008; 10: 1470-1476
 - 20 Koga K, Matsumoto K, Akiyoshi T, Kubo M, Yamanaka N, Tasaki A, Nakashima H, Nakamura M, Kuroki S, Tanaka M, Katano M. Purification, characterization and biological significance of tumor-derived exosomes. *Anticancer Res* 2005; 25: 3703-3707
 - 21 Liu C, Yu S, Zinn K, Wang J, Zhang L, Jia Y, Kappes JC, Barnes S, Kimberly RP, Grizzle WE, Zhang HG. Murine mammary carcinoma exosomes promote tumor growth by suppression of NK cell function. *J Immunol* 2006; 176: 1375-1385
 - 22 赵丽华, 范华骅. Exosome及其在免疫耐受方面的作用. *生命科学* 2007; 19: 174-178
 - 23 Graner MW, Alzate O, Dechkovskaia AM, Keene JD, Sampson JH, Mitchell DA, Bigner DD. Proteomic and immunologic analyses of brain tumor exosomes. *FASEB J* 2009; 23: 1541-1557
 - 24 Al-Nedawi K, Meehan B, Micallef J, Lhotak V, May L, Guha A, Rak J. Intercellular transfer of the oncogenic receptor EGFRvIII by microvesicles derived from tumour cells. *Nat Cell Biol* 2008; 10: 619-624
 - 25 Aleshin A, Finn RS. SRC: a century of science brought to the clinic. *Neoplasia* 2010; 12: 599-607
 - 26 Okamoto W, Okamoto I, Yoshida T, Okamoto K, Takezawa K, Hatashita E, Yamada Y, Kuwata K, Arao T, Yanagihara K, Fukuoka M, Nishio K, Nakagawa K. Identification of c-Src as a potential therapeutic target for gastric cancer and of MET activation as a cause of resistance to c-Src inhibition. *Mol Cancer Ther* 2010; 9: 1188-1197
 - 27 Sirvent A, Bénistant C, Pannequin J, Veracini L, Simon V, Bourgaux JF, Hollande F, Cruzalegui F, Roche S. Src family tyrosine kinases-driven colon cancer cell invasion is induced by Csk membrane delocalization. *Oncogene* 2010; 29: 1303-1315
 - 28 Mayer EL, Krop IE. Advances in targeting SRC in the treatment of breast cancer and other solid malignancies. *Clin Cancer Res* 2010; 16: 3526-3532
 - 29 Ischenko I, Guba M, Yezhelyev M, Papyan A, Schmid G, Green T, Fennell M, Jauch KW, Bruns CJ. Effect of Src kinase inhibition on metastasis and tumor angiogenesis in human pancreatic cancer. *Angiogenesis* 2007; 10: 167-182
 - 30 于虹, 怀娜, 马秀梅. Src激酶抑制剂PP2对人胃癌细胞生物学行为的影响. *肿瘤* 2010; 30: 822-826

编辑 曹丽鸥 电编 何基才

ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) CN 14-1260/R 2011年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

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

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

5-HT在亮菌防治顺铂化疗诱发胃肌电变化中的调控作用

杜静, 李平, 汪克明, 蔡荣林, 张梅, 孙鑫

■背景资料

亮菌(*Armillariella tabescens*)是我国最初发现并拥有自主知识产权的一种真菌, 不仅具有提取简单方便、价格便宜及不良反应小的优点, 且能提高肿瘤患者机体免疫力、改善化疗患者的胃肠道不良反应。

杜静, 李平, 张梅, 孙鑫, 安徽医科大学附属省立医院中医科安徽省合肥市 230001

汪克明, 蔡荣林, 安徽中医学院经脉脏腑相关研究中心 安徽省合肥市 230038

杜静, 在读硕士, 主要从事中西医结合治疗肿瘤研究。

国家中医药管理局中医肿瘤病学重点学科基金资助项目, No. 国中医药发(2009)30

作者贡献分布: 杜静与李平对此文所作贡献两均等; 此课题由杜静、李平、汪克明及张梅设计; 研究过程由杜静、汪克明、蔡荣林及孙鑫操作完成; 研究所用新试剂及分析工具由李平提供; 数据分析由杜静、李平及汪克明完成; 本论文写作由杜静、李平及汪克明完成。

通讯作者: 李平, 教授, 主任医师, 230001, 安徽省合肥市, 安徽医科大学附属省立医院中医科。liping64@sina.com

电话: 0551-5161169-8188

收稿日期: 2010-11-11 修回日期: 2011-01-06

接受日期: 2011-01-11 在线出版日期: 2011-02-28

Involvement of 5-hydroxytryptamine in the preventive effect of *Armillariella tabescens* against cisplatin-induced changes in gastric electromyographic activity in rats

Jing Du, Ping Li, Ke-Ming Wang, Rong-Lin Cai, Mei Zhang, Xin Sun

Jing Du, Ping Li, Mei Zhang, Xin Sun, Department of Chinese Medicine, Anhui Provincial Hospital, Anhui Medical University, Hefei 230001, Anhui Province, China.

Ke-Ming Wang, Rong-Lin Cai, Research Center on Correlation Between Channels and Viscera, Anhui University of Traditional Chinese Medicine, Hefei 230038, Anhui Province, China

Supported by: the Foundation for National Key Discipline of Chinese Medical Oncology of State Administration of Traditional Chinese Medicine, No. Guo Zhong Yi Yao Fa (2009)30

Correspondence to: Professor Ping Li, Department of Chinese Medicine, Anhui Provincial Hospital, Anhui Medical University, Hefei 230001, Anhui Province, China. liping64@sina.com

Received: 2010-11-11 Revised: 2011-01-06

Accepted: 2011-01-11 Published online: 2011-02-28

Abstract

AIM: To investigate the preventive effect of *Armillariella tabescens* against cisplatin-induced changes in gastric electromyographic activity in rats and to explore the role of 5-hydroxytryptamine (5-HT) in this process.

METHODS: Ninety male Sprague-Dawley rats were randomized into control group, model group, ondansetron group, low-, medium-, and high-dose *Armillariella tabescens* groups. Rats were injected intraperitoneally with cisplatin (6 mg/kg) to induce pica. The electrical activity of gastric antral smooth muscle was recorded and analyzed using the Biopac MP100-CE acquisition system. The concentration of 5-HT in gastric antrum tissue was assayed by ELISA. The effect of *Armillariella tabescens* on gastric electromyographic activity and its relationship with 5-HT were then examined.

RESULTS: During 24-72 h after cisplatin administration, the cycles per minute (CPM) and amplitude of vibration (AV) of slow-wave in the gastric antrum were significantly higher in the model group than in the control group (all $P < 0.05$), medium-, and high-dose *Armillariella tabescens* groups (all $P < 0.01$), and the differences were most significant between the model group (CPM: 7.33 ± 2.92 , AV: 249.75 ± 79.09) and the control group (CPM: 3.00 ± 1.55 , AV: 148.04 ± 63.51) and high-dose *Armillariella tabescens* group (CPM: 4.13 ± 1.14 , AV: 163.46 ± 26.14) at 24 h after cisplatin administration. Compared with the control group, the concentrations of 5-HT ($\mu\text{g/L}$) in the other groups were dramatically increased (24 h: 389.7 ± 25.5 , 354.5 ± 34.9 , 314.5 ± 31.5 , 282.2 ± 19.6 , 271.0 ± 21.1 vs 244.6 ± 27.3 , all $P < 0.05$ or 0.01). CMP and AV increased with the increase in the concentrations of 5-HT.

CONCLUSION: *Armillariella tabescens* could effectively inhibit cisplatin-induced changes in gastric electromyographic activity in rats possibly via mechanisms involving 5-HT.

Key Words: *Armillariella tabescens*; Electrogastrogram; 5-Hydroxytryptamine; Chemotherapy; Vomiting

Du J, Li P, Wang KM, Cai RL, Zhang M, Sun X. Involvement of 5-hydroxytryptamine in the preventive effect of *Armillariella tabescens* against cisplatin-induced changes in gastric electromyographic activity in rats. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(6): 562-567

■同行评议者

任超世, 研究员, 中国医学科学院生物医学工程研究所

摘要

目的:探讨外源性亮菌抗顺铂(DDP)化疗过程中并发胃平滑肌电活动改变及5-羟色胺(5-HT)在此过程中的调控作用。

方法:90只♂SD大鼠随机分为6组:空白对照组、模型组、亮菌低、中、高剂量组及昂丹司琼组,参照De Jonghe法以6 mg/kg体质量腹腔注射DDP制造化疗性大鼠异食癖恶心呕吐模型,采用Biopac专用胃肠电记录分析系统检测胃窦部平滑肌电活动,运用ELISA方法检测大鼠胃窦5-HT含量,观察亮菌对DDP复制模型后不同时间段的胃电活动的影响及其与5-HT的关系。

结果:造模后24-72 h,模型组大鼠胃窦慢波每分钟频率(CPM)与平均振幅(AV)均显著高于空白对照组($P<0.05$)与亮菌中、高剂量组($P<0.01$),以造模后24 h模型组(CPM: 7.33 ± 2.92 , AV: 249.75 ± 79.09)与空白对照组(CPM: 3.00 ± 1.55 , AV: 148.04 ± 63.51)、亮菌高剂量(CPM: 4.13 ± 1.14 , AV: 163.46 ± 26.14)的差异最明显。与空白对照组相比较,其他各组大鼠胃窦组织5-HT含量($\mu\text{g/L}$)均明显升高(24 h: 389.7 ± 25.5 , 354.5 ± 34.9 , 314.5 ± 31.5 , 282.2 ± 19.6 , 271.0 ± 21.1 vs 244.6 ± 27.3 , $P<0.05$ 或 0.01)。胃窦CMP及AV总体趋势随着5-HT含量增加而上升,尤以造模后24 h趋势最为明显。

结论:亮菌可有效抑制DDP化疗所诱发的胃节律性运动紊乱,其对化疗过程中诱发的胃节律性运动紊乱的抑制作用机制可能与5-HT的调控作用有关。

关键词:亮菌;胃电图;5-羟色胺;化学治疗;呕吐

杜静,李平,汪克明,蔡荣林,张梅,孙鑫. 5-HT在亮菌防治顺铂化疗诱发胃机电变化中的调控作用. 世界华人消化杂志 2011; 19(6): 562-567
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/562.asp>

0 引言

化疗诱发恶心呕吐等胃肠道反应是胃肠节律性运动紊乱的反映^[1-3]。近20年的研究显示,5-羟色胺(5-hydroxytryptamine, 5-HT)受体拮抗剂不但在化疗药所致的恶心呕吐等胃肠道反应中扮演关键的抗呕吐作用^[4-6],且5-HT受体在胃起搏过程中对胃慢波活动起着一定的调控作用^[7-9]。本研究通过腹腔注射顺铂的方法制造化疗性大鼠异食癖恶心呕吐模型,探讨亮菌通过改变胃肌电活动而防治顺铂化疗所诱发的恶心呕吐等胃

肠道反应的机制,初步了解5-HT在亮菌防治顺铂化疗诱发胃机电变化中的调控作用。

1 材料和方法

1.1 材料 健康♂SD大鼠,体质量200-250 g(安徽医科大学实验动物中心)。实验前适应性喂养1 wk,饲养期间,保持实验室清洁安静,采光及通风良好,室温在20℃左右,饲以普通颗粒饲料(安徽医科大学实验动物中心),自由饮水。亮菌口服液(安徽立方药业,批号H34020002);顺铂(南京制药厂,批号H20030675);大鼠5-HT ELISA试剂盒(上海朗顿生物技术有限公司,批号BPE10493R);昂丹司琼(江苏奥赛康药业有限公司,批号H20060195);高岭土(金岩高岭土开发有限责任公司);甲酸、丙酮、庚烷、氯仿(安徽医科大学设备科)。

1.2 方法

1.2.1 分组:健康♂SD大鼠90只,随机分为6组:第1组空白对照组,第2组模型组,第3组亮菌口服液低剂量组,第4组亮菌口服液中剂量组,第5组亮菌口服液高剂量组,第6组昂丹司琼组,每组24、48及72 h各5只。

1.2.2 造模:实验前第3天,放置50 g高岭土于另一个标准食物槽内。实验第1天下午20:00,第3、4、5组分别按成人每千克体质量用量的3倍、7倍和14倍给予亮菌口服液3、7和14 mL/kg灌胃,第6组每隔12 h给予昂丹司琼2 mg/kg腹腔注射^[10],第2组以生理盐水灌胃。如上法处理4 d。参照De Jonghe等^[11]法腹腔注射顺铂制造化疗性大鼠异食癖恶心呕吐模型,于实验第2天,对第2、3、4、5、6组分别按6 mg/kg体质量腹腔注射顺铂。第1组均不给试剂。

1.2.3 观测指标:(1)高岭土:SD大鼠单笼饲养,每日下午19:00记录大鼠高岭土摄入量(撒落的高岭土碎屑收集干燥后称重,精确到0.01 g);(2)胃电图:大鼠禁食12 h后,按70 mL/L的水合氯醛5 mL/kg体质量腹腔注射麻醉后,仰卧位固定,腹正中线切口开腹,暴露全胃,于胃窦部浆膜下埋植单极Φ0.2 mm铂金丝圆环电极(部分埋植1对电极)。胃肌电活动记录及分析采用Biopac生物信号采集系统(MP100-CE, Santa Barbara, CA, USA)。放大器参数:LF 0.005 Hz, HF 0.5 Hz。连续描记60 min;(3)5-HT:胃肌电图描记结束后,将大鼠颈椎脱臼处死。取距幽门1 cm内胃窦部全层组织0.5 g,均置-80℃冰箱中待测。取胃窦组织0.1 g并加入2 mL甲酸/丙酮(V/V: 15/85)匀浆^[12]。

■研究前沿

有关胃电快波、慢波与胃平滑肌收缩运动的同步性为学术界关注的主要问题之一,一般认为快波较慢波能更好地反映胃平滑肌收缩运动情况,但目前实验中常采用的单通道记录胃平滑肌快慢波电活动,易引起快波电位的严重失真,因此如何有效的采用分离双通道法同步记录胃电快波、慢波与胃平滑肌收缩运动亟待进一步研究。

■相关报道

余跃等研究显示, 5-HT₄受体拮抗剂GR113808能引起胃电紊乱, 而胃起搏以较小的刺激能量就能纠正之, 提示胃起搏可能是通过5-HT₄受体的介导而对胃慢波进行调控的。

表 1 各组大鼠胃窦组织5-HT含量的比较 (mean ± SD, μg/L)

分组	24 h	48 h	72 h
空白对照组	244.6 ± 27.3	244.6 ± 27.3	244.6 ± 27.3
模型组	389.7 ± 25.5 ^b	353.1 ± 24.5 ^b	323.2 ± 28.9 ^b
亮菌低剂量组	354.5 ± 34.9 ^b	341.5 ± 20.2 ^b	303.0 ± 22.6 ^b
亮菌中剂量组	314.5 ± 31.5 ^{bd}	325.4 ± 28.6 ^b	293.7 ± 32.0 ^b
亮菌高剂量组	282.2 ± 19.6 ^{bd}	302.2 ± 34.5 ^{bd}	283.6 ± 33.8 ^{bc}
昂丹司琼组	271.0 ± 21.1 ^{ad}	282.2 ± 20.6 ^{bd}	266.5 ± 18.8 ^{bd}

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs 空白对照组; ^c $P < 0.05$, ^d $P < 0.01$ vs 模型组。

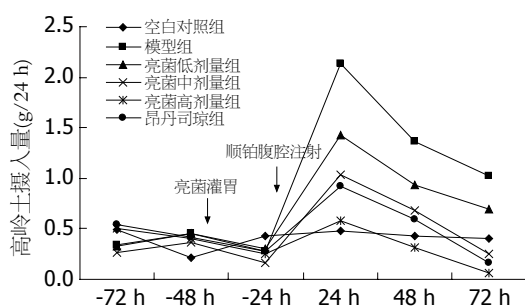


图 1 亮菌对大鼠高岭土摄入量的影响。

用甲酸/丙酮对沉淀物进行离心和萃取后, 混合的上清用庚烷/氯仿(V/V: 8/1, 其中每1 mL的甲酸/丙酮加3 mL庚烷/氯仿)振荡清洗10 min. 离心10 min后(500 g)将有机相和脂质相被抽吸弃除, 并将水相在37 °C环境下干燥. 样品用ELISA洗涤液进行重建. 最后按说明书用ELISA法测定分析5-HT含量. 采用酶联免疫分析仪(Model550, Biorad, USA)在 $\lambda = 450$ nm处测读A值。

统计学处理 采用SPSS13.0统计软件进行分析. 各项指标均以mean ± SD表示, 多组间比较方差齐用LSD检验, 方差不齐用Dunnett's C检验。

2 结果

2.1 不同剂量亮菌对大鼠高岭土摄入量的影响 造模前72 h高岭土摄入量各组间差异均无统计学意义($P > 0.05$); 造模后24 h, 模型组大鼠高岭土摄入量显著上升, 与空白对照组比较差异具有统计学意义(2.13 ± 0.96 vs 0.48 ± 0.10 , $P < 0.01$), 造模后48-72 h模型组大鼠高岭土摄入量逐渐下降, 但均显著高于空白对照组($P < 0.05$); 造模后24-72 h, 亮菌高、中剂量组及昂丹司琼组大鼠高岭土摄入量均显著低于模型组($P < 0.05$), 其中以造模后24 h亮菌高剂量组大鼠高岭土摄入量与模型组比较差异最明显(0.58 ± 0.23 vs 2.13 ± 0.96 , 图1)。

2.2 不同剂量亮菌对大鼠胃窦慢波频率的影响 造模后24-72 h, 胃窦慢波每分钟频率均为模型组显著高于空白对照组($P < 0.01$), 其中以24 h模型组(7.33 ± 2.92)与空白对照组(3.00 ± 1.55)胃窦慢波频率差异最显著. 造模后24-72 h, 亮菌低、中、高剂量组及昂丹司琼组与模型组的慢波频率比较显示, 亮菌低、中、高剂量组及昂丹司琼组的慢波频率均显著低于模型组($P < 0.01$), 其中, 以造模后24 h亮菌高剂量(4.13 ± 1.14)与模型组(7.33 ± 2.92)胃窦慢波频率差异最明显, 而昂丹司琼组对慢波频率的抑制效果不及亮菌中、高剂量组, 尤以造模后48-72 h更为显著(图2)。

2.3 不同剂量亮菌对大鼠胃窦慢波振幅的影响 造模后24、48、72 h, 胃窦慢波平均振幅均为模型组显著高于空白对照组($P < 0.05$), 以24 h模型组(249.75 ± 79.09)与空白对照组(148.04 ± 63.51)胃窦慢波平均振幅差异最显著; 造模后24-72 h, 亮菌低、中、高剂量组及昂丹司琼组的慢波平均振幅均显著低于模型组($P < 0.01$)(除外24 h亮菌低剂量组), 其中以造模后24 h亮菌高剂量(163.46 ± 26.14)与模型组(249.75 ± 79.09)胃窦慢波平均振幅差异最明显, 而昂丹司琼组对慢波平均振幅的抑制效果不及亮菌中、高剂量组, 尤以与造模后72 h亮菌中剂量组比较更为明显(图3)。

2.4 不同剂量亮菌对大鼠胃窦组织中5-HT含量的影响 造模后24-72 h, 各组大鼠胃窦组织中5-HT含量均显著高于空白对照组($P < 0.05$); 造模后24-72 h, 亮菌低、中、高剂量组及昂丹司琼组与模型组的胃窦5-HT含量比较发现, 造模后24 h亮菌中剂量组、造模后24-72 h亮菌高剂量组及昂丹司琼组的胃窦5-HT含量显著低于模型组($P < 0.05$), 其余各组胃窦5-HT含量均低于模型组, 但差异均无统计学意义($P > 0.05$, 表1)。

2.5 大鼠胃窦慢波频率与5-HT含量的关系 对大

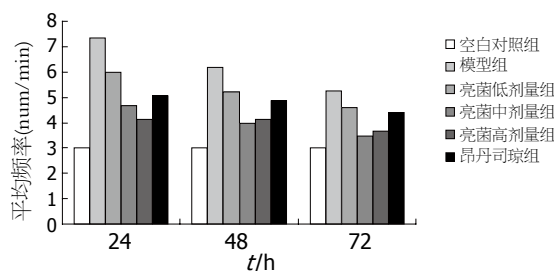


图 2 亮菌对大鼠胃窦慢波频率的影响。

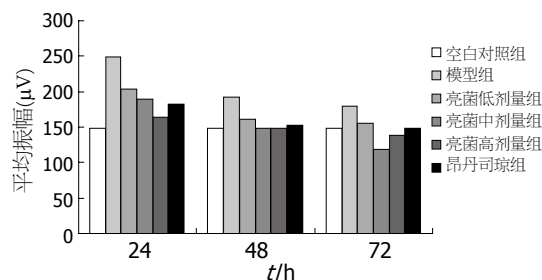


图 3 亮菌对大鼠胃窦慢波振幅的影响。

■创新盘点

本研究以大鼠胃平滑肌电活动节律变化为依据, 探讨顺铂化疗过程中诱发的胃平滑肌电活动改变及5-HT在此过程中的调控作用。探讨亮菌对大鼠顺铂化疗过程中诱发的胃节律性运动紊乱的抑制作用, 机制可能与5-HT的调控作用有关。

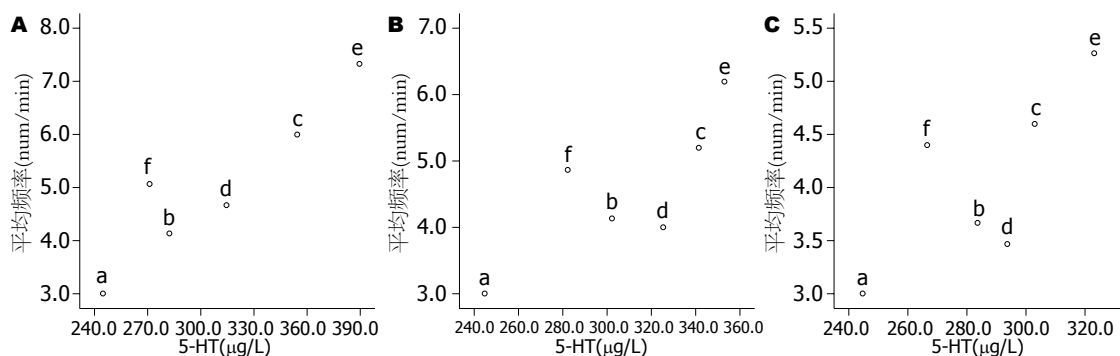


图 4 大鼠胃窦慢波频率与5-HT含量的关系。A: 24 h; B: 48 h; C: 72 h。a: 空白对照组; b: 亮菌高剂量组; c: 亮菌低剂量组; d: 亮菌中剂量组; e: 模型组; f: 昂丹司琼组。

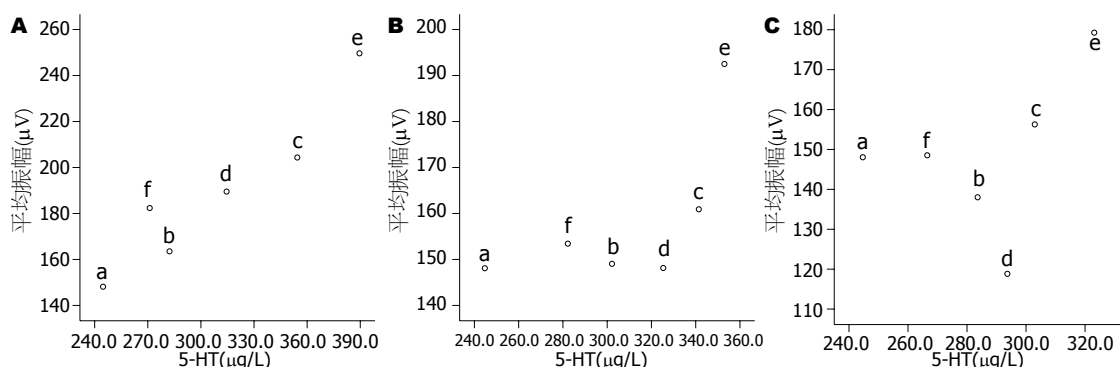


图 5 大鼠胃窦慢波振幅与5-HT含量的关系。A: 24 h; B: 48 h; C: 72 h。a: 空白对照组; b: 亮菌高剂量组; c: 亮菌低剂量组; d: 亮菌中剂量组; e: 模型组; f: 昂丹司琼组。

鼠胃窦慢波频率与胃窦5-HT含量作散点图分析显示, 腹腔注射顺铂后24-72 h, 胃窦慢波频率总体趋势随着5-HT含量增加而上升, 以腹腔注射顺铂后24 h变化最为明显; 其中, 腹腔注射顺铂后24-72 h, 亮菌中、高剂量组的5-HT含量均高于昂丹司琼组, 但其对胃窦慢波频率的抑制作用均强于昂丹司琼组, 尤以腹腔注射顺铂后48 h和72 h更为明显(图4)。

2.6 大鼠胃窦慢波振幅与5-HT含量的关系 对大鼠胃窦慢波振幅与胃窦5-HT含量作散点图分析显示, 腹腔注射顺铂后24-72h, 胃窦慢波振幅总体趋势基本呈现随5-HT含量增加而上升, 尤以腹腔注射顺铂后24 h变化最为明显; 其中, 腹腔注射顺铂后24-72 h, 亮菌中、高剂量组的5-HT

含量均高于昂丹司琼组, 但其对胃窦慢波振幅的抑制作用均强于昂丹司琼组, 尤以腹腔注射顺铂后48 h和72 h更为明显(图5)。

3 讨论

恶心呕吐是肿瘤化疗常见的胃肠道反应, 其中顺铂所致的恶心呕吐等消化道反应发生率高达90%以上, 严重影响肿瘤患者的生存质量与治疗效果^[13-17]。近20年, 5-HT受体阻滞剂的广泛应用使得约70%的急性呕吐可被有效控制, 但仍有约30%的急性呕吐和50%的迟发性呕吐尚未得到有效的控制^[18-20]。因此, 如何更有效地防治化疗所致的恶心、呕吐等胃肠道反应的发生, 对改善患者生活质量并保证化疗的顺利进行有重要意义。

■应用要点

本研究提示,亮菌可有效抑制顺铂化疗所诱发的胃节律性运动紊乱,其对化疗过程中诱发的胃节律性运动紊乱的抑制作用机制可能与5-HT的调控作用有关。该结论对亮菌防治化疗诱发胃肠道反应的机制深入研究具有一定的理论指导意义。

已有研究证实,大鼠异食癖行为可以用作有呕吐反射动物的呕吐模型^[11,21-24]。本研究即参照De Jonghe等^[11]法腹腔注射顺铂制造化疗性大鼠异食癖恶心呕吐模型,研究结果显示,造模后24 h模型组高岭土摄入量显著上升,与空白对照组比较差异具有显著性,表明化疗后异食癖恶心呕吐模型复制成功;同时,在造模前24 h对亮菌高、中、低剂量组与空白对照组大鼠高岭土摄入量比较发现,亮菌三剂量组与空白对照组大鼠高岭土摄入量差异无统计学意义,说明亮菌不影响大鼠高岭土摄入量。亮菌对顺铂化疗诱发胃肠道反应的防治效果研究显示,造模后24、48及72 h,亮菌高、中、低剂量组高岭土摄入量均低于模型组,其中以造模后24 h亮菌高剂量组高岭土摄入量的抑制作用最为显著,由此可见,亮菌对顺铂化疗诱发大鼠异食癖反应有显著的抑制作用。

国外研究^[1-3]表明,化疗诱发恶心呕吐等胃肠道反应是胃肠节律性运动紊乱的反映。呕吐在很大程度上取决于其内在的电活动,慢波是胃肠道肌电活动的起步电位,慢波调控胃肠平滑肌收缩的节律、时间、地点、频率和方向,是胃动力的基础。国内谭万初等^[25]研究发现,顺铂化疗致吐会加快家鸽胃肌电慢波频率,导致节律异常,而予以抗止呕药则能显著减慢慢波频率,降低异常节律指数;此外,余晓云等^[26]应用顺铂诱发犬呕吐的胃肌电研究发现,顺铂化疗致吐会显著增加犬胃肌电慢波频率,且胃肌电过速和过缓发生的百分比明显增加。本研究结果表明,腹腔注射顺铂后24-72 h,与空白对照组比较,模型组大鼠胃窦慢波每分钟频率明显增加、平均振幅显著增高,其中尤以造模后24 h变化最为明显,此外,在本次试验过程中,还同步记录了3例模型组大鼠胃体和胃窦部平滑肌电活动,发现外源性顺铂复制模型后,胃体与胃窦部平滑肌电活动同步性较差,常见胃窦部慢波节律启动时间早于胃体部,这可能是顺铂诱发其异位节律所致;由此可见,顺铂化疗过程中可诱发大鼠胃节律性运动紊乱。而给予亮菌灌胃后结果显示,造模后24-72 h亮菌中、高剂量组的慢波频率与平均振幅均显著低于模型组,同步观察的5例亮菌组大鼠胃体和胃窦部平滑肌电活动经分析发现,亮菌组胃体与胃窦部平滑肌电活动同步性较好,仅1例出现常见胃窦部慢波节律启动时间早于胃体部,结果提示亮菌对顺铂化疗诱发的大鼠胃节律性运动紊乱有明

显的抑制作用。

目前,化疗导致胃肠节律性运动紊乱的具体机制仍不十分清楚,现有研究认为,胃肠节律性运动紊乱与神经系统、脑肠肽及免疫因素等有密切关系。余跃等研究^[8]显示,5-HT₄受体拮抗剂GR113808能引起胃电紊乱,提示胃起搏可能是通过5-HT₄受体的介导而对胃慢波进行调控;而5-HT在化疗药所致恶心呕吐等胃肠道不良反应的机制中扮演关键角色^[4-6]。本研究结果表明,造模后24-72 h亮菌组胃窦组织5-HT含量显著低于模型组,而对大鼠胃窦慢波频率及振幅与5-HT含量的关系分析表明,腹腔注射顺铂后24-72 h,胃窦慢波频率及振幅总体趋势随着5-HT含量增加而上升,提示亮菌可能通过抑制化疗后大鼠胃肠道组织5-HT的释放,从而起到对大鼠胃慢波的调控作用,其中以腹腔注射顺铂后24 h调控作用最为明显,该结果可能与顺铂化疗所诱发的急性期恶心呕吐等胃肠道反应的主要机制为5-HT有关^[4-6]。本研究采用组间比较设计的方法,故不能验证5-HT含量与胃窦节律性运动紊乱的因果关系,因此,在探讨5-HT在亮菌防治顺铂化疗诱发胃肌电变化中的调控作用时尚需考虑时间因素的影响。

此外,对大鼠胃窦慢波频率及振幅与5-HT含量的关系分析还发现,腹腔注射顺铂后24-72 h,亮菌中、高剂量组的5-HT含量均高于昂丹司琼组,但其对胃窦慢波振幅及频率的抑制作用均强于昂丹司琼组,尤以腹腔注射顺铂后48 h和72 h更为明显,该结果提示,亮菌对顺铂化疗诱发胃窦节律性运动紊乱的抑制作用除5-HT机制外(与昂丹司琼机制相似),可能还存在其他途径,如亮菌通过提高化疗后大鼠体内NO水平而起到对大鼠胃慢波的调控作用^[27-30]。有关亮菌与5-HT受体抑制剂对胃肠节律性运动紊乱的抑制作用的比较,提示亮菌可能存在其他途径的观点,在亮菌能有效治疗慢性胃炎、溃疡性结肠炎和小儿腹泻等研究结果中亦得到进一步佐证^[31],但该结论尚需进一步研究。

总之,亮菌可有效抑制顺铂化疗所诱发的胃节律性运动紊乱,其对大鼠顺铂化疗过程中诱发的胃节律性运动紊乱的抑制作用机制可能与5-HT的调控作用有关,二者均以造模后24 h效果最为明显。

4 参考文献

- 1 Yu X, Yang J, Hou X, Zhang K, Qian W, Chen JD. Cisplatin-induced gastric dysrhythmia and emesis

- in dogs and possible role of gastric electrical stimulation. *Dig Dis Sci* 2009; 54: 922-927
- 2 Riezzo G, Clemente C, Leo S, Russo F. The role of electrogastrography and gastrointestinal hormones in chemotherapy-related dyspeptic symptoms. *J Gastroenterol* 2005; 40: 1107-1115
- 3 Lo LH, Tai YS, Jou SJ. [A pilot study: gastric motility and nausea/vomiting in two leukemia children receiving chemotherapy]. *Huli Zazhi* 2006; 53: 46-53
- 4 Hesketh PJ. Chemotherapy-induced nausea and vomiting. *N Engl J Med* 2008; 358: 2482-2494
- 5 Zhang WD, Wang XW, Chen ZD, Qin FZ, Shu YQ, Pan LX, Zhang MH. [Tropisetron hydrochloride in preventing and treating chemotherapy-induced nausea and vomiting: a phase II, randomized, multicenter, double-blinded, comparative clinical trial]. *Ai Zheng* 2007; 26: 870-873
- 6 Abenhardt W, Bosse D, Böning L, Bojko P, Hitz H, Völkl S, Fromm M, Mittermüller J, Gödel N, Schick HD, Dietzfelbinger H, Hinke A. [Treatment of chemotherapy-induced nausea and vomiting with 5-hydroxytryptamine type 3 receptor antagonists]. *Dtsch Med Wochenschr* 2006; 131: 2707-2712
- 7 Hoyer D, Hannon JP, Martin GR. Molecular, pharmacological and functional diversity of 5-HT receptors. *Pharmacol Biochem Behav* 2002; 71: 533-554
- 8 余跃, 殷光甫, 钱伟, 侯晓华. 5-羟色胺受体参与胃起搏对胃慢波活动的调控. *胃肠病学* 2006; 11: 495-498
- 9 张慧, 欧阳守, 黄伟峰. 5-HT及其阻断剂脑内微注射和微电刺激对家兔胃电活动的影响. *世界华人消化杂志* 2009; 17: 3189-3196
- 10 Rudd JA, Yamamoto K, Yamatodani A, Takeda N. Differential action of ondansetron and dexamethasone to modify cisplatin-induced acute and delayed kaolin consumption ("pica") in rats. *Eur J Pharmacol* 2002; 454: 47-52
- 11 De Jonghe BC, Horn CC. Chemotherapy-induced pica and anorexia are reduced by common hepatic branch vagotomy in the rat. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2008; 294: R756-R765
- 12 Smith JE, Lane JD, Shea PA, McBride WJ, Aprison MH. A method for concurrent measurement of picomole quantities of acetylcholine, choline, dopamine, norepinephrine, serotonin, 5-hydroxytryptophan, 5-hydroxyindoleacetic acid, tryptophan, tyrosine, glycine, aspartate, glutamate, alanine, and gamma-aminobutyric acid in single tissue samples from different areas of rat central nervous system. *Anal Biochem* 1975; 64: 149-169
- 13 Ballatori E, Roila F, Ruggeri B, Betti M, Sarti S, Soru G, Cruciani G, Di Maio M, Andrea B, Deuson RR. The impact of chemotherapy-induced nausea and vomiting on health-related quality of life. *Support Care Cancer* 2007; 15: 179-185
- 14 Hesketh PJ, Aapro M, Street JC, Carides AD. Evaluation of risk factors predictive of nausea and vomiting with current standard-of-care antiemetic treatment: analysis of two phase III trials of aprepitant in patients receiving cisplatin-based chemotherapy. *Support Care Cancer* 2010; 18: 1171-1177
- 15 De Jonghe BC, Horn CC. Chemotherapy agent cisplatin induces 48-h Fos expression in the brain of a vomiting species, the house musk shrew (*Suncus murinus*). *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2009; 296: R902-R911
- 16 Cohen L, de Moor CA, Eisenberg P, Ming EE, Hu H. Chemotherapy-induced nausea and vomiting: incidence and impact on patient quality of life at community oncology settings. *Support Care Cancer* 2007; 15: 497-503
- 17 周宏锋, 张玉新, 吴良平, 邓鉴文, 丁洪亮, 康慧鑫. 洛铂与草酸铂在联合化疗方案中毒副作用的比较. *世界华人消化杂志* 2008; 16: 225-227
- 18 Eisenberg P, Figueroa-Vadillo J, Zamora R, Charu V, Hajdenberg J, Cartmell A, Macciocchi A, Grunberg S. Improved prevention of moderately emetogenic chemotherapy-induced nausea and vomiting with palonosetron, a pharmacologically novel 5-HT₃ receptor antagonist: results of a phase III, single-dose trial versus dolasetron. *Cancer* 2003; 98: 2473-2482
- 19 Hickok JT, Roscoe JA, Morrow GR, King DK, Atkins JN, Fitch TR. Nausea and emesis remain significant problems of chemotherapy despite prophylaxis with 5-hydroxytryptamine-3 antiemetics: a University of Rochester James P. Wilmot Cancer Center Community Clinical Oncology Program Study of 360 cancer patients treated in the community. *Cancer* 2003; 97: 2880-2886
- 20 Geling O, Eichler HG. Should 5-hydroxytryptamine-3 receptor antagonists be administered beyond 24 hours after chemotherapy to prevent delayed emesis? Systematic re-evaluation of clinical evidence and drug cost implications. *J Clin Oncol* 2005; 23: 1289-1294
- 21 Yuan CS, Wang CZ, Mehendale SR, Aung HH, Foo A, Israel RJ. Protease inhibitor-induced nausea and vomiting is attenuated by a peripherally acting, opioid-receptor antagonist in a rat model. *AIDS Res Ther* 2009; 6: 19
- 22 Cabezas PA, Vera G, Castillo M, Fernández-Pujol R, Martín MI, Abalo R. Radiological study of gastrointestinal motor activity after acute cisplatin in the rat. Temporal relationship with pica. *Auton Neurosci* 2008; 141: 54-65
- 23 Mehendale S, Aung H, Wang A, Yin JJ, Wang CZ, Xie JT, Yuan CS. American ginseng berry extract and ginsenoside Re attenuate cisplatin-induced kaolin intake in rats. *Cancer Chemother Pharmacol* 2005; 56: 63-69
- 24 Aung HH, Mehendale SR, Xie JT, Moss J, Yuan CS. Methylalntrexone prevents morphine-induced kaolin intake in the rat. *Life Sci* 2004; 74: 2685-2691
- 25 谭万初, 邓晓虹, 向未, 李婧. 大半夏汤防治化疗呕吐的胃肌电生理研究. *现代中西医结合杂志* 2009; 18: 2122-2123
- 26 余晓云, 侯晓华. 胃电刺激对药物诱导的犬呕吐症状和胃肌电活动的影响及其中枢机制研究. 武汉: 华中科技大学博士学位论文 2009: 1-79
- 27 余跃, 殷光甫, 钱伟, 侯晓华. NO参与了胃起搏调控胃慢波活动. *胃肠病学和肝病学杂志* 2007; 16: 247-249
- 28 龙庆林, 王振华. 大鼠氮能神经与胃电节律失常的关系. *第四军医大学学报* 2003; 24: 1572-1574
- 29 沈业寿, 马金宝. 亮菌研究的现状与展望. *安徽大学学报(自然科学版)* 2007; 31: 82-86
- 30 罗霞, 余梦瑶, 许晓燕, 曾瑾, 江南, 郑林用. 亮菌多糖 IPS-B2对小鼠腹腔巨噬细胞活性及其相关基因转录的影响. *中国中药杂志* 2008; 33: 1305-1308
- 31 王建军, 李平. 亮菌制剂研究概况. *中医药临床杂志* 2010; 22: 469-470

■同行评价

本文设计合理, 结果可靠, 对于化疗诱发恶心呕吐等胃肠道反应方面的研究有一定的参考意义。

编辑 曹丽鸥 电编 何基才

Ghrelin及NF- κ B在急性坏死性胰腺炎并肝损伤中的作用

苏娟, 唐国都, 杨慧莹, 覃蒙斌, 梁志海

■背景资料

Ghrelin可减少炎症因子的产生,减轻组织炎症反应,对抗过氧化物形成;而褪黑素亦具有强大的抗氧化作用。目前Ghrelin在急性坏死性胰腺炎中的作用研究大多集中于检测在血清的水平及其受体的含量,但对于胰腺组织及其他胰外器官的研究较少;褪黑素、Ghrelin与胰腺炎三者关系的研究鲜有报道。

苏娟, 唐国都, 杨慧莹, 覃蒙斌, 梁志海, 广西医科大学第一附属医院消化内科 广西壮族自治区南宁市 530021
苏娟, 2008级硕士生, 主要从事急性胰腺炎的发病机制方面的研究。

广西自然科学基金资助项目(桂科自), No. 0728107

作者贡献分布: 本课题由唐国都、梁志海及苏娟共同设计; 研究过程由苏娟、杨慧莹及覃蒙斌完成; 论文写作由苏娟与覃蒙斌完成。

通讯作者: 唐国都, 教授, 530021, 广西壮族自治区南宁市双拥路6号, 广西医科大学第一附属医院消化内科。

tguodu02@yahoo.com.cn

电话: 0771-5356501

收稿日期: 2010-11-08 修回日期: 2010-12-23

接受日期: 2010-12-29 在线出版日期: 2011-02-28

Role of ghrelin and NF- κ B in the pathogenesis of acute necrotizing pancreatitis-associated liver injury

Juan Su, Guo-Du Tang, Hui-Ying Yang, Meng-Bin Qin, Zhi-Hai Liang

Juan Su, Guo-Du Tang, Hui-Ying Yang, Meng-Bin Qin, Zhi-Hai Liang, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530021, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China
Supported by: the Natural Science Foundation of Guangxi, No. 0728107

Correspondence to: Professor Guo-Du Tang, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, 6 Shuangyong Road, Nanning 530021, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China. tguodu02@yahoo.com.cn

Received: 2010-11-08 Revised: 2010-12-23

Accepted: 2010-12-29 Published online: 2011-02-28

Abstract

AIM: To investigate the expression of ghrelin in the liver of rats with acute necrotizing pancreatitis (ANP) with liver injury and to explore the role of ghrelin and NF- κ B in the pathogenesis of ANP-associated liver injury and the mechanism underlying the therapeutic effects of melatonin against ANP.

METHODS: Seventy-two male Sprague-Dawley rats were randomly and equally divided into control group, ANP group, and melatonin intervention group. Rats of the ANP group and melatonin intervention group were injected with 6% L-Arg (1.5 g/kg) intraperitoneally three times

to induce ANP. Rats of the control group were injected with same volume of normal saline. The melatonin intervention group was given 1% melatonin (50 μ g/kg) intraperitoneally 0.5 h before the first injection of L-Arg. Rats were sacrificed at 6, 12, and 24 h after the injection of melatonin. Pathological changes in the pancreatic and hepatic tissue were observed and graded under a microscope. The expression of ghrelin and NF- κ B mRNAs was evaluated by RT-PCR, while the protein expression of NF- κ B was detected by Western blot.

RESULTS: Pancreatic and hepatic pathological scores, serum amylase, and expression of NF- κ B mRNA (6 h: 0.74 ± 0.04 vs 0.40 ± 0.05 ; 12 h: 0.77 ± 0.03 vs 0.40 ± 0.02 ; 24 h: 0.82 ± 0.04 vs 0.40 ± 0.03 , all $P = 0.001$) and protein in the liver at all time points were significantly higher (24 h: 0.48 ± 0.07 vs 0.6 ± 0.04 , $P < 0.05$), and ghrelin mRNA expression was significantly lower in the ANP group than in the control group (6 h: 0.39 ± 0.04 vs 0.66 ± 0.03 ; 12 h: 0.14 ± 0.37 vs 0.30 ± 0.05 ; 24 h: 0.22 ± 0.02 vs 0.59 ± 0.05 , all $P < 0.05$). Pancreatic pathological scores, hepatic pathological scores, serum amylase, and expression of NF- κ B mRNA (6 h: 0.50 ± 0.05 vs 0.74 ± 0.04 , 12 h: 0.54 ± 0.04 vs 0.77 ± 0.03 , 24 h: 0.57 ± 0.03 vs 0.82 ± 0.04 , all $P < 0.05$) and protein were decreased (24 h: 0.32 ± 0.04 vs 0.48 ± 0.07 , $P < 0.05$), and ghrelin mRNA expression was elevated (6 h: 0.54 ± 0.03 vs 0.39 ± 0.04 , 12 h: 0.40 ± 0.09 vs 0.30 ± 0.05 , 24 h: 0.39 ± 0.04 vs 0.22 ± 0.02 , all $P < 0.05$) in the melatonin intervention group compared with in the ANP group.

CONCLUSION: The expression of ghrelin may be related to the severity of ANP with liver injury. NF- κ B may also be involved in the pathogenesis of ANP with liver injury. Exogenous melatonin can reduce ANP possibly by up-regulating ghrelin expression and down-regulating NF- κ B expression.

Key Words: Acute necrotizing pancreatitis; Liver injury; Ghrelin; Nuclear factor- κ B; Melatonin

Su J, Tang GD, Yang HY, Qin MB, Liang ZH. Role of

■同行评议者

秦成勇, 教授, 山东省立医院消化内科

ghrelin and NF- κ B in the pathogenesis of acute necrotizing pancreatitis-associated liver injury. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(6): 568-574

性坏死性胰腺炎并肝损伤中的作用. *世界华人消化杂志* 2011; 19(6): 568-574

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/568.asp>

摘要

目的: 观察Ghrelin、NF- κ B在大鼠急性坏死性胰腺炎并肝损伤及褪黑素干预时在肝脏中的表达, 探讨两者在其中的作用及褪黑素对Ghrelin的影响和可能机制。

方法: 72只♂SD大鼠随机分为对照组(C组, $n = 24$)、急性坏死性胰腺炎组(A组, $n = 24$)、褪黑素干预组(M组, $n = 24$)。A组分3次腹腔注射6%左旋精氨酸(L-Arg)1.5 g/kg, 诱发急性坏死性胰腺炎, C组同法注射等量生理盐水, M组在首次注射L-Arg前0.5 h腹腔注射1%褪黑素50 μ g/kg。各组大鼠在末次腹腔注射后6、12、24 h分批处死。光镜下观察胰腺及肝脏病理改变并进行评分, 测定血清淀粉酶水平, RT-PCR检测肝脏Ghrelin及NF- κ B mRNA水平, Western blot检测肝NF- κ B蛋白表达。

结果: A组各时点胰腺及肝脏病理评分、血清淀粉酶、肝NF- κ B mRNA(6 h: 0.74 ± 0.04 vs 0.40 ± 0.05 ; 12 h: 0.77 ± 0.03 vs 0.40 ± 0.02 ; 24 h: 0.82 ± 0.04 vs 0.40 ± 0.03 , 均 $P = 0.000$)及蛋白表达(24 h: 0.48 ± 0.07 vs 0.16 ± 0.04 , $P = 0.000$)均较C组显著升高(均 $P < 0.01$)。Ghrelin mRNA较C组明显降低(6 h: 0.39 ± 0.04 vs 0.66 ± 0.03 ; 12 h: 0.14 ± 0.37 vs 0.30 ± 0.05 ; 24 h: 0.22 ± 0.02 vs 0.59 ± 0.05 , 均 $P = 0.000$)。M组各时点胰腺及肝脏病理评分、血清淀粉酶、肝NF- κ B mRNA(6 h: 0.50 ± 0.05 vs 0.74 ± 0.04 ; 12 h: 0.54 ± 0.04 vs 0.77 ± 0.03 ; 24 h: 0.57 ± 0.03 vs 0.82 ± 0.04 , 均 $P < 0.05$)及蛋白表达(24 h: 0.32 ± 0.04 vs 0.48 ± 0.07 , $P < 0.05$), 均较A组显著降低(均 $P < 0.05$)。Ghrelin mRNA较A组升高(6 h: 0.54 ± 0.03 vs 0.39 ± 0.04 ; 12 h: 0.40 ± 0.09 vs 0.30 ± 0.05 ; 24 h: 0.39 ± 0.04 vs 0.22 ± 0.02 , 均 $P < 0.05$)。

结论: Ghrelin在急性胰腺炎并肝损伤时的表达可能与病变严重程度有关; NF- κ B在该病变发展过程中起了重要作用, 外源性褪黑素可以减轻急性胰腺炎的胰腺和肝脏病变, 该保护作用可能与提高Ghrelin的表达、下调NF- κ B的活性有关。

关键词: 急性胰腺炎; 肝损伤; Ghrelin; 核因子- κ B; 褪黑素

0 引言

急性胰腺炎(acute pancreatitis, AP), 临床上分为轻症与重症两型, 是常见的急腹症之一。重症急性胰腺炎(severe acute pancreatitis, SAP)以胰腺出血、坏死为主要病理基础, 易并发胃肠、肝、肺、肾等器官的急性损伤, 造成多器官功能障碍(multiple organ dysfunction syndrome, MODS)甚至多器官功能衰竭(multiple organ failure, MOF), 病死率高。各种病因, 包括胆石症、大量饮酒及暴饮暴食、胰腺本身病变导致胰管阻塞等, 引起腺泡细胞损伤, 胰酶激活、释放, 同时活化炎症细胞引起多种炎症介质及细胞因子产生并释放入血, 氧化应激损伤形成, 导致胰腺微循环障碍、胰管通透性增高, 各有害因素进入血循环, 损伤机体其他脏器。Ghrelin是1999年发现的生长激素促分泌受体的天然配体, 主要在胃合成分泌, 在肠道、肝、肾、肺、心脏及中枢神经系统都有表达, 具有刺激生长激素释放、调节摄食、刺激胃酸及胃蛋白酶分泌、提高心输出量及升高血压等多种生物学功能^[1,2]。研究发现Ghrelin和急性胰腺炎的严重程度有关; 其具有抗炎、抗氧化损伤等作用^[3,4]。而核转录因子 κ B(nuclear factor- κ B, NF- κ B)是目前较公认的参与胰腺炎合并胰外器官损伤的关键因子^[5]。本实验通过多次大剂量腹腔注射L-精氨酸(L-Arg)诱导建立急性胰腺炎并肝损伤的模型, 观察Ghrelin与NF- κ B在肝脏的表达与相关器官的病理损伤的关系, 探讨Ghrelin、NF- κ B在肝脏损伤中的作用及褪黑素(melatonin, Mel)对其的影响和可能机制。

1 材料和方法

1.1 材料 清洁级♂SD大鼠72只, 体质量180-250 g, 由广西医科大学动物实验中心提供。L-Arg(美国Sigma公司); 1%Mel(德国Ruibio公司); NF- κ B单克隆抗体、 β -actin单克隆抗体、HRP标记的羊抗鼠二抗(均为Santa Cruz公司); TRIzol(Invitrogen公司); RT-PCR逆转录试剂盒(MBI公司); RT-PCR Taq酶(美国Promega公司); 胞质胞核蛋白抽提、Bradford蛋白定量试剂盒(碧云天公司); ECL(北京普利来公司)。

■ 研发前沿

目前对Ghrelin的研究重在炎症损伤中的抗炎症、抗氧化作用, 尤其是其在炎症相关性疾病中的潜在治疗作用成为热点。而褪黑素因抗氧化应激等作用对氧化相关疾病的保护作用亦是研究热点之一。

苏娟, 唐国都, 杨慧莹, 覃蒙斌, 梁志海. Ghrelin及NF- κ B在急

■相关报道

Waseem等的研究提示Ghrelin呈剂量、时间依赖性抑制炎症因子的产生;而预先给予外源性Ghrelin则减低了NF- κ B的激活程度;增强了p38MAPK的活性,从而提高了抑炎因子的释放。Ni等证实褪黑素通过抑制NF- κ B的活性、减少TNF- α 的表达,降低胰腺炎肝损伤时的细胞凋亡、坏死。

1.2 方法

1.2.1 分组及造模: 72只大鼠随机分为3组, 对照组(C组, 24只), 急性坏死性胰腺炎模型组(A组, 24只), Mel干预组(M组, 24只)。各组大鼠实验前禁食12 h, 自由饮水。A组: 分3次腹腔注射6% L-Arg 1.5 g/kg, 每次间隔1 h, 诱发急性坏死性胰腺炎^[6]; C组同法注射等量生理盐水; M组在首次注射L-Arg前0.5 h腹腔注射1% Mel 50 μ g/kg, 之后同A组方法。各组大鼠在末次腹腔注射后6、12、24 h按时点每批8只分批处死。留取动静脉血、胰腺、肝脏组织标本。

1.2.2 胰腺及肝脏组织切片、HE染色: 留取的标本40 g/L甲醛固定, 石蜡包埋、切片后进行HE染色, 在光镜下每张切片随机观察5个视野并评分, 均由同一病理医师完成。每张切片评分为5个视野均值, 胰腺、肝脏病理评分分别参考Kusske^[7]、Schmidt^[8]评分标准。

1.2.3 血清淀粉酶测定: 各时点分批处死大鼠后取动脉血, 全自动生化分析仪测定血清淀粉酶含量。

1.2.4 肝脏NF- κ B、Ghrelin mRNA水平检测: RT-PCR测定。TRIzol提取细胞总RNA。引物依据GenBank中大鼠NF- κ B及Ghrelin mRNA序列设计。NF- κ B上游引物: 5'-AGCTCAAGATCTGCC GAGTA-3'; 下游引物5'-GATCTGCCCAGGTGG TAACAC-3'; 扩增片段为557 bP。Ghrelin上游引物序列: 5'-GTGTCTTCAGCGACTATCT-3'; 下游引物序列: 5'-CCTGTCAGTGGTTACTTGTT-3'; 扩增片段为362 bP。 β -actin上游引物序列5'-CC CATCTATGAGGGTTACGC-3'; 下游引物序列: 5'-TTTAATGTCACGCACGATTTC-3'; 扩增片段为150 bP。RT-PCR的具体操作按试剂盒说明进行。逆转录合成cDNA反应条件: 65 $^{\circ}$ C, 5 min; 42 $^{\circ}$ C, 60 min; 70 $^{\circ}$ C, 5 min。合成的cDNA加相应引物进行扩增。PCR反应体系为50 μ L, 5 \times buffer 10 μ L, 1.5 mmol/L MgCl₂, dNTP 1 μ L(10 mmol/L), 上下游引物各2.5 μ L(10 μ mol/L), Taq酶0.25 μ L(5 U/ μ L), cDNA模板1 μ L, ddH₂O 33 μ L。NF- κ B扩增条件为: 预变性94 $^{\circ}$ C 5 min, 94 $^{\circ}$ C变性30 s, 60 $^{\circ}$ C退火30 s, 72 $^{\circ}$ C延伸45 s, 共35个循环, 总延伸72 $^{\circ}$ C 10 min。Ghrelin扩增条件为: 预变性95 $^{\circ}$ C 5 min, 94 $^{\circ}$ C变性30 s, 56 $^{\circ}$ C退火40 s, 72 $^{\circ}$ C延伸40 s, 共35个循环, 总延伸72 $^{\circ}$ C 10 min。PCR产物用1.5%琼脂糖凝胶电泳后进行凝胶成像系统分析。

1.2.5 肝脏NF- κ B的Western blot检测: 称取一定量的组织, 按照说明书抽提胞核蛋白后, 按照试剂盒操作, 制作蛋白标准曲线、测定蛋白浓度。取等量蛋白在SDS-PAGE上电泳(12%分离胶, 5%浓缩胶)后转移至PVDF膜, 5%脱脂奶粉封闭, NF- κ B单抗按1:800、 β -actin单抗过夜冰敷, TBST洗膜3次后二抗1:4 000常温孵育, 同前法洗膜3次, 应用增强的化学发光法(Enhanced chemiluminescence, ECL)显影、定影后, 图片经扫描用Quantity One软件分析。

统计学处理 应用SPSS13.0软件包分析, 实验数据均用mean \pm SD表示, 采用单因素方差分析对数据进行检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 胰腺大体观及病理变化 C组大鼠胰腺肉眼观无变化, 镜下见胰腺腺泡结构完整, 腺小叶清晰, 偶见少量水肿和炎性细胞浸润, 无坏死、出血。A组胰腺外观呈灰白色或暗紫色, 水肿明显。腹腔见淡黄色或血性腹水, 部分脏器粘连、脂肪皂化。镜下见胰腺腺泡水肿, 结构不清, 炎性细胞浸润、甚至片状组织坏死及出血, 腺小叶结构破坏。病变在各时点随时间延续而加重。M组的病变较A组减轻, 胰腺外观稍肿, 腹水减少, 腹腔脏器无粘连、脂肪皂化。镜下见腺泡水肿轻于A组, 腺泡细胞坏死, 少量炎性细胞浸润, 但无片状出血坏死。各组胰腺评分见表1。

2.2 肝脏大体观及病理变化 C组肝脏表面鲜红色, 光滑无出血、渗出。光镜下见肝窦、汇管区无明显变化, 肝细胞结构清晰。A组肝脏外观呈暗红色, 水肿。镜下肝细胞浊肿, 肝窦扩张充血明显, 汇管区见炎性细胞浸润, 少量肝细胞坏死。各时点病变随时间而加重。M组细胞肿胀程度较A组减轻, 肝窦扩张, 汇管区炎性细胞浸润少量, 无肝细胞坏死。各组肝脏评分见表1。

2.3 血清淀粉酶 A组各时点的淀粉酶比C组显著升高, 6、12、24 h相应各时点M组比A组降低。各组淀粉酶的数值见表1。

2.4 肝脏NF- κ B、Ghrelin mRNA水平 A组各时点NF- κ B mRNA较C组显著升高, 且其表达水平随时间提高; 同时点M组表达较A组降低, 差异有统计学意义, 在各个时点的表达随时间增加; Ghrelin mRNA在C组表达最高, A组的表达显著低于C组, 且随着时间的增加, Ghrelin mRNA降低。M组较A组同时点表达有所回升($P<0.05$, 图

表 1 各组大鼠胰腺和肝脏病理学评分、血清淀粉酶含量 (mean ± SD, n = 8)

分组	胰腺病理评分	肝脏病理评分	淀粉酶 (U/L)
C组			
6 h	0.14 ± 0.37	0.25 ± 0.46	1736.25 ± 435.99
12 h	0.14 ± 0.37	0.50 ± 0.53	1901.12 ± 777.11
24 h	0.33 ± 0.51	1.00 ± 0.76	2033.00 ± 862.66
A组			
6 h	4.50 ± 1.19 ^a	4.00 ± 0.76 ^a	2129.42 ± 760.16 ^a
12 h	5.75 ± 1.49 ^a	4.88 ± 0.83 ^a	3012.22 ± 1424.89 ^a
24 h	8.43 ± 1.39 ^a	6.13 ± 0.83 ^a	4598.42 ± 2273.79 ^a
M组			
6 h	1.72 ± 0.75 ^c	3.00 ± 0.76 ^c	1824.12 ± 333.55 ^c
12 h	2.37 ± 1.18 ^c	2.88 ± 0.83 ^c	1834.87 ± 499.07 ^c
24 h	6.57 ± 0.65 ^c	3.38 ± 0.74 ^c	3990.75 ± 1145.61 ^c

^aP<0.05 vs C组; ^cP<0.05 vs A组。

表 2 各组大鼠肝脏Ghrelin及NF-κB mRNA水平 (mean ± SD, n = 8)

分组	Ghrelin mRNA/β-actin	NF-κB mRNA/β-actin
C组		
6 h	0.66 ± 0.03	0.40 ± 0.05
12 h	0.64 ± 0.09	0.40 ± 0.02
24 h	0.59 ± 0.05	0.40 ± 0.03
A组		
6 h	0.39 ± 0.04 ^a	0.74 ± 0.04 ^a
12 h	0.30 ± 0.05 ^a	0.77 ± 0.03 ^a
24 h	0.22 ± 0.02 ^a	0.82 ± 0.04 ^a
M组		
6 h	0.54 ± 0.03 ^c	0.50 ± 0.05 ^c
12 h	0.40 ± 0.09 ^c	0.54 ± 0.04 ^c
24 h	0.39 ± 0.04 ^c	0.57 ± 0.03 ^c

^aP<0.05 vs C组; ^cP<0.05 vs A组。

1, 表2)。

2.5 肝脏NF-κB的Western blot 以β-actin为内参, 在24 h NF-κB蛋白的表达, M组较C组显著提高, 而M组较之于A组有所降低(24 h: 0.48 ± 0.07 vs 0.32 ± 0.04, 0.16 ± 0.04, 均P<0.05, 图2)。

3 讨论

肝脏是机体有毒物质代谢、降解、排泄的主要场所, 尤其是胃肠道吸收的物质, 绝大部分经门静脉入肝。ANP发生后, 释放入血的胰酶、大量炎性介质和细胞因子、各种氧自由基、肠道细菌移位及内毒素等, 经门静脉首先进入肝脏, 损伤肝实质。肝功能受损后, 对有害物质清除能力

■创新盘点

本文通过对急性坏死性胰腺炎及褪黑素干预下Ghrelin和NF-κB表达的研究, 在国内外首次探讨褪黑素、Ghrelin与胰腺炎三者之间的关系, 为临床AP的诊疗提供新的思路。

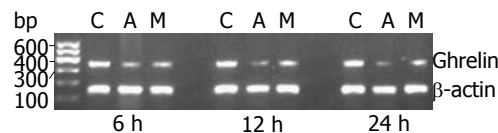


图 1 肝脏Ghrelin mRNA的表达. C: C组; A: A组; M: M组。

下降, 从而加剧了疾病的发展, 形成恶性循环, 最终导致肝功能衰竭。其中, 炎症反应和氧化损伤是最关键的机制。肝Kupffer细胞是体内最大的巨噬细胞群。从胰腺、胃肠道产生而到达肝脏的炎症因子, 包括TNF-α、IL-1、IL-6、IL-8及磷脂酶A2(phospholipases, PLA2)等, 不仅直接损伤肝细胞, 还激活肝血窦内的Kupffer细胞, 后者经不同的信号转导途径, 活化NF-κB、上调TNF-α、Fas的表达, 从而分泌TNF-α、Fas-L、TGF-β1、IL-1、IL-6、IL-8等细胞因子, 介导细胞凋亡或者坏死^[9]。而各种氧自由基可直接将胞膜脂质过氧化, 损伤细胞; 其本身也可激活Kupffer细胞、网状内皮细胞、中性粒细胞等。炎性细胞被激活、分泌大量的炎症因子, 参与触发“瀑布式”级联反应, 使炎症从局部蔓延至全身, 即所谓的“全身严重反应综合征”(systemic inflammatory response syndrome, SIRS), 最终引起MODS。

Ghrelin最先由Kojima等^[10]于1999年从大鼠胃组织中提纯出来。Ghrelin由28个氨基酸组成, 在体内包括中枢神经系统、肺、肾、心血管、消化及免疫系统都有广泛分布。在消化系统中, 整个胃肠道及胰腺、肝脏中均有分布, 胃肠道X/A样细胞是主要的分泌细胞^[11]。Ghrelin与其活

■应用要点

本研究再次证实褪黑素对胰腺炎有抑制作用, Ghrelin及NF- κ B在该疾病过程中起着重要的作用, 提高Ghrelin的表达和抑制NF- κ B活性, 为胰腺炎治疗提供了新思路。

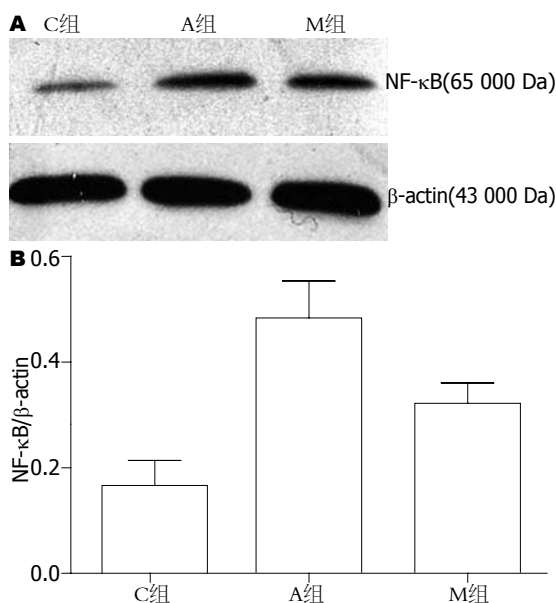


图2 各组大鼠肝脏24 h NF- κ B蛋白水平。

性受体GHS-R1a结合后, 可促使生长激素释放、参与调控机体的摄食行为, 抑制脂肪降解, 调节机体的能量平衡^[12]。而在病理状态, Ghrelin能抑制炎症因子的产生和释放, 减轻机体的炎症反应。研究发现, 脂多糖诱导的巨噬细胞活化后, 炎症因子IL-1 β 、TNF- α 大量生成, 而抗炎因子IL-10产生减少; 予外源性Ghrelin则可剂量、时间依赖性地降低IL-1 β 、TNF- α , 同时提高IL-10的表达^[13]。Ghrelin可提高缺血/再灌注损伤的胃黏膜血流灌注, 加上抗炎作用, 促进损伤部位的修复, 从而在胃肠黏膜损伤时发挥保护作用^[14,15]。Mel是主要在胃肠道和松果体分泌的一种抗氧化剂, 具有脂溶性, 因而能够直接进入细胞, 对抗氧自由基、增强过氧化酶活性而保护DNA、蛋白质及生物膜不受氧化损害, 其抗氧化能力比维生素E、谷胱甘肽强^[16]。研究显示, 在消化系统中, Ghrelin对肝脏、胃、肠道及胰腺病变均具有保护作用^[17-20]。

NF- κ B是一种能与免疫球蛋白 κ 轻链基因的增强序列 κ B序列特意结合的蛋白因子。静息状态下, NF- κ B与其抑制蛋白I- κ B(inhibitor protein- κ B)结合存在于胞质中, 受各种胞外刺激后, I- κ B磷酸化被水解, 两者分离, NF- κ B被释放进入胞核, 与多种目的基因的特定DNA序列结合, 启动这些基因的转录, 其中包括如ICAM-1、IL-1、IL-8、IL-10、TNF- α 、Fas-L等炎症介质及细胞因子, 从而介导一系列的炎症反应。在胰腺炎的全身炎症反应中, NF- κ B可能是触发“瀑布式”

级联反应的重要开关, 尤其是在肝脏损伤时, Kupffer细胞的NF- κ B被活化后, TNF- α 、Fas的表达也上调, 产生大量的细胞因子, 是胰腺炎肝损伤的关键步骤^[9,21]。研究发现, Ghrelin与Mel发挥抗炎、抗氧化作用时, 都与NF- κ B活性的降低有关, 两者可能都通过NF- κ B途径下调细胞因子及炎症介质、氧自由基的表达, 从而对机体发挥保护作用^[22,23]。

在本实验中, NF- κ B mRNA和蛋白表达水平在A组显著高于C组, 且随时间而增高, 与病理切片观察到的两个器官损伤程度改变一致; 与此相反, 肝Ghrelin mRNA在C组表达最高, 而A组显著降低, 且随着胰腺、肝脏损伤的加重而降低。予Mel预处理, 对应各时点的NF- κ B mRNA和蛋白表达水平较A组均下降, 而肝Ghrelin mRNA的表达有所恢复, 同时可见胰腺及肝脏的病理改变减轻; 而肝脏的超氧化物歧化酶(super oxide dismutase, SOD)含量亦有恢复, 作为脂质过氧化程度指标的丙二醛(malonaldehyde, MDA)含量亦减少。分析原因可能有如下几个方面。首先, 炎性介质、细胞因子及氧自由基进入肝脏, 通过活化细胞内NF- κ B并致一系列炎症反应损伤肝细胞的同时, 还对在肝脏有少量分布的Ghrelin细胞有损害作用, 直接使后者Ghrelin mRNA的转录、翻译受到阻碍; 其次, 急性坏死性胰腺炎进展时, 胃肠黏膜亦可因细菌毒素及应激相关性损伤导致胃肠上皮受损, 可能使Ghrelin生成减少, 在肝脏的分布减少, 其对肝组织的保护作用显著减弱, 间接使分泌Ghrelin细胞的功能降低, mRNA合成减低; 再者, 炎症因子还可直接对Ghrelin细胞进行干扰。有实验证实外源性IL-1 β 可使大鼠胃Ghrelin mRNA表达显著下降^[24]。据此推测A组的肝脏Ghrelin mRNA表达下调也和在此聚集的大量细胞因子有关。Mel干预后, 通过下调NF- κ B活性, 发挥其抗炎抗氧化作用, 使得肝细胞及Ghrelin细胞损伤减轻, Ghrelin mRNA表达及SOD含量得以升高, MDA的形成得到控制。这一系列过程, 都与NF- κ B途径有关。研究表明外源性Ghrelin在急性胰腺炎过程中可以改善该脏器的血流灌注、抑制炎症因子产生、促进胰腺细胞增殖^[25-27]。因此, 本实验虽未给予外源性Ghrelin, 而是通过检测内源性Ghrelin在胰腺炎及Mel干预组的表达, 间接证明了Ghrelin的保护作用。由此我们想到, Ghrelin有降低细胞因子及炎性介质水平、氧自由基损

伤的作用, 那么在胰腺炎初期, Ghrelin的减少很可能使促炎与抗炎、氧化与抗氧化两个平衡缺少一个调控因素, 从而打破平衡, 致使病变进一步加重。

本研究证明: 急性胰腺炎并肝损伤时, 肝脏Ghrelin的表达下降; 外源性Mel可以减轻急性胰腺炎的胰腺和肝脏病变, 上调Ghrelin的表达水平。Ghrelin和Mel有可能通过共同的通路, 即下调NF- κ B的活性在胰腺炎肝损伤中发挥保护作用。Ghrelin、Mel和以NF- κ B为靶点的药物, 可成为今后胰腺炎治疗研究的一个方向。

4 参考文献

- 1 Kojima M, Kangawa K. Ghrelin: structure and function. *Physiol Rev* 2005; 85: 495-522
- 2 杜改梅, 刘茂军, 陈钟鸣. Ghrelin对大鼠胃黏膜上皮细胞胃酸分泌的调节作用. *世界华人消化杂志* 2009; 17: 3486-3490
- 3 Lee SH, Kim YD, Kong YH, Han KH, Jeong WJ, Lee SJ, Cheon GJ. The relevance of serum ghrelin concentration to severity of acute pancreatitis. *Gut Liver* 2010; 4: 234-240
- 4 Katergari SA, Milousis A, Pagonopoulou O, Asimakopoulou B, Nikolettos NK. Ghrelin in pathological conditions. *Endocr J* 2008; 55: 439-453
- 5 Rakonczay Z Jr, Hegyi P, Takács T, McCarroll J, Saluja AK. The role of NF-kappaB activation in the pathogenesis of acute pancreatitis. *Gut* 2008; 57: 259-267
- 6 赖铭裕, 梁志海, 唐国都, 孙学成. 腹腔注射左旋精氨酸诱导急性坏死性胰腺炎大鼠模型. *世界华人消化杂志* 2006; 14: 2233-2236
- 7 Kusske AM, Rongione AJ, Ashley SW, McFadden DW, Reber HA. Interleukin-10 prevents death in lethal necrotizing pancreatitis in mice. *Surgery* 1996; 120: 284-288; discussion 289
- 8 Schmidt J, Rattner DW, Lewandowski K, Compton CC, Mandavilli U, Knoefel WT, Warshaw AL. A better model of acute pancreatitis for evaluating therapy. *Ann Surg* 1992; 215: 44-56
- 9 Murr MM, Yang J, Fier A, Gallagher SF, Carter G, Gower WR Jr, Norman JG. Regulation of Kupffer cell TNF gene expression during experimental acute pancreatitis: the role of p38-MAPK, ERK1/2, SAPK/JNK, and NF-kappaB. *J Gastrointest Surg* 2003; 7: 20-25
- 10 Kojima M, Hosoda H, Date Y, Nakazato M, Matsuo H, Kangawa K. Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature* 1999; 402: 656-660
- 11 Date Y, Kojima M, Hosoda H, Sawaguchi A, Mondal MS, Suganuma T, Matsukura S, Kangawa K, Nakazato M. Ghrelin, a novel growth hormone-releasing acylated peptide, is synthesized in a distinct endocrine cell type in the gastrointestinal tracts of rats and humans. *Endocrinology* 2000; 141: 4255-4261
- 12 Broglio F, Prodam F, Riganti F, Gottero C, Deste-fanis S, Granata R, Muccioli G, Abribat T, van der Lely AJ, Ghigo E. The continuous infusion of acylated ghrelin enhances growth hormone secretion and worsens glucose metabolism in humans. *J Endocrinol Invest* 2008; 31: 788-794
- 13 Waseem T, Duxbury M, Ito H, Ashley SW, Robinson MK. Exogenous ghrelin modulates release of pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines in LPS-stimulated macrophages through distinct signaling pathways. *Surgery* 2008; 143: 334-342
- 14 Brzozowski T, Konturek PC, Sliwowski Z, Pajdo R, Drozdowicz D, Kwiecien S, Burnat G, Konturek SJ, Pawlik WW. Prostaglandin/cyclooxygenase pathway in ghrelin-induced gastroprotection against ischemia-reperfusion injury. *J Pharmacol Exp Ther* 2006; 319: 477-487
- 15 Konturek PC, Brzozowski T, Walter B, Burnat G, Hess T, Hahn EG, Konturek SJ. Ghrelin-induced gastroprotection against ischemia-reperfusion injury involves an activation of sensory afferent nerves and hyperemia mediated by nitric oxide. *Eur J Pharmacol* 2006; 536: 171-181
- 16 Rozov SV, Filatova EV, Orlov AA, Volkova AV, Zhloba AR, Blashko EL, Pozdeyev NV. N1-acetyl-N2-formyl-5-methoxykynuramine is a product of melatonin oxidation in rats. *J Pineal Res* 2003; 35: 245-250
- 17 Hong RT, Xu JM, Mei Q. Melatonin ameliorates experimental hepatic fibrosis induced by carbon tetrachloride in rats. *World J Gastroenterol* 2009; 15: 1452-1458
- 18 李燕舞, 宋宁, 王汝俊. 黄芪总苷对应激大鼠胃黏膜氧自由基及褪黑素受体的影响. *世界华人消化杂志* 2008; 16: 3321-3323
- 19 刘坤, 周薇, 李军华. 褪黑素对实验性溃疡性结肠炎大鼠肠组织趋化因子IL-8和MCP-1的影响. *世界华人消化杂志* 2008; 16: 1168-1172
- 20 钟卫一, 唐国都, 梁志海, 黄文福, 梁金仙, 王珺平. 褪黑素对大鼠急性坏死性胰腺炎的干预作用及机制. *世界华人消化杂志* 2009; 17: 2352-2356
- 21 Zhang XP, Jiang J, Yu YP, Cheng QH, Chen B. Effect of Danshen on apoptosis and NF-kB protein expression of the intestinal mucosa of rats with severe acute pancreatitis or obstructive jaundice. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2010; 9: 537-546
- 22 Li WG, Gavrilu D, Liu X, Wang L, Gunnlaugsson S, Stoll LL, McCormick ML, Sigmund CD, Tang C, Weintraub NL. Ghrelin inhibits proinflammatory responses and nuclear factor-kappaB activation in human endothelial cells. *Circulation* 2004; 109: 2221-2226
- 23 Ni Y, Wu JS, Fang PP, Wu XL, Sun XC, Jia GB, Zhang RZ. [Mechanism of liver injury in severe acute pancreatitis rats and role of melatonin]. *Zhonghua Yixue Zazhi* 2008; 88: 2867-2871
- 24 Asakawa A, Inui A, Kaga T, Yuzuriha H, Nagata T, Ueno N, Makino S, Fujimiya M, Nijima A, Fujino MA, Kasuga M. Ghrelin is an appetite-stimulatory signal from stomach with structural resemblance to motilin. *Gastroenterology* 2001; 120: 337-345
- 25 Warzecha Z, Ceranowicz P, Dembinski A, Cieszkowski J, Kusnierz-Cabala B, Tomaszewska R, Kuwahara A, Kato I. Therapeutic effect of ghrelin in the course of cerulein-induced acute pancreatitis in rats. *J Physiol Pharmacol* 2010; 61: 419-427
- 26 Sehirli O, Sener E, Sener G, Cetinel S, Erzik C, Yeğen BC. Ghrelin improves burn-induced multiple organ injury by depressing neutrophil infiltration

■同行评价

本文设计合理, 结果可靠, 为探讨Ghrelin及NF- κ B在急性坏死性胰腺炎并肝损伤中的作用奠定了实验基础。

and the release of pro-inflammatory cytokines. *Peptides* 2008; 29: 1231-1240

27 Daniel P, Leśniowski B, Jasińska A, Pietruczuk M,

Malecka-Panas E. Usefulness of assessing circulating levels of resistin, ghrelin, and IL-18 in alcoholic acute pancreatitis. *Dig Dis Sci* 2010; 55: 2982-2987

编辑 李薇 电编 李薇

ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) CN 14-1260/R 2011年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

《世界华人消化杂志》出版流程

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

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

第二步 审稿: 送审编辑对所有来稿进行课题查新, 并进行学术不端检测, 对不能通过预审的稿件直接退稿, 通过预审的稿件送交同行评议专家进行评议. 编辑部主任每周一组织定稿会, 评估审稿人意见, 对评审意见较高, 文章达到本刊发表要求的稿件送交总编辑签发拟接受, 对不能达到本刊发表要求的稿件退稿.

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

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

第五步 排版制作: 电子编辑对稿件基本情况进行核对, 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16 wk内完成. (编辑部主任: 李军亮 2010-01-18)

ERK1/2 siRNA干扰质粒对IGF-1诱导结肠平滑肌细胞产生干细胞因子的影响

袁玉丰, 余盈娟, 林琳

袁玉丰, 余盈娟, 林琳, 南京医科大学第一附属医院消化科
江苏省南京市 210029

袁玉丰, 在读硕士, 主要从事胃肠道动力性疾病方面的研究。

国家自然科学基金资助项目, No. 30971354

江苏省自然科学基金资助项目, No. BK2008466

作者贡献分布: 该课题由袁玉丰与林琳共同设计; 研究过程由袁玉丰操作完成; 研究所用试剂及分析工具由袁玉丰提供; 数据分析由袁玉丰与余盈娟完成; 论文撰写由袁玉丰完成; 林琳协助课题设计并修改论文。

通讯作者: 林琳, 教授, 210029, 江苏省南京市广州路300号, 南京医科大学第一附属医院消化科. lin9100@yahoo.com.cn

收稿日期: 2010-11-24 修回日期: 2011-01-04

接受日期: 2011-01-11 在线出版日期: 2011-02-28

Transfection with siRNA against ERK1/2 inhibits IGF-1-induced stem cell factor expression in colonic smooth muscle cells

Yu-Feng Yuan, Ying-Juan Yu, Lin Lin

Yu-Feng Yuan, Ying-Juan Yu, Lin Lin, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210029, Jiangsu Province, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30971354; and the Natural Science Foundation of Jiangsu Province, No. BK2008466

Correspondence to: Professor Lin Lin, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, 300 Guangzhou Road, Nanjing 210029, Jiangsu Province, China. lin9100@yahoo.com.cn

Received: 2010-11-24 Revised: 2011-01-04

Accepted: 2011-01-11 Published online: 2011-02-28

Abstract

AIM: To investigate how insulin-like growth factor-1 (IGF-1) regulates the expression of stem cell factor (SCF) in colonic smooth muscle cells (SMCs).

METHODS: After rat colonic SMCs were treated with different concentrations of IGF-1 (0, 50, 100, 150 $\mu\text{g/L}$) for different durations (0, 5, 15, 30, 45, 60 min), the levels of phosphorylated ERK1/2 and SCF were determined by RT-PCR and Western blot. Rat colonic SMCs were then transfected with siRNA against ERK1/2 to examine the impact of ERK1/2 down-regulation on IGF-1-induced SCF expression.

RESULTS: After treatment with IGF-1, the level of phosphorylated ERK1/2 in colonic SMCs reached a peak at about 15 min (0.417 ± 0.036 vs 0.101 ± 0.015 ; $P < 0.05$). The optimal concentration of IGF-1 to induce the expression of phosphorylated ERK1/2 and SCF was 100 $\mu\text{g/L}$ (0.790 ± 0.051 vs 0.336 ± 0.013 ; 0.765 ± 0.061 vs 0.289 ± 0.021 , both $P < 0.05$). After treatment with IGF-1, the expression levels of phosphorylated ERK1/2, total ERK1/2, and SCF in colonic SMCs transfected with siRNA against ERK1/2 were lower than those in the control group (0.284 ± 0.021 vs 0.732 ± 0.005 ; 0.256 ± 0.015 vs 0.712 ± 0.023 ; 0.219 ± 0.020 vs 0.673 ± 0.013 ; 0.621 ± 0.027 vs 1.725 ± 0.012 ; 0.821 ± 0.019 vs 1.751 ± 0.043 ; 0.275 ± 0.061 vs 0.531 ± 0.047 ; all $P < 0.05$).

CONCLUSION: IGF-1 treatment up-regulated the expression of phosphorylated ERK1/2 and SCF in colonic SMCs, while transfection with siRNA against ERK1/2 down-regulated IGF-1-induced expression of phosphorylated ERK1/2 and SCF, suggesting that the ERK/MAPK pathway may be involved in IGF-1-induced expression of phosphorylated ERK1/2 and SCF.

Key Words: ERK1/2; Transfection; Insulin-like growth factor-1; Colonic smooth muscle cell; Stem cell factor

Yuan YF, Yu YJ, Lin L. Transfection with siRNA against ERK1/2 inhibits IGF-1-induced stem cell factor expression in colonic smooth muscle cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(6): 575-580

摘要

目的: 探讨IGF-1诱导的大鼠结肠平滑肌细胞(SMC)产生干细胞因子(SCF)的信号途径。

方法: 以不同时间(0, 5, 15, 30, 45, 60 min)、不同浓度(0, 50, 100, 150 $\mu\text{g/L}$)的IGF-1诱导结肠SMC; 以ERK1/2 siRNA干扰质粒转染大鼠结肠SMC, RT-PCR及Western blot检测IGF-1诱导下结肠SMC产生ERK1/2及SCF的变化。

结果: 在15 min时IGF-1诱导结肠SMC表达

■背景资料

胃肠动力障碍性疾病与胃肠道Cajal间质细胞(ICC)的缺失或病变有关, 干细胞因子(SCF)作为ICC生长、功能及表型维持的主要调控因子, 是影响ICC数量和超微结构改变的直接原因。

■同行评议者

王钦红, 副教授, 美国杜克大学医学院肿瘤生物系

■ 研究前沿

尽管已知IGF-1在多种细胞的增殖分化过程中扮演着重要角色,但在胃肠道SMC中的具体作用机制尚不清楚。

磷酸化ERK1/2最强(0.417 ± 0.036 vs 0.101 ± 0.015 , $P < 0.05$)。在100 $\mu\text{g/L}$ 作用15 min时磷酸化ERK1/2和SCF表达最强(0.790 ± 0.051 vs 0.336 ± 0.013 ; 0.765 ± 0.061 vs 0.289 ± 0.021 , 均 $P < 0.05$)。在IGF-1诱导下,转染入ERK1/2 siRNA的结肠SMC产生的p-ERK1/2、t-ERK1/2及SCF较对照组明显降低(0.284 ± 0.021 vs 0.732 ± 0.005 ; 0.256 ± 0.015 vs 0.712 ± 0.023 ; 0.219 ± 0.020 vs 0.673 ± 0.013 ; 0.621 ± 0.027 vs 1.725 ± 0.012 ; 0.821 ± 0.019 vs 1.751 ± 0.043 ; 0.275 ± 0.061 vs 0.531 ± 0.047 ; 均 $P < 0.05$)。

结论: IGF-1可以使结肠SMC表达磷酸化ERK1/2和SCF增加。ERK1/2 siRNA可使ERK1/2和结肠SMC产生的SCF明显降低,从而证实IGF-1促进大鼠结肠SMC产生SCF是通过ERKMAPK通路。

关键词: ERK1/2; 转染; 胰岛素样生长因子1; 结肠平滑肌细胞; 干细胞因子

袁玉丰, 余盈娟, 林琳. ERK1/2 siRNA干扰质粒对IGF-1诱导结肠平滑肌细胞产生干细胞因子的影响. 世界华人消化杂志 2011; 19(6): 575-580

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/575.asp>

0 引言

胃肠动力障碍性疾病与胃肠道Cajal间质细胞(interstitial cells of Cajal, ICC)的缺失或病变有关,干细胞因子(stem cell factor, SCF)作为ICC生长、功能及表型维持的主要调控因子,是影响ICC数量和超微结构改变的直接原因。研究发现,胰岛素样生长因子1(insulin-like growth factor 1, IGF-1)可调控胃平滑肌细胞(smooth muscle cell, SMC)合成SCF,进而对胃ICC有保护作用^[1]。我们前期实验发现,IGF-1能促进体外培养的胃和结肠SMC合成SCF,呈浓度和时间依赖性^[2-4];且在细胞水平发现胃结肠SMC该作用是通过ERKMAPK通路完成的^[3,4]。本实验从基因水平进一步证实IGF-1诱导大鼠结肠SMC表达SCF的信号通路。

1 材料和方法

1.1 材料 ERK1/2 siRNA由Invitrogen公司合成,序列参照文献[5], ERK1/2 siRNA序列为: 5'-GCCGCCGCCGCCGCCAT-3',与MAPK mRNA翻译起始部位的17个碱基序列互补;随机核苷酸序列: 5'-CGCGCGCTCGCGCACCC-3'。SD大鼠,雌雄不拘,体质量180-200 g(南京医

科大学动物中心提供)。DMEM培养液、胎牛血清(Gibco公司);大豆胰蛋白酶抑制剂(Gibco, USA); II型胶原酶(Sigma公司);重组大鼠IGF-1(R&D, UK); SCF抗体(Santa Cruz, USA); phospho-p44/42 MAPK抗体、p44/42 MAPK抗体(CST, USA)。

1.2 方法

1.2.1 结肠SMC的分离和培养: SD大鼠断椎处死,快速取自肛门上2 cm至回盲部的全部结肠,含抗生素的缓冲液反复漂洗、仔细剥离黏膜层和浆膜层。将平滑肌组织减碎匀浆,置入消化液(0.1%的II型胶原酶和0.01%的大豆胰蛋白酶抑制剂)中,30 $^{\circ}\text{C}$ 消化20 min,1 000 r/min离心5 min、弃消化液,反复2次,加入含100 mL/L胎牛血清的DMEM培养液终止消化,1 000 r/min离心5 min,DMEM培养液重悬细胞、过筛、50 mL/L CO_2 、37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育箱中培养,SMC长至致密单层时,传代培养。用3-5代SMC进行实验。

1.2.2 转染: 按FuGENE[®]步骤进行操作: (1)将状态良好、处于对数生长期的SMC用2.5 g/L胰酶、完全培养基悬浮成单细胞悬液,按照每孔 $3-6 \times 10^6$ 个细胞接种于6孔板中; (2)补充完全培养液至2 mL,细胞生长稳定且细胞贴壁覆盖率70%-80%左右时,进行转染实验; (3)用100 μL 无血清DMEM培养液稀释2 μg 质粒; (4)震荡混悬FuGENE[®],将6 μL FuGENE[®]加入质粒稀释液; (5)充分混合,室温孵育15 min; (6)将质粒复合物缓慢加入各培养皿中(加有2 mL不含抗生素的完全培养液)、混匀、置于37 $^{\circ}\text{C}$ 、50 mL/L的 CO_2 培养箱中培养; (7)第2天观察转染效率,培养48 h。

1.2.3 分组: SMC+IGF-1(100 $\mu\text{g/L}$)^[3],分别培养0, 5, 15, 30, 45, 60 min。不同浓度组: SMC+IGF-1(0, 50, 100, 150 $\mu\text{g/L}$)培养15 min。转染组: 将结肠SMC分为对照组、反义组(加入ERK1/2 siRNA)、随机组(加入随机核苷酸),培养48 h,再加入100 $\mu\text{g/L}$ IGF-1培养16 h。以上实验重复3次。

1.2.4 RP-PCR法检测总ERK1、ERK2和SCF mRNA: 按TRIzol试剂提取各组细胞的总mRNA,以cDNA为模板进行PCR扩增。 (1)SCF和内参GAPDH的循环条件: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性5 min、94 $^{\circ}\text{C}$ 变性15 s、55 $^{\circ}\text{C}$ 退火30 s、72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸15 s、共循环30次,最后于72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸8 min。SCF上游引物: 5'-TTC GCT TGT AAT TGG CTT TGC-3'; 下游引物: 5'-CAA CTG CCC TTG TAA GAC TTG CA-3'(76 bp)。GAPDH上游引物: 5'-CCC CCA ATG TAT CCG TTG TG-3'; 下游引物: 5'-TAG

表 1 IGF-1(100 μ g/L)诱导结肠SMC对p-ERK1/2和t-ERK1/2蛋白的影响 (mean \pm SD)

分组	p-ERK1/2	t-ERK1/2
0 min	0.101 \pm 0.015 ^c	0.132 \pm 0.021
5 min	0.214 \pm 0.019 ^c	0.135 \pm 0.017
15 min	0.417 \pm 0.036 ^a	0.134 \pm 0.026
30 min	0.306 \pm 0.023 ^c	0.136 \pm 0.019
45 min	0.293 \pm 0.041 ^c	0.134 \pm 0.013
60 min	0.209 \pm 0.053 ^c	0.136 \pm 0.031

^a $P < 0.05$ vs 0 min; ^c $P < 0.05$ vs 15 min.

CCC AGG ATG CCC TTT AGT-3'(118 bp). (2)ERK1/2循环条件: 94 $^{\circ}$ C预变性5 min、94 $^{\circ}$ C变性30 s、58 $^{\circ}$ C退火30 s、72 $^{\circ}$ C延伸30 s、共循环30次, 最后于72 $^{\circ}$ C延伸7 min. ERK1上游引物: 5'-TAC ACG CAG TTG CAG TAC ATC G-3'; 下游引物: 5'-CGC AGG ATC TGG TAG AGG AAG T-3'(332 bp); ERK2上游引物5'-GGA GCT TGT GGA AAT ACC TTG G-3'; 下游引物: 5'-GAC GCA GTG TTC CTC TCT GCT A-3'(499 bp)^[6]. PCR产物经2%琼脂糖凝胶电泳、观察、拍照.

1.2.5 Western bolt法检测SMC中的p-ERK1/2、t-ERK1/2和SCF蛋白: 蛋白裂解液提取各组细胞蛋白, BCA法测定蛋白浓度. 40 μ g蛋白/泳道加样, 恒流30 mA电泳, 恒压100 V转膜60 min, 封闭2 h. 分别加入p-ERK1/2、t-ERK1/2和SCF一抗, 4 $^{\circ}$ C过夜; 二抗1:5 000, 37 $^{\circ}$ C孵育, 曝光、显影.

统计学处理 所有数据录入SPSS10.0软件包分析, 以mean \pm SD表示, 采用方差分析和成组 t 检验, $P < 0.05$ 为有显著性差异.

2 结果

2.1 IGF-1诱导结肠SMC不同时间对p-ERK1/2和t-ERK1/2蛋白的影响 IGF-1(100 μ g/L)作用于结肠SMC 5 min后p-ERK1/2表达开始增高, 15 min时表达最高($P < 0.05$), 之后逐渐降低, 但t-ERK1/2蛋白的表达无变化($P > 0.05$, 表1, 图1).

2.2 不同浓度IGF-1诱导结肠SMC对p-ERK1/2、t-ERK1/2和SCF蛋白的影响 IGF-1在50 μ g/L时, p-ERK1/2和SCF表达开始增加($P < 0.05$), 在100 μ g/L时表达最多($P < 0.05$), 之后逐渐下降, 但t-ERK1/2没有变化($P > 0.05$, 表2, 图2).

2.3 IGF-1对于转染ERK1/2 siRNA的结肠SMC产生p-ERK1/2、t-ERK1/2的影响 与对照组相比, 反义组结肠SMC产生p-ERK1/2、t-ERK1/2显著降低($P < 0.05$), 随机组无显著变化($P > 0.05$, 表3,

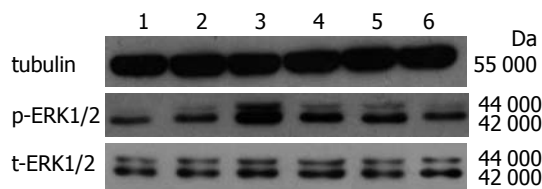


图 1 100 μ g/L的IGF-1作用于结肠SMC对p-ERK1/2蛋白的影响. 1: 0 min; 2: 5 min; 3: 15 min; 4: 30 min; 5: 45 min; 6: 60 min.

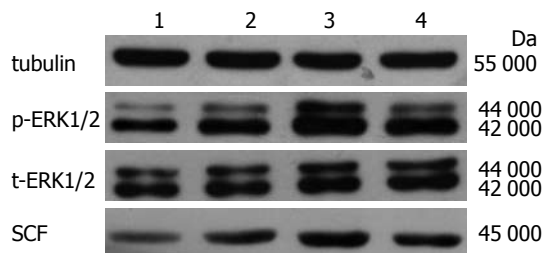


图 2 不同浓度IGF-1对结肠SMC中p-ERK1/2和SCF蛋白的影响. 1: 0 μ g/L; 2: 50 μ g/L; 3: 100 μ g/L; 4: 150 μ g/L.

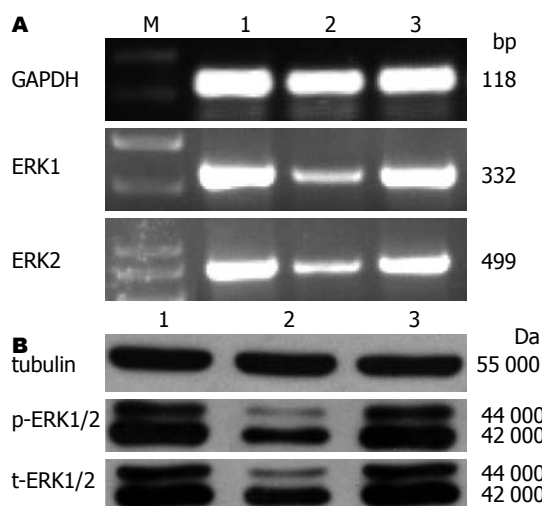


图 3 IGF-1对于转染ERK1/2 siRNA的结肠SMC产生p-ERK1/2和SCF的影响. A: mRNA; B: 蛋白; M: 100 bp DNA标记; 1: 正常组; 2: 反义组; 3: 随机组.

图3), 说明ERK1/2 siRNA确实降低了ERK1/2的表达.

2.4 IGF-1对转染ERK1/2 siRNA的结肠SMC产生SCF的影响 与对照组相比, 反义组结肠SMC产生SCF显著降低($P < 0.05$), 随机组无显著变化($P > 0.05$, 表3, 图4).

3 讨论

胃肠动力障碍是消化科常见症候群(包括糖尿病胃肠动力障碍), 严重影响患者的生活质量, 其机制尚不清楚. ICC是一类起源于间充质的特殊细胞群, 以网状结构分布于消化系肠神经末梢和平滑肌细胞之间; ICC、肠神经细胞和SMC构成

■相关报道

Horvath等将糖尿病小鼠胃窦和胃体组织给予IGF-1, 可完全阻止ICC的减少, 提示IGF-1可能刺激平滑肌细胞表达干细胞因子, 进而对ICC起保护作用. 宁月季等在细胞水平用IGF-1刺激大鼠胃和结肠SMC, 发现IGF-1通过ERK/MAPK通路刺激SMC产生SCF.

■创新盘点

本研究首次应用RNA干扰技术对结肠SMC进行干预,结果证实了IGF-1调控SMC产生SCF的信号通路。

表 2 IGF-1诱导结肠SMC对p-ERK1/2、t-ERK1/2和SCF蛋白的影响 (mean ± SD)

IGF-1(μg/L)	p-ERK1/2	t-ERK1/2	SCF
0	0.336 ± 0.013	0.409 ± 0.021	0.289 ± 0.021
50	0.554 ± 0.046 ^a	0.410 ± 0.012	0.391 ± 0.017 ^a
100	0.790 ± 0.051 ^{ce}	0.411 ± 0.013	0.654 ± 0.061 ^{ce}
150	0.591 ± 0.029 ^a	0.408 ± 0.043	0.498 ± 0.043 ^a

^a*P*<0.05 vs IGF-1(0 μg/L); ^c*P*<0.05 vs IGF-1(50 μg/L); ^e*P*<0.05 vs IGF-1(150 μg/L)。

表 3 IGF-1对转染ERK1/2 siRNA的结肠SMC产生p-ERK1/2、t-ERK1/2和SCF mRNA及蛋白的影响 (mean ± SD)

分组	mRNA			蛋白		
	ERK1	ERK2	SCF	p-ERK1/2	t-ERK1/2	SCF
对照组	0.732 ± 0.005	0.712 ± 0.023	0.673 ± 0.013	1.725 ± 0.012	1.751 ± 0.043	0.531 ± 0.047
反义组	0.284 ± 0.021 ^{ac}	0.256 ± 0.015 ^{ac}	0.219 ± 0.020 ^{ac}	0.621 ± 0.027 ^{ac}	0.821 ± 0.019 ^{ac}	0.275 ± 0.061 ^{ac}
随机组	0.721 ± 0.037	0.725 ± 0.037	0.669 ± 0.027	1.754 ± 0.041	1.847 ± 0.011	0.542 ± 0.037

^a*P*<0.05 vs 对照组; ^c*P*<0.05 vs 随机组。

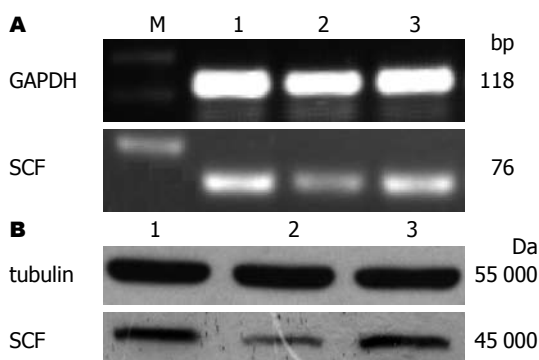


图 4 IGF-1对于转染ERK1/2 siRNA的结肠SMC产生SCF的影响. A: mRNA; B: 蛋白; M: 100 bp DNA标记; 1: 对照组; 2: 反义组; 3: 随机组。

“功能元件”,共同调控胃肠道的各种生理功能^[7,8]。近年随着对胃肠道ICC结构、功能及其胃肠运动调控机制的深入研究,已经证实ICC数量和结构异常与多种胃肠疾病相关^[9-14]。

SCF是一种多功能细胞生长因子,包括可溶型干细胞因子(soluble stem cell factor, s-SCF)和膜结合型干细胞因子(membrane-bound stem cell factor, m-SCF),两者都有生物学活性,在多种细胞的增殖、分化和迁移过程中发挥重要的调控作用。研究发现,人体SCF可由多种细胞产生,但维持胃肠ICC所需的SCF来源于胃肠SMC^[1]。SCF与其天然配体c-Kit组成SCF-Kit系统,直接参与ICC的分化、发育、增殖、表型维持等过程^[15-18]。我们的前期实验发现,SCF减少与胃肠ICC病变及胃肠运动障碍有直接关系,给予外源性SCF可

明显改善糖尿病模型鼠胃肠ICC及胃肠运动异常^[16,19-20],另外前期实验还提示,体外培养胃和结肠SMC,给予IGF-1可促进SCF表达^[2-4]。

IGF-1是胰岛素样生长因子家族中的一员,具有促进细胞增殖和分化,调节细胞周期,加速细胞物质代谢,抑制细胞凋亡等功能^[21]。IGF-1的信号转导途径主要为PI3K途径和MAPK途径^[22]。文献报道,IGF-1可使SMC表面的IGF-1 R磷酸化,进而激活细胞内下游的信号通路,主要通过PI3K、MAPK信号转导通路,以协同或分别或以相反的作用方式,参与IGF-1介导的细胞增殖、分化、抗凋亡等效应^[23]。丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)是细胞内的一类丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,该家族主要包括细胞外信号调节蛋白激酶(extracellular regulating kinase, ERK)、c-Jun氨基末端激酶和P38蛋白激酶^[24,25],他将细胞外刺激信号转导至细胞内及细胞核内,引起细胞一系列生物学反应如细胞增殖、分化、转化及凋亡^[26,27]。ERK通路是迄今研究较多、备受关注的重要MAPK信号通路。在细胞中各种因素^[28,29]激活ERK1/2后,活化的ERK1/2激酶移位到细胞核,调控信号转导途径的关键效应分子(如NF-κB、AP-1、c-Myc等)的表达,在细胞的增殖中起重要作用^[30,31]。我们前期实验将ERKMAPK的抑制剂PD98059加入结肠SMC、使IGF-1诱导的SCF表达降低,提示IGF-1是通过ERKMAPK通路诱导结肠SMC产生SCF^[2-4]。本实验向结肠SMC转染ERK siRNA

使p-ERK1/2、总ERK1/2和SCF表达均降低(包括mRNA和蛋白),说明干扰成功,进而从基因水平证实IGF-1诱导结肠SMC产生SCF确实通过ERKMAPK通路。

总之,本实验从基因水平证实IGF-1诱导结肠SMC产生SCF的信号通路,为进一步探讨SCF的调控、合成、保护胃肠ICC及其信号途径和影响因素提供了可靠的实验依据,有利于进一步探讨胃肠ICC在胃肠动力障碍性疾病中的作用、为开发新的治疗药物拓展了思路。

4 参考文献

- Horváth VJ, Vittal H, Lőrincz A, Chen H, Almeida-Porada G, Redelman D, Ordög T. Reduced stem cell factor links smooth myopathy and loss of interstitial cells of cajal in murine diabetic gastroparesis. *Gastroenterology* 2006; 130: 759-770
- 宁月季, 张蔚, 成家飞, 李学良, 王美峰, 林琳. 胰岛素样生长因子1对大鼠结肠平滑肌细胞中干细胞因子表达的影响. *世界华人消化杂志* 2009; 17: 3502-3506
- 宁月季, 张蔚, 成家飞, 李学良, 王美峰, 林琳. 胰岛素样生长因子1调节胃平滑肌细胞表达干细胞因子的ERKMAPK通路. *中华医学杂志* 2010; 90: 2402-2406
- 宁月季, 张蔚, 李慧, 成家飞, 李学良, 林琳. 胰岛素样生长因子1对结肠平滑肌细胞产生干细胞因子的调控. *中华消化杂志* 2010; 30: 241-245
- Glennon PE, Kaddoura S, Sale EM, Sale GJ, Fuller SJ, Sugden PH. Depletion of mitogen-activated protein kinase using an antisense oligodeoxynucleotide approach downregulates the phenylephrine-induced hypertrophic response in rat cardiac myocytes. *Circ Res* 1996; 78: 954-961
- 葛金华, 朱月永, 刘豫瑞, 江家冀, 董蓓. siRNA降低COX-2基因表达对肝癌细胞系HepG2增殖的影响. *世界华人消化杂志* 2009; 17: 2244-2250
- Kito Y, Ward SM, Sanders KM. Pacemaker potentials generated by interstitial cells of Cajal in the murine intestine. *Am J Physiol Cell Physiol* 2005; 288: C710-C720
- Wang XY, Sanders KM, Ward SM. Intimate relationship between interstitial cells of cajal and enteric nerves in the guinea-pig small intestine. *Cell Tissue Res* 1999; 295: 247-256
- Nakahara M, Isozaki K, Hirota S, Vanderwinden JM, Takakura R, Kinoshita K, Miyagawa J, Chen H, Miyazaki Y, Kiyohara T, Shinomura Y, Matsuzawa Y. Deficiency of KIT-positive cells in the colon of patients with diabetes mellitus. *J Gastroenterol Hepatol* 2002; 17: 666-670
- Battaglia E, Bassotti G, Bellone G, Dughera L, Serra AM, Chiusa L, Repici A, Mioli P, Emanuelli G. Loss of interstitial cells of Cajal network in severe idiopathic gastroparesis. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 6172-6177
- Ward SM, Sanders KM. Physiology and pathophysiology of the interstitial cell of Cajal: from bench to bedside. I. Functional development and plasticity of interstitial cells of Cajal networks. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2001; 281: G602-G611
- Piotrowska AP, Solari V, Puri P. Distribution of interstitial cells of Cajal in the internal anal sphincter of patients with internal anal sphincter achalasia and Hirschsprung disease. *Arch Pathol Lab Med* 2003; 127: 1192-1195
- Sperelakis N, Daniel EE. Activation of intestinal smooth muscle cells by interstitial cells of Cajal in simulation studies. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2004; 286: G234-G243
- Forster J, Damjanov I, Lin Z, Sarosiek I, Wetzel P, McCallum RW. Absence of the interstitial cells of Cajal in patients with gastroparesis and correlation with clinical findings. *J Gastrointest Surg* 2005; 9: 102-108
- Ward SM, Ordög T, Bayguinov JR, Horowitz B, Epperson A, Shen L, Westphal H, Sanders KM. Development of interstitial cells of Cajal and pacemaking in mice lacking enteric nerves. *Gastroenterology* 1999; 117: 584-594
- 徐丽明, 林琳, 汤玉蓉, 张红杰, 李学良. 干细胞因子对糖尿病结肠Cajal间质细胞的影响. *中华消化杂志* 2008; 28: 388-391
- 徐丽明, 林琳, 汤玉蓉, 张红杰, 李学良. 干细胞因子对糖尿病小鼠结肠Cajal间质细胞的干预效应. *世界华人消化杂志* 2008; 16: 1294-1298
- Sanders KM, Ward SM. Interstitial cells of Cajal: a new perspective on smooth muscle function. *J Physiol* 2006; 576: 721-726
- 罗云, 林琳, 张红杰, 李学良, 吴高珏, 王美峰. 糖尿病慢传输运动结肠Cajal间质细胞和干细胞因子的变化. *世界华人消化杂志* 2007; 15: 458-463
- 徐丽明, 林琳, 罗云, 吴高珏, 汤玉蓉, 张红杰, 李学良. 糖尿病结肠动力障碍时Cajal间质细胞和干细胞因子的变化以及胰岛素的干预效应. *胃肠病学* 2008; 13: 200-204
- Ji RR, Suter MR. p38 MAPK, microglial signaling, and neuropathic pain. *Mol Pain* 2007; 3: 33
- Lim HJ, Park HY, Ko YG, Lee SH, Cho SY, Lee EJ, Jameson JL, Jang Y. Dominant negative insulin-like growth factor-1 receptor inhibits neointimal formation through suppression of vascular smooth muscle cell migration and proliferation, and induction of apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 325: 1106-1114
- Dupont J, Dunn SE, Barrett JC, LeRoith D. Microarray analysis and identification of novel molecules involved in insulin-like growth factor-1 receptor signaling and gene expression. *Recent Prog Horm Res* 2003; 58: 325-342
- Johnson GL, Lapadat R. Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. *Science* 2002; 298: 1911-1912
- Bobick BE, Kulyk WM. Regulation of cartilage formation and maturation by mitogen-activated protein kinase signaling. *Birth Defects Res C Embryo Today* 2008; 84: 131-154
- Dinev D, Jordan BW, Neufeld B, Lee JD, Lindemann D, Rapp UR, Ludwig S. Extracellular signal regulated kinase 5 (ERK5) is required for the differentiation of muscle cells. *EMBO Rep* 2001; 2: 829-834
- Yu W, Liao QY, Hantash FM, Sanders BG, Kline K. Activation of extracellular signal-regulated kinase and c-Jun-NH(2)-terminal kinase but not p38 mitogen-activated protein kinases is required for RRR-alpha-tocopheryl succinate-induced apoptosis of human breast cancer cells. *Cancer Res* 2001; 61: 6569-6576
- Chang F, Steelman LS, Lee JT, Shelton JG, Navolanic PM, Blalock WL, Franklin RA, McCubrey JA. Signal transduction mediated by the Ras/Raf/MEK/ERK pathway from cytokine receptors to transcription factors: potential targeting for therapeutic interven-

■应用要点

IGF-1通过ERK-PAPK通路刺激结肠SMC表达SCF,从而对ICC起调控作用,从而为临床治疗胃肠动力障碍性疾病提供了新的理论依据。

■同行评价

本文新颖性较好,为更好地理解IGF-1调控SCF产生的机制提供实验理论基础。

- tion. *Leukemia* 2003; 17: 1263-1293
- 29 Reddy KB, Nabha SM, Atanaskova N. Role of MAP kinase in tumor progression and invasion. *Cancer Metastasis Rev* 2003; 22: 395-403
- 30 Raviv Z, Kalie E, Seger R. MEK5 and ERK5 are localized in the nuclei of resting as well as stimulated cells, while MEKK2 translocates from the cytosol to the nucleus upon stimulation. *J Cell Sci* 2004; 117: 1773-1784
- 31 Da Silva CA, Heilbock C, Kassel O, Frossard N. Transcription of stem cell factor (SCF) is potentiated by glucocorticoids and interleukin-1beta through concerted regulation of a GRE-like and an NF-kappaB response element. *FASEB J* 2003; 17: 2334-2336

编辑 李薇 电编 何基才

ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) CN 14-1260/R 2011年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

《世界华人消化杂志》修回稿须知

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

1 修回稿信件

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

2 稿件修改

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

3 版权

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

健脾为基础的复方辨证治疗对胃癌根治术后无病生存期的影响

孙姗姗, 赵爱光, 杨金坤, 赵刚, 蔡泳, 李朝燕

孙姗姗, 赵爱光, 杨金坤, 李朝燕, 上海中医药大学附属龙华医院肿瘤一科 上海市 200032
赵刚, 上海交通大学医学院附属仁济医院普外科 上海市 200127
蔡泳, 上海交通大学公共卫生学院预防医学教研室 上海市 200025
孙姗姗, 在读博士, 主要从事胃癌中西医结合治疗的临床研究。
民政部基金资助项目, No. (2007)18-2-15
上海市重点学科建设项目基金资助项目, No. Y0302
作者贡献分布: 病例收集、随访、统计分析及撰写文章由孙姗姗完成; 课题试验方案设计、中西医治疗方案制订、数据审核、文章修改由赵爱光与杨金坤完成; 试验方案设计及统计分析由蔡泳协助完成; 病例收集及随访由赵刚与李朝燕协助完成。
通讯作者: 赵爱光, 200032, 上海市徐汇区宛平南路725号, 上海中医药大学附属龙华医院肿瘤一科, aiguang@hotmail.com
电话: 021-64385700-3722 传真: 021-64398310
收稿日期: 2010-11-02 修回日期: 2010-12-09
接受日期: 2010-12-21 在线出版日期: 2011-02-28

Effect of treatment with a Jianpi herbal formula on disease-free survival in patients with gastric cancer after radical gastrectomy

Shan-Shan Sun, Ai-Guang Zhao, Jin-Kun Yang, Gang Zhao, Yong Cai, Zhao-Yan Li

Shan-Shan Sun, Ai-Guang Zhao, Jin-Kun Yang, Zhao-Yan Li, Department of Oncology, Longhua Hospital, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200032, China
Gang Zhao, Department of Surgery, Renji Hospital, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200127, China
Yong Cai, Department of Preventive Medicine, School of Public Health, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200025, China
Supported by: the Foundation of Ministry of Civil Affairs, No. (2007)18-2-15; and the Shanghai Key Discipline Construction Foundation, No. Y0302
Correspondence to: Ai-Guang Zhao, Department of Oncology, Longhua Hospital, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, 725 South Wanping Road, Xuhui District, Shanghai 200032, China. aiguang@hotmail.com
Received: 2010-11-02 Revised: 2010-12-09
Accepted: 2010-12-21 Published online: 2011-02-28

Abstract

AIM: To investigate the effect of treatment with a Jianpi herbal formula on disease-free survival (DFS) in patients with gastric cancer after radical gastrectomy.

METHODS: A total of 474 gastric cancer patients after radical gastrectomy were assigned to treatment group ($n = 196$; undergoing treatment with the Jianpi herbal formula and chemotherapy) and control group ($n = 278$; undergoing chemotherapy only). Independent factors influencing DFS in gastric cancer patients after radical gastrectomy were analyzed using the Kaplan-Meier method and Cox proportional hazards model. A stratified analysis was performed by clinicopathologic stage.

RESULTS: Cox analysis showed that clinicopathologic stage ($P = 0.000$) and treatment with the Jianpi herbal formula ($P = 0.000$) were independent factors influencing DFS in gastric cancer patients after radical gastrectomy. Stratified analysis indicated that treatment with the Jianpi herbal formula was an independent factor influencing DFS in patients with stage IV (M0) gastric cancer after radical gastrectomy ($P = 0.034$). Patients of the treatment group had a significantly longer DFS than those of the control group (39.78 mo vs 18.38 mo, $P = 0.023$). Treatment with the Jianpi herbal formula was also an independent factor influencing DFS in patients with stage III gastric cancer after radical gastrectomy ($P = 0.000$). The 1-, 3-, and 5-year DFS rates were significantly higher in the treatment group than in the control group (94% vs 82%, 76% vs 47%, 67% vs 39%).

CONCLUSION: Treatment with the Jianpi herbal formula can prolong DFS in stages III and IV (M0) gastric cancer patients after radical gastrectomy.

Key Words: Gastric cancer; Chinese Medicine; Metastasis and recurrence; Disease-free survival

Sun SS, Zhao AG, Yang JK, Zhao G, Cai Y, Li ZY. Effect of treatment with a Jianpi herbal formula on disease-free survival in patients with gastric cancer after radical gastrectomy. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(6): 581-587

摘要

目的: 研究健脾为基础的中药复方辨证治疗对

■背景资料

近年来,胃癌发病率及死亡率呈上升趋势,目前外科根治性手术被认为是唯一有可能获得治愈胃癌的方法。但日本的统计数据表明,术后复发率仍高达20%,美国根治术后仍有60%患者会出现局部复发或远处转移。

■同行评议者

魏睦新,教授,南京医科大学第一附属医院中西医结合科

■相关报道

文献报道及本课题组多年的临床和实验研究健脾表明,基础中药对胃癌术后患者的复发转移有防治作用。

胃癌根治术后患者无病生存期(DFS)的影响。

方法:采用非随机同期对照研究的方法,将胃癌根治术后病例分别纳入中药组(中药+化疗)和对照组(单纯化疗),采用Kaplan-Meier法和Cox比例风险模型对影响胃癌根治术后DFS的相关影响因素进行单因素和多因素分析,并根据临床病理分期进行进一步分层分析。

结果:共入组病例474例,中药组196例,对照组278例。Cox分析显示临床病理分期($P = 0.000$)和中药治疗($P = 0.000$)是胃癌根治术后DFS的独立影响因素。对I-IV(M0)期进行分层研究显示,中药治疗是IV期胃癌根治术后DFS的独立影响因素($P = 0.034$),中药组的DFS较对照组长(39.78 mo vs 18.38 mo, $P = 0.023$);中药治疗是III期胃癌根治术后DFS的独立影响因素($P = 0.000$),中药组1、3、5年无病生存率分别为:94%、76%、67%,对照组分别为:82%、47%、39%。

结论:以健脾为基础的中药复方辨证治疗能延长IV(M0)期胃癌根治术后中位DFS。健脾为基础的中药复方辨证治疗可延长III期胃癌根治术后患者DFS。

关键词:胃肿瘤;中药;复发转移;无病生存期

孙姗姗, 赵爱光, 杨金坤, 赵刚, 蔡泳, 李朝燕. 健脾为基础的复方辨证治疗对胃癌根治术后无病生存期的影响. 世界华人消化杂志 2011; 19(6): 581-587

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/581.asp>

0 引言

近年来,胃癌发病率及死亡率呈上升趋势^[1,2],目前外科根治性手术被认为是唯一有可能获得治愈胃癌的方法。但日本的统计数据表明,术后复发率仍高达20%,美国根治术后仍有60%患者会出现局部复发或远处转移^[3]。国外文献对根治术后治疗方案延长无病生存期(disease-free survival, DFS)的报道不甚明确^[4-9],我们的前期研究^[10-12]显示,中医药在延长无病生存期,改善生存质量等方面具有一定的作用。本文将采用非随机同期对照研究的设计^[13-15],以DFS为主要疗效指标,采用Log-rank单因素、Cox多因素回归方法,评价健脾为基础的复方对胃癌患者DFS影响作用。

1 材料和方法

1.1 材料 2001-01-01/2008-12-31在上海中医药大

学附属龙华医院肿瘤一科、上海交通大学附属瑞金医院消化外科、上海交通大学附属仁济医院普外科等诊治的胃癌根治术后病例,符合以下各项要求者。诊断标准:依据卫生部《中国常见恶性肿瘤诊治规范》的诊断,依据手术病理组织学诊断明确;依据国际抗癌联盟(UICC第六版)胃癌TNM分期法进行临床病理分期。纳入标准:(1)有明确胃癌病理组织学诊断为腺癌者;(2)有明确TNM分期患者,TNM分期I b-IV期(M0),接受根治术(R0)后病例;(3)根治术前未针对胃癌进行治疗,如新辅助放化疗;(4)年龄 ≥ 18 岁,男女均可;(5)Karnofsky评分 ≥ 60 分;(6)预计生存期6 mo以上;(7)根治术后8 wk内开始化疗,且化疗周期 ≥ 3 个周期;(8)骨髓、肝肾、心等功能正常;(9)患者知情同意,并接受长期随访。排除标准:(1)二重或多重癌患者;(2)接受靶向药物治疗患者;(3)孕妇、哺乳期妇女和精神病患者。

1.2 方法

1.2.1 分组及治疗:采用非随机同期对照研究,分别依据患者自愿的原则,分为中药组(中药+化疗)和对照组(单纯化疗)。对照组:化疗 ≥ 3 个周期,且未在我科接受辨证分型中医药治疗。中药组:化疗 ≥ 3 个周期,依据自愿的原则,在上海中医药大学附属龙华医院肿瘤一科接受辨证分型中药治疗持续6 mo及以上。中医治疗方案:基本处方由太子参15 g,炒白术12 g,茯苓30 g,红藤30 g,生牡蛎30 g,夏枯草9 g等组成,采用水煎剂,每日1剂,分2-4次服。1-2 wk辨证1次,修正中药处方,记录服药持续的时间。未服上述中药则纳入非中药治疗组。化疗方案:氟尿嘧啶类化疗药物为基础的单药或二药、三药联合化疗,依据手术方式、病理组织学类型、临床病理分期、体能状况等情况选择,21-28 d为1个周期。

1.2.2 观察项目:一般体检项目(身高、体质量、血压、心率、呼吸及体温等);安全性指标(血常规、尿常规、粪常规+粪便隐血试验、肝肾功能、电解质、心电图等);疗效性指标(CEA、CA-199等肿瘤标志物)。门诊患者术后两年内每3 mo复查1次,第3年每半年复查1次,之后每年复查1次;住院患者每月复查;腹部CT/MRI(或腹部及盆腔B超)及胸片:术后两年内每3 mo复查1次,第3年每半年复查1次,之后每年复查1次;胃镜:术后每年复查1次。DFS以及相应的1、3、5年无病生存率:记录患者手术日直到首次出现肿瘤复发/转移各种原因导致死亡(或失访)的时间。

表 1 胃癌根治术后病例基本资料

变量	n
性别	
男	308
女	166
年龄(岁)	
≤45	68
46-60	224
61-75	168
>75	14
原发部位	
上区	53
中、下区残胃	415
皮革胃	6
病理类型	
高-中分化(腺癌、管状或乳头状腺癌)	93
低分化腺癌(黏液腺癌、印戒细胞癌或未分化癌)	381
临床病理分期	
I b	41
II 期	87
III 期	253
IV 期	93
化疗周期	
<6	102
6	301
>6	71
化疗方案	
单药方案	17
两药方案	259
三药方案	118
其他方案	80
服用中药治疗	
未用及服用<6 mo	278
服用≥6 mo	196
转移复发或死亡事件(DFS终点)	
未出现或失访	303
出现(终点事件)	171(36.1%)
死于胃癌	
未出现或失访	344
出现(终点事件)	130(27.4%)

1.2.3 随访: 收集住院病史及门诊记录, 采用门诊随访、电话随访、信访等方式, 直至出现转移复发(复发转移是以影像学明确病灶或再次手术时病理为诊断依据)或死亡或观察截止日期2010-01-01. 失访患者观察截止日期为最后1次随访到的时间.

1.2.4 数据收集及转换: 根据病例报告表(case report form, CRF)的项目采用Microsoft Excel数据库管理软件建立数据库, 并对有关信息编码赋

表 2 影响胃癌根治术后DFS的单因素分析结果

变量	χ^2 值	P值
病理类型	8.529	0.003
临床病理分期	71.260	0.000
化疗周期	9.528	0.009
服用中药治疗	35.662	0.000
性别	0.004	0.947
年龄	1.297	0.255
原发部位	3.344	0.188
化疗方案	4.405	0.221

值^[16-18].

统计学处理 统计学处理使用SPSS16.0软件. 单因素分析: 应用Kaplan-meier法估算中位总生存期(overall survival, OS)、DFS, 各因素组间生存分布差异采用Log-rank进行显著性检验. 多因素分析: 应用Cox模型进行预后因素分析. 基线均衡性分析采用构成比的 χ^2 检验或Fisher检验. 所有统计分析的显著性水准为 $\alpha = 0.05$. 预设分层: 本研究以临床病理分期分层, 并根据研究结束后多因素分析结果以影响研究终点的因素分层.

2 结果

2.1 病例资料描述 依据纳入排除标准共获得475例可进行相关统计的胃癌根治术后病例资料, 其中中药组196例, 没有剔除或退出研究, 最终纳入统计分析的中药组196例; 对照组279例, 因发现二重癌(原发肺癌)1例(胃癌术后82 mo)剔除, 最终纳入统计分析的对照组278例. 随访时间最长为107.3 mo, 最短6.0 mo, 失访32例, 失访率6.75%(表1).

2.2 全组病例分析

2.2.1 单因素分析: 病理类型、临床病理分期、服用中药治疗及化疗周期4个因素是胃癌根治术后DFS的影响因素. 其他4个不是影响因素(表2).

2.2.2 多因素分析: Cox多因素回归分析表明: 胃癌根治术后DFS的独立影响因素为临床病理分期($P = 0.000$)、服用中药治疗($P = 0.000$). 临床病理分期中以IV期为参照, I b期、II 期、III 期的相对危险度分别为0.113、0.143及0.578; 服用中药治疗的相对危险度为0.424; 而性别、年龄、原发部位、病理类型、化疗方案、化疗周期均不是独立影响因素($P>0.05$, 表3).

多因素分析结果显示临床病理分期和服用中药治疗是胃癌根治术后DFS的独立影响因素, 使用卡方检验进行构成比比较, 但结果显示, 两

■应用要点
以健脾为基础的中药复方辨证治疗能延长IV (M0)期胃癌根治术后中位DFS. 健脾为基础的中药复方辨证治疗可延长III期胃癌根治术后患者DFS.

■同行评价

本文设计合理,具有一定的临床实用价值。

表 3 胃癌根治术后DFS比例风险模型分析

因子	回归系数	标准误	统计量	P值	相对危险度(95%CI)
临床病理分期			47.847	0.000	
I b期 vs IV期	-2.183	0.522	17.471	0.000	0.113(0.041-0.314)
II期 vs IV期	-1.944	0.330	34.619	0.000	0.143(0.075-0.274)
III期 vs IV期	-0.548	0.167	10.741	0.001	0.578(0.417-0.802)
服用中药治疗	-0.859	0.175	24.060	0.000	0.424(0.301-0.597)

表 4 中药组与对照组临床病理分期构成比比较 $n(\%)$

	I b期	II期	III期	IV期
中药组	28(14.3)	41(20.9)	100(51.0)	27(13.8)
对照组	13(4.7)	46(16.5)	153(55.0)	66(23.7)

表 5 III期胃癌根治术后病例基本资料

变量	n
性别	
男	170
女	83
年龄(岁)	
≤45	42
46-60	108
61-75	93
>75	10
原发部位	
上区	32
中、下区残胃	219
皮革胃	2
病理类型	
高-中分化(腺癌、管状或乳头状腺癌)	44
低分化腺癌(黏液腺癌、印戒细胞癌或未分化癌)	209
化疗周期(个)	
3-5	53
6	158
>6	42
化疗方案	
单药方案	9
两药方案	139
三药方案	69
其他方案	36
服用中药治疗	
未用及服用<6 mo	153
服用≥6 mo	100
转移复发或死亡事件(DFS终点)	
未出现或失访	155
出现(终点事件)	98(38.7%)
死于胃癌	
未出现或失访	182
出现(终点事件)	71(28.1%)

$P = 0.000$

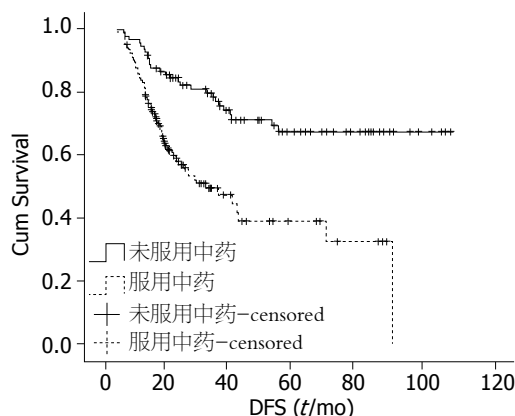


图 1 III期胃癌根治术后中药组与对照组患者DFS比较。

组之间构成比有统计学意义,基线不平衡,不能直接比较(表4)。按照预设分层根据临床病理分期进行分层研究。

2.3 分层研究

2.3.1 中药治疗对I b-II期胃癌根治术后DFS的影响: 由于I b期的患者过少,未达到多因素分析所需样本量,故将其与II期合并分析。I b-II期患者共128例。终点事件发生率低(11.7%),统计分析结果可信度较低,故暂未进行统计分析,未对两组进行比较。

2.3.2 中药治疗对III期胃癌根治术后DFS的影响: III期患者共253例,中药组100例,对照组153例;出现终点事件98例,发生率为38.7%。基本资料见表5。单因素分析结果显示:服用中药治疗($P = 0.000$)是本组病例中III期胃癌根治术后DFS的影响因素;而其他因素均不是。多因素分析结果显示:本组病例中III期胃癌根治术后DFS的独立影

响因素为服用中药治疗($P = 0.000$),中药治疗的相对危险度为0.344, 95.0%CI(0.218-0.544)。III期胃癌根治术后两组患者的DFS及1、3、5年无病生存率结果(表6, 图1),显示中药组中位DFS未达到,但中药组累积无病生存率较化疗组显著

表 6 中药对Ⅲ期胃癌根治术后患者DFS的影响

分组	n	中位DFS(mo)	无病生存率(%)		
			1年	3年	5年
中药组	100	未达到	94	76	67
对照组	153	31.30	82	47	39

表 7 IV期胃癌根治术后病例基本资料

变量	n
性别	
男	59
女	34
年龄(岁)	
≤45	15
46-60	40
61-75	36
>75	2
原发部位	
上区	13
中、下区	77
皮革胃	3
病理类型	
高-中分化(腺癌、管状或乳头状腺癌)	11
低分化腺癌(黏液腺癌、印戒细胞癌或未分化癌)	82
化疗周期(个)	
3-5	24
6	53
>6	16
化疗方案	
单药方案	2
两药方案	42
三药方案	31
其他方案	18
服用中药治疗	
未用及服用<6 mo	66
服用≥6 mo	27
转移复发或死于胃癌(DFS终点)	
未出现或失访	35
出现(终点事件)	58(62.4%)
死于胃癌	
未出现或失访	44
出现(终点事件)	49(52.7%)

提高。由于中药组中位DFS未达到, 对两组四分位DFS进行比较, 结果显示: 对照组四分位DFS为14.1 mo, 中药组四分位DFS为36.6 mo, 中药组较对照组延长22.5 mo($P = 0.000$)。

2.3.3 中药治疗对IV期胃癌根治术后DFS的影响: IV期患者共93例, 中药组27例, 对照组66例;

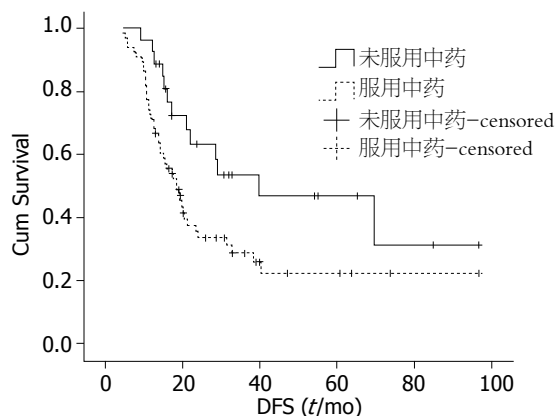


图 2 IV期胃癌根治术后中药组与对照组患者DFS比较。

出现终点事件58例, 发生率为62.4%, 基本资料见表7。单因素分析结果显示: 中药($P = 0.023$)和化疗周期($P = 0.015$)是本组病例中IV期胃癌根治术后DFS的影响因素; 而其他因素均不是。多因素分析结果显示: IV期胃癌根治术后DFS的独立影响因素为服用中药治疗($P = 0.034$)和化疗周期($P = 0.027$)。而性别、年龄、原发部位、病理类型、化疗方案均不是独立影响因素($P > 0.05$)。服用中药治疗的相对危险度为0.509(95%CI: 0.272-0.951); 化疗周期是影响因素, 对其中3个变量两两比较, 结果显示: 化疗3-5周期与化疗6个周期之间比较有统计学意义($P = 0.008$), 以化疗6个周期为参照, 化疗3-5个周期相对危险度为2.274(95%CI: 1.241-4.169), 而化疗大于6个周期与化疗6个周期之间和化疗>6个周期与化疗3-5个周期之间比较无统计学意义(表8)。多因素分析结果显示化疗周期和服用中药治疗是IV期根治术后DFS的独立影响因素, 使用卡方检验进行构成比比较, 结果显示, 两组之间构成比无统计学意义, 基线平衡, 可以直接比较(表9)。IV期胃癌根治术后两组患者的中位DFS及1、3、5年无病生存率结果(表10, 图2)显示中药组较对照组延长21.4 mo($P = 0.023$)。

2.4 不良反应 按照研究规定定期进行血象、肝肾功能等检测, 未发现与中药治疗相关的不良反应。

3 讨论

本研究多因素分析结果显示胃癌根治术后DFS

表 8 IV期胃癌根治术后DFS比例风险模型分析

因子	回归系数	标准误	统计量	P值	相对危险度(95%CI)
化疗周期			7.209	0.027	
3-5 vs >6	0.380	0.370	1.052	0.305	1.462(0.708-3.019)
6 vs >6	-0.442	0.340	1.688	0.194	0.643(0.330-1.252)
3-5 vs 6	0.882	0.309	7.061	0.008	2.274(1.241-4.169)
服用中药治疗	-0.676	0.319	4.489	0.034	0.509(0.272-0.951)

表 9 中药组与对照组化疗周期构成比比较 $n(\%)$

	3-5个周期	6个周期	>6个周期
中药组	5(18.5)	17(63.0)	5(18.5)
对照组	19(28.8)	36(54.5)	11(16.7)

$P = 0.589$

的独立影响因素有临床病理分期和服用中药治疗, 健脾为基础的中药复方辨证治疗是胃癌根治术后DFS的独立保护性因素. IV(M0)期胃癌患者服用中药治疗能够延长DFS. 目前III期患者中药组中位DFS未达到, 但由中药组1、3、5年无病生存率较化疗组显著提高可以看出, 服用中药治疗可以延长III期患者的DFS.

近年来, 本科室根据多年治疗经验及实验室研究总结出健胃为基础, 结合清热解毒, 软坚化痰等作为胃癌的治法. 先贤张景岳《景岳全书》中已指出: “治反胃之法……必宜以扶助正气, 健脾养胃为主”. 本科室主张“脾”为胃癌的“病本”, 病因病机与“虚”、“痰”、“瘀”、“毒”有关, 其中尤以脾胃虚弱为胃癌发生与发展的一个基本因素. 文献报道[19]及我们多年的临床和实验研究^[12,20-21]健脾表明为基础的中药对胃癌术后患者的复发转移有防治作用.

中医在中国古代对胃癌及其转移就有一定的认识. 胃癌属于中医“胃脘痛”、“噎膈”、“痞满”、“呃逆”、“反胃”、“伏梁”、“积聚”等范畴. 并将肿瘤的转移称为“传舍”. 其后宋·杨士瀛《仁斋直指附遗方论》曰: “癌者, 上高下深, 岩穴之状, 颗颗累垂. 毒根深藏, 穿孔透里”. 其中“穿孔透里”的性质, 是对癌症易于浸润转移这一特点的形象描述. 中医认为癌毒传舍是胃癌根治术后转移复发的基本病理过程, 而正气亏虚、余毒未尽、伏邪流注经络脏腑则是其病因病机^[22].

胃癌根治术后患者服用中药预防复发转

移, 改善生活质量的思路, 来源于中医“未病先防”的思想^[23]. 胃癌经过根治术治疗后, 体内仍有可能存在微小的肿瘤病灶, 即中医谓之“伏邪”、“余毒”、“余邪”, 是肿瘤复发转移的根源所在, 即癌毒传舍^[24]. “未病先防”是指胃部的原发病灶已经被切除, 但余毒仍可留于经络, 如遇正虚, 正不胜邪, 余毒蔓延而造成复发转移, 于是需要提前用药防止其复发转移.

从本研究III期和IV(M0)期患者的1、3、5年累积无病生存率可以看出胃癌根治术后患者复发转移多发生在根治术后3年内, 3年后这种趋势逐渐减缓, 与其他文献报道相符^[25,26], 因此胃癌根治术后3年内的治疗应该受到特别重视. 对于III, IV(M0)期胃癌辅助化疗一般认为术后8 wk内开始, 行6个疗程, 化疗结束后多为术后半年, 西医认为此时全面复查, 如无复发转移无需其他治疗, 即可进入观察. 但从本研究和其他文献来看, 术后1-3年复发转移率最高, 证明很多病期较晚的患者化疗后仍有癌细胞残存体内, 此时中药治疗就能够很好地发挥作用, 以其不良反应小, 患者依从性好的优势成为预防胃癌根治术后复发转移的重要治疗手段. 所以胃癌术后1-3年内可以选择中药治疗预防复发转移, 如有条件可延长服用时间至5年或更久, 以弥补手术和辅助化疗的不足之处.

此外, 本研究结果显示化疗周期是IV(M0)期胃癌根治术后DFS的独立影响因素, 化疗6个周期患者较化疗<6个周期患者DFS长, 而化疗>6个周期与化疗6个周期之间以及化疗>6个周期与化疗<6个周期之间差异无统计学意义. 这与大多数辅助化疗方案都以化疗6个周期为标准相符合, 因此在临床工作中如患者身体状况允许, 提倡胃癌根治术后尤其是IV期患者^[27,28], 应积极完成6个周期辅助化疗. 但化疗药物具有明显的不良反应^[29,30], 对人体损伤较大, 中医认为治疗疾病应中病即止, 过度用药反而会耗伤正气, 研究表明化疗>6个周期较化疗6个周期

表 10 中药对IV期胃癌根治术后患者DFS的影响

分组	n	中位DFS(mo)	无病生存率(%)		
			1年	3年	5年
中药组	27	39.78	96	52	46
对照组	66	18.38	71	30	23

及<6个周期未显示出生存优势, 故认为, 辅助化疗6个周期即可, 无需延长化疗时间。

4 参考文献

- 孙秀娣, 牧人, 周有尚, 戴旭东, 张思维, 皇甫小梅, 孙杰, 李连弟, 鲁凤珠, 乔友林. 中国胃癌死亡率20年变化情况及其发展趋势预测. 中华肿瘤杂志 2004; 26: 4-9
- Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin* 2005; 55: 74-108
- Ajani JA. Evolving chemotherapy for advanced gastric cancer. *Oncologist* 2005; 10 Suppl 3: 49-58
- 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
- Sakuramoto S, Sasako M, Yamaguchi T, Kinoshita T, Fujii M, Nashimoto A, Furukawa H, Nakajima T, Ohashi Y, Imamura H, Higashino M, Yamamura Y, Kurita A, Arai K. Adjuvant chemotherapy for gastric cancer with S-1, an oral fluoropyrimidine. *N Engl J Med* 2007; 357: 1810-1820
- Janunger KG, Hafström L, Glimelius B. Chemotherapy in gastric cancer: a review and updated meta-analysis. *Eur J Surg* 2002; 168: 597-608
- 赵树靛, 房静远. 胃癌根治术后辅助性化疗意义的荟萃分析. 中国消化内镜 2007; 1: 15-21
- Cunningham D, Allum WH, Stenning SP, Thompson JN, Van de Velde CJ, Nicolson M, Scarffe JH, Lofts FJ, Falk SJ, Iveson TJ, Smith DB, Langley RE, Verma M, Weeden S, Chua YJ, MAGIC Trial Participants. Perioperative chemotherapy versus surgery alone for resectable gastroesophageal cancer. *N Engl J Med* 2006; 355: 11-20
- Oba K. Efficacy of adjuvant chemotherapy using tegafur-based regimen for curatively resected gastric cancer: update of a meta-analysis. *Int J Clin Oncol* 2009; 14: 85-89
- Zhao AG, Cao W, Xu Y, Zhao G, Liu BY, Cai Y, Yang JZ, Gu Y, Yuan W, Zhu YJ, Han YY, Yang JY. [Survival benefit of an herbal formula for invigorating spleen for elderly patients with gastric cancer]. *Zhongxiyi Jiehe Xuebao* 2010; 8: 224-230
- Cao ND, Zhao AG, Yang JK. [Survival time of advanced gastric cancer patients treated with integrated traditional Chinese and Western medicine therapy]. *Zhongxiyi Jiehe Xuebao* 2010; 8: 116-120
- Yang JK, Zhen J, Shen KP. [Clinical study on post-operative metastasis prevention of progressive stage of gastric cancer by weichang'an]. *Zhongguo Zhongxiyi Jiehe Xuebao* 2003; 23: 580-582
- 毛兵, 王刚, 樊涛, 陈小东, 刘佳, 王蕾, 常静, 马建昕, 郭佳, 付娟娟, 李廷谦. 中医药随机对照试验报告质量评价. 中国循证医学杂志 2007; 7: 880-887
- 万朝敏. 临床医学研究常用设计方案实施方法非随机对照研究. 中国实用儿科杂志 2008; 23: 398-400
- 梁伟雄. 关于中医药临床研究联合用药设计相关问题的思考. 中药新药与临床药理 2009; 20: 91-93
- 赵爱光, 曹雯, 徐燕, 赵刚, 刘炳亚, 蔡泳, 杨金祖, 顾纁, 苑伟, 朱莹杰, 韩颖盈, 杨金坤. 以健脾为基础的复方辨证治疗对老年胃癌患者生存期的影响. 中西医结合学报 2010; 8: 224-230
- Wanebo HJ, Kennedy BJ, Chmiel J, Steele G Jr, Winchester D, Osteen R. Cancer of the stomach. A patient care study by the American College of Surgeons. *Ann Surg* 1993; 218: 583-592
- 陈映霞, 秦叔逵, 何泽明, 王琳, 钱军, 邵志坚, 刘秀峰, 廖峰, 龚新雷. 胃差异化腺癌根治术后辅助化疗的临床研究. 临床肿瘤学杂志 2007; 12: 651-654
- Cao W, Zhao AG. [Prescription rules of Chinese herbal medicines in treatment of gastric cancer]. *Zhongxiyi Jiehe Xuebao* 2009; 7: 1-8
- 赵爱光. 脾虚与胃癌发生发展的相关性研究. 上海中医药杂志 1998; 5: 10-12
- 赵海磊, 赵爱光, 尤胜富, 顾纁, 唐莱娣, 杨金坤. 健脾中药复方胃肠安对人胃癌裸小鼠原位移植瘤生长和转移的影响. 中西医结合学报 2005; 3: 378-381
- 徐振晔, 郑展. 中医药分阶段防治恶性肿瘤术后复发转移优化方案探讨. 中西医结合学报 2007; 5: 7
- 赵艳莉. 祖国医学“未病先防”思想对肿瘤防治现状的启示. 陕西中医学院学报 2006; 29: 25-26
- 李佃贵, 史纯纯, 崔建从, 俞芹, 娄莹莹, 杜艳茹. 中医“治未病”思想在胃癌防治中的应用. 环球中医药 2009; 2: 422-424
- 陈燕翔, 黄春英. 影响胃癌根治术后复发转移的因素. 井冈山学院学报 2008; 29: 85-86
- 许远, 陈力, C. Hoang-Vu, 陈周迅, 李国刚, 任征. 胃癌术后早期复发的相关因素分析. 实用肿瘤杂志 2006; 21: 315-318
- 张国伟, 宋丽杰. 进展期胃癌化疗现状与进展. 临床药物治疗杂志 2009; 7: 14-18
- 李玉升, 储大同. 胃癌化疗的临床应用. 临床肿瘤学杂志 2000; 5: 220-222
- Biancosino C, Albert M, Linder A. Acute toxicity of irinotecan in the ex-vivo isolated perfused human lung model--high-dose therapy during isolated perfusion without acute toxic lung edema. *Interact Cardiovasc Thorac Surg* 2007; 6: 583-587
- Leblond J, Le Pessot F, Hubert-Buron A, Duclos C, Vuichoud J, Faure M, Breuillé D, Déchelotte P, Coëffier M. Chemotherapy-induced mucositis is associated with changes in proteolytic pathways. *Exp Biol Med* (Maywood) 2008; 233: 219-228

编辑 李薇 电编 何基才

肝癌相关基因表达的荧光定量PCR检测及分子诊断指数的建立

余俊, 王毅军, 高英堂, 石文霞, 王瞿辉, 刘彤, 许彦杰, 杨斌, 杜智

■背景资料

Capurro等联合检测血清GPC3、AFP用以诊断肝癌, 结果提高了敏感性而未降低特异性。多基因联合检测已逐渐应用于肝癌的早期诊断及预后评估。基因标志物的检测有助于早期发现肝癌。

余俊, 天津医科大学第三中心临床学院 天津市 300170
王毅军, 天津市第三中心医院肝胆外科 天津市 300170
高英堂, 王瞿辉, 许彦杰, 杨斌, 杜智, 天津市第三中心医院
天津市人工细胞重点实验室 天津市 300170
石文霞, 刘彤, 天津市第三中心医院 天津市肝胆疾病研究所
天津市 300170
余俊, 在读硕士, 主要从事肝、胆、胰腺疾病方面的研究。
天津市重点科技攻关基金资助项目, No. 05YFSZSF02500
天津市卫生局基金面上资助项目, No. 09KY04
作者贡献分布: 此课题由王毅军与杜智设计; 荧光定量PCR检测及论文撰写由余俊完成; 数据分析由高英堂与石文霞完成; 生物信息学分析由杨斌完成; 实验标本收集与管理由王毅军、王瞿辉、刘彤及许彦杰完成。
通讯作者: 王毅军, 教授, 300170, 天津市河东区津塘路83号, 天津市第三中心医院肝胆外科。wangyijuncarl@yahoo.com.cn
电话: 022-84112205 传真: 022-84112205
收稿日期: 2010-11-25 修回日期: 2011-01-09
接受日期: 2011-01-11 在线出版日期: 2011-02-28

Detection of HCC-associated gene expression by real-time fluorescence quantitative PCR to establish a molecular diagnostic index for HCC

Jun Yu, Yi-Jun Wang, Ying-Tang Gao, Wen-Xia Shi, Qu-Hui Wang, Tong Liu, Yan-Jie Xu, Bin Yang, Zhi Du

Jun Yu, the Third Central Clinical College of Tianjin Medical University, Tianjin 300170, China
Yi-Jun Wang, Department of Hepatobiliary Surgery, Tianjin Third Central Hospital, Tianjin 300170, China
Ying-Tang Gao, Qu-Hui Wang, Yan-Jie Xu, Bin Yang, Zhi Du, Key Lab of Artificial Cells, Tianjin Third Central Hospital, Tianjin 300170, China
Wen-Xia Shi, Tong Liu, Tianjin Third Central Hospital, Institute for Hepatobiliary Diseases, Tianjin 300170, China
Supported by: the Key Project of Tianjin Science and Technology Commission, No. 05YFSJSF02500; and the Foundation of Tianjin Health Bureau, No. 09KY04
Correspondence to: Professor Yi-Jun Wang, Department of Hepatobiliary Surgery, Tianjin Third Central Hospital, 83 Jintang Road, Hedong District, Tianjin 300170, China. wangyijuncarl@yahoo.com.cn
Received: 2010-11-25 Revised: 2011-01-09
Accepted: 2011-01-11 Published online: 2011-02-28

Abstract

AIM: To develop a molecular diagnostic index for hepatocellular carcinoma (HCC).

METHODS: The expression of 11 genes was assessed by real-time fluorescent quantitative

polymerase chain reaction (QRT-PCR) in 40 HCC specimens and matched tumor-adjacent specimens and surgical margin specimens, 10 cirrhotic tissue specimens, and 10 normal liver tissue specimens. Using G3PDH as a control, the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method was used to calculate the relative gene expression levels. HCC-associated genes were then selected to establish a molecular diagnostic model for HCC.

RESULTS: Compared with normal liver tissue specimens, approximately 65.0%, 75.0%, and 67.5% of HCC specimens showed a >3-fold increase in the expression levels of tumor suppressor genes PRDM2, IGFBP3, and DLC-1, and approximately 87.5%, 77.5%, 82.5%, 85.0%, and 67.5% of HCC specimens showed a >3-fold decrease in the expression levels of oncogenes GPC3, STMN, CCNA2, BIRC5, and AFP, respectively. The expression levels of these eight genes differed significantly between HCC and cirrhotic tissue (0.45 ± 0.69 vs 0.50 ± 0.20 ; 0.17 ± 0.20 vs 0.67 ± 0.47 ; 0.29 ± 0.48 vs 0.58 ± 0.60 ; 677.57 ± 999.30 vs 4.41 ± 3.99 ; 17.56 ± 28.28 vs 1.17 ± 1.08 ; 53.17 ± 103.64 vs 2.09 ± 1.50 ; 16.53 ± 16.39 vs 1.82 ± 1.39 ; 4445.70 ± 11642.87 vs 0.86 ± 0.43 , all $P < 0.05$). Molecular diagnostic index was estimated based on these eight genes, which was 2.2 ± 1.5 , 3.0 ± 1.6 , 2.9 ± 1.5 , 6.3 ± 1.2 for liver cirrhosis, surgical margin, tumor-adjacent tissue, and cancer tissue, respectively. The molecular diagnostic index for cancer tissue was significantly different from those for liver cirrhosis, surgical margin, and tumor-adjacent tissue. When a molecular diagnostic index of 4 or greater was adopted to diagnose liver cancer using liver cirrhosis as a control, the sensitivity, specificity, and the area under the receiving operative curve (ROC) were 100%, 90%, and 0.995, respectively.

CONCLUSION: A molecular diagnostic index for HCC was successfully established using fluorescence quantitative PCR to detect HCC-associated genes.

Key Words: Hepatocellular carcinoma; Gene; Ex-

■同行评议者

李淑德, 主任医师, 中国人民解放军第二军医大学长海医院消化内科

pression; Real-time fluorescent quantitation polymerase chain reaction; Molecular diagnostic index

Yu J, Wang YJ, Gao YT, Shi WX, Wang QH, Liu T, Xu YJ, Yang B, Du Z. Detection of HCC-associated gene expression by real-time fluorescence quantitative PCR to establish a molecular diagnostic index for HCC. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(6): 588-595

摘要

目的: 研究肝细胞癌相关基因表达, 建立肝癌分子诊断指数, 以期能更准确的诊断肝癌。

方法: 采用实时荧光定量PCR检测40例肝细胞癌患者癌组织和配对的癌旁2 cm及手术切缘组织、10例肝硬化组织、10例正常肝脏组织中11个基因的表达, 以管家基因G3PDH为对照, $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算目的基因相对表达量, 挑选出特异性好且与正常肝、肝硬化组织表达差异大的肝癌相关基因, 依据这些基因在组织中表达异常的个数建立分子诊断指数。

结果: 在40例癌组织中, 抑癌基因PRDM2、IGFBP3、DLC-1分别有65.0%、75.0%、67.5%的标本表达<3倍正常肝组织, 癌基因GPC3、STMN、CCNA2、BIRC5、AFP分别有87.5%、77.5%、82.5%、85.0%、67.5%的标本表达>3倍正常肝组织, 并且与肝硬化组织表达差异显著(0.45 ± 0.69 vs 0.50 ± 0.20 ; 0.17 ± 0.20 vs 0.67 ± 0.47 ; 0.29 ± 0.48 vs 0.58 ± 0.60 ; 677.57 ± 999.30 vs 4.41 ± 3.99 ; 17.56 ± 28.28 vs 1.17 ± 1.08 ; 53.17 ± 103.64 vs 2.09 ± 1.50 ; 16.53 ± 16.39 vs 1.82 ± 1.39 ; $4\ 445.70 \pm 1\ 1642.87$ vs 0.86 ± 0.43 , 均 $P < 0.05$)。以此8个基因建立分子诊断指数, 其在肝硬化、手术切缘、癌旁2 cm、癌组织中分别为 2.2 ± 1.5 、 3.0 ± 1.6 、 2.9 ± 1.5 、 6.3 ± 1.2 , 癌组与肝硬化组、切缘组、癌旁2 cm组差异显著。以肝硬化组作为对照组, 当分子诊断指数 ≥ 4 诊断为肝癌时, ROC曲线的敏感性为100%, 特异性为90%, AUC = 0.995。

结论: 利用荧光定量PCR检测肝癌相关基因表达, 成功建立分子诊断指数, 提高了肝癌诊断的敏感性及特异性。

关键词: 肝细胞癌; 基因; 表达; 实时荧光定量PCR; 分子诊断指数

余俊, 王毅军, 高英堂, 石文霞, 王瞿辉, 刘彤, 许彦杰, 杨斌, 杜智. 肝癌相关基因表达的荧光定量PCR检测及分子诊断指数的建立. *世界华人消化杂志* 2011; 19(6): 588-595
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/588.asp>

0 引言

血清标志物甲胎蛋白(alpha fetoprotein, AFP)作为诊断肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)的“金标准”已逐渐被人们质疑, 其敏感性之低在临床上易造成大量患者漏诊^[1]. Capurro等^[2]联合检测血清GPC3、AFP用以诊断肝癌, 结果提高了敏感性而未降低特异性. 多基因联合检测已逐渐应用于肝癌的早期诊断及预后评估. 肝癌的发生涉及到细胞功能的许多方面, 是一个多因素、多步骤、多基因参与的复杂过程. 基因表达异常明显早于组织学改变, 基因标志物的检测有助于早期发现肝癌^[3]. 实时荧光定量RT-PCR(real-time fluorescent quantitative polymerase chain reaction, QRT-PCR)是一种简便、快速且高敏感性的基因表达检测方法, 能准确分析基因表达水平的改变. 本研究应用QRT-PCR法检测11个与肝癌相关的基因, 筛选出8个表达特异的基因建立分子诊断指数, 以提高诊断及鉴别诊断肝癌的能力, 更早、更准确的诊断肝癌。

1 材料和方法

1.1 材料 收集2006-09/2009-12天津市第三中心医院肝胆外科手术组织标本60例, 包括40例HCC患者的癌组织(T)、癌旁2 cm(N2)和手术切缘(M)组织. 其中男32例, 女8例; 年龄38-75(平均 56 ± 9)岁; AFP<20 ng/mL或肿瘤直径<3 cm共15例; 高、中、低分化肝癌分别为14、19、7例; 标本均经病理证实. 另有10例肝硬化组织、10例正常肝组织(取自手术治疗的肝血管瘤旁组织)作为对照. 标本切取后立即投入液氮中, 于-80℃保存. 所有标本取材均通过院伦理委员会审核, 家属知情签字同意。

1.2 方法

1.2.1 RNA提取和逆转录: 参照Promega公司RNAagents试剂盒提取总RNA, 每50 mg组织的总RNA溶于50 μ L DEPC水中, 琼脂糖凝胶电泳检测RNA完整性, 紫外分光光度计检测A值, 计算其浓度. 逆转录参照Promega公司的ImRrom-II™使用说明, 反应体系为2 μ g RNA、3 μ L随机引物, 补DEPC水至24 μ L; 70℃热变性15 min, 迅速冰浴3 min; 再依次加入4.8 μ L 25 mmol/L MgCl₂、8 μ L 5×逆转录缓冲液、2 μ L 10 mmol/L dNTP Mix、1.5 μ L逆转录酶, 至终体积为40 μ L; 离心后置于PCR仪中, 37℃, 90 min。

1.2.2 引物设计: 依据GenBank中癌基因GPC3、STMN、CCNA2、UBD、CD133、BIRC5、

■ 相关报道

Llovet等用荧光定量PCR法检测55个基因, 从中筛选出12个肝癌表达特异基因, 进一步应用Logistic回归分析确定了3个基因组合, 包括GPC3, LYVE1, survivin, 用此3基因联合检测早期小肝癌与异型增生结节, 结果分辨精确率达94%。

■创新盘点

本研究应用实时荧光定量PCR法检测11个与肝癌相关的基因,筛选出8个表达特异的基因建立分子诊断指数,对40例肝癌(包括15例AFP阴性及肿瘤直径<3 cm肝癌)及10例肝硬化进行诊断,结果诊断精确度达98%。

表 1 12个基因的引物序列

引物	序列5'→3'片段	大小(bp)	退火温度(°C)
G3PDH	CTCATGACCACAGTCCATGCCATCACTG CATGAGGTCCACCACCCTGTTGCTGTA	140	62.5
PRDM2	GGGATGGATGTGCATTGATG GCAGAGGTGAAATCTGGCTCA	350	60.0
IGFBP3	GGGCTCTGCGTCAACGCTAGTG CCCCTTCCTGCCTTTGAAGG	445	62.5
DLC-1	TTTACCACCTGCTGAATTACTCAGCC ACGTCTGTGTAGTGACAGGAAAGCC	300	63.0
WVVOX	AGGGCGAGTGAAGCAGTGTACGC CGGTGGTGGCAGCTCCCTGTTG	601	62.5
STMN	TATCCAGGTGAAAGAACTGGAGAAG TCTTCAATGTGCTTATCCTTCTCTC	381	60.0
GPC3	TGACCTGAAAGTATTGGGAATTTCC CAATAGTGGTGGTCAGCTTTCCTG	427	63.0
CCNA2	ATGTCACCGTTCCTCCTTGG CCAGTCCACGAGGATAGCTCTC	401	60.0
BIRC5	CCATTAACCGCCAGATTGAA TTCCAGCTCCTTGAAGCAGAA	249	65.0
AFP	TCAGTGAGGACAAACTATTGG CTCTTCAGCAAAGCAGACTTC	395	62.5
CD133	GACCCATTGGCATTCTCTTGA ACACATACAAAAGAAATACCCACCC	251	63.0
UBD	AGAGATGGCTCCCAATGCTTCCT CTTCACCACTTTCAGGGTAAGGTG	250	60.0

AFP, 抑癌基因PRDM2、IGFBP3、DLC-1、WVVOX和管家基因G3PDH的mRNA序列设计引物,采用Primer Express 2.0软件设计,由上海生物工程技术服务有限公司负责合成,序列见表1。

1.2.3 实时荧光定量PCR检测12个基因的表达水平:优化反应条件,如引物浓度、退火温度和延伸时间等,使目的基因和管家基因的扩增效率保持一致。按照TaKaRa公司的QRT-PCR反应体系,组成如下: cDNA模板2 μL、上下游引物各0.4 μL、1 μL Taq聚合酶、2 μL 2.5 mmol/L dNTP和2.5 μL 10×PCR缓冲液,加超纯水至总体积25 μL。采用两步PCR法,扩增条件为: 95 °C预变性2 min, 94 °C变性45 s,各基因退火温度见表1。根据各基因的实时扩增曲线和溶解曲线进行分析,取CT值,按 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法^[4]计算待测目的基因相对表达量,其前提是目的基因和G3PDH扩增效率相似且均接近于100%。计算各样本平均CT值和 ΔCT 值($\Delta CT = CT_{目的基因} - CT_{G3PDH}$),计算 $2^{-\Delta\Delta CT}$ ($\Delta\Delta CT = \Delta CT_{目的样本} - \Delta CT_{参照样本}$),其数值用于表示目的样本相对于参照样本目的基因的相对倍数。 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 值相差3倍认为有表达差异。

统计学处理 采用SPSS16.0统计软件包进行数据分析,计量资料以mean±SD表示,如数据不呈正态分布或方差不齐采用秩和检验,两组间均数比较采用 t 检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。生存分析应用Kaplan-Meier法,生存率比较采用Log-rank检验。

2 结果

2.1 荧光定量PCR体系建立 提取的总RNA纯度及完整性较好,逆转录为cDNA。随机混合5份cDNA样品模板按2的倍数连续梯度稀释, QRT-PCR检测11个基因与G3PDH的实时荧光曲线,通过cDNA浓度梯度的log值对 ΔCT 值($\Delta CT = CT_{目的基因} - CT_{内参基因}$)作图比较两基因扩增效率。所得直线斜率绝对值<0.1,说明目的基因和内参基因扩增效率一致,实验结果可以应用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法进行相对定量分析。

2.2 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法检测11个基因的相对表达水平并建立分子诊断指数 在40例癌组织中,抑癌基因PRDM2、IGFBP3、DLC-1分别有65.0%、75.0%、67.5%的标本表达呈3倍量下调;癌基因

表 2 8个基因在各组中的表达存在差异

	NL	LC	M	N2	T	P值
<i>n</i>	10	10	38	40	40	
PRDM2	1.08 ± 0.43	0.50 ± 0.20	0.91 ± 1.19	0.82 ± 0.88	0.45 ± 0.69	0.000
IGFBP3	1.11 ± 0.52	0.67 ± 0.47	0.59 ± 0.53	0.61 ± 0.49	0.17 ± 0.20	0.000
DLC-1	1.04 ± 0.30	0.58 ± 0.60	0.57 ± 0.63	0.66 ± 0.74	0.29 ± 0.48	0.000
STMN	1.02 ± 0.22	1.17 ± 1.08	2.37 ± 2.27	2.13 ± 1.76	17.56 ± 28.28	0.000
GPC3	1.05 ± 0.33	4.41 ± 3.99	8.18 ± 16.12	6.55 ± 10.58	677.57 ± 999.30	0.000
CCNA2	1.04 ± 0.31	2.09 ± 1.50	4.77 ± 5.77	3.65 ± 4.32	53.17 ± 103.64	0.000
BIRC5	1.04 ± 0.31	1.82 ± 1.39	2.51 ± 2.31	3.48 ± 6.50	16.53 ± 16.39	0.000
AFP	1.10 ± 0.50	0.86 ± 0.43	10.76 ± 26.71	54.44 ± 249.26	4 445.70 ± 11 642.87	0.000

NL: 正常肝; LC: 肝硬化; M: 手术切缘; N2: 癌旁2 cm; T: 癌. P值: NL, LC, M, N2, T多组独立样本间秩和检验.

GPC3、STMN、CCNA2、BIRC5、AFP分别有87.5%、77.5%、82.5%、85.0%、67.5%的标本表达呈3倍量上调; 而WVOX只有30.0%的标本呈3倍量下调, CD133只有10.0%的标本呈3倍量上调; UBD有90.0%的标本呈3倍量上调, 但亦有70.0%的肝硬化标本呈3倍量上调, 特异性差; 最终选取PRDM2、IGFBP3、DLC-1、GPC3、STMN、CCNA2、BIRC5、AFP作为肝癌高度相关基因.

GPC3等8个基因在正常肝(NL)、肝硬化(LC)、手术切缘(M)、癌旁2 cm(N2)、癌(T)组的两组或多组间表达存在差异(均 $P < 0.01$, 表2). 其中抑癌基因PRDM2、IGFBP3、DLC-1从正常肝、肝硬化到癌组表达呈明显递减趋势, 癌基因GPC3、STMN、CCNA2、BIRC5、AFP从正常肝、肝硬化到癌组表达呈明显递增趋势; 在肝癌标本中, 癌组的抑癌基因表达明显低于癌旁2 cm组及切缘组, 而癌基因正相反; 8个基因在癌旁2 cm组及切缘组中的表达差异不明显(表2). 进一步以8个基因在NL, LC, M, N2, T组的表达量做散点图, 从散点图可以看出各基因在个体中的差异表达(图1).

依据这8个基因在组织中3倍量上调或下调的个数建立分子诊断指数, 即标本中每有一个基因表达量与正常组相差3倍则分子诊断指数增加1, 因此分子诊断指数从0到8. 结果在正常肝、肝硬化、切缘、癌旁2 cm、癌组中诊断指数分别为0、 2.2 ± 1.5 、 3.0 ± 1.6 、 2.9 ± 1.5 、 6.3 ± 1.2 , 显示癌组>癌旁2 cm组、切缘组>肝硬化组>正常组, 癌组明显高于其他4组, 平均值是肝硬化组的2.9倍, 是癌旁2 cm及切缘组的2.1倍, 均 $P < 0.01$; 癌旁2 cm及切缘组略高于肝硬化组, 但

无统计学意义($P > 0.05$). 结果还显示在10例肝硬化标本中诊断指数0-4; 38例切缘标本中除246指数为6, 其余均 ≤ 5 ; 40例癌旁2 cm标本中除348指数为6, 其余均 ≤ 5 (此2例标本肿瘤直径均>10 cm, TNM分期为III期、IV期, 病理均为低分化); 40例癌组织中除217、262、369、374标本指数为4, 其余的36例均 ≥ 5 (此4例标本肿瘤直径为8 cm, 2 cm, 3 cm, 4 cm, TNM分期均为II期, 病理均为中、高、高、高分化).

2.3 分子诊断指数在40例肝癌标本中的比较 通过成对比较40例HCC患者切缘、癌旁2 cm与癌组织的分子诊断指数, 有50%的切缘组织诊断指数大于癌旁2 cm组织, 且除1例标本外(标本374在切缘、癌旁2 cm、癌中指数分别为1、5、4)切缘及癌旁2 cm组指数均小于配对的癌组, 癌组与癌旁2 cm及切缘组差异明显($P < 0.01$); 切缘组与癌旁2 cm组之间无统计学差异($P > 0.05$, 表3). 当分子诊断指数取 ≥ 4 诊断为恶性组织时, 能鉴别出100%的肝癌和90%的肝硬化组织(图2).

2.4 肝癌标本中分子诊断指数与临床资料的联系 所有肝癌标本病理回报手术切缘未见癌侵及, 但切缘组织诊断指数明显高于正常组织. 分子诊断指数与肿瘤大小、血清AFP高低、分化程度没有明显联系: 40例肝癌标本中AFP阴性或肿瘤直径<3 cm的共有15例, 其癌组中分子诊断指数从4到8, 平均 5.8 ± 1.4 , 其余25例肝癌诊断指数从4到8, 平均 6.5 ± 1.1 , 两者无统计学差异($P > 0.05$); 14例高分化肝癌、19例中分化肝癌与7例低分化肝癌诊断指数分别为 5.9 ± 1.4 、 6.3 ± 1.1 、 6.7 ± 1.1 , 三者无统计学差异($P > 0.05$).

2.5 癌组织中分子诊断指数与患者预后的关系 在40例癌标本中, 诊断指数从4到8, 如将诊断指

■应用要点

分子诊断指数可以有效地诊断AFP阴性肝癌及小肝癌, 提示多基因联合诊断肝癌有望提高肝癌诊断的准确度, 以更早的发现肝癌.

■同行评价

本文学术性较高,对原发性肝癌的早期诊断有重要的理论指导价值。

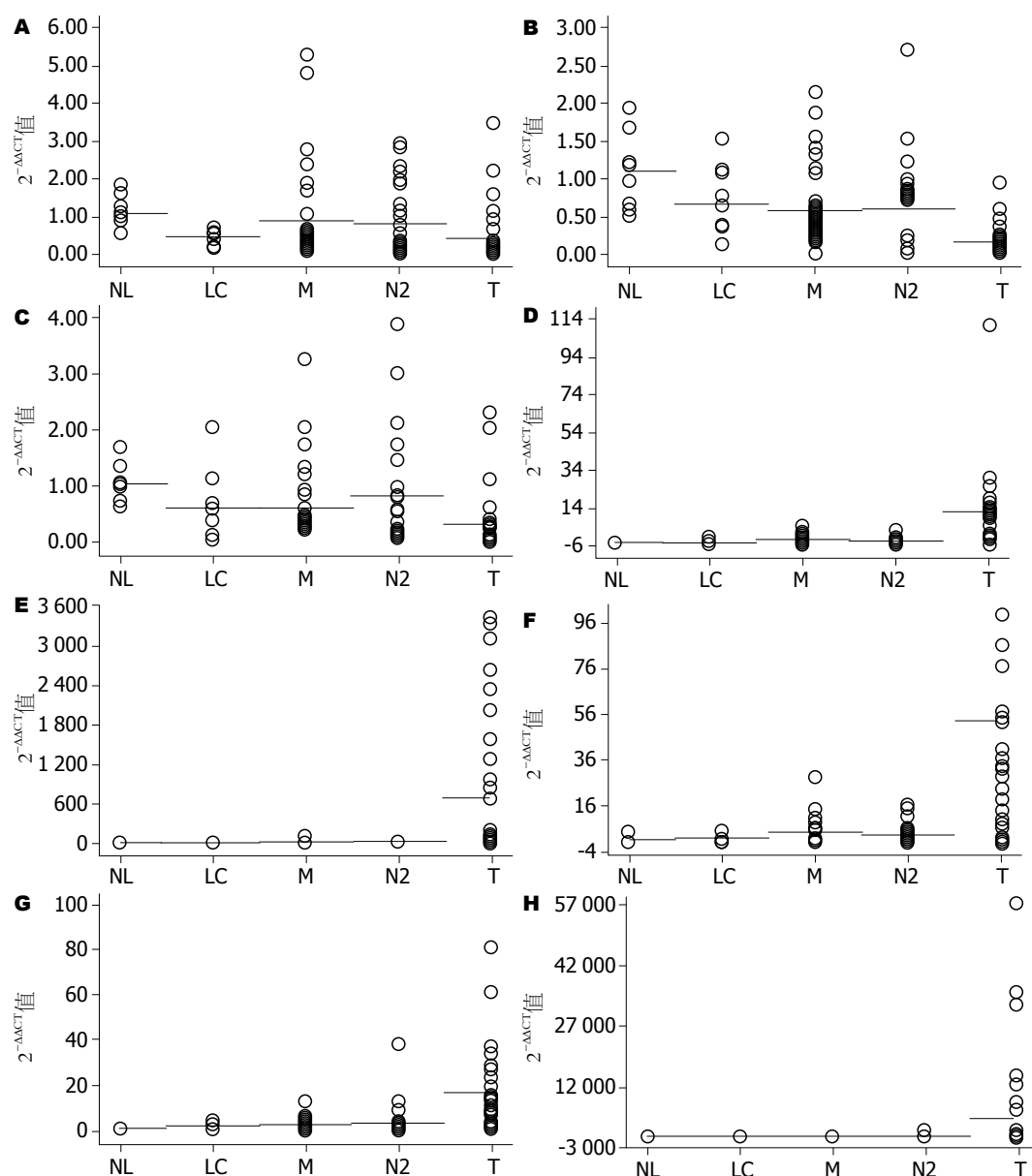


图1 8个基因在正常肝(NL)、肝硬化(LC)、手术切缘(M)、癌旁2 cm(N2)、癌(T)组织中的相对表达量。A: PRDM2; B: IGFBP3; C: DLC-1; D: STMN; E: GPC3; F: CCNA2; G: BIRC5; H: AFP。

数7、8列为高诊断指数组(共15例样本), 6、5、4例为低诊断指数组(共25例样本), 对两组采用Log-rank检验进行生存分析并绘制Kaplan-Meier生存曲线, 结果低诊断指数组比高诊断指数组生存曲线高、下降平缓, 两条曲线差异具有统计学意义($P = 0.044$), 提示低诊断指数组预后较好(图3)。

3 讨论

近30年来, 随着分子生物学的飞速发展, 人们逐步在分子水平上认识了肝癌的本质。肝癌发生的分子机制复杂, 根本原因在于肝炎病毒的慢性感染, 癌基因、癌相关基因的激活及抑癌基因的失活, 引起细胞生长失控, 肝细胞出现持续

增殖, 最后导致癌变^[5]。分子诊断技术及基因标志物在肝癌早期发现、术后复发和转移监测中的应用, 正向高度灵敏、特异诊断方向发展^[6]。单基因研究很难说明肝癌变化的本质, 单凭单个基因诊断早期肝癌易造成漏诊与误诊。以本研究中在癌中表达差异最大的GPC3为例, 在40例癌标本中有35例表达量上调, 造成了5例标本漏诊; 而10例肝硬化标本有6例标本上调, 又会造成肝癌的误诊。因而寻找新型肝癌诊断标志物并采用多个标志物联合检测可望提高肝癌诊断率。

Paradis等^[7]用筛选的13个基因做分子诊断指数研究, 结果显示25例正常肝和22例肝硬化标本分子诊断指数0-4, HCC标本中除2例标本分

表 3 40例肝癌标本的分子诊断指数

样本	M	N2	T	样本	M	N2	T
215	3	2	5	320	3	5	7
217	1	2	4	339	4	5	7
220	3	2	6	348	5	6	7
221	4	3	6	349	4	4	5
222	3	3	7	358	5	5	8
233	3	4	6	359	5	4	6
245	5	5	7	363	2	0	5
246	6	5	7	365	3	2	6
262	3	1	4	369	3	3	4
265	5	3	8	374	1	5	4
267	5	3	8	376	4	2	7
269	3	1	8	381	1	2	6
270	2	1	6	386	1	1	5
273	3	1	5	398	0	1	6
291	1	4	8	399	0	3	7
296	4	3	7	402		3	5
301	1	2	8	407		2	6
302	5	3	7	409	4	3	6
306	1	4	7	410	4	2	5
310	2	2	7	411	3	2	7

M: 手术切缘; N2: 癌旁2 cm; T: 癌. 从编号215到411共40例肝癌标本, 他们在手术切缘、癌旁2 cm、癌组织中的分子诊断指数是根据8个基因相对表达量 $>$ 或 $<$ 3倍正常组织表达量的基因个数确定的, 即标本中每有一个基因表达量与正常组织相差3倍则分子诊断指数增加1, 因此分子诊断指数0-8, 数字表示基因变异表达的个数.

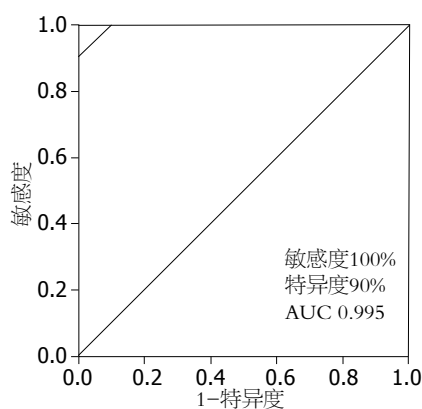


图 2 分子诊断指数的ROC曲线.

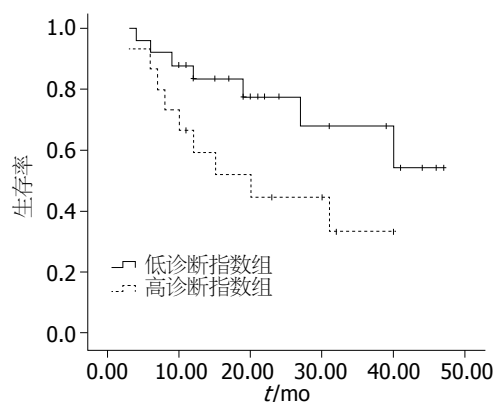


图 3 肝癌低诊断指数组与高诊断指数组的生存曲线.

子诊断指数为2和3外, 其余的34例标本分子诊断指数均 $>$ 5. 王伟丽等^[8]报道了用6个基因建立分子诊断指数, 同时检测了正常肝、肝炎、肝硬化、肝癌组织, 结果正常组和肝炎组分子诊断指数接近于0; 肝硬化组中除1例标本外分子诊断指数介于0-2, 平均值为1.58; 肝癌组中除1例标本外都 \geq 3, 分子诊断指数平均值为5.24, 与肝硬化等组差异显著. 以上结果表明分子诊断指数所具有的可行性和优越性.

Jia等^[6]用GPC3等5个基因对58例HCC标

本、36例肝硬化非癌标本进行检测, 结果表明5个基因组合评分能检测出100%的非癌组织, 71%的癌组织, 说明相对于单个基因检测, 5个基因组合诊断能改善预测的精确性, 包括AFP阴性肝癌及小肝癌. Llovet等^[9]用荧光定量PCR法检测55个基因, 从中筛选出12个肝癌表达特异基因, 进一步应用Logistic回归分析确定了3个基因组合, 包括GPC3、LYVE1、survivin, 用此3基因联合检测早期小肝癌与异型增生结节, 结果分辨精确率达94%. 本研究从以往文献和实验基础上选择肝

癌中表达水平较正常组织差异大、特异性好的多个基因进行分子诊断指数的初步研究. 选择抑癌基因PRDM2^[10,11]、IGFBP3^[12,13]、DLC1^[14,15]、WWOX^[16,17]、癌基因STMN^[18]、CCNA2^[19]、GPC3^[20-22]、BIRC5^[23]、AFP^[24-26]、CD133^[27,28]、UBD^[29]作为分子诊断指数的候选基因, 包括了细胞增殖相关基因、黏附功能相关基因、坏死凋亡相关基因等. 本次实时荧光定量PCR结果表明, 抑癌基因PRDM2、IGFBP3、DLC1、WWOX, 癌基因STMN、CCNA2、GPC3、BIRC5、AFP、CD133、UBD的表达与文献相符. 筛选其中8个基因建立分子诊断指数. 本研究采用分子诊断指数的方法诊断肝癌, 其相对于单基因诊断具有高灵敏性及特异性. 以肝硬化组作为对照组, 肝癌组为实验组, 当分子诊断指数 ≥ 4 诊断为肝癌时, ROC曲线的敏感性为100%, 特异性为90%, AUC为0.995, 阳性结果预示值PPV = 97.6%, 阴性结果预示值NPV = 100%, 准确度 = 98%. 分子诊断指数明显优于单个基因的诊断, 提高了肝癌诊断的准确性, 包括AFP阴性及肿瘤直径 < 3 cm的肝癌(分子诊断指数均 ≥ 4), 可以更早期的发现肿瘤.

从分子诊断指数中还可以看出: 高分化肝癌共有14例, 平均诊断指数为5.9, 是肝硬化组(平均诊断指数为2.2)的2.7倍, 可以有效地对临床上组织病理学难以鉴别的高分化癌结节与肝硬化结节进行诊断; 手术虽然可以将肿瘤完整切除, 病理回报手术切缘亦未见癌侵及, 但在手术切缘仍存在许多分子变异, 并且在肝硬化、癌旁2 cm的硬化组织中亦存在分子变异, 这些分子变异在肝硬化组织、癌旁硬化组织中即已出现, 他们参与了从细胞变性、癌前病变到癌的全过程. GPC3、AFP、STMN等基因在细胞生长、分化及迁移中起重要作用, 他们在癌旁及肝硬化组织中的变异表达提示着某些组织具有恶性潜能, 将来有可能恶变, 正如Hoshida等^[30]研究发现癌旁组织比癌组织基因差异表达能更可靠的预测肝癌复发.

在本研究数据中, 可以发现个别基因在个别样本中的异常表达, 比如癌基因STMN在374癌组织中、CCNA2在386癌组织中、AFP在270、301、381、399癌组织中却呈现低表达, 而抑癌基因PRDM2在349癌组织中呈现高表达, 这可能是分子异质性的结果. 从分子诊断指数上看, 246、348标本在切缘或癌旁2 cm组织中指数偏高(值为6), 而217、262、369、374在癌组中偏

低(值为4), 这可能与肿瘤生长特性有关, 从临床资料中可以看出前2例标本肿瘤直径大, 分化差, 恶性度高, 癌向周围广泛浸润, 而后4例肿瘤直径较小, 分化好, 基因变异表达少. 标本374的癌组诊断指数低于癌旁组, 可能与肿瘤组织坏死影响血供从而基因表达减少有关.

本研究通过定量检测肝癌相关基因表达, 成功建立了分子诊断指数. 初步结果表明: 由多基因组成的分子诊断指数比单一基因能更准确的诊断肝癌; 分子诊断指数能有效鉴别肝硬化结节、肝癌结节; 分子诊断指数在AFP阴性及小肝癌中有较高灵敏度, 可以更早诊断肝癌. 由于从组织中获取基因操作复杂、费用昂贵, 不易在临床开展. 下一步的工作是在外周血中筛选更多、更能反应肝癌生物行为的基因, 优化组合, 并增加癌前病变和早期肝癌的临床样本量, 建立费用低廉、结果可靠、操作简便、可用于临床的分子诊断指数.

4 参考文献

- 1 Stefaniuk P, Cianciara J, Wiercinska-Drapalo A. Present and future possibilities for early diagnosis of hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2010; 16: 418-424
- 2 Capurro M, Wanless IR, Sherman M, Deboer G, Shi W, Miyoshi E, Filmus J. Glypican-3: a novel serum and histochemical marker for hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 2003; 125: 89-97
- 3 Kojiro M, Roskams T. Early hepatocellular carcinoma and dysplastic nodules. *Semin Liver Dis* 2005; 25: 133-142
- 4 Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 2001; 25: 402-408
- 5 Thorgeirsson SS, Lee JS, Grisham JW. Molecular prognostication of liver cancer: end of the beginning. *J Hepatol* 2006; 44: 798-805
- 6 Jia HL, Ye QH, Qin LX, Budhu A, Forgues M, Chen Y, Liu YK, Sun HC, Wang L, Lu HZ, Shen F, Tang ZY, Wang XW. Gene expression profiling reveals potential biomarkers of human hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res* 2007; 13: 1133-1139
- 7 Paradis V, Bièche I, Dargère D, Laurendeau I, Laurent C, Bioulac Sage P, Degott C, Belghiti J, Vidaud M, Bedossa P. Molecular profiling of hepatocellular carcinomas (HCC) using a large-scale real-time RT-PCR approach: determination of a molecular diagnostic index. *Am J Pathol* 2003; 163: 733-741
- 8 王伟丽, 高英堂, 杜智, 王毅军, 景丽, 郭华, 杨斌, 白同. 应用实时荧光定量RT-PCR法建立肝癌分子诊断指数. *世界华人消化杂志* 2009; 17: 985-991
- 9 Llovet JM, Chen Y, Wurmnbach E, Roayaie S, Fiel MI, Schwartz M, Thung SN, Khitrov G, Zhang W, Villanueva A, Battiston C, Mazzaferro V, Bruix J, Waxman S, Friedman SL. A molecular signature to discriminate dysplastic nodules from early hepatocellular carcinoma in HCV cirrhosis. *Gastroenterology* 2006; 131: 1758-1767

- 10 Fang W, Piao Z, Buyse IM, Simon D, Sheu JC, Peruchio M, Huang S. Preferential loss of a polymorphic RIZ allele in human hepatocellular carcinoma. *Br J Cancer* 2001; 84: 743-747
- 11 Fang W, Piao Z, Simon D, Sheu JC, Huang S. Mapping of a minimal deleted region in human hepatocellular carcinoma to 1p36.13-p36.23 and mutational analysis of the RIZ (PRDM2) gene localized to the region. *Genes Chromosomes Cancer* 2000; 28: 269-275
- 12 Luo SM, Tan WM, Deng WX, Zhuang SM, Luo JW. Expression of albumin, IGF-1, IGFBP-3 in tumor tissues and adjacent non-tumor tissues of hepatocellular carcinoma patients with cirrhosis. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 4272-4276
- 13 Subramaniam K, Ooi LL, Hui KM. Transcriptional down-regulation of IGFBP-3 in human hepatocellular carcinoma cells is mediated by the binding of TIA-1 to its AT-rich element in the 3'-untranslated region. *Cancer Lett* 2010; 297: 259-268
- 14 Wong CM, Lee JM, Ching YP, Jin DY, Ng IO. Genetic and epigenetic alterations of DLC-1 gene in hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* 2003; 63: 7646-7651
- 15 Song LJ, Ye SL, Wang KF, Weng YQ, Liang CM, Sun RX, Zhao Y, Liu YK, Tang ZY. [Relationship between DLC-1 expressions and metastasis in hepatocellular carcinoma]. *Zhonghua Ganzangbing Zazhi* 2005; 13: 428-431
- 16 Park SW, Ludes-Meyers J, Zimonjic DB, Durkin ME, Popescu NC, Aldaz CM. Frequent downregulation and loss of WWOX gene expression in human hepatocellular carcinoma. *Br J Cancer* 2004; 91: 753-759
- 17 Yakicier MC, Legoix P, Vaury C, Gressin L, Tubacher E, Capron F, Bayer J, Degott C, Balabaud C, Zucman-Rossi J. Identification of homozygous deletions at chromosome 16q23 in aflatoxin B1 exposed hepatocellular carcinoma. *Oncogene* 2001; 20: 5232-5238
- 18 Lee HS, Lee DC, Park MH, Yang SJ, Lee JJ, Kim DM, Jang Y, Lee JH, Choi JY, Kang YK, Kim DI, Park KC, Kim SY, Yoo HS, Choi EJ, Yeom YI. STMN2 is a novel target of beta-catenin/TCF-mediated transcription in human hepatoma cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 345: 1059-1067
- 19 Jain S, Singhal S, Lee P, Xu R. Molecular genetics of hepatocellular neoplasia. *Am J Transl Res* 2010; 2: 105-118
- 20 Liu H, Li P, Zhai Y, Qu CF, Zhang LJ, Tan YF, Li N, Ding HG. Diagnostic value of glypican-3 in serum and liver for primary hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2010; 16: 4410-4415
- 21 李宝定, 赵青川, 祝仰廷, 张福琴, 窦科峰. 肝癌组织、外周血细胞磷脂酰肌醇蛋白聚糖3 mRNA表达的意义. *中华外科杂志* 2009; 44: 458-462
- 22 Suzuki M, Sugimoto K, Tanaka J, Tameda M, Inagaki Y, Kusagawa S, Nojiri K, Beppu T, Yoneda K, Yamamoto N, Ito M, Yoneda M, Uchida K, Takase K, Shiraki K. Up-regulation of glypican-3 in human hepatocellular carcinoma. *Anticancer Res* 2010; 30: 5055-5061
- 23 Matsunaga Y, Koda M, Murawaki Y. Expression of matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs) in hepatocellular carcinoma tissue, compared with the surrounding non-tumor tissue. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol* 2004; 115-116: 143-150
- 24 Debruyne EN, Delanghe JR. Diagnosing and monitoring hepatocellular carcinoma with alpha-feto-protein: new aspects and applications. *Clin Chim Acta* 2008; 395: 19-26
- 25 常彬霞, 辛绍杰. 甲胎蛋白及其临床应用研究进展. *世界华人消化杂志* 2010; 18: 576-580
- 26 Yamamoto K, Imamura H, Matsuyama Y, Kume Y, Ikeda H, Norman GL, Shums Z, Aoki T, Hasegawa K, Beck Y, Sugawara Y, Kokudo N. AFP, AFP-L3, DCP, and GP73 as markers for monitoring treatment response and recurrence and as surrogate markers of clinicopathological variables of HCC. *J Gastroenterol* 2010; 45: 1272-1282
- 27 Sasaki A, Kamiyama T, Yokoo H, Nakanishi K, Kubota K, Haga H, Matsushita M, Ozaki M, Matsuno Y, Todo S. Cytoplasmic expression of CD133 is an important risk factor for overall survival in hepatocellular carcinoma. *Oncol Rep* 2010; 24: 537-546
- 28 张华, 高志红, 许田英, 朱建凤, 张阳. CD133在肝细胞癌表达的临床意义. *肿瘤研究与临床* 2009; 21: 440-443
- 29 Oliva J, Bardag-Gorce F, Lin A, French BA, French SW. The role of cytokines in UbD promoter regulation and Mallory-Denk body-like aggregates. *Exp Mol Pathol* 2010; 89: 1-8
- 30 Hoshida Y, Villanueva A, Kobayashi M, Peix J, Chiang DY, Camargo A, Gupta S, Moore J, Wrobel MJ, Lerner J, Reich M, Chan JA, Glickman JN, Ikeda K, Hashimoto M, Watanabe G, Daidone MG, Roayaie S, Schwartz M, Thung S, Salvesen HB, Gabriel S, Mazzaferro V, Bruix J, Friedman SL, Kumada H, Llovet JM, Golub TR. Gene expression in fixed tissues and outcome in hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med* 2008; 359: 1995-2004

编辑 李薇 电编 何基才

大肠腺管开口分型与hMLH1和hMSH2蛋白表达在染色放大内镜下的相关性

唐采白, 程慧敏, 杨伟利, 赵俊华, 王恒

■背景资料

大肠肿瘤是常见肿瘤, 在我国绝大部分大肠癌在发现时已近中晚期, 5年生存率在30%-60%, 所以早期诊断大肠癌和研究其发病机制以期寻找更加有效的治疗方法显得尤为重要。近年来, 我国部分医院开展了染色放大内镜工作, 并发表了一些研究报告, 但通过染色放大内镜观察肠的微细结构及其与DNA错配修复酶hMLH1、hMSH2表达的相关性国内报道很少。

唐采白, 赵俊华, 王恒, 徐州医学院附属第三医院消化科 江苏省徐州市 221003

程慧敏, 杨伟利, 徐州医学院附属第三医院病理科 江苏省徐州市 221003

唐采白, 副教授, 主要从事消化系统肿瘤临床病理研究和消化系统疾病内镜诊断和介入治疗研究。

江苏省徐州市科技计划基金资助项目, No. XM08C067

作者贡献分布: 唐采白与程慧敏对此文所作贡献均等; 此课题由唐采白与程慧敏设计; 研究过程由唐采白、程慧敏、杨伟利、赵俊华及王恒操作完成; 数据分析由唐采白与程慧敏完成; 本文写作由唐采白与程慧敏完成。

通讯作者: 程慧敏, 主任医师, 副教授, 221003, 江苏省徐州市, 徐州医学院附属第三医院病理科, chenghuimin530323@yahoo.cn 电话: 0516-83638269

收稿日期: 2010-11-15 修回日期: 2011-01-14

接受日期: 2011-01-21 在线出版日期: 2011-02-28

Relationship between pit patterns of colorectal polypoid lesions classified by magnifying chromoendoscopy and expression of hMLH1 and hMSH2 proteins in colorectal mucosa

Cai-Bai Tang, Hui-Min Cheng, Wei-Li Yang, Jun-Hua Zhao, Heng Wang

Cai-Bai Tang, Jun-Hua Zhao, Heng Wang, Department of Gastroenterology, the Third Affiliated Hospital of Xuzhou Medical College, Xuzhou 221003, Jiangsu Province, China
Hui-Min Cheng, Wei-Li Yang, Department of Pathology, the Third Affiliated Hospital of Xuzhou Medical College, Xuzhou 221003, Jiangsu Province, China

Supported by: the Foundation of Science and Technology of Xuzhou City in Jiangsu Province, No. XM08C067

Correspondence to: Associate Professor Hui-Min Cheng, Department of Pathology, the Third Affiliated Hospital of Xuzhou Medical College, Xuzhou 221003, Jiangsu Province, China. chenghuimin530323@yahoo.cn

Received: 2010-11-15 Revised: 2011-01-14

Accepted: 2011-01-21 Published online: 2011-02-28

Abstract

AIM: To explore the relationship between pit patterns of colorectal polypoid lesions classified by magnifying chromoendoscopy and expression of human MutL homolog 1/2 (hMLH1/2) proteins in colorectal mucosa.

METHODS: Colorectal lesions in 146 patients

were classified as type I to V pit patterns by magnifying chromoendoscopy using the Kudo criteria. All lesions were pathologically confirmed as nonneoplastic, adenomatous or cancerous lesions. Colorectal mucosal biopsy specimens were used to detect the expression of hMLH1 and hMSH2 proteins by immunohistochemistry.

RESULTS: A total of 256 polypoid lesions were found in 146 patients by magnifying chromoendoscopy. The rates of loss of hMLH1 and hMSH2 protein expression increased gradually from type I to type V pit patterns in 256 polypoid lesions [hMLH1: 0.0% (0/11), 1.61% (1/62), 19.68% (25/127), 33.33% (1/3), 32.26% (10/31), 36.36% (8/22); hMSH2: 0.00% (0/11), 3.22% (2/62), 16.53% (21/127), 33.33% (1/3), 35.48% (11/31), 40.90% (9/22); all $P < 0.01$]. The rates of loss of hMLH1 and hMSH2 expression were 2.70% and 4.05% in nonneoplastic lesions, 23.07% and 16.92% in adenoma lesions, and 25% and 30.76% in cancerous lesions. The rates of loss of hMLH1 and hMSH2 protein expression were significantly higher in cancerous lesions than in adenomatous and nonneoplastic lesions (both $P < 0.01$). There was no significant difference between the rate of loss of hMLH1 and that of hMSH2 protein expression in all lesions (all $P > 0.05$).

CONCLUSION: The rates of loss of hMLH1 and hMSH2 protein expression gradually increased from type I to type V pit patterns, suggesting that mutation or functional deficiency of DNA mismatch repair genes is an early event in colorectal carcinogenesis. Lesion classification by magnifying chromoendoscopy or detection of the loss of hMLH1 and hMSH2 protein expression can help identify precancerous and colorectal lesions from colorectal lesions.

Key Words: Colorectal Neoplasm; hMLH1; hMSH2; Immunohistochemistry; Pit pattern; Magnifying chromoendoscopy

Tang CB, Cheng HM, Yang WL, Zhao JH, Wang H. Re-

■同行评议者

姜春萌, 教授, 大连医科大学附属第二医院消化科

relationship between pit patterns of colorectal polypoid lesions classified by magnifying chromoendoscopy and expression of hMLH1 and hMSH2 proteins in colorectal mucosa. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2011; 19(6): 596-601

摘要

目的: 探讨染色放大内镜下大肠病变的腺管开口分型与病变组织hMLH1和hMSH2蛋白表达的关系。

方法: 根据Kudo分型方法, 染色放大内镜下大肠病变腺管开口分为 I - V 型; 所有病灶性质由病理组织学分别确诊为非肿瘤性病变、腺瘤性病变及癌性病变; 免疫组织化学方法检测活检组织hMLH1和hMSH2蛋白的表达。

结果: 应用染色放大内镜对146例患者的大肠黏膜进行细微结构形态学观察, 共检出息肉样病变256枚。随着腺管开口分型序数的递增, 活检组织中hMLH1与hMSH2蛋白的丢失率逐渐增高, I - V 型hMLH1丢失率分别为0.00%(0/11)、1.61%(1/62)、19.68%(25/127)、33.33%(1/3)、32.26%(10/31)、36.36%(8/22); hMSH2蛋白丢失率分别为0.00%(0/11)、3.22%(2/62)、16.53%(21/127)、33.33%(1/3)、35.48%(11/31)、40.90%(9/22), 组间两两比较差异有统计学意义(均 $P < 0.01$); 74例大肠黏膜非肿瘤性病变中2例hMLH1表达阴性, 占2.70%(2/74), 3例hMSH2表达阴性, 占4.05%(3/74); 130例腺瘤组织中30例hMLH1表达阴性, 占23.07%(30/130), 22例hMSH2表达阴性, 占16.92%(22/130); 52例癌变组织中13例hMLH1表达阴性, 占25%(13/52), 16例hMSH2表达阴性, 占30.76%(16/52), 癌性病变组hMLH1与hMSH2蛋白的丢失率明显高于腺瘤性病变组及非肿瘤性病变组(均 $P < 0.01$); hMSH2与hMLH1蛋白的丢失率在不同病变组织中(非肿瘤性病变、腺瘤性病变及癌性病变)无相关性(均 $P > 0.05$)。

结论: 随着大肠腺管分型序数的递增, hMLH1和hMSH2蛋白的丢失率逐渐增加, 与大肠病变病理诊断中的丢失率具有一致性, 提示DNA错配修复基因突变或功能缺失可能是大肠发生癌变进程中的早期事件, 染色放大内镜下随访大肠腺管组织中hMLH1和hMSH2蛋白的丢失率有助于发现癌前病变、大肠癌。

关键词: 大肠肿瘤; hMLH1; hMSH2; 免疫组织化学; 腺管开口; 染色放大内镜

华人消化杂志 2011; 19(6): 596-601

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/596.asp>

0 引言

DNA错配修复基因作为一组高度保守的看家基因, 主要功能是纠正复制和重组中的碱基配对错误及因基因损伤所致的碱基配对错误、碱基插入、缺失等损伤, 对DNA基因组的稳定性起着重要的作用。研究表明^[1-8], 错配修复基因的突变是结直肠癌发生发展的重要途径之一, 其中hMLH1和hMSH2是最重要的两个错配修复基因。日本学者Kudo等^[9]研究发现, 结直肠腺管开口即凹窝形态在不同性质的病变中有不同特征, 并提出Kudo分型。为此, 本研究采用染色放大内镜观察大肠腺管开口分型, 同时应用免疫组织化学的方法检测大肠病变组织中错配修复基因hMSH2、hMLH1蛋白的表达丢失情况, 探讨hMSH2和hMLH1蛋白的丢失率与染色放大内镜下大肠腺管开口分型之间的相关性。

1 材料和方法

1.1 材料 选择2008-01/2010-06在徐州医学院第三附院消化科行结肠镜检的结直肠疾病患者146例, 其中男97例、女49例, 年龄27-83(平均58.3)岁。放大电子结肠镜为日本Olympus公司产CF TYPE H260AZI型, 染色剂采用0.2%靛胭脂液, 所有检查均由同一内镜医师操作及做出内镜下诊断。146例患者经0.2%靛胭脂染色放大后发现息肉样病变256枚。患者检查前均签署知情同意书, 并经医院伦理委员会批准。

1.2 方法

1.2.1 腺管开口类型: 采用工藤进英Kudo的分型方法, 其分类如下: I 型为规则圆形小窝; II 型为规则星状或乳头样小窝; III L 型为大管状或大圆形小窝; III s 型为圆管状小窝; IV 型为脑沟或脑回状; V 型不规则或无结构。I 型为正常或黏膜下肿物, II 型为炎性息肉, III 型为凹陷性肿瘤或隆起性肿瘤, IV 型为绒毛状腺瘤, V 型为大肠癌。最终非肿瘤性病变、腺瘤性病变及癌性病变判定以病理组织学诊断为标准。

1.2.2 SP法观察hMLH1和hMSH2蛋白的表达: hMSH2和hMLH1单克隆抗体购自美国Santa Cruz生物制剂公司, SP(鼠)免疫组织化学试剂盒购自福州迈新生物技术开发公司。采用免疫组织化学方法进行染色, 一抗浓度均稀释为1:200。标本经甲醛固定, 石蜡包埋, 切成4 μm厚的组织切片,

■ 相关报道

Fu等应用染色放大内镜在122例患者中发现206个大肠息肉样病变, 最后经病理学证实染色放大内镜对瘤性的和非瘤性病变的诊断准确性达95.6%, 而普通电子结肠镜仅84%。

唐采白, 程慧敏, 杨伟利, 赵俊华, 王恒. 大肠腺管开口分型与hMLH1和hMSH2蛋白表达在染色放大内镜下的相关性. 世界

■创新盘点

本研究通过染色放大内镜的方法,观察大肠表面微细结构改变,按大肠腺管开口形态进行分型。对大肠病变hMLH1和hMSH2蛋白表达进行同步检测,分析其在大肠病变组织中的表达差异,对大肠癌的发病机制提出新的观点,评价大肠腺管开口类型结合肿瘤相关基因的检测对于判断大肠非肿瘤性和肿瘤性病变的诊断价值。

表 1 256枚息肉样病变pit类型与组织学改变的关系

Pit分型	n	病理诊断		
		非肿瘤性病变	腺瘤性病变	癌性病变
I型	11	11	0	0
II型	62	55	7	0
III L型	127	8	107	12
III s型	3	0	3	0
IV型	31	0	8	23
V型	22	0	5	17
合计	256	74	130	52

附于玻片上。实验采用免疫组织化学SP法,步骤按试剂盒说明书进行操作。用正常大肠细胞核棕黄色染色为阳性对照,用PBS液代替一抗作为阴性对照,切片内细胞hMLH1或hMSH2蛋白检测缺乏核染色者记录为失表达,每次实验均设阴性及阳性对照。hMLH1和hMSH2蛋白表达主要表现为细胞核出现棕色或棕褐色颗粒。结果判定: hMLH1和hMSH2蛋白表达情况,以每张切片的阳性细胞数<5%为蛋白表达缺失,≥5%为蛋白表达阳性。

统计学处理 用SPSS13.0统计软件对实验数据进行统计学分析, hMSH2、hMLH1蛋白在大肠病变活检组织中的表达变化结果及其与腺管开口分型之间的比较采用 χ^2 检验,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 染色放大内镜下观察腺管开口分型结果 146例患者经0.2%的靛胭脂染色放大后发现息肉样病变256枚,息肉样病变腺管开口分型按照工藤进英提出的pit分型标准,本组256枚息肉样病变pit分型为I型11枚,II型62枚,III s型3枚,IIIL型127枚,IV型31枚,V型22枚(图1)。根据病理组织学诊断结果,256枚I型至V型息肉样病变经病理诊断为非肿瘤性病变、腺瘤性病变、癌性病变例数详见表1。

2.2 腺管开口分型与hMLH1和hMSH2的表达的关系 I-V型腺管开口形态中均有hMLH1与hMSH2蛋白表达,随着腺管开口分型序数的递增, hMLH1与hMSH2蛋白的丢失率逐渐增高, I-V型hMLH1丢失率分别为0.0%(0/11)、1.61%(1/62)、19.68%(25/127)、33.33%(1/3)、32.26%(10/31)、36.36%(8/22); hMSH2蛋白丢失率分别为0.00%(0/11)、3.22%(2/62)、16.53%(21/127)、33.33%(1/3)、35.48%(11/31)

表 2 256枚息肉样病变pit类型与hMLH1和hMSH2表达的关系 (n)

Pit分型	n	hMLH1		hMSH2	
		阳性	阴性	阳性	阴性
I型	11	11	0	11	0
II型	62	61	1	60	2
III L型	127	102	25	106	21
III s型	3	2	1	2	1
IV型	31	21	10	20	11
V型	22	14	8	13	9
P值		0.0002		0.0001	
χ^2 值		24.13		27.35	

表 3 hMLH1与hMSH2在大肠病变活检组织和正常组织中的丢失结果 (n)

分组	n	hMLH1	hMSH2
非肿瘤性病变	74	2	3
腺瘤性病变	130	30	22
癌性病变	52	13	16
P值		0.0003	
χ^2 值		15.99	

40.90%(9/22), 组间两两比较差异有统计学意义($P<0.01$, 表2)。

2.3 hMLH1与hMSH2在大肠病变活检组织中的表达 非肿瘤性病变、腺瘤及癌变组织中hMLH1和hMSH2有不同程度的表达。74例大肠黏膜非肿瘤性病变包括炎性息肉、增生性息肉、幼年性息肉、黑斑息肉及肥大增生等,其中2例hMLH1表达阴性,3例hMSH2表达阴性;130例腺瘤组织中hMLH1和hMSH2多呈弥漫性表达,部分区域呈局灶性表达增强,其中30例hMLH1表达阴性,22例hMSH2表达阴性;52例癌变组织中hMLH1和hMSH2为灶性表达(图2),其中13例hMLH1表达阴性,16例hMSH2表达阴性;腺瘤组及癌变组hMLH1、hMSH2蛋白丢失率与非肿瘤性病变组比较差异显著($P<0.001$, 表3)。另外,在不同病变组织中(非肿瘤性病变、腺瘤性病变及癌性病变),hMSH2与hMLH1蛋白的丢失率经Spearman关联性分析,无相关性($P=0.3333$)。

3 讨论

肿瘤的发生是一个多基因参与多阶段的过程,人体细胞有一系列的机制保证遗传物质的稳定性,DNA错配修复系统是其中之一。错配修复基因是一组高度保守的管家基因, hMLH1和hMSH2基因是人类错配修复系统的重要成员,



图 1 256枚息肉样病变pit类型与组织学改变的关系. A: I型; B: II型; C: III型; D: IV型; E: V型.

■应用要点

随着大肠腺管分型序数的递增, hMLH1和hMSH2蛋白的丢失率逐渐增加, 与大肠病变病理诊断中的丢失率具有一致性, 提示DNA错配修复基因突变或功能缺失可能是大肠发生癌变进程中的早期事件, 染色放大内镜下检测大肠腺管组织中hMLH1和hMSH2蛋白的丢失率有助于发现癌前病变、大肠癌.

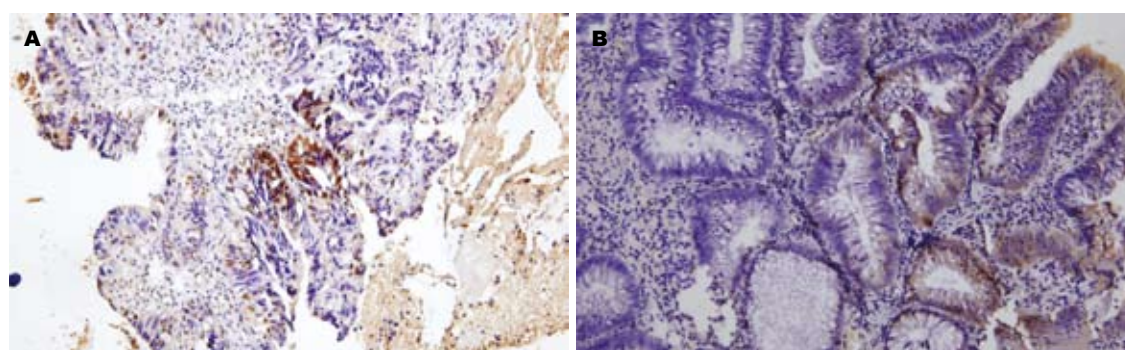


图 2 大肠癌变组织(免疫组织化学×200). A: hMSH2; B: hMLH1.

其中任何一种错配修复基因突变最终将导致机体DNA错配修复系统功能的异常, 可引起广泛的体细胞突变和DNA复制错误, 错配修复功能缺失也可导致一些抑癌基因突变率的增加和突变的积累而促进肿瘤的发生.

hMLH1和hMSH2与多种肿瘤的发生、发展关系密切, 他们的异常表达无论在遗传性肿瘤还是散发性肿瘤中均有发现^[10-14]. 资料表明, hMLH1在碱基错配修复过程中发挥着解旋及切开错配碱基的关键作用, hMSH2基因是最早被发现的人类错配修复基因, 是细菌MutS和酵母菌MSH2的人类同源体, 其编码蛋白参与组成hMutS二聚体, 此二聚体能识别DNA复制中的错配碱基及插入缺失环, 是完成DNA修复的必需组件. hMLH1和hMSH2蛋白表达水平的降低能

引起DNA错配修复功能低下, 使癌相关基因突变不能及时得以纠正, 从而导致肿瘤的易感性增加^[15-18].

近年来, 随着内镜放大倍数和分辨率的提高, 染色放大内镜在大肠疾病诊断中的应用逐渐增多^[19-24]. 日本学者Kudo等^[9]提出的黏膜腺管开口分型为染色放大内镜检查提供了诊断标准, 对染色黏膜观察后再采用放大内镜对大肠腺管开口分型进行仔细观察, 可以大致判断是否为肿瘤性病变以及病变的浸润程度^[25-29]. Emura等^[30]研究表明染色放大内镜按Kudo分类法鉴别良恶性肿瘤, 其敏感性和特异性均在90%以上. 染色放大内镜有助于早期大肠癌发现, 但目前染色放大内镜下大肠黏膜微细结构改变与致癌基因突变的关系尚相关报道.

同行评价

本文科学性较好, 具有较好的临床实用性.

本研究采用染色放大内镜观察到256枚大肠黏膜息肉样病变, 在大肠黏膜腺管开口 I - V 型中hMLH1蛋白的丢失率分别为0.0%(0/11)、1.61%(1/62)、19.68%(25/127)、33.33%(1/3)、32.26%(10/31)、36.36%(8/22), hMSH2蛋白的丢失率分别为0.00%(0/11)、3.22%(2/62)、16.53%(21/127)、33.33%(1/3)、35.48%(11/31) 40.90%(9/22), 随大肠黏膜腺管开口分型序数的递增, 其丢失率逐渐升高. 病理诊断中非肿瘤性病变-腺瘤性病变-癌性病变hMLH1和hMSH2基因蛋白的丢失率亦逐渐升高, 与大肠黏膜腺管开口 I - V 型中hMLH1蛋白的丢失率具有一致性. 本研究比较了大肠黏膜非肿瘤性病变、腺瘤性病变及癌性病变中hMLH1和hMSH2蛋白表达丢失率, 经统计学分析hMLH1和hMSH2蛋白表达丢失率无相关性, 所以两者在大肠癌变的过程中各自发挥不同作用.

本研究显示, 随着大肠腺管开口序数的升高, hMLH1和hMSH2蛋白的丢失率逐渐增加, 与大肠病变病理诊断中的丢失率具有一致性. hMLH1和hMSH2基因蛋白的丢失率从非肿瘤性病变、腺瘤性病变到癌性病变逐渐升高, 提示在肿瘤发生的早期阶段已经有MMR的基因的突变或功能异常, 尤其是hMLH1和hMSH2的突变可能是大肠癌发生的早期事件之一. 因此, 染色放大内镜下随访大肠腺管组织中hMLH1和hMSH2蛋白的丢失率有助于发现癌前病变、大肠癌.

参考文献

- 1 刘文志, 王亚东, 柳仲林, 王舒宝. hMLH1和hMSH2表达在中国人遗传性非息肉病性结直肠癌遴选中的价值. *中国癌症杂志* 2010; 19: 662-666
- 2 丁小兵, 王梦龙. 错配修复基因与结直肠癌. *现代肿瘤医学* 2007; 15: 423-425
- 3 顾国利, 魏学明, 王石林, 任力, 胡益云, 李德昌. 遗传性非息肉病性大肠癌中hMSH2、hMLH1、TβR II、MMP-7及TIMP-2的表达和其特殊生物学行为间的关系. *世界华人消化杂志* 2007; 15: 1738-1744
- 4 黄彦钦, 袁瑛, 王亚平, 朱明, 张苏展, 郑树. 中国人遗传性非息肉病性结直肠癌家系错配修复基因突变的研究. *中华外科杂志* 2007; 43: 317-320
- 5 Berndt SI, Platz EA, Fallin MD, Thuita LW, Hoffman SC, Helzlsouer KJ. Mismatch repair polymorphisms and the risk of colorectal cancer. *Int J Cancer* 2007; 120: 1548-1554
- 6 宋伟庆, 韩彩丽, 周保军, 张轶华, 陈怡, 刘玉, 韦金英. COX-2与hMLH1、hMSH2在大肠癌中表达的相关性研究. *世界华人消化杂志* 2005; 13: 105-109
- 7 杨磊, 丁彦青, 李国新, 余江, 王瑜, 周军, 杨红军, 张进华. 青年大肠癌微卫星不稳定和hMLH1/hMSH2表达缺失在遗传性非息肉病性大肠癌初筛中的应用. *南方医科大学学报* 2007; 27: 779-782
- 8 付蕾, 盛剑秋, 孙自勤, 韩敏, 黄继胜, 牧宏, 韩文良, 牛

- 宏, 李爱琴, 武子涛, 李世荣. 76个中国人遗传性非息肉病性大肠癌家系hMLH1和hMSH2基因突变规律研究. *胃肠病学和肝病学杂志* 2007; 16: 459-461
- 9 Kudo S, Tamura S, Nakajima T, Yamano H, Kusaka H, Watanabe H. Diagnosis of colorectal tumorous lesions by magnifying endoscopy. *Gastrointest Endosc* 1996; 44: 8-14
- 10 Park JW, Chang HJ, Park S, Kim BC, Kim DY, Baek JY, Kim SY, Oh JH, Choi HS, Park SC, Jeong SY. Absence of hMLH1 or hMSH2 expression as a stage-dependent prognostic factor in sporadic colorectal cancers. *Ann Surg Oncol* 2010; 17: 2839-2846
- 11 Altavilla G, Fassan M, Busatto G, Orsolan M, Giacomelli L. Microsatellite instability and hMLH1 and hMSH2 expression in renal tumors. *Oncol Rep* 2010; 24: 927-932
- 12 Vageli D, Daniil Z, Dahabreh J, Karagianni E, Vamvakopoulou DN, Ioannou MG, Scarpinato K, Vamvakopoulos NC, Gourgoulis KI, Koukoulis GK. Phenotypic mismatch repair hMSH2 and hMLH1 gene expression profiles in primary non-small cell lung carcinomas. *Lung Cancer* 2009; 64: 282-288
- 13 Li M, Liu L, Wang Z, Wang L, Liu Z, Xu G, Lu S. Overexpression of hMSH2 and hMLH1 protein in certain gastric cancers and their surrounding mucosae. *Oncol Rep* 2008; 19: 401-406
- 14 Zheng JY, Ren TS, Liu B, Wang MN, Liao HH. [Expression and significance of mismatch repair genes hMLH1 and hMSH2 in sporadic colorectal carcinoma]. *Zhonghua Zhongliu Zazhi* 2010; 32: 590-594
- 15 夏嶙, 刘希双, 杨堃, 隋爱华. 错配修复基因hMLH1和hMSH2在胃癌组织中的表达及意义. *世界华人消化杂志* 2009; 17: 3446-3450
- 16 Stasikowska-Kanicka O, Stawarski P, Wagrowska-Danilewicz M, Danilewicz M. Immunohistochemical analysis of hMLH1 and hMSH2 proteins in serous ovarian tumours. *Pol J Pathol* 2009; 60: 174-178
- 17 Czerninski R, Krichevsky S, Ashhab Y, Gazit D, Patel V, Ben-Yehuda D. Promoter hypermethylation of mismatch repair genes, hMLH1 and hMSH2 in oral squamous cell carcinoma. *Oral Dis* 2009; 15: 206-213
- 18 Naqvi RA, Hussain A, Deo SS, Kukreti H, Chauhan M, Sarin R, Saxena A, Asim M, Shukla NK, Husain SA, Pasha ST, Basir SF. Hypermethylation analysis of mismatch repair genes (hmlh1 and hmsh2) in locally advanced breast cancers in Indian women. *Hum Pathol* 2008; 39: 672-680
- 19 王焱, 李志霞, 安大立, 韩加刚, 吴江平. 放大内镜在结直肠肿瘤样病变诊断治疗中的应用价值. *中华胃肠外科杂志* 2005; 8: 416-418
- 20 张志镒, 吴正奇, 米登海, 卢林芝, 石淑琴, 赵光源. 染色内镜与放大内镜诊治大肠息肉的临床研究. *中国内镜杂志* 2005; 11: 1144-1149
- 21 姜泊, 张亚历. 应重视肠道疾病临床诊疗中新技术的应用. *中华内科杂志* 2006; 45: 4-5
- 22 Kiesslich R, Neurath MF. Chromo- and magnifying endoscopy for colorectal lesions. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2005; 17: 793-801
- 23 Fu KI, Kato S, Sano Y, Fujii T. Magnification with chromoendoscopy is the most reliable method to determine whether colorectal lesions are neoplastic or not. *Endoscopy* 2007; 39: 476; author reply 477
- 24 Thorlacius H, Toth E. Role of chromoendoscopy in colon cancer surveillance in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 2007; 13: 911-917
- 25 Kanao H, Tanaka S, Oka S, Kaneko I, Yoshida S, Arihiro K, Yoshihara M, Chayama K. Clinical sig-

- nificance of type V(l) pit pattern subclassification in determining the depth of invasion of colorectal neoplasms. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 211-217
- 26 Hurlstone DP, Sanders DS. Recent advances in chromoscopic colonoscopy and endomicroscopy. *Curr Gastroenterol Rep* 2006; 8: 409-415
- 27 杜仙蓉, 刘锦涛. 放大内镜结合染色内镜对早期大肠癌及其癌前病变的诊断和治疗. *国际消化病杂志* 2008; 28: 501-503
- 28 Li X, Chen H, Gao Y, Chen X, Ge Z. Prediction of histology and invasive depth of colorectal neoplasia based on morphology of surface depression using magnifying chromocolonoscopy. *Int J Colorectal Dis* 2010; 25: 79-85
- 29 王明春, 李绥军, 周福润, 鞠爱红, 刘彩霞, 黄留业. 染色放大内镜对结直肠早期癌及癌前病变的诊断价值. *中华消化内镜杂志* 2005; 22: 353-354
- 30 Emura F, Saito Y, Taniguchi M, Fujii T, Tagawa K, Yamakado M. Further validation of magnifying chromocolonoscopy for differentiating colorectal neoplastic polyps in a health screening center. *J Gastroenterol Hepatol* 2007; 22: 1722-1727

编辑 李薇 电编 何基才

ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) CN 14-1260/R 2011年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

《世界华人消化杂志》性质、刊登内容及目标

本刊讯 《世界华人消化杂志》[国际标准刊号ISSN 1009-3079 (print), ISSN 2219-2859 (online), 国内统一刊号CN 14-1260/R, Shijie Huaren Xiaohua Zazhi/*World Chinese Journal of Digestology*], 是一本由来自国内23个省、市、自治区、特别行政区的496位胃肠病学和肝病专家支持的开放存取的同行评议的旬刊杂志, 旨在推广国内各地的胃肠病学和肝病领域临床实践和基础研究相结合的最具有临床意义的原创性及各类评论性的文章, 使其成为一种公众资源, 同时科学家、医生、患者和学生可以通过这样一个不受限制的平台来免费获取全文, 了解其领域的所有的关键的进展, 更重要的是这些进展会为本领域的医务工作者和研究者服务, 为他们的患者及基础研究提供进一步的帮助。

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

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

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

KLF6和WWOX蛋白在结直肠癌组织中的表达及意义

万晓娟, 宋锐锋, 陈玉龙, 徐珂, 徐峰

■背景资料

结直肠癌是消化系统常见的恶性肿瘤之一。近年来, 随着我国生活水平不断提高及饮食习惯的改变, 结直肠癌的发病率及死亡率呈上升趋势, 严重危害人们的健康。因此, 探讨结直肠癌的发病机制, 寻找有效预防及治疗的途径, 是目前迫切需要解决的问题。

万晓娟, 宋锐锋, 陈玉龙, 徐峰, 郑州大学第一附属医院消化内科 河南省郑州市 450052

徐珂, 河南师范大学生命科学学院 河南省新乡市 453007
万晓娟, 在读硕士, 主要从事消化系统肿瘤的基础与临床研究。

作者贡献分布: 此课题由万晓娟与徐峰设计; 研究过程及统计分析由万晓娟、宋锐锋及徐珂完成; 研究所用材料由徐峰提供; 本论文写作由万晓娟完成; 徐峰与陈玉龙审阅。

通讯作者: 徐峰, 教授, 主任医师, 450052, 河南省郑州市建设东路1号, 河南省郑州大学第一附属医院消化内科。

xufengmd@sina.com

电话: 0371-66295927

收稿日期: 2010-11-16 修回日期: 2011-01-06

接受日期: 2011-01-11 在线出版日期: 2011-02-28

Significance of KLF6 and WWOX protein expression in colorectal carcinoma

Xiao-Juan Wan, Rui-Feng Song, Yu-Long Chen, Ke Xu, Feng Xu

Xiao-Juan Wan, Rui-Feng Song, Yu-Long Chen, Feng Xu, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, Henan Province, China

Ke Xu, College of Life Sciences, Henan Normal University, Xinxiang 453007, Henan Province, China

Correspondence to: Professor Feng Xu, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, 1 East Jianshe Road, Zhengzhou 450052, Henan Province, China. xufengmd@sina.com

Received: 2010-11-16 Revised: 2011-01-06

Accepted: 2011-01-11 Published online: 2011-02-28

Abstract

AIM: To investigate the expression of Kruppel-like factor 6 (KLF6) and WW domain-containing oxidoreductase (WWOX) proteins in colorectal carcinoma and to analyze their clinicopathological significance.

METHODS: The expression of KLF6 and WWOX proteins was detected by immunohistochemistry in 40 colorectal carcinoma specimens and 40 normal colorectal mucosa specimens.

RESULTS: The positive rates of KLF6 and WWOX protein expression differed significantly between colorectal carcinoma and normal colorectal mucosa (KLF6: 45.0% vs 82.5%, WWOX: 37.5% vs 90.0%, both $P < 0.05$). The expression of KLF6 and WWOX proteins was

found to be associated with tumor differentiation, lymph node metastasis, and tumor invasion in colorectal carcinoma (all $P < 0.05$). A positive correlation was noted between the expression of KLF6 and that of WWOX in colorectal carcinoma ($r = 0.320$, $P < 0.05$).

CONCLUSION: Reduced expression of KLF6 and WWOX proteins may be related with the development, progression, and prognosis of colorectal carcinoma. Combined detection of KLF6 and WWOX protein expression is helpful for diagnosis and evaluation of the prognosis of colorectal carcinoma.

Key Words: Colorectal carcinoma; Kruppel-like factor 6; WW domain-containing oxidoreductase; Immunohistochemistry

Wan XJ, Song RF, Chen YL, Xu K, Xu F. Significance of KLF6 and WWOX protein expression in colorectal carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(6): 602-607

摘要

目的: 探讨KLF6和WWOX蛋白在结直肠癌组织中的表达及其临床病理意义。

方法: 采用免疫组织化学法分别检测40例结直肠癌及40例正常结直肠黏膜组织中KLF6和WWOX蛋白的表达, 并分析两者的表达水平与其临床病理因素的关系。

结果: 结直肠癌组织中的KLF6和WWOX蛋白的阳性表达率明显低于正常结直肠黏膜组织(45.0% vs 82.5%; 37.5% vs 90.0%, 均 $P < 0.05$), KLF6和WWOX蛋白在结直肠癌组织中的表达呈正相关($r = 0.320$, $P < 0.05$), 并与肿瘤组织的分化程度、淋巴结转移及浸润深度均密切相关(均 $P < 0.05$)。

结论: KLF6和WWOX的低表达可能与结直肠癌的发生、发展及预后有关, 联合检测两者对结直肠癌的诊断及预后判断具有重要意义。

关键词: 结直肠癌; Kruppel样因子6; 包含氧化还原酶的WW域; 免疫组织化学

■同行评议者

顾国利, 副主任医师, 中国人民解放军空军总医院普通外科

万晓娟, 宋锐锋, 陈玉龙, 徐珂, 徐峰. KLF6和WVOX蛋白在结直肠癌组织中的表达及意义. 世界华人消化杂志 2011; 19(6): 602-607

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/602.asp>

0 引言

结直肠癌是消化系统常见的恶性肿瘤之一, 在欧美国家居恶性肿瘤死因的第2位^[1]. 近年来, 随着我国生活水平的不断提高及饮食习惯的改变, 结直肠癌的发病率及死亡率呈上升趋势^[2], 严重危害人们的健康. 因此, 探讨结直肠癌的发病机制, 寻找有效预防及治疗的途径, 是目前迫切需要解决的问题. Kruppel样因子6(Kruppel-like factor 6, KLF6), 又称锌指转录因子9(zinc finger factor9, ZP9), 是一种具有抑制细胞生长、促进凋亡、参与细胞衰老调控的抑癌基因^[3,4], 虽然在肝癌^[5,6]、前列腺癌^[7-10]等方面的研究较多, 但在结直肠癌方面的报道相对少见. 包含氧化还原酶的WW域(WW domain-containing oxidoreductase, WVOX)是Bednarek等^[11]在2000年应用鸟枪基因测序技术鉴定出的一种候选抑癌基因. 有文献报道, 在人类卵巢癌、肺癌、胃癌等多种肿瘤中WVOX呈现低表达, 并与肿瘤浸润深度、淋巴结转移及临床病理分期有关, 还发现过表达的WVOX可以诱导肿瘤细胞凋亡并抑制其生长^[12-15]. KLF6和WVOX蛋白分别在多种恶性肿瘤中存在异常表达, 但联合检测两者在结直肠癌的表达及相关性研究, 迄今国内外均未见报道. 本实验采用免疫组织化学法检测KLF6和WVOX蛋白在40例结直肠癌及40例正常结直肠黏膜组织中的表达, 并探讨两者与结直肠癌发生、发展的关系及其临床意义.

1 材料和方法

1.1 材料 收集郑州大学第一附属医院2008-2009年期间手术切除的结直肠癌标本40例及40例相应的癌旁正常组织(距肿瘤边缘 ≥ 5 cm). 患者术前均未行放化疗及免疫治疗. 其中男19例, 女21例, 年龄30-81岁, 均经病理学确诊并有完整的临床资料. 所有组织均用40 g/L中性甲醛固定, 常规石蜡包埋, 4 μ m厚的连续切片. 其中有淋巴结转移17例, 无淋巴结转移23例; 按组织学分级, 高+中分化21例, 低分化+黏液腺癌19例; 有浆膜浸润22例, 无浆膜浸润18例; 浓缩型兔抗KLF6多克隆抗体、浓缩型兔抗WVOX多克隆抗体、SP免疫组化染色试剂盒均购自北京博奥森生物技术有限公司, DAB显色试剂盒购自北京中杉金

桥生物技术有限公司.

1.2 方法

1.2.1 免疫组织化学: 采用链霉菌抗生物素蛋白-过氧化物酶连接法(streptavidin- peroxidase, SP). KLF6和WVOX抗体稀释浓度均为1:100, DAB显色, 苏木素复染, 操作步骤严格按照说明书进行. 实验中以已知的阳性组织(KLF6: 肺癌组织; WVOX: 胃癌组织)作阳性对照, PBS液代替一抗作阴性对照.

1.2.2 评分方法: 参考许红霞等^[16]的计分方法, 并做适当修改: KLF6以腺体胞质和(或)胞核出现黄色颗粒为阳性, WVOX以腺体胞质中出现黄色颗粒为阳性, 随机选取5个高倍视野计数, 以阳性细胞数和着色强度综合判断. 着色强度计分: 无色0分, 淡黄色1分, 棕黄色2分, 黄褐色3分; 阳性细胞数计分: 0%-5%为0分, 6%-25%为1分, 26%-50%为2分, 51%-75%为3分, >75%为4分, 以上两项之积, 0-4分为蛋白表达降低或缺失(阴性), 5-12分为中(+)、高(++)度阳性表达(阳性).

统计学处理 采用SPSS16.0统计软件进行数据分析, 统计方法采用 χ^2 检验及Spearman关联性分析, 检验水准 $\alpha = 0.05$.

2 结果

2.1 KLF6蛋白在结直肠不同组织中的表达及其与结直肠癌临床生物学行为的关系 KLF6蛋白主要定位于胞质中, 部分胞质、胞核可同时呈阳性表达, 在正常组织中有较强表达, 呈棕黄色或黄褐色颗粒, 在癌组织中着色较弱, 表达缺失常见(图1). KLF6蛋白在结直肠癌及正常组织的阳性表达率分别为45.0%、82.5%, 组间差异有统计学意义($P < 0.05$, 表1). KLF6蛋白在结直肠癌组织的表达与患者的性别、年龄无关($P > 0.05$), 而与肿瘤的分化程度、浸润深度及淋巴结转移有关($P < 0.05$, 表2).

2.2 WVOX蛋白在结直肠不同组织中的表达及其与结直肠癌临床生物学行为的关系 WVOX蛋白主要在胞质中表达, 呈棕黄色或黄褐色颗粒, 其在正常组织中可见强阳性表达, 在癌组织中呈弱表达或表达缺失(图2), WVOX蛋白在结直肠癌及正常组织的阳性表达率分别为37.5%、90.0%, 组间差异有统计学意义($P < 0.05$, 表1). WVOX蛋白在结直肠癌组织中的表达与患者的性别、年龄无关($P > 0.05$), 但与肿瘤的分化程度、浸润深度及淋巴结转移有关($P < 0.05$, 表2).

■ 研究前沿

一般认为肿瘤的发生、发展及转移是个复杂而有序的多阶段生物学过程, 受多个基因的调控, 结直肠癌的发生亦是如此. 近年来对抑癌基因KLF6和WVOX的研究成为国内外的热门课题.

■相关报道

王少平等应用RT-PCR及Western blot技术对肝癌研究发现, 癌组织中KLF6 mRNA及蛋白表达水平明显低于正常组织.

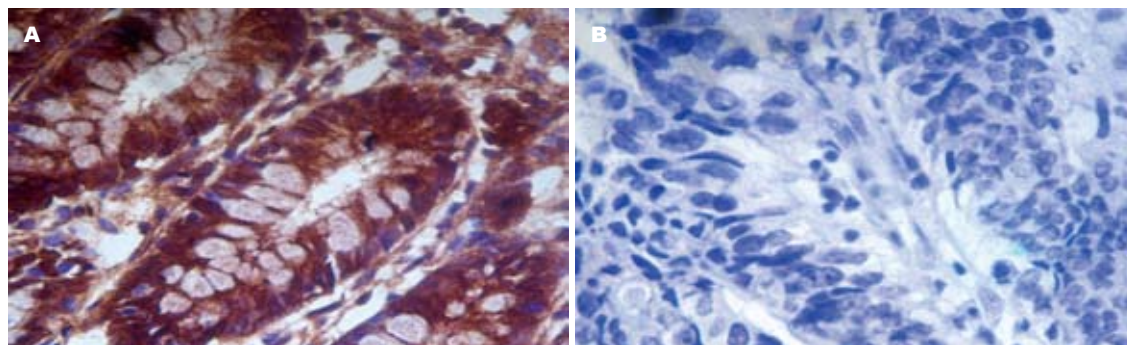


图 1 KLF6蛋白的表达(SP × 400). A: 正常组织中阳性表达; B: 结直肠癌组织中阴性表达.

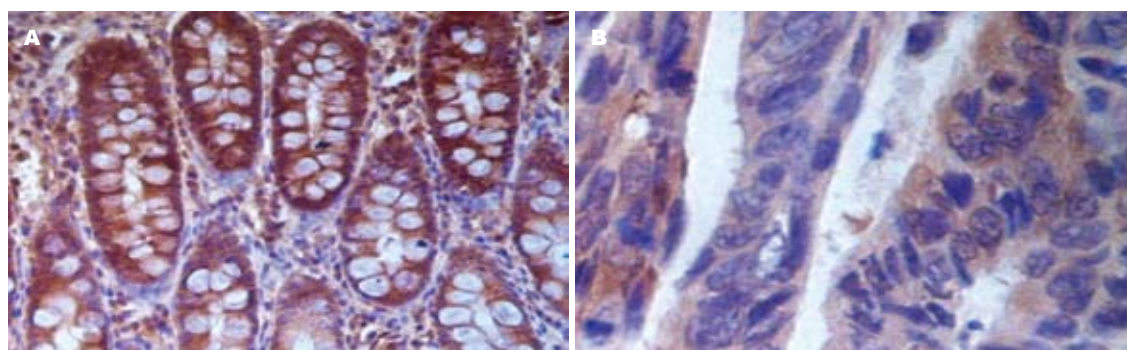


图 2 WWOX蛋白的表达. A: 正常组织阳性表达(SP × 200); B: 结直肠癌组织弱阳性表达(SP × 400).

表 1 KLF6和WWOX蛋白在结直肠癌及正常黏膜组织中的表达 ($n = 40$)

组织类别	KLF6				χ^2 值	P值	WWOX				χ^2 值	P值
	-	+	++	阳性率(%)			-	+	++	阳性率(%)		
结直肠癌	22	11	7	45.0	12.170	0.000	25	9	6	37.5	23.854	0.000
正常组织	7	15	18	82.5			4	20	16	90.0		

2.3 KLF6与WWOX蛋白在结直肠癌组织中表达相关性分析 KLF6与WWOX蛋白在结直肠癌中的表达水平呈正相关($P < 0.05$, 表3).

3 讨论

一般认为肿瘤的发生、发展及转移是个复杂而有序的多阶段生物学过程, 受多个基因的调控, 结直肠癌的发生亦是如此, 近年来对抑癌基因KLF6和WWOX的研究成为国内外的热门课题.

KLF6是转录因子Kruppel家族成员之一, 位于人类10p15区域, 因其羧基末端具有锌指结构, 故称锌指转录因子, 可特异性的与多种基因启动子中GC盒结合, 与其他家族成员不同的是, 其氨基末端富含酸性氨基酸残基, 与转录活性有关, 参与细胞的增殖、分化、凋亡、生长等过程. 近年研究发现其在肿瘤的发生发展中起到一定的作用, 并在多种肿瘤组织中呈现低

表达或表达缺失. KLF6的抑癌作用是Narla等^[7]在对前列腺癌的研究中发现的, 野生型KLF6能以P53非依赖方式上调P21的表达, 从而显著降低细胞增殖, 而突变型则没有上述作用, 同时, 在前列腺癌组织中还发现存在KLF6基因的杂合性丢失(loss of heterozygosity, LOH), KLF6基因的LOH在前列腺癌组织中发生率高达77%, 对发生LOH的癌组织进行基因测序, 结果显示KLF6等位基因中有71%发生了突变, 突变导致了KLF6蛋白非保守氨基酸的序列变化, LOH和点突变等导致的KLF6基因的失活、在肿瘤的发生、发展及转移过程中起了重要作用, 并认为KLF6是前列腺癌潜在的抑癌基因, 在人类其他肿瘤的发生、发展及演进过程中可能也起着重要作用. 在对胃癌^[17]的研究中也发现KLF6基因存在LOH. 本实验发现KLF6蛋白在结直肠癌组织的阳性表达率显著低于正常结直肠组织; 随

表 2 KLF6和WWOX蛋白在结直肠癌组织中的表达与临床病理因素的关系

因素	n	KLF6				χ^2 值	P值	WWOX				χ^2 值	P值
		-	+	++	阳性(%)			-	+	++	阳性(%)		
性别													
男	19	9	3	7	52.6			11	4	4	42.1		
女	21	13	4	4	38.1	0.852	0.356	14	3	4	33.3	0.327	0.567
年龄(岁)													
<60	20	8	7	5	60.0			10	4	6	50.0		
≥60	20	14	4	2	30.0	3.636	0.057	15	2	3	25.0	2.667	0.102
淋巴结转移													
有	17	13	2	2	23.5			14	1	2	17.6		
无	23	9	6	8	60.9	5.507	0.019	11	6	6	52.2	4.972	0.026
分化程度													
高+中	21	7	5	9	66.7			9	5	7	57.1		
低+黏液腺癌	19	15	3	1	21.1	8.386	0.004	16	3	0	15.8	7.278	0.007
浆膜浸润													
有	22	16	4	2	27.3			17	3	2	22.7		
无	18	6	8	4	66.7	6.208	0.013	8	3	7	55.6	4.552	0.033

表 3 KLF6和WWOX蛋白在结直肠癌组织中表达的相关性(n)

KLF6	WWOX		合计	值	P值
	++	-			
++	10	8	18		
-	5	17	22		
合计	15	25	40	0.320	0.033

着肿瘤浸润程度加深及淋巴结转移, KLF6蛋白的阳性表达率也随之下降; 随着分化程度的降低, KLF6蛋白的表达率亦下降, 有的甚至表达缺失, 提示KLF6蛋白的表达水平与肿瘤的分化程度、浸润深度及淋巴结转移均有关, 与王夫景等^[18]的研究结果一致. 但Cho等^[19]的研究发现仅有36.6%的结直肠癌组织呈现KLF6表达降低或表达缺失, 且与肿瘤的大小密切相关, 而与肿瘤分期、部位及淋巴结转移无关, 与本实验及王夫景等的研究结果存在差异. 关于KLF6蛋白在结直肠癌组织的表达水平及其与临床病理因素关系的报道少见, 有待于更多的研究来证实. 在神经胶质细胞瘤CRL2020和A235细胞株中进行KLF6重建, 细胞增殖减少将近50%, 而KLF6敲出后, 细胞增殖增加2.5-4.5倍^[20]. 抑癌基因KLF6的转染可以明显抑制前列腺癌PC-3细胞的生长增殖并诱导其凋亡, 其作用机制可能与下调Bcl-2和cyclin D1的表达有关^[21]. KLF6可直接激活转录因子3(activating transcription factor 3, ATF3), 结合并激活其启动子, 进而诱导肿瘤细

胞的凋亡. Huang等^[8]用siRNA敲出ATF3后能阻断KLF6诱导的细胞凋亡, 而肿瘤来源的突变型KLF6却不能激活ATF3, 无法诱导凋亡. KLF6可通过多种途径抑制细胞的增殖并诱导其凋亡, 发挥抑癌基因的作用, 而KLF6的表达缺失将使肿瘤细胞逃逸凋亡, 从而促进肿瘤的发生发展. 野生型KLF6能以P53非依赖方式上调P21的表达^[7], 还能与cyclin D1作用, 并破坏cyclin D1和CDK4的复合体, 从而引起细胞周期停滞, KLF6可能是细胞周期的一个检查点^[22], 由于KLF6不依赖P53, 设想KLF6和P53可能在细胞周期的调控上发挥着类似的作用. 以上关于KLF6抑制细胞增殖及促进细胞凋亡的途径有待于在结直肠癌的进一步研究中证实.

WWOX基因跨越了基因组内STS markers D16s518和D16s516的一个>10⁶ bp的区域, 这个区域位于染色体的16q23.3-q24.1(普通型脆性位点, FRA16D), 与对应于常见染色体脆性位点FRA3B的FHIT基因非常相像, 他的结构异常也与多种肿瘤密切相关, 故被认为是继FHIT基因之后的又一个新的抑癌基因^[11,23]. WWOX易受外界因素的影响, 当环境致癌因素作用于FRA16D时, 引起WWOX基因发生断裂, 变异和失活, 从而导致肿瘤的产生. 本实验发现WWOX蛋白主要在胞质中表达, 在结直肠癌组织中的阳性表达率显著低于正常结直肠组织, 与李秋芳等^[24]在肺癌方面的报道基本一致. 并且随着分化程度的降低, WWOX蛋白的阳性表达率下降, 有的

■创新盘点

本实验应用免疫组织化学法联合检测KLF6和WWOX蛋白在结直肠癌及癌旁正常黏膜组织中的表达情况, 从而在蛋白水平上探讨二者与结直肠癌各项临床病理参数之间的关系, 为KLF6和WWOX成为判断结直肠癌生物学行为的重要参考指标提供理论依据.

■应用要点

本实验证实了KLF6和WWOX蛋白在结直肠癌表达的情况及二者的相关性。联合检测两种蛋白的表达,对结直肠癌的诊断及预后判断具有重要意义,为结直肠癌的治疗提供新的思路及理论依据。

甚至呈阴性表达;随着肿瘤浸润程度加深及淋巴结转移,WWOX蛋白的阳性表达率也随之下降,提示WWOX蛋白的表达水平与肿瘤的分化程度、浸润深度及淋巴结转移均相关,与许红霞等^[16]、陈志英等^[25]的研究结果基本相符,其正常表达可能在结直肠组织中发挥着抑癌基因的作用,低表达或表达缺失可能参与了结直肠癌的发生、发展及转移的过程。在对肝外胆管癌的研究中发现WWOX mRNA的表达显著低于正常胆管组织,47%表达缺失,WWOX蛋白表达的缺失频率为57%,且与组织学分级显著相关^[26]。WWOX蛋白含有414个氨基酸,在他的氨基酸末端有2个WW结构域,主要与蛋白之间相互作用有关,而蛋白之间的相互作用是抑癌基因通过信号转导途径抑制肿瘤生长所必需的。Chang等^[27]研究指出WWOX蛋白主要位于线粒体,在凋亡应激因素TNF/十字胞碱、苍术苷等作用下,WWOX蛋白合成增加,第1个WW结构域中的Try33磷酸化,线粒体通透性改变,WWOX蛋白从线粒体转位至细胞核,上调促凋亡因子P53,下调抑制凋亡因子Bcl-2、Bcl-xL,从而增强TNF介导的细胞毒性;同时增强TRADD介导的细胞凋亡。而郭文娟等^[28]的研究发现Bcl-xL在结肠腺癌中的阳性率明显高于正常组织。在对胃癌、肺癌的研究中发现WWOX调节位点的超甲基化现象^[14,15],Qin等^[29]认为在前列腺癌中WWOX基因的表达下调归因于WWOX基因调节带的DNA超甲基化,而用脱氧杂氮胞苷(5-aza-2-deoxycytidine, AZA),一种DNA甲基转移酶抑制剂进行治疗,增加了癌细胞中WWOX mRNA和蛋白的表达,并且肿瘤的生长也被抑制。杨巍等^[30]所构建的pcDNA4/myc-WWOX真核表达载体转染肿瘤细胞能抑制肿瘤生长并诱导其凋亡,使得人为促进肿瘤细胞高表达WWOX蛋白有望作为一种新的基因治疗手段。但关于WWOX在结直肠癌的具体作用机制尚未完全明确,有待于更深入的研究。

本实验还发现KLF6与WWOX蛋白在结直肠癌组织中的表达呈正相关($r = 0.320, P < 0.05$),且随着肿瘤分化程度的降低以及临床分期和淋巴结转移的增加,两者的表达均在降低,提示两者的低表达共同促进结直肠癌的发生及侵袭转移。在前面的叙述中已提到KLF6可引起细胞周期停滞,KLF6可能是细胞周期的一个检查点^[22],野生型KLF6能以P53非依赖方式上调P21的表达,降低细胞的增殖^[7],KLF6和P53可能在细胞

周期的调控上发挥着类似的作用^[6],而WWOX可上调促凋亡因子P53^[27],那么,我们可设想WWOX可通过某种机制来上调KLF6的表达,从而共同发挥抑癌基因的作用,两者的低表达又共同促进结直肠癌的发生及侵袭转移。但到目前为止,两者之间相互作用的具体机制尚未见报道,故上述的假设有待于广大学者的进一步研究来证实。

总之,KLF6和WWOX蛋白在结直肠癌中的表达均明显低于正常组织,其低表达可能与结直肠癌的发生、发展及转移有关。联合检测两者对结直肠癌的诊断,恶性程度及预后的判断具有重要意义。

4 参考文献

- 1 Ferlay J, Autier P, Boniol M, Heanue M, Colombet M, Boyle P. Estimates of the cancer incidence and mortality in Europe in 2006. *Ann Oncol* 2007; 18: 581-592
- 2 王双双, 关景明, 范玉晶. 大肠癌发病的相关因素. *世界华人消化杂志* 2005; 13: 534-536
- 3 Koivisto PA, Hyytinen ER, Matikainen M, Tammela TL, Ikonen T, Schleutker J. Kruppel-like factor 6 germ-line mutations are infrequent in Finnish hereditary prostate cancer. *J Urol* 2004; 172: 506-507
- 4 Lièvre A, Landi B, Côté JF, Veyrie N, Zucman-Rossi J, Berger A, Laurent-Puig P. Absence of mutation in the putative tumor-suppressor gene KLF6 in colorectal cancers. *Oncogene* 2005; 24: 7253-7256
- 5 王少平, 亢黎莉, 陈孝平, 周鹤俊, 周卫江, 徐江. KLF6基因在原发性肝癌中的表达. *华中科技大学学报(医学版)* 2008; 37: 343-346
- 6 潘修成, 陈智, 陈峰, 陈晓红, 周承, 羊正纲. 原发性肝癌组织中Kruppel样因子6(KLF6)的表达及其对肝癌细胞增殖的抑制作用. *实用肿瘤杂志* 2007; 22: 125-129
- 7 Narla G, Heath KE, Reeves HL, Li D, Giono LE, Kimmelman AC, Glucksman MJ, Narla J, Eng FJ, Chan AM, Ferrari AC, Martignetti JA, Friedman SL. KLF6, a candidate tumor suppressor gene mutated in prostate cancer. *Science* 2001; 294: 2563-2566
- 8 Huang X, Li X, Guo B. KLF6 induces apoptosis in prostate cancer cells through up-regulation of ATF3. *J Biol Chem* 2008; 283: 29795-29801
- 9 孙明, 黄健, 林天歆, 庞健, 廖勇彬, 胡明, 陈学中. 野生型KLF6对前列腺癌LNCaP细胞的作用. *第四军医大学学报* 2007; 28: 1257-1259
- 10 Leow CC, Wang BE, Ross J, Chan SM, Zha J, Carano RA, Frantz G, Shen MM, de Sauvage FJ, Gao WQ. Prostate-specific Klf6 inactivation impairs anterior prostate branching morphogenesis through increased activation of the Shh pathway. *J Biol Chem* 2009; 284: 21057-21065
- 11 Bednarek AK, Laflin KJ, Daniel RL, Liao Q, Hawkins KA, Aldaz CM. WWOX, a novel WW domain-containing protein mapping to human chromosome 16q23.3-24.1, a region frequently affected in breast cancer. *Cancer Res* 2000; 60: 2140-2145
- 12 Paige AJ, Taylor KJ, Taylor C, Hillier SG, Farrington S, Scott D, Porteous DJ, Smyth JF, Gabra H, Watson JE. WWOX: a candidate tumor suppressor gene involved in multiple tumor types. *Proc Natl Acad Sci*

- U S A 2001; 98: 11417-11422
- 13 Xiong Z, Hu S, Wang Z. Cloning of WWOX gene and its growth-inhibiting effects on ovarian cancer cells. *J Huazhong Univ Sci Technol Med Sci* 2010; 30: 365-369
- 14 Baykara O, Demirkaya A, Kaynak K, Tanju S, Toker A, Buyru N. WWOX gene may contribute to progression of non-small-cell lung cancer (NSCLC). *Tumour Biol* 2010; 31: 315-320
- 15 Maeda N, Semba S, Nakayama S, Yanagihara K, Yokozaki H. Loss of WW domain-containing oxidoreductase expression in the progression and development of gastric carcinoma: clinical and histopathologic correlations. *Virchows Arch* 2010; 457: 423-432
- 16 许红霞, 周建农, 莫伏根, 侯宁, 胡赛男, 束永前. 抑癌基因WWOX和FHIT在结直肠癌中的表达及临床意义. *南京医科大学学报(自然科学版)* 2007; 27: 812-815
- 17 Sangodkar J, Shi J, DiFeo A, Schwartz R, Bromberg R, Choudhri A, McClinch K, Hatami R, Scheer E, Kremer-Tal S, Martignetti JA, Hui A, Leung WK, Friedman SL, Narla G. Functional role of the KLF6 tumour suppressor gene in gastric cancer. *Eur J Cancer* 2009; 45: 666-676
- 18 王夫景, 杨茂鹏, 于洪亮, 杨维良. 抑癌基因KLF6和APC在结直肠癌组织中的表达及临床意义. *中华胃肠外科杂志* 2006; 9: 429-432
- 19 Cho YG, Choi BJ, Song JW, Kim SY, Nam SW, Lee SH, Yoo NJ, Lee JY, Park WS. Aberrant expression of krUppel-like factor 6 protein in colorectal cancers. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 2250-2253
- 20 Camacho-Vanegas O, Narla G, Teixeira MS, Di-Feo A, Misra A, Singh G, Chan AM, Friedman SL, Feuerstein BG, Martignetti JA. Functional inactivation of the KLF6 tumor suppressor gene by loss of heterozygosity and increased alternative splicing in glioblastoma. *Int J Cancer* 2007; 121: 1390-1395
- 21 孙明, 杨恭如, 黄健, 李虹, 卢一平, 魏强, 范天勇, 李响. 转染抑癌基因KLF6对前列腺癌PC-3细胞的作用研究. *中华男科学杂志* 2006; 12: 502-509
- 22 Camacho-Vanegas O, Narla G, Teixeira MS, Di-Feo A, Misra A, Singh G, Chan AM, Friedman SL, Feuerstein BG, Martignetti JA. Functional inactivation of the KLF6 tumor suppressor gene by loss of heterozygosity and increased alternative splicing in glioblastoma. *Int J Cancer* 2007; 121: 1390-1395
- 23 Bednarek AK, Keck-Waggoner CL, Daniel RL, Laflin KJ, Bergsagel PL, Kiguchi K, Brenner AJ, Aldaz CM. WWOX, the FRA16D gene, behaves as a suppressor of tumor growth. *Cancer Res* 2001; 61: 8068-8073
- 24 李秋芳, 杨霄鹏, 王静, 吴逸明. NSCLC中WWOX蛋白、erbB2蛋白的表达及其与细胞增殖之间的关系. *中国老年学杂志* 2010; 30: 2095-2097
- 25 陈志英, 何常, 王菊芳, 李珀. WWOX蛋白在大肠癌中的表达及意义. *四川医学* 2008; 29: 389-391
- 26 顾军, 王梅, 王雅杰, 李咏梅, 袁杨, 薛春燕. 抑癌基因WWOX在肝外胆管癌中的表达. *世界华人消化杂志* 2007; 15: 1302-1305
- 27 Chang NS, Pratt N, Heath J, Schultz L, Slevin D, Carey GB, Zevotek N. Hyaluronidase induction of a WW domain-containing oxidoreductase that enhances tumor necrosis factor cytotoxicity. *J Biol Chem* 2001; 276: 3361-3370
- 28 郭文娟, 王爱英, 高春. 细胞凋亡在结肠腺癌组织中的变化及其相关蛋白的表达. *世界华人消化杂志* 2009; 17: 2589-2594
- 29 Qin HR, Iliopoulos D, Semba S, Fabbri M, Druck T, Volinia S, Croce CM, Morrison CD, Klein RD, Huebner K. A role for the WWOX gene in prostate cancer. *Cancer Res* 2006; 66: 6477-6481
- 30 杨巍, 袁红艳, 郑旸, 常雅萍. WWOX基因转染抑瘤效应的实验研究. *中国老年学杂志* 2008; 28: 128-130

■同行评价

本文新颖性较好, 具有较好的可读性和科学价值.

编辑 曹丽鸥 电编 何基才

ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) CN 14-1260/R 2011年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

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

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

PTEN在胃癌中的研究进展

杨 桢, 吕农华

■背景资料

胃癌是一种常见的恶性肿瘤,其发病率和死亡率居高不下。目前只有早期胃癌患者才可望通过手术治愈;而大多数胃癌病例确诊时已处晚期,治疗方法有限、预后不佳,给人类健康带来了巨大的危害。

杨桢, 吕农华, 南昌大学第一附属医院消化内科 江西省消化系疾病研究所 江西省消化病研究重点实验室 江西省南昌市 330006

国家自然科学基金资助项目, No. 81060038

江西省研究生创新专项资金资助项目, No. YC10A020

作者贡献分布: 本文综述由杨桢完成; 吕农华审校。

通讯作者: 吕农华, 教授, 主任医师, 博士生导师, 330006, 江西省南昌市永外正街17号, 南昌大学第一附属医院消化内科。

lunonghua@163.com

电话: 0791-8692705 传真: 0791-8623153

收稿日期: 2010-12-20 修回日期: 2011-02-20

接受日期: 2011-02-22 在线出版日期: 2011-02-28

Role of PTEN in gastric carcinogenesis

Zhen Yang, Nong-Hua Lv

Zhen Yang, Nong-Hua Lv, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Nanchang University; Gastroenterology Institute of Jiangxi Province; Jiangxi Provincial Key Laboratory for Digestive Diseases, Nanchang 330006, Jiangxi Province, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 81060038; and the Graduate Innovation Foundation of Jiangxi Province, No. YC10A020

Correspondence to: Professor Nong-Hua Lv, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Nanchang University, 17 Yongwaizheng Avenue, Nanchang 330006, Jiangxi Province, China. lunonghua@163.com

Received: 2010-12-20 Revised: 2011-02-20

Accepted: 2011-02-22 Published online: 2011-02-28

Abstract

The PTEN (phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten) gene is another important tumor suppressor gene found after *p53* gene, and its encoded protein is involved in cellular differentiation, reproduction and apoptosis, as well as cellular adhesion and mobility, and genetic stability that is often lost in various human cancers. Recently, some studies have indicated that down-regulation of PTEN protein expression due to genetic or epigenetic changes, like mutation, loss of heterozygosity (LOH) and promoter hypermethylation, participates in gastric carcinogenesis. These studies could help us understand the pathogenesis of gastric cancer (GC), and show us a new molecular marker that could be used to evaluate TNM stage, histological type, or differentiation grade of GC biopsies, and GC treatment. In this article, we will focus

on the functions of PTEN, the mechanisms of its inactivation in GC, and the important role of its inactivation in the development and prognosis of GC.

Key Words: Phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten; Gastric cancer; Carcinogenesis

Yang Z, Lv NH. Role of PTEN in gastric carcinogenesis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(6): 608-613

摘要

第10号染色体同源缺失性磷酸酶-张力蛋白基因(phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten, PTEN)是继*p53*之后发现的另一重要的抑癌基因,其编码的蛋白质可调控多种细胞信号转导通路或功能分子,构成一个复杂的网络系统,在调控细胞增殖与凋亡、迁移与黏附和遗传稳定等方面发挥重要作用。目前研究发现人类许多肿瘤均存在PTEN的失活,PTEN失活也与这些肿瘤的发生、发展有关。近年来,人们对PTEN在胃癌中的作用也进行了大量的研究,发现PTEN失活在胃癌中亦是一个多发事件,其表达下降与胃癌的发生、发展、预后都有着密切的关系,有助于我们理解胃癌发生、发展的机制,也为早期诊断和基因治疗提供了新的思路。

关键词: 第10号染色体同源缺失性磷酸酶-张力蛋白基因; 胃癌; 致癌机制

杨桢, 吕农华. PTEN在胃癌中的研究进展. *世界华人消化杂志* 2011; 19(6): 608-613

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/608.asp>

0 引言

胃癌是一种常见的恶性肿瘤,随着诊疗水平的提高,其发病率和死亡率虽较前已有所下降,但仍居各类癌症的第4位和第2位^[1,2]。目前只有早期胃癌患者才可望通过手术治愈;而大多数胃癌病例确诊时已处晚期,治疗方法有限、预后不佳,给人类健康带来了巨大的危害。为此,研究人员一直致力于明确胃癌发生、发展的机制,

■同行评议者

周士胜, 教授, 大连大学医学院医学研究中心

探索胃癌早期诊断及基因治疗的新方法. 目前认为, 胃癌的发生、发展是一个多阶段、多步骤、有序的过程, 是多因素的综合结果, 而抑癌基因的失活和癌基因的活化可能在其中发挥了重要的作用. 第10号染色体同源缺失性磷酸酶-张力蛋白基因(phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten, PTEN)是1997年发现的一种抑癌基因^[3-5], 其编码的蛋白质可调控多种细胞信号转导通路或功能分子, 构成一个复杂的网络系统, 在调控细胞增殖与凋亡、迁移与黏附和遗传稳定等方面发挥重要作用. 目前研究发现, 人类许多肿瘤均存在PTEN的失活, PTEN的失活也与这些肿瘤的发生、发展有关. PTEN失活在胃癌中亦是一个多发事件, 其表达下降与胃癌的发生、发展、预后有着密切关系, 有助于我们理解胃癌发生、发展机制, 也为早期诊断和基因治疗提供了新的思路.

1 PTEN的结构

PTEN基因^[3], 又名MMAC1(muted in multiple advanced cancers)基因^[4]或TEP1(TGF- β -regulated and epithelial cell enriched phosphatase)基因^[5], 是1997年由3个实验室分离鉴定并统一命名而确认的新的抑癌基因. PTEN基因位于染色体10q23.3, 全长200 kb, 有9个外显子和8个内含子, 编码着由403个氨基酸残基组成、相对分子质量约为47 000 Da的蛋白质. PTEN蛋白中与抑癌功能相关的结构包括: (1)N端磷酸酶结构域: 存在保守的磷酸酶基序HCSSGSSR, 其与酪氨酸磷酸酶和丝/苏氨酸磷酸酶催化域具有高度同源性, 故具有去磷酸化酪氨酸、丝/苏氨酸残基的作用, 是PTEN发挥肿瘤抑制活性的功能区; (2)C端C2结构域: 能以Ca²⁺非依赖性方式与磷脂结合, 参与PTEN在胞膜的有效定位和体内细胞的信号转导; (3)尾区的PDZ结合基序和两个PEST序列: 调节PTEN的稳定性和生物学活性.

2 PTEN的功能

目前的研究表明, PTEN可调控多种细胞信号转导通路或功能分子, 构成一个复杂的网络系统, 在调控细胞增殖与凋亡、迁移与黏附和遗传稳定等方面发挥重要作用.

PTEN具有脂质磷酸酶和蛋白磷酸酶的双重活性, 可通过磷酸酶依赖的方式调控细胞信号转导, 亦具有非磷酸酶依赖的生物学功能. 与大多数抑癌基因不同, PTEN基因编码的蛋白质不仅

可在胞核内发挥作用, 在胞质中亦具功能, 而细胞内不同的亚定位对PTEN的稳定及功能发挥影响甚大. 目前, 对PTEN蛋白研究最为深入的是其对PI3K/Akt信号通路的负性调控作用^[6], 而后者在介导细胞存活、促进细胞增殖和抑制细胞凋亡中发挥重要作用. PI3K通过其3位羟基磷酸化产物, 第二信使-PIP3转移Akt到细胞膜上, 并改变Akt的构象使之能被3'-磷脂酰肌醇依赖蛋白激酶1/2所磷酸化和激活, 从而传递抗凋亡信号, 而胞质内的PTEN可脱去PIP3肌醇环的3位磷酸, 使PIP3去磷酸化为PIP2^[7]. 正常情况下, PI3K和PTEN分别发挥磷酸化和去磷酸化的作用, 维持着PIP2和PIP3的动态平衡; 当PTEN功能失活时, PIP3不能去磷酸化为PIP2, 过多的PIP3积聚, 从而激活Akt通路, 通过调控P27、BAD、FOXO、mTOR、GSK-3等下游因子, 发挥抑制细胞凋亡、促进细胞存活和增殖的作用. 除调控Akt通路外, 胞质内的PTEN还可抑制EGF刺激引起的shc磷酸化, 进而抑制Ras/MAPK通路的活化^[8]; 亦可通过FAK脱磷酸化等途径, 抑制细胞迁移、伸展和黏附^[9,10].

与大多数抑癌基因相仿, 胞核内的PTEN亦具有重要的生物学功能. 核内的PTEN可下调cyclin D1水平, 诱导细胞G₀-G₁期阻滞, 抑制肿瘤生长^[11]. 新近的一项研究表明, 胞核内的PTEN还可通过非磷酸酶依赖的方式与着丝粒蛋白CENP-C结合, 维持着丝粒稳定; 也可与E2F1协同, 激活Rad51转录, 调控DNA双链断裂(DNA double-strand breaks, DSBs)修复, 抑制因DSBs引起的染色体不稳定, 从而发挥染色体结构、功能监护者的作用^[12]. 且与胞质中的PTEN相比, 胞核内的PTEN半衰期更长、更稳定, 故认为PTEN胞核内分布在肿瘤抑制中可能发挥更大的作用.

3 PTEN在胃癌中的失活方式

PTEN基因是与人类肿瘤相关性较高的一种抑癌基因. 目前的研究发现, 在多种肿瘤组织或细胞中均存在PTEN的失活. 新近的研究也表明, PTEN基因的失活与胃癌的发生、发展有着密切的关系, 这些失活的主要方式有: 基因突变、杂合性丢失(loss of heterozygosity, LOH)和启动子甲基化.

3.1 PTEN基因突变 基因突变是PTEN失活的主要方式之一. 目前在多种人类恶性肿瘤中均发现了PTEN基因的突变, 但情况却不尽相同, 在

■研究前沿

目前胃癌确切的发生、发展机制仍不清楚, 而抑癌基因的失活和癌基因的活化可能在其中发挥了重要的作用. 明确各种抑癌基因、癌基因在其中的作用, 进而探索胃癌早期诊断及基因治疗的新方法, 是目前及今后相当长时间内的研究热点和重点.

■相关报道

Zheng等对113例胃癌组织及癌旁正常组织中PTEN表达进行分析,发现胃癌组织中PTEN表达率为54.9%,显著低于癌旁正常组织(89.4%)。

恶性胶质瘤、黑素瘤、前列腺癌中, PTEN基因突变多发生在病变的晚期, 而在甲状腺癌、子宫内膜癌则多见于癌变的早期, 另有一些类型的肿瘤却并未检测到PTEN基因的突变, 表明PTEN基因突变只参与了某些肿瘤的发生、发展。目前, 大多数的研究显示胃癌中PTEN基因的突变率并不高。Sato等^[13]检测了10株胃癌细胞株和58例原发性胃癌组织, 发现仅有1例原发性胃癌存在PTEN基因第7内含子5个碱基的缺失, 且这一缺失并不改变mRNA序列。Lima等^[14]利用PCR-SSCP方法检测了48例胃腺癌标本的PTEN基因外显子, 也仅发现1例标本存在易位突变, 认为PTEN基因突变在胃癌中属偶发事件, 另有多项研究也得到了类似的结果^[15-17]。但Wang等^[18]的一项研究却发现, 60例进展期胃癌中有17例(28.3%)存在PTEN基因的突变, 包括8例错义突变、5例沉默突变、2例无义突变、1例碱基缺失和1例内含子拼接供体位点突变, 认为PTEN基因突变在进展期胃癌的发生中可能起重要作用。

3.2 PTEN基因LOH LOH是PTEN失活的另一重要方式, 在恶性胶质瘤、子宫内膜癌、前列腺癌、恶性黑素瘤等肿瘤细胞株或组织中均常见PTEN的LOH。虽然PTEN基因突变在胃癌中较少见, 但随着研究的日趋深入, 近年来发现PTEN的LOH却较常见。Byun等^[19]研究发现, 33%(5/15)的胃癌细胞株和36%(22/55)的胃癌组织PTEN基因mRNA低表达, 而PTEN基因LOH率高达47%, 与PTEN mRNA低表达密切相关; 且进展期胃癌LOH率显著高于早期胃癌, 低分化胃癌LOH率显著高于高、中分化胃癌; 此外, 存在LOH的胃癌组织仅存的等位基因均未检测出基因突变, 推测胃癌变过程中无需PTEN功能完全失活, 单基因失活即足以促进胃黏膜癌变。Li等^[20]检测了不同胃黏膜损伤中PTEN基因突变和LOH情况, 发现随着胃黏膜癌变进展, LOH率逐渐升高, 在萎缩性胃炎、肠上皮化生、不典型增生、早期胃癌和进展期胃癌中, LOH率分别为10%(3/30)、10%(3/30)、13.3%(4/30)、20%(6/30)和33.3%(9/30); 此外, 在癌前病变和早期胃癌中均未检测到PTEN基因突变, 而在10%的进展期胃癌中发现PTEN基因突变, 且同时存在LOH, 认为PTEN基因LOH在胃癌前病变中即可出现, 而基因突变则只在进展期胃癌中存在, PTEN基因突变和LOH可共同促进胃癌的浸润和转移。此外, 有研究认为PTEN基因的LOH状

态与胃癌患者对化疗的敏感性有关^[21], 也与胃癌相关死亡有关, 可作为一独立因素判断预后^[22]。

3.3 PTEN基因启动子甲基化 DNA甲基化是基因调控的重要方式之一, 特别是在富含CpG的区域。CpG岛位于多数基因的启动子区域, 其异常甲基化可引起抑癌基因的失活。目前在脑肿瘤、血液系统恶性肿瘤、恶性黑色素瘤等肿瘤中均已观察到PTEN基因启动子的甲基化, 认为启动子甲基化亦是PTEN失活的重要方式之一。Kang等^[23]检测了66例胃癌组织, 发现其中有26例(39%)存在PTEN启动子甲基化, 而26例启动子甲基化病例中又有19例(73%)存在PTEN表达缺失, 认为在胃癌中PTEN失活与其启动子甲基化密切相关。Hino等^[24]的一项研究发现43%的EB病毒阳性胃癌PTEN表达缺失, 显著高于阴性者(10%), 而PTEN基因启动子甲基化亦多见于EB病毒阳性的胃癌, 并进一步证实EB病毒可通过其潜伏膜蛋白2A激活DNA甲基转移酶1, 进而引起PTEN启动子甲基化。但Sato等^[13]检测了10株胃癌细胞株和20例胃癌组织, 却未发现PTEN mRNA的表达缺失和启动子CpG岛甲基化。另有学者认为, 胃癌细胞株和胃癌组织中启动子甲基化的是PTEN的拟基因, 而非PTEN基因^[19]。

除基因突变、LOH和启动子甲基化外, 新近的一项研究推测微小RNA(miRNAs)可能也在PTEN失活中发挥一定的作用^[25]。

4 PTEN在胃癌发生、发展中的作用

目前, 大部分研究认为PTEN失活在胃癌中是一个多发事件, 与胃癌的发生、发展密切相关。Zheng等^[26,27]对113例胃癌组织及癌旁正常组织中PTEN表达进行分析, 发现胃癌组织中PTEN表达率为54.9%, 显著低于癌旁正常组织(89.4%)。Zheng等^[28]和Yang等^[29]还进一步按照“正常胃黏膜-肠上皮化生-不典型增生-胃癌”的发展模式检测了不同胃黏膜损伤中PTEN的表达率, 结果发现随着胃黏膜癌变的进展, PTEN表达率逐渐降低, 不典型增生和胃癌中PTEN表达率显著低于正常胃黏膜和肠上皮化生; 并发现进展期胃癌PTEN表达率显著低于早期胃癌, 胃癌淋巴结转移者表达率显著低于未转移者, 弥漫型胃癌显著低于肠型胃癌, 而印戒细胞癌PTEN表达率最低, 显著低于高中分化型胃癌; 认为PTEN表达减少或缺失在胃黏膜癌变及胃癌进展的过程中是一个多发事件, PTEN可作为判断胃癌病理生物学行为的一个指标。另有

项研究也得到了与上述研究相似的结果^[17,30-37], 并有研究发现PTEN表达缺失的胃癌患者较PTEN表达阳性者3年生存率更低^[35], 但PTEN低表达与肿瘤大小、远处转移等生物学行为的相关性尚有争议之处。

此外, 许多研究对PTEN在胃黏膜癌变及胃癌进展中的可能作用及机制也进行了探讨。有研究显示, 胃癌组织caspase-3表达显著低于癌旁正常组织, 与PTEN表达正相关, PTEN低表达可能通过下调caspase-3表达, 引起细胞凋亡异常, 从而促进胃黏膜癌变及胃癌进展^[27]。Zhou等^[36]研究发现, PTEN表达阴性胃癌的微血管密度(microvessel density, MVD)显著高于PTEN表达阳性者, 而血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)表达阳性胃癌的MVD显著高于VEGF表达阴性者, 并发现PTEN表达阴性胃癌的VEGF表达显著高于PTEN表达阳性者, 故推测PTEN低表达可能通过上调VEGF, 进而导致血管生成, 促进胃癌进展, 其他学者的多项研究也支持这一观点^[28,29,38-40]。学者们还推测PTEN除引起细胞凋亡异常和促进血管生成外, 还可能通过抑制细胞黏附、促进细胞迁移等途径促进胃癌的发生、发展。

5 PTEN和胃癌化疗耐药与基因治疗

手术治疗是根治胃癌的唯一途径, 但胃癌患者确诊时多处于病变晚期, 单纯手术治疗难以根治胃癌、预防复发, 化疗便成为胃癌治疗的另一重要手段。然而, 目前胃癌的化疗效果也不尽如人意, 究其原因主要是肿瘤细胞对化疗药耐药。大量研究显示, Akt信号转导通路活化是肿瘤细胞产生化疗耐药的重要途径之一, Akt磷酸化活化后可降低肿瘤细胞对化疗药物的敏感性, 导致化疗失败。Oki等^[21]研究发现存在PTEN基因LOH的胃癌患者化疗敏感性较差。Hwang等^[41]的研究进一步显示, SNU-5或SNU-216胃癌细胞株过表达PTEN均可提高依托泊苷或阿霉素诱导的细胞凋亡。Yu等^[42]还将PTEN转染BGC-823细胞, 发现过表达PTEN可降低BGC-823细胞的Akt基础活性及化疗后活性, 并可增加BGC-823对依托泊苷或阿霉素的敏感性, 促进肿瘤细胞凋亡、抑制肿瘤细胞生长, 推测PTEN失活可能是胃癌组织中Akt通路活化, 进而引起肿瘤耐药的重要原因。

给予外源性PTEN除可提高胃癌细胞化疗敏感性外, 也可直接对胃癌细胞增殖、凋亡、

细胞周期调控产生影响。He等^[43]将外源性PTEN导入胃癌细胞株SGC7901, 发现PTEN-SGC7901细胞较未转染PTEN的SGC7901细胞倍增时间显著延长, 集落形成率及集落大小也较未转染者减小, G₁期细胞显著增多; 并发现PTEN-SGC7901细胞培养上清液及胞质中VEGF和MMP-9表达量显著降低, 推测PTEN可能通过抑制VEGF、MMP-9表达进而抑制SGC7901细胞生长、增殖。此外, Hwang等^[41]、Yi等^[44]、Hang等^[45]的研究也发现, 外源性PTEN可显著抑制胃癌细胞增殖、促进细胞凋亡、阻滞细胞周期。Hang等的研究还发现, 外源性PTEN可抑制胃癌细胞Akt、FAK和p44/42MAPK通路, 而对正常细胞则无此影响, 推测这可能是外源性PTEN选择性诱导肿瘤细胞死亡的机制之一, 认为外源性PTEN可望成为胃癌治疗的新策略^[45]。

6 结论

在后P53时代, PTEN被学者们视为又一重要的抑癌基因。随着研究的日益深入, PTEN复杂的功能网络也逐渐清晰。目前, 大多数研究认为PTEN表达减少或缺失在胃黏膜癌变和胃癌进展中是一个多发事件, 与胃癌的发生、发展、化疗耐药性密切相关, 但亦存在不同意见。PTEN是否可作为胃癌生物学行为和预后判断的指标, 进而成为胃癌生物治疗的新靶标, 仍有待我们进一步研究。此外, 对于PTEN在胃癌中失活的机制, 目前较为公认的是: PTEN基因突变在胃癌中属偶发事件, 可能仅在进展期胃癌中存在; 而PTEN的LOH和启动子甲基化却较常见, 可能是胃癌中PTEN失活的主要方式。但对于这些失活方式尚存在争议之处, 不同的研究结果是否与样本大小、病例进展阶段、组织学亚型和人种不同有关, 亦有待进一步研究。

因此, 深入研究胃黏膜癌变和胃癌进展过程中PTEN细胞信号网络的变化及其机制和生物学作用, 对探讨PTEN的抑癌作用及胃癌发生、发展的机制有着重要的意义, 也为胃癌及其癌前病变防治策略的制定, 进一步开发基于PTEN的转基因治疗提供新的理论和实验依据。

7 参考文献

- 1 Parkin DM, Bray FI, Devesa SS. Cancer burden in the year 2000. The global picture. *Eur J Cancer* 2001; 37 Suppl 8: S4-S66
- 2 Parkin DM. International variation. *Oncogene* 2004; 23: 6329-6340
- 3 Li J, Yen C, Liaw D, Podsypanina K, Bose S, Wang

■同行评价

本文可读性较好, 帮助读者全面了解PTEN在胃癌中的作用。

- SI, Puc J, Miliareis C, Rodgers L, McCombie R, Bigner SH, Giovannella BC, Ittmann M, Tycko B, Hibshoosh H, Wigler MH, Parsons R. PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer. *Science* 1997; 275: 1943-1947
- 4 Steck PA, Pershouse MA, Jasser SA, Yung WK, Lin H, Ligon AH, Langford LA, Baumgard ML, Hattier T, Davis T, Frye C, Hu R, Swedlund B, Teng DH, Tavtigian SV. Identification of a candidate tumour suppressor gene, MMAC1, at chromosome 10q23.3 that is mutated in multiple advanced cancers. *Nat Genet* 1997; 15: 356-362
- 5 Li DM, Sun H. TEPI, encoded by a candidate tumor suppressor locus, is a novel protein tyrosine phosphatase regulated by transforming growth factor beta. *Cancer Res* 1997; 57: 2124-2129
- 6 Stambolic V, Suzuki A, de la Pompa JL, Brothers GM, Mirtsos C, Sasaki T, Ruland J, Penninger JM, Siderovski DP, Mak TW. Negative regulation of PKB/Akt-dependent cell survival by the tumor suppressor PTEN. *Cell* 1998; 95: 29-39
- 7 Maehama T, Dixon JE. The tumor suppressor, PTEN/MMAC1, dephosphorylates the lipid second messenger, phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate. *J Biol Chem* 1998; 273: 13375-13378
- 8 Gu J, Tamura M, Yamada KM. Tumor suppressor PTEN inhibits integrin- and growth factor-mediated mitogen-activated protein (MAP) kinase signaling pathways. *J Cell Biol* 1998; 143: 1375-1383
- 9 Tamura M, Gu J, Matsumoto K, Aota S, Parsons R, Yamada KM. Inhibition of cell migration, spreading, and focal adhesions by tumor suppressor PTEN. *Science* 1998; 280: 1614-1617
- 10 Tamura M, Gu J, Takino T, Yamada KM. Tumor suppressor PTEN inhibition of cell invasion, migration, and growth: differential involvement of focal adhesion kinase and p130Cas. *Cancer Res* 1999; 59: 442-449
- 11 Radu A, Neubauer V, Akagi T, Hanafusa H, Georgescu MM. PTEN induces cell cycle arrest by decreasing the level and nuclear localization of cyclin D1. *Mol Cell Biol* 2003; 23: 6139-6149
- 12 Shen WH, Balajee AS, Wang J, Wu H, Eng C, Pandolfi PP, Yin Y. Essential role for nuclear PTEN in maintaining chromosomal integrity. *Cell* 2007; 128: 157-170
- 13 Sato K, Tamura G, Tsuchiya T, Endoh Y, Sakata K, Motoyama T, Usuba O, Kimura W, Terashima M, Nishizuka S, Zou T, Meltzer SJ. Analysis of genetic and epigenetic alterations of the PTEN gene in gastric cancer. *Virchows Arch* 2002; 440: 160-165
- 14 Lima EM, Araújo JJ, Harada ML, Assumpção PP, Burbano RR, Casartelli C. Molecular study of the tumour suppressor gene PTEN in gastric adenocarcinoma in Brazil. *Clin Exp Med* 2005; 5: 129-132
- 15 Oki E, Tokunaga E, Nakamura T, Ueda N, Futatsugi M, Mashino K, Yamamoto M, Watanabe M, Ikebe M, Kakeji Y, Baba H, Maehara Y. Genetic mutual relationship between PTEN and p53 in gastric cancer. *Cancer Lett* 2005; 227: 33-38
- 16 Chang JG, Chen YJ, Perng LL, Wang NM, Kao MC, Yang TY, Chang CP, Tsai CH. Mutation analysis of the PTEN/MMAC1 gene in cancers of the digestive tract. *Eur J Cancer* 1999; 35: 647-651
- 17 Guo CY, Xu XF, Wu JY, Liu SF. PCR-SSCP-DNA sequencing method in detecting PTEN gene mutation and its significance in human gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 3804-3811
- 18 Wang JY, Huang TJ, Chen FM, Hsieh MC, Lin SR, Hou MF, Hsieh JS. Mutation analysis of the putative tumor suppressor gene PTEN/MMAC1 in advanced gastric carcinomas. *Virchows Arch* 2003; 442: 437-443
- 19 Byun DS, Cho K, Ryu BK, Lee MG, Park JI, Chae KS, Kim HJ, Chi SG. Frequent monoallelic deletion of PTEN and its reciprocal association with PIK-3CA amplification in gastric carcinoma. *Int J Cancer* 2003; 104: 318-327
- 20 Li YL, Tian Z, Wu DY, Fu BY, Xin Y. Loss of heterozygosity on 10q23.3 and mutation of tumor suppressor gene PTEN in gastric cancer and precancerous lesions. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 285-288
- 21 Oki E, Baba H, Tokunaga E, Nakamura T, Ueda N, Futatsugi M, Mashino K, Yamamoto M, Ikebe M, Kakeji Y, Maehara Y. Akt phosphorylation associates with LOH of PTEN and leads to chemoresistance for gastric cancer. *Int J Cancer* 2005; 117: 376-380
- 22 Oki E, Kakeji Y, Baba H, Tokunaga E, Nakamura T, Ueda N, Futatsugi M, Yamamoto M, Ikebe M, Maehara Y. Impact of loss of heterozygosity of encoding phosphate and tensin homolog on the prognosis of gastric cancer. *J Gastroenterol Hepatol* 2006; 21: 814-818
- 23 Kang YH, Lee HS, Kim WH. Promoter methylation and silencing of PTEN in gastric carcinoma. *Lab Invest* 2002; 82: 285-291
- 24 Hino R, Uozaki H, Murakami N, Ushiku T, Shinozaki A, Ishikawa S, Morikawa T, Nakaya T, Sakatani T, Takada K, Fukayama M. Activation of DNA methyltransferase 1 by EBV latent membrane protein 2A leads to promoter hypermethylation of PTEN gene in gastric carcinoma. *Cancer Res* 2009; 69: 2766-2774
- 25 Guo J, Miao Y, Xiao B, Huan R, Jiang Z, Meng D, Wang Y. Differential expression of microRNA species in human gastric cancer versus non-tumorous tissues. *J Gastroenterol Hepatol* 2009; 24: 652-657
- 26 Zheng HC, Sun JM, Li XH, Yang XF, Zhang YC, Xin Y. Role of PTEN and MMP-7 expression in growth, invasion, metastasis and angiogenesis of gastric carcinoma. *Pathol Int* 2003; 53: 659-666
- 27 Zheng HC, Li YL, Sun JM, Yang XF, Li XH, Jiang WG, Zhang YC, Xin Y. Growth, invasion, metastasis, differentiation, angiogenesis and apoptosis of gastric cancer regulated by expression of PTEN encoding products. *World J Gastroenterol* 2003; 9: 1662-1666
- 28 Zheng HC, Chen Y, Kuang LG, Yang L, Li JY, Wu DY, Zhang SM, Xin Y. [Expression of PTEN-encoding product in different stages of carcinogenesis and progression of gastric carcinoma]. *Zhonghua Zhongliu Xue* 2003; 25: 13-16
- 29 Yang L, Kuang LG, Zheng HC, Li JY, Wu DY, Zhang SM, Xin Y. PTEN encoding product: a marker for tumorigenesis and progression of gastric carcinoma. *World J Gastroenterol* 2003; 9: 35-39
- 30 Lee HS, Lee HK, Kim HS, Yang HK, Kim WH. Tumor suppressor gene expression correlates with gastric cancer prognosis. *J Pathol* 2003; 200: 39-46
- 31 Yang XF, Yang L, Mao XY, Wu DY, Zhang SM, Xin Y. Pathobiological behavior and molecular mechanism of signet ring cell carcinoma and mucinous adenocarcinoma of the stomach: a comparative study. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 750-754

- 32 Zheng H, Takahashi H, Murai Y, Cui Z, Nomoto K, Miwa S, Tsuneyama K, Takano Y. Pathobiological characteristics of intestinal and diffuse-type gastric carcinoma in Japan: an immunostaining study on the tissue microarray. *J Clin Pathol* 2007; 60: 273-277
- 33 Deng H, Wu RL, Zhou HY, Huang X, Chen Y, Liu LJ. Significance of Survivin and PTEN expression in full lymph node-examined gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 1013-1017
- 34 Liu GY, Liu KH, Zhang Y, Wang YZ, Wu XH, Lu YZ, Pan C, Yin P, Liao HF, Su JQ, Ge Q, Luo Q, Xiong B. Alterations of tumor-related genes do not exactly match the histopathological grade in gastric adenocarcinomas. *World J Gastroenterol* 2010; 16: 1129-1137
- 35 Li DW, Wu Q, Peng ZH, Yang ZR, Wang Y. [Expression and significance of Notch1 and PTEN in gastric cancer]. *Ai Zheng* 2007; 26: 1183-1187
- 36 Zhou YJ, Xiong YX, Wu XT, Shi D, Fan W, Zhou T, Li YC, Huang X. Inactivation of PTEN is associated with increased angiogenesis and VEGF overexpression in gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 3225-3229
- 37 Zheng H, Takahashi H, Murai Y, Cui Z, Nomoto K, Tsuneyama K, Takano Y. Low expression of FHIT and PTEN correlates with malignancy of gastric carcinomas: tissue-array findings. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2007; 15: 432-440
- 38 Zheng H, Takahashi H, Murai Y, Cui Z, Nomoto K, Niwa H, Tsuneyama K, Takano Y. Expressions of MMP-2, MMP-9 and VEGF are closely linked to growth, invasion, metastasis and angiogenesis of gastric carcinoma. *Anticancer Res* 2006; 26: 3579-3583
- 39 Zheng H, Tsuneyama K, Cheng C, Takahashi H, Cui Z, Nomoto K, Murai Y, Takano Y. Expression of KAI1 and tenascin, and microvessel density are closely correlated with liver metastasis of gastrointestinal adenocarcinoma. *J Clin Pathol* 2007; 60: 50-56
- 40 Park GS, Joo YE, Kim HS, Choi SK, Rew JS, Park CS, Kim SJ. [Expression of PTEN and its correlation with angiogenesis in gastric carcinoma]. *Korean J Gastroenterol* 2005; 46: 196-203
- 41 Hwang PH, Kim SY, Lee JC, Kim SJ, Yi HK, Lee DY. PTEN/MMAC1 enhances the growth inhibition by anticancer drugs with downregulation of IGF-II expression in gastric cancer cells. *Exp Mol Med* 2005; 37: 391-398
- 42 Yu HG, Ai YW, Yu LL, Zhou XD, Liu J, Li JH, Xu XM, Liu S, Chen J, Liu F, Qi YL, Deng Q, Cao J, Liu SQ, Luo HS, Yu JP. Phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway plays an important role in chemoresistance of gastric cancer cells against etoposide and doxorubicin induced cell death. *Int J Cancer* 2008; 122: 433-443
- 43 He RF, Hu ZL, Wen JF. [Biological implication of PTEN gene expression in human gastric cancer and related molecular mechanisms]. *Zhonghua Binglixue Zazhi* 2007; 36: 324-328
- 44 Yi HK, Kim SY, Hwang PH, Kim CY, Yang DH, Oh Y, Lee DY. Impact of PTEN on the expression of insulin-like growth factors (IGFs) and IGF-binding proteins in human gastric adenocarcinoma cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 330: 760-767
- 45 Hang Y, Zheng YC, Cao Y, Li QS, Sui YJ. Suppression of gastric cancer growth by adenovirus-mediated transfer of the PTEN gene. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 2224-2229

编辑 李军亮 电编 何基才

ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) CN 14-1260/R 2011年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

汤姆森-路透公布 2009 年 *WJG* 影响因子 2.092

本刊讯 根据2010-06-18汤姆森-路透发布的2009年度期刊引证报告, *World Journal of Gastroenterology* (*WJG*) (中文刊名《世界胃肠病学杂志》) 影响因子为2.092, 论文总被引次数12 740次, 特征因子0.05832, 分别位于65种国际胃肠肝病学期刊的第33位, 8位和5位。

与2008年的影响因子(2.081), 总被引次数(10 822次), 特征因子(0.05006)相比, *WJG*在2009年国际胃肠肝病学期刊中的排名分别增加了7个百分点, 4个百分点和3个百分点。(*WJG*编辑部主任: 程剑侠 2010-06-18)

酒精性急性胰腺炎发病机制及临床特征

余贤恩

■背景资料

急性胰腺炎(AP)是由胆道疾病、酒精、高脂血症等多种原因引起的全身炎症性疾病。Frey等研究表明AP发病率已明显增加, Yadav等报道美国酒精性急性胰腺炎(AAP)发病率从7.5例/10万人增加到8.1例/10万人, 约增加12%。

余贤恩, 广西百色市人民医院消化科 广西壮族自治区百色市 533000

通讯作者: 余贤恩, 533000, 广西壮族自治区百色市, 广西百色市人民医院消化科. yuxianenys@163.com

收稿日期: 2010-11-11 修回日期: 2011-01-20

接受日期: 2011-01-23 在线出版日期: 2011-02-28

Alcoholic acute pancreatitis: pathogenesis and clinical characteristics

Xian-En Yu

Xian-En Yu, Department of Gastroenterology, People's Hospital of Baise, Baise 533000, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China

Correspondence to: Xian-En Yu, Department of Gastroenterology, People's Hospital of Baise, Baise 533000, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China. yuxianenys@163.com

Received: 2010-11-11 Revised: 2011-01-20

Accepted: 2011-01-23 Published online: 2011-02-28

Abstract

Animal and clinical studies have shown that alcohol and its metabolic products, endotoxin, viral infection, drinking pattern, smoking, obesity, genetic variability, and gene polymorphisms were very important in the pathogenesis of alcoholic acute pancreatitis (AAP). The morbidity of AAP has been increased in the past decade, and male gender is strongly associated with increased risk of AAP. The mortality of AAP is high, while the quality of life of survivors of severe AAP is low. In this paper, we review the pathogenesis and clinical characteristics of AAP.

Key Words: Alcoholic acute pancreatitis; Pathogenesis; Clinical characteristics

Yu XE. Alcoholic acute pancreatitis: pathogenesis and clinical characteristics. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(6): 614-618

摘要

动物实验及临床研究表明, 酒精及其代谢产物、细菌内毒素、病毒感染、饮酒方式、吸烟、肥胖及宿主的基因突变及基因多态性在酒精性急性胰腺炎发生中具有重要作用。酒精

性急性胰腺炎的发病率已明显增加, 其以男性为主, 病死率高, 重症存活者生活质量低下。本文综述了酒精性急性胰腺炎的发病机制及临床特征。

关键词: 酒精性急性胰腺炎; 发病机制; 临床特征

余贤恩. 酒精性急性胰腺炎发病机制及临床特征. 世界华人消化杂志 2011; 19(6): 614-618

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/6/614.asp>

0 引言

急性胰腺炎(acute pancreatitis, AP)是由胆道疾病、酒精、高脂血症等多种原因引起的全身炎症性疾病。Frey等^[1]研究表明AP发病率已明显增加, Yadav等^[2]报道美国酒精性急性胰腺炎(alcoholic acute pancreatitis, AAP)发病率从7.5例/10万人增加到8.1例/10万人, 约增加12%。酒精消费与胰腺炎的关系在国际上受重视已超过100多年, 分析认为酒精消费与发生胰腺炎的危险之间存在量一效关系^[3]。并非所有嗜酒的人都发生胰腺炎, 既往认为5%嗜酒者有胰腺炎的临床表现^[4], Maruyama等^[5]报道日本男性嗜酒者9.1%-17.4%患酒精性胰腺炎。为何只有少部分嗜酒者发生胰腺炎? 因此, 进一步探索及了解AAP发病机制及临床表现特征, 对于胰腺炎的预防、诊治很有意义。

1 AAP发病机制

AAP的发生是酒精、宿主、环境因素的相互作用及共同影响的结果, 这些作用及影响无论在动物还是在人体都具有一定的特征。

1.1 动物实验

1.1.1 酒精及其代谢产物的作用: 给大鼠喂食酒精, 8 wk后胰腺RNA表达出现改变, 激活的转录因子3、热休克蛋白70、热休克蛋白27及meso-trypsinogen增加, 而叶酸转运蛋白、金属硫蛋白减少, 引起胰腺实质损失、持续炎症及纤维化。乙醇也使大鼠血清及胰腺组织中的铁离子增加, 此与胰腺的氧化损伤有关^[6], 而且非氧化代谢产

■同行评议者

黄颖秋, 教授, 本溪钢铁(集团)有限责任公司总医院消化内科

物-脂肪酸乙酯中介了AP早期胰腺细胞损伤^[7,8]. 用乙醇喂养♂Wistar大鼠后, 大鼠胰腺caspase表达减少, cathepsin B表达增加, 阻止细胞凋亡, 促进细胞死亡. 胰腺细胞的死亡(坏死)就会导致胰腺炎^[9].

乙醇对离体的大鼠胰腺腺泡细胞(pancreatic acinar cell, PAC)的损伤是通过蛋白激酶C- ϵ (protein kinase C- ϵ , PKC- ϵ)来激活NF- κ B而发生的, 其增强CCK-8引起的NF- κ B激活的作用至少部分是通过PKC- ϵ 来实现的^[10], 并使胰腺PKC- α 中介的Munc18c细胞膜电位改变, 进而导致胰腺炎^[11]. Siech等^[12]对离体大鼠PAC及胰腺星状细胞(pancreatic stellate cells, PSC)进行了详细研究. PAC培养24 h后, 再加入乙醇及/或脂肪(VLDL), 通过检测淀粉酶、脂肪酶、乳酸酶、细胞凋亡因子、氧化应激物等了解PAC功能及培养PSC来了解恢复情况. 加入观察物培养6 h后发现, VLDL及酒精通过氧化应激来加重PAC的损伤, 且出现具有量一效变化关系的细胞凋亡及/或死亡. VLDL及酒精还促进PSC增生及细胞外基质蛋白的合成.

长期用乙醇喂养大鼠, 可使其白细胞黏附性增加, 导致胰腺微循环障碍^[13], 增加动物重症坏死性胰腺炎(severe necrotizing pancreatitis, SNP)肝脏、胰腺损伤, 而氧化钒可以改善肝、胰微循环, 减少肝、胰的损伤程度^[14,15].

1.1.2 细菌感染-细菌内毒素的作用: 对大鼠在体及离体胰腺研究发现, 细菌内毒素-脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)增加酒精引起的胰腺组织损伤及纤维化. 撤除酒精后, 胰腺损伤(包括纤维化)会恢复, 并增加PSC凋亡. 如果继续使用酒精, 则使胰腺损伤永存, 并阻止PSC凋亡. 酒精及LPS明显抑制PSC凋亡, LPS的这种作用可以被Toll样受体4 siRNA所阻滞^[16,17]. 研究还发现用酒精喂养的大鼠注射LPS后, 出现多器官损伤, 胰腺坏死及炎症较非酒精喂养的动物严重, 且这种损伤与LPS之间存在量一效关系. LPS引起胰腺损伤是胰腺细胞坏死, 而非凋亡^[18,19]. 说明内毒素协同酒精对胰腺损伤.

1.1.3 病毒感染: Jerrells等^[20]对小鼠研究发现, 让酒精喂养C57BL/6小鼠感染科萨其病毒B3, 动物胰腺、脾脏的病毒增加, 体液免疫下降, 结果出现较严重胰腺炎. 表明病毒感染是酒精引起胰腺炎的一个重要共同致病因素.

1.2 临床研究 基因-环境因素共同促发了人群患酒精性胰腺炎^[21], 即酒精、宿主性别、年龄、民

族、种族、体质量指数、吸烟情况、饮酒方式及饮食等情况以及各因素间的相互影响在酒精性胰腺炎发生中具有重要作用. Whitcomb提出了Sentinel Acute Pancreatitis Event(SAPE)假设模型, 酒精作用于中枢神经系统及胰腺, 影响细胞死亡或凋亡、组织内巨噬细胞及星状细胞的反应及功能, 酒精还影响免疫系统反应; 中枢神经系统对胰腺进行调节; 吸烟等环境因素也影响对炎症反应及星状细胞功能.

1.2.1 酒精种类及饮酒方式的影响: 各种酒精饮料含有乙醇及多种非乙醇成分, 可以引起胰腺细胞发生不同反应^[22], Barreto等^[23]报道, 印度乡村生产的酒精含有多种副产物, 如丁醇、丙醇、乙醛、醋酸及微量的甲醇, 而含有这些副产物的酒精较白兰地、威士忌等导致了人群中酒精性胰腺炎高发率.

饮酒方式对胰腺炎发生也有影响. 饮酒超过100 g/d(8次/d), 饮酒时间>5-10年, 则发生酒精性胰腺炎, 但也有报道饮酒 ≥ 60 g/d, 20-30年发生酒精性胰腺炎. 饮酒量与胰腺炎的相关性不如饮酒量与酒精性肝炎或肝硬化的相关性那么高. 近来研究认为每天饮酒4次是发生酒精性胰腺炎的阈值^[3].

1.2.2 吸烟的影响: 超过90%酒精性胰腺炎患者是长期吸烟者. 吸烟是酒精性胰腺炎的共同病因, 吸毒也会增加AP的发病率^[2,24]. DiMagno等^[25]报道吸烟是发生AP、复发性AP及慢性胰腺炎的共同病因, 且存在量一效关系. 但也有报道吸烟与慢性胰腺炎明显相关, 而与AP相关的证据不足^[26].

1.2.3 肥胖的影响: 肥胖多伴有高脂血症及高粘血症, 易造成胰腺微循环障碍. 同时脂肪组织及脂联素的作用, 使免疫功能失调. 肥胖不仅是AP发生局部及全身并症的危险因素, 也是酒精性慢性胰腺炎的重要危险因素^[27,28].

1.2.4 炎症细胞因子及调节物的影响: 炎症细胞因子及调节物参与了许多炎症反应及细胞组织坏死过程. 炎症性细胞因子IL-6、IL-8及TNF- α 、抵抗素、生长素释放肽在AAP发生及发展中具有重要促进作用^[29,30]. SAP患者血高迁移率族蛋白1(high-mobility group box chromosomal protein 1, HMGB1)浓度增加, 且与AP严重程度有关, 其导致严重炎症及器官衰竭^[31].

1.2.5 基因的影响: 基因突变及基因多态性在AP发生中具独特作用. 基因差异会引起是否患病以及病变程度不同的结局.

■相关报道
Barreto等报道, 印度乡村生产的酒精含有多种副产物, 如丁醇、丙醇、乙醛、醋酸及微量的甲醇, 而含有这些副产物的酒精较白兰地、威士忌等导致了人群中酒精性胰腺炎高发率.

■同行评价

本文内容详实,对临床工作有一定的参考价值。

酗酒者及酒精中毒者的乙醇脱氢酶、乙醛脱氢酶、微粒体细胞色素P-450系统都具有基因多态性。且乙醇脱氢酶2及乙醛脱氢酶2的多态性是亚洲人患酒精性肝硬化、酒精性胰腺炎及酒精中毒危险因素^[2]。Miyasaka等^[4]研究认为羧化脂肪酶(carboxyl ester lipase, CEL)基因的多态性,尤其是L等位基因增加,与酒精性胰腺炎发生密切相关。Chao等^[32]报道,CD14基因中的C等位基因与中国人患AAP密切相关。而囊性纤维化跨膜传导调节因子(cystic fibrosis transmembrane regulator, CFTR)、免疫反应性阳离子胰蛋白酶原(cationic trypsinogen, PRSS1)、蛋白酶抑制因子Kazal型1(serine protease inhibitor Kazal type 1, SPINK1)基因突变增加AP发生,且CFTR基因突变在AP患者中常见,但在慢性胰腺炎中不明显。而N34S SPINK1基因突变在急性复发性胰腺炎及慢性胰腺炎中不明显。61%的急性复发性胰腺炎患者至少携带1种基因突变及/或基因多态性^[2,33]。但对日本378名健康者及604例胰腺疾病患者研究发现,AP患者无基因变异携带者,且AP患者的p.G191R基因较健康者少见^[34]。Joergensen等^[35]对首次AP发作的青年患者进行研究,32%特发性胰腺炎患者的病因是基因病变,在全部AP患者中4%病因是基因问题。所以有关基因对胰腺炎的影响还需要研究不同性别、民族、种族、年龄等相关情况。

2 AAP的临床特征

2.1 临床表现及诊断 AAP多见于男性,男/女为2.5-5/1,好发于年龄为35-44岁的男性及25-34岁的女性。大多有腹痛或者AP复发的相关表现^[2]。Nordback等^[36]研究发现,首次发生AAP者,腹痛、恶心、呕吐等大部分症状是出现在停止饮酒数小时到48 h内。超声内镜检查发现酒精性胰腺炎患者的胰腺在早期已有明显图像改变^[37]。Kim等^[38]研究发现,与急性胆源性胰腺炎相比,AAP病例胰腺CT检查显示胰腺周围的渗出病变更明显、更严重。SPINK1基因特异性使得AAP病例胰腺组织出现坏死、慢性损害等改变^[39,40]。

依据病史及临床表现,对AAP诊断不难。血清二唾液酸转铁蛋白是AAP区别于其他AP在病因诊断上准确、简便、快速的生化标志物^[41,42]。

2.2 发病率增加 有关AAP发病率报道不一致。Miyasaka等^[4]于2005年报道5%嗜酒者患AAP。对重度酒精依赖者研究发现至少3%患AAP^[24],而Yadav等^[2]报道美国AAP发病率从7.5例/10万人

增加到8.4例/10万人。Maruyama等^[5]研究表明9.1%-17.4%饮酒日本男子患AAP,而且发现患者开始饮酒的年龄较轻,每天饮酒量大。在荷兰研究表明,1992-2004年住院AP及慢性胰腺炎患者已增加,增长为11.8-19.2例/100 000人/年,并预测认为,与2004年相比,2010年至少增加9.9%^[43]。

2.3 复发率受多因素影响 半数AAP复发,复发者的C-反应蛋白及白细胞均较高^[44]。持续饮酒是复发的重要危险因素,假性囊肿形成似乎与胰腺炎复发密切相关^[45],而基因改变也在急性复发性胰腺炎中具有重要作用^[46]。为减少AAP复发,Nordback等^[47]进行了一个2年的对照研究,一组为住院期间的单次健康教育咨询,另一组为每隔半年定期健康教育咨询。结果显示定期健康教育咨询组5例AP患者复发9次,而对照组13例AP患者复发20次。第1个半年时两组复发率相近(4次/5次),后续观察发现定期教育组复发率较对照组明显减少(5次/15次, $P = 0.02$)。研究表明,通过定期健康教育咨询以减少酒精消费,可以防止AAP复发。

2.4 病死率较高 酒精性胰腺炎病死率较非酒精性胰腺炎的高^[1,48]。Deng等^[49]研究表明,狂饮者中男性患胰腺炎较多、血三酰甘油较高、Balthazar CT评分高、APACHE II评分较高、总的并发症及总的病死率较高。Lowenfels等^[50]报道表明AP总的病死率<5%。病死率增加与肥胖率及饮酒量增加等有关。

2.5 重症存活者的生活质量较低 存活者生活质量与组织器官受疾病损伤程度、康复效果等有关。与胆源性AP相比,AAP易转化为慢性胰腺炎^[44],慢性胰腺炎患者生活质量较其他疾病患者生活质量差,而酒精性慢性胰腺炎患者生活质量又较非酒精性慢性胰腺炎患者生活质量差^[2]。酒精性胰腺炎的胰腺坏死感染者经手术治疗后生活质量仍较低^[51-53]。

总之,无论是动物实验或是临床研究都显示AP发生与酒精、吸烟、肥胖、细菌内毒素、病毒感染、基因多态性及基因突变等共同致病因素有关。AAP发病率逐年提高,其病死率也较高。因此积极地进行健康宣传教育,减少酒精消费是降低AP发生及防止其复发的有效途径。

3 参考文献

- 1 Frey CF, Zhou H, Harvey DJ, White RH. The incidence and case-fatality rates of acute biliary, alcoholic, and idiopathic pancreatitis in California, 1994-2001. *Pancreas* 2006; 33: 336-344

- 2 Yadav D, Papachristou GI, Whitcomb DC. Alcohol-associated pancreatitis. *Gastroenterol Clin North Am* 2007; 36: 219-238, vii
- 3 Irving HM, Samokhvalov AV, Rehm J. Alcohol as a risk factor for pancreatitis. A systematic review and meta-analysis. *JOP* 2009; 10: 387-392
- 4 Miyasaka K, Ohta M, Takano S, Hayashi H, Higuchi S, Maruyama K, Tando Y, Nakamura T, Takata Y, Funakoshi A. Carboxylester lipase gene polymorphism as a risk of alcohol-induced pancreatitis. *Pancreas* 2005; 30: e87-e91
- 5 Maruyama K, Otsuki M. Incidence of alcoholic pancreatitis in Japanese alcoholics: survey of male sobriety association members in Japan. *Pancreas* 2007; 34: 63-65
- 6 Kiziler AR, Aydemir B, Gulyasar T, Unal E, Gunes P. Relationships among iron, protein oxidation and lipid peroxidation levels in rats with alcohol-induced acute pancreatitis. *Biol Trace Elem Res* 2008; 124: 135-143
- 7 Gukovsky I, Lugea A, Shahsahebi M, Cheng JH, Hong PP, Jung YJ, Deng QG, French BA, Lungo W, French SW, Tsukamoto H, Pandol SJ. A rat model reproducing key pathological responses of alcoholic chronic pancreatitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2008; 294: G68-G79
- 8 Kubisch CH, Gukovsky I, Lugea A, Pandol SJ, Kuick R, Misek DE, Hanash SM, Logsdon CD. Long-term ethanol consumption alters pancreatic gene expression in rats: a possible connection to pancreatic injury. *Pancreas* 2006; 33: 68-76
- 9 Wang YL, Hu R, Lugea A, Gukovsky I, Smoot D, Gukovskaya AS, Pandol SJ. Ethanol feeding alters death signaling in the pancreas. *Pancreas* 2006; 32: 351-359
- 10 Satoh A, Gukovskaya AS, Reeve JR Jr, Shimosegawa T, Pandol SJ. Ethanol sensitizes NF-kappaB activation in pancreatic acinar cells through effects on protein kinase C-epsilon. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2006; 291: G432-G438
- 11 Cosen-Binker LI, Lam PP, Binker MG, Gaisano HY. Alcohol-induced protein kinase Calpha phosphorylation of Munc18c in carbachol-stimulated acini causes basolateral exocytosis. *Gastroenterology* 2007; 132: 1527-1545
- 12 Siech M, Zhou Z, Zhou S, Bair B, Alt A, Hamm S, Gross H, Mayer J, Beger HG, Tian X, Kornmann M, Bachem MG. Stimulation of stellate cells by injured acinar cells: a model of acute pancreatitis induced by alcohol and fat (VLDL). *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2009; 297: G1163-G1171
- 13 Grauvogel J, Daemrlich TD, Ryschich E, Gebhard MM, Werner J. Chronic alcohol intake increases the severity of pancreatitis induced by acute alcohol administration, hyperlipidemia and pancreatic duct obstruction in rats. *Pancreatol* 2010; 10: 603-612
- 14 Cuthbertson CM, Christophi C. Disturbances of the microcirculation in acute pancreatitis. *Br J Surg* 2006; 93: 518-530
- 15 Schneider L, Hackert T, Longerich T, Hartwig W, Fritz S, Krych R, Fortunato F, Gebhard MM, Werner J. Effects of gadolinium chloride and glycine on hepatic and pancreatic tissue damage in alcoholic pancreatitis. *Pancreas* 2010; 39: 502-509
- 16 Vonlaufen A, Phillips PA, Xu Z, Zhang X, Yang L, Pirola RC, Wilson JS, Apte MV. Withdrawal of alcohol promotes regression while continued alcohol intake promotes persistence of LPS-induced pancreatic injury in alcohol-fed rats. *Gut* 2011; 60: 238-246
- 17 Vonlaufen A, Xu Z, Daniel B, Kumar RK, Pirola R, Wilson J, Apte MV. Bacterial endotoxin: a trigger factor for alcoholic pancreatitis? Evidence from a novel, physiologically relevant animal model. *Gastroenterology* 2007; 133: 1293-1303
- 18 Sarady-Andrews JK, Liu F, Gallo D, Nakao A, Overhaus M, Ollinger R, Choi AM, Otterbein LE. Biliverdin administration protects against endotoxin-induced acute lung injury in rats. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2005; 289: L1131-L1137
- 19 Fortunato F, Deng X, Gates LK, McClain CJ, Bimmler D, Graf R, Whitcomb DC. Pancreatic response to endotoxin after chronic alcohol exposure: switch from apoptosis to necrosis? *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2006; 290: G232-G241
- 20 Jerrells TR, Vidlak D, Strachota JM. Alcoholic pancreatitis: mechanisms of viral infections as cofactors in the development of acute and chronic pancreatitis and fibrosis. *J Leukoc Biol* 2007; 81: 430-439
- 21 Whitcomb DC. Gene-environment factors that contribute to alcoholic pancreatitis in humans. *J Gastroenterol Hepatol* 2006; 21 Suppl 3: S52-S55
- 22 Feick P, Gerloff A, Singer MV. Effect of non-alcoholic compounds of alcoholic drinks on the pancreas. *Pancreatol* 2007; 7: 124-130
- 23 Barreto SG, Jardine D, Phillips P, Bhatia M, Saccone GT. Can by-products in country-made alcohols induce acute pancreatitis? *Pancreas* 2010; 39: 1199-1204
- 24 Yadav D, Eigenbrodt ML, Briggs MJ, Williams DK, Wiseman EJ. Pancreatitis: prevalence and risk factors among male veterans in a detoxification program. *Pancreas* 2007; 34: 390-398
- 25 DiMaggio MJ, DiMaggio EP. Chronic pancreatitis. *Curr Opin Gastroenterol* 2010; 26: 490-498
- 26 Sand J, Lankisch PG, Nordback I. Alcohol consumption in patients with acute or chronic pancreatitis. *Pancreatol* 2007; 7: 147-156
- 27 Martínez J, Johnson CD, Sánchez-Payá J, de Madaria E, Robles-Díaz G, Pérez-Mateo M. Obesity is a definitive risk factor of severity and mortality in acute pancreatitis: an updated meta-analysis. *Pancreatol* 2006; 6: 206-209
- 28 Ammann RW, Raimondi S, Maisonneuve P, Mullhaupt B. Is obesity an additional risk factor for alcoholic chronic pancreatitis? *Pancreatol* 2010; 10: 47-53
- 29 Novovic S, Andersen AM, Ersbøll AK, Nielsen OH, Jorgensen LN, Hansen MB. Proinflammatory cytokines in alcohol or gallstone induced acute pancreatitis. A prospective study. *JOP* 2009; 10: 256-262
- 30 Daniel P, Leśniowski B, Jasińska A, Pietruczuk M, Małacka-Panas E. Usefulness of assessing circulating levels of resistin, ghrelin, and IL-18 in alcoholic acute pancreatitis. *Dig Dis Sci* 2010; 55: 2982-2987
- 31 Yasuda T, Ueda T, Takeyama Y, Shinzeki M, Sawa H, Nakajima T, Ajiki T, Fujino Y, Suzuki Y, Kuroda Y. Significant increase of serum high-mobility group box chromosomal protein 1 levels in patients with severe acute pancreatitis. *Pancreas* 2006; 33: 359-363
- 32 Chao YC, Chu HC, Chang WK, Huang HH, Hsieh TY. CD14 promoter polymorphism in Chinese alcoholic patients with cirrhosis of liver and acute pancreatitis. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 6043-6048
- 33 Cavestro GM, Zuppardo RA, Bertolini S, Sereni G, Frulloni L, Okolicsanyi S, Calzolari C, Singh SK, Sianesi M, Del Rio P, Leandro G, Franzè A, Di

- Mario F. Connections between genetics and clinical data: Role of MCP-1, CFTR, and SPINK-1 in the setting of acute, acute recurrent, and chronic pancreatitis. *Am J Gastroenterol* 2010; 105: 199-206
- 34 Kume K, Masamune A, Takagi Y, Kikuta K, Watanabe T, Satoh K, Satoh A, Hirota M, Hamada S, Shimosegawa T. A loss-of-function p.G191R variant in the anionic trypsinogen (PRSS2) gene in Japanese patients with pancreatic disorders. *Gut* 2009; 58: 820-824
- 35 Joergensen M, Brusgaard K, Crüger DG, Gerdes AM, Schaffalitzky de Muckadell OB. Incidence, etiology and prognosis of first-time acute pancreatitis in young patients: a population-based cohort study. *Pancreatology* 2010; 10: 453-461
- 36 Nordback I, Pelli H, Lappalainen-Lehto R, Sand J. Is it long-term continuous drinking or the post-drinking withdrawal period that triggers the first acute alcoholic pancreatitis? *Scand J Gastroenterol* 2005; 40: 1235-1239
- 37 Thuler FP, Costa PP, Paulo GA, Nakao FS, Ardengh JC, Ferrari AP. Endoscopic ultrasonography and alcoholic patients: can one predict early pancreatic tissue abnormalities? *JOP* 2005; 6: 568-574
- 38 Kim YS, Kim Y, Kim SK, Rhim H. Computed tomographic differentiation between alcoholic and gallstone pancreatitis: Significance of distribution of infiltration or fluid collection. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 4524-4528
- 39 Pezzilli R, Morselli-Labate AM. Alcoholic pancreatitis: pathogenesis, incidence and treatment with special reference to the associated pain. *Int J Environ Res Public Health* 2009; 6: 2763-2782
- 40 Pandol SJ, Raraty M. Pathobiology of alcoholic pancreatitis. *Pancreatology* 2007; 7: 105-114
- 41 Pérez-Mateo M. How we predict the etiology of acute pancreatitis. *JOP* 2006; 7: 257-261
- 42 Methuen T, Kylänpää L, Kekäläinen O, Halonen T, Tukiainen E, Sarna S, Kemppainen E, Haapiainen R, Puolakkainen P, Salaspuro M. Disialotransferrin, determined by capillary electrophoresis, is an accurate biomarker for alcoholic cause of acute pancreatitis. *Pancreas* 2007; 34: 405-409
- 43 Spanier BW, Dijkgraaf MG, Bruno MJ. Trends and forecasts of hospital admissions for acute and chronic pancreatitis in the Netherlands. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2008; 20: 653-658
- 44 Yasuda T, Ueda T, Takeyama Y, Shinzeki M, Sawa H, Nakajima T, Kuroda Y. Long-term outcome of severe acute pancreatitis. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 2008; 15: 397-402
- 45 Pelli H, Lappalainen-Lehto R, Piironen A, Järvinen S, Sand J, Nordback I. Pancreatic damage after the first episode of acute alcoholic pancreatitis and its association with the later recurrence rate. *Pancreatology* 2009; 9: 245-251
- 46 Keim V. Role of genetic disorders in acute recurrent pancreatitis. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 1011-1015
- 47 Nordback I, Pelli H, Lappalainen-Lehto R, Järvinen S, Rätty S, Sand J. The recurrence of acute alcohol-associated pancreatitis can be reduced: a randomized controlled trial. *Gastroenterology* 2009; 136: 848-855
- 48 Yadav D, Lowenfels AB. Trends in the epidemiology of the first attack of acute pancreatitis: a systematic review. *Pancreas* 2006; 33: 323-330
- 49 Deng L, Xue P, Huang L, Yang X, Wan M, Xia Q. Binge drinking aggravates the outcomes of first-attack severe acute pancreatitis. *Pancreas* 2010; 39: 149-152
- 50 Lowenfels AB, Maisonneuve P, Sullivan T. The changing character of acute pancreatitis: epidemiology, etiology, and prognosis. *Curr Gastroenterol Rep* 2009; 11: 97-103
- 51 Papachristou GI, Papachristou DJ, Morinville VD, Slivka A, Whitcomb DC. Chronic alcohol consumption is a major risk factor for pancreatic necrosis in acute pancreatitis. *Am J Gastroenterol* 2006; 101: 2605-2610
- 52 Reszetow J, Hać S, Dobrowolski S, Stefaniak T, Wajda Z, Gruca Z, Sledziński Z, Studniarek M. Biliary versus alcohol-related infected pancreatic necrosis: similarities and differences in the follow-up. *Pancreas* 2007; 35: 267-272
- 53 Cinquepalmi L, Boni L, Dionigi G, Rovera F, Diurni M, Benevento A, Dionigi R. Long-term results and quality of life of patients undergoing sequential surgical treatment for severe acute pancreatitis complicated by infected pancreatic necrosis. *Surg Infect (Larchmt)* 2006; 7 Suppl 2: S113-S116

编辑 李薇 电编 何基才

EGCG对氟尿嘧啶抑制肝癌细胞生长的增强作用

林少芒, 曹良启, 张智辉, 萧剑彬, 李强

林少芒, 曹良启, 张智辉, 萧剑彬, 李强, 广州医学院第二附属医院普外科三区 广东省广州市 510260
广东省自然科学基金资助项目, No. 9451018201003643
广州医学院博士启动基金资助项目, No. 2008C35
作者贡献分布: 此课题由林少芒与曹良启共同设计; 研究过程由林少芒、曹良启、萧剑彬及李强完成; 数据分析由张智辉完成; 论文撰写由曹良启完成; 实验指导及论文修改由林少芒完成。
通讯作者: 曹良启, 510260, 广东省广州市, 广州医学院第二附属医院普外科三区. clq0829@163.com
电话: 020-34153080
收稿日期: 2010-11-30 修回日期: 2011-01-14
接受日期: 2011-01-23 在线出版日期: 2011-02-28

EGCG enhances 5-fluorouracil-induced cell growth inhibition in human hepatocellular carcinoma cell line BEL-7402

Shao-Mang Lin, Liang-Qi Cao, Zhi-Hui Zhang, Jian-Bin Xiao, Qiang Li

Shao-Mang Lin, Liang-Qi Cao, Zhi-Hui Zhang, Jian-Bin Xiao, Qiang Li, Department of General Surgery (Division III), the Second Affiliated Hospital of Guangzhou Medical College, Guangzhou 510260, Guangdong Province, China
Supported by: the Natural Science Foundation of Guangdong, No. 9451018201003643; and the Doctoral Start-up Fund of Guangzhou Medical College, No. 2008C35
Correspondence to: Liang-Qi Cao, Department of General Surgery (Division III), the Second Affiliated Hospital of Guangzhou Medical College, Guangzhou 510260, Guangdong Province, China. clq0829@163.com
Received: 2010-11-30 Revised: 2011-01-14
Accepted: 2011-01-23 Published online: 2011-02-28

Abstract

AIM: To investigate whether epigallocatechin-3-gallate (EGCG) enhances 5-fluorouracil (5-FU)-induced cell growth inhibition in human hepatocellular carcinoma cell line BEL-7402 and to explore potential mechanisms involved.

METHODS: MTT assay was used to evaluate cell viability. Western blotting analysis was performed to detect protein expression, and small interfering RNA was used to suppress COX-2 expression. ELISA assay was applied to test the release of prostaglandin E₂ (PGE₂).

RESULTS: Treatment with different concentrations of EGCG (5, 10, 25, or 50 mmol/L) significantly inhibited the growth of BEL-7402 cells

compared with control cells (treated with 0.1% DMSO, all $P < 0.05$). When cells were treated with 10 mmol/L 5-FU in combination with either 5, 10, 25, or 50 mmol/L EGCG, the percentages of viable cell significantly decreased when compared with cells treated with each drug alone, suggesting a synergistic effect between the two drugs. Moreover, EGCG down-regulated the expression of COX-2 and reduced the release of PGE₂ in BEL-7402 cells.

CONCLUSION: EGCG enhances 5-FU-induced cell growth inhibition in human hepatocellular carcinoma cell line BEL-7402 possibly by down-regulating COX-2 expression and inhibiting PGE₂ release.

Key Words: Epigallocatechin-3-gallate; 5-Fluorouracil; Hepatocellular carcinoma

Lin SM, Cao LQ, Zhang ZH, Xiao JB, Li Q. EGCG enhances 5-fluorouracil-induced cell growth inhibition in human hepatocellular carcinoma cell line BEL-7402. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(6): 619-623

摘要

目的: 研究表没食子儿茶素没食子酸酯(EGCG)是否具有增强5-氟尿嘧啶(5-FU)抑制肝癌BEL-7402细胞生长的作用, 并探讨其中的机制。

方法: 应用MTT法观察肝癌细胞的生存率; Western blot进行蛋白分析; 应用小RNA干扰(siRNA)法来沉默BEL-7402细胞中COX-2蛋白的表达; ELISA定量测定细胞培养上清液中前列腺素E₂(PGE₂)的含量。

结果: 与对照组(0.1% DMSO)相比, 工作浓度为5、10、25、50 mmol/L的EGCG显著抑制BEL-7402细胞的生长($P < 0.05$), 分别下降至为 $76.55\% \pm 1.98\%$ 、 $52.88\% \pm 4.28\%$ 、 $18.54\% \pm 2.88\%$ 和 $7.95\% \pm 0.90\%$ ($q = 0.86, 1.31, 1.33, 1.17$)。当与10 mmol/L 5-FU联合用药时, 细胞生存率下降更为显著, 即浓度为5 mmol/L EGCG与5-FU联合用药表现出两药相加作用; 10、25、50 mmol/L EGCG浓度为与5-FU

■背景资料

原发性肝癌恶性程度高, 死亡率高。5-FU是肝癌化疗中常用药物, 表没食子儿茶素没食子酸酯(EGCG)为儿茶素单体成分, 已经证实它能够防治肝硬化和诱导肝癌细胞凋亡的作用。利用联合用药, 克服化疗药物耐药, 产生协同作用成为当今晚期肝癌治疗的突破口。

■同行评议者

王悦华, 副主任医师, 首都医科大学宣武医院普外科

■ 研发前沿

原发性肝癌是我国常见的恶性肿瘤之一, 发病率和死亡率高, 对于失去手术机会的肝癌患者, 常规化疗效果差, 并容易产生耐药。因此, 寻找高效的化疗药物或新的联合化疗方案, 探索药物间相互作用的机制, 以求提高对肝癌的治疗效果成为当今研究的热点。

联合用药表现出协同作用。进一步研究发现, EGCG下调BEL-7402细胞中COX-2蛋白表达, 降低PGE₂的释放, 这一系列分子活动参与5-FU协同抗肝癌细胞生长作用。

结论: EGCG具有协同增强5-FU抑制BEL-7402细胞生长作用。

关键词: 表没食子儿茶素没食子酸酯; 5-氟尿嘧啶; 肝肿瘤

林少芒, 曹良启, 张智辉, 萧剑彬, 李强. EGCG对氟尿嘧啶抑制肝癌细胞生长的增强作用. 世界华人消化杂志 2011; 19(6): 619-623

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/619.asp>

0 引言

原发性肝癌(primary liver cancer, PLC)是我国常见的恶性肿瘤之一, 年死亡率占肿瘤死亡率的第2位, 就世界范围内而言, 其发病率呈上升趋势, 严重危害人类的健康和生命。表没食子儿茶素没食子酸酯(epigallocatechin-3-gallate, EGCG)是从绿茶提取的儿茶素单体成分。先前的研究已经证实EGCG能够防治肝硬化和诱导肝癌细胞凋亡的作用, 其机制尚在探索之中^[1-3]。5-氟尿嘧啶(5-fluorouracil, 5-FU)是肝癌化疗中常用药物, 也是各种联合化疗方案中必不可少的化疗药物之一。由于肿瘤细胞对药物产生耐药性则严重影响了肝癌的疗效, 成为晚期肝癌化疗的障碍^[4,5]。因此, 临床和科研工作者正努力寻找更好的化疗药物或新的联合化疗方案从肝癌发生发展的基因调控机制中寻找新的药物靶点, 以求提高对肝癌的治疗效果。本文通过体外实验观察EGCG联合5-FU对肝癌细胞生长的影响, 并探讨其中的机制。

1 材料和方法

1.1 材料 EGCG, 5-FU和Celecoxib购于美国Cayman公司, 这些化学药品溶于DMSO(终浓度为0.1%)。兔多克隆抗人COX-2(72 000 Da)和辣根过氧化物酶耦联的羊抗兔二抗均为美国Santa Cruz公司产品, PGE₂-ELISA试剂盒购于深圳晶美生物有限公司。人肝癌细胞系BEL-7402细胞由中山大学第一附属医院肝胆外科汪谦教授惠赠。细胞培养在含100 mL/L胎牛血清, 青霉素100 kU/L和链霉素100 mg/L的DMEM高糖(由Gibco公司提供)培养基中, 于37 °C、50 mL/L CO₂培养箱中静置培养。待细胞融合至80%-90%时常规

消化传代, 每2-3 d传代1次, 取对数生长期的细胞进行实验。

1.2 方法

1.2.1 MTT法测定细胞生存率: 取对数生长期细胞, 以含100 mL/L胎牛血清的DMEM培养基调整细胞浓度为 1×10^5 /mL, 按200 μ L/孔接种于96孔板, 37 °C、50 mL/L CO₂孵箱中培养8 h; 观察细胞贴壁后弃去培养液, 每孔重新加入含不同工作浓度的EGCG或/和5-FU培养液200 μ L, 每一浓度设置5个复孔, 对照组仅加含0.1% DMSO等体积的培养液, 并设无细胞培养液的空白对照; 常规培养48 h后取出培养板, 每孔加入MTT(5 g/L)20 μ L并继续孵育4 h后弃培养液, 每孔加入DMSO 200 μ L, 微量振荡器振荡10 min至结晶溶解, 空白对照调零, 酶标仪上测定570 nm波长处吸光度值(A), 计算细胞存活率及抑制率。细胞存活率 = 实验孔A值/对照孔A值 \times 100%, 细胞抑制率 = 1-细胞生存率。药物相互作用的结果根据金正均法^[6-8]进行判断, 即在量效曲线区间内根据两药合并用药的抑制率及两单药的抑制率计算q值: $q = \frac{\text{两药合用的抑制率}}{\text{两单药预计抑制率}} = \frac{EA+B/(EA+EB-EA \times EB)}{EA+B/(EA+EB-EA \times EB)}$ 。当 $0.85 \leq q \leq 1.15$ 时, 两药有相加作用; 当 $q > 1.15$ 时, 两药有协同作用; 当 $q < 0.85$ 时, 两药有拮抗作用。

1.2.2 细胞总蛋白提取和Western blot分析: BEL-7402细胞经各处理因素处理24 h后, 预冷PBS漂洗3次后, 每孔加入冰冷的蛋白裂解液200 μ L, 放置于4 °C, 30 min, 15 000 g离心10 min收集裂解物总蛋白, 取50 μ g总蛋白行十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)并原位电转印至PVDF膜; 膜经封闭液[含20 mmol/L Tris-HCl(pH7.6)、150 mmol/L NaCl、0.1%吐温-20和5%脱脂奶粉]处理1 h后, 与目的蛋白一抗或内参照 β -actin分别4 °C孵育过夜。膜经漂洗后再与辣根过氧化物酶耦联的二抗常温孵育1 h, 应用增强化学发光法(ECL)发光试剂曝光、显影并成像。

1.2.3 小RNA干扰: 人COX-2基因的小RNA干扰(small interfering RNA, siRNA)序列由广州锐博生物科技公司设计并合成。干扰的靶序列为GGAACGTTGTGAATAACAT, 正义链(5'-3'): GGAACGUUGUGAAUA ACAU dTdT反义链(3'-5'): dTdT CCUUGCAACACUUAUUGUA。将BEL-7402细胞接种至6孔板, 用无抗生素的培养基培养24 h至细胞完全贴壁, 保证细胞密度达到50%融合, 弃去旧的培养基, 重新加入

无抗生素的培养液1 500 μL 。取转染试剂(Lipofectamine2000)10 μL ，用250 μL 的Opti-MEMI培养基(不含血清，不含抗生素)进行稀释，轻晃，室温静置5 min。再用250 μL 的Opti-MEMI培养基稀释10 μL 的siRNA或control siRNA(两种siRNA终浓度均为100 nmol/L)溶液加入上述混合液共同室温孵育20 min。然后，将含有转染试剂和siRNA或control siRNA混合液加入上述6孔板中于培养箱中培养48 h后处理。

1.2.4 PGE_2 的定量检测：调整BEL-7402细胞浓度为 $1 \times 10^5/\text{mL}$ ，按200 $\mu\text{L}/\text{孔}$ 接种于96孔板， 37°C 、50 mL/L CO_2 孵箱中培养8 h；观察细胞贴壁后弃去培养液，每孔重新加入含不同工作浓度的EGCG或/和5-FU培养液200 μL ，每一浓度设置3个复孔，无药对照组仅加含0.1% DMSO等体积的培养液，并设无细胞培养液的空白对照。培养24 h后收集上清，按 PGE_2 -ELISA试剂盒说明进行测定。

统计学处理 实验数据用mean \pm SD表示，采用SPSS11.0统计软件进行完全随机设计的单因素方差分析，多个样本均数间的两两比较采用Student-Newman-Keuls q 检验，以 $P < 0.05$ 表示差异有显著性。

2 结果

2.1 EGCG协同5-FU抑制BEL-7402细胞生长 工作浓度为5、10、25、50 mmol/L的EGCG处理BEL-7402细胞48 h后的生存率分别是92.94% \pm 3.19%、81.62% \pm 3.59%、49.32% \pm 2.27%、27.07% \pm 3.46%，各组生存率之间两两比较有显著性差异($P < 0.05$)。10 mmol/L 5-FU作用于该细胞48 h后，细胞生存率为78.30% \pm 4.78%；当与EGCG联合用药时，细胞生存率明显降低，分别下降至为76.55% \pm 1.98%、52.88% \pm 4.28%、18.54% \pm 2.88%和7.95% \pm 0.90%($q = 0.86$ 、1.31、1.33、1.17)，即浓度为5 mmol/L EGCG与5-FU联合用药表现出两药相加作用，而浓度为10、25、50 mmol/L EGCG与5-FU联合用药表现出两药之间存在协同效应。

2.2 EGCG下调BEL-7402细胞COX-2蛋白表达 如图1所示，与对照组相比，EGCG明显下调了BEL-7402细胞COX-2蛋白表达；单药10 mmol/L 5-FU处理细胞后，COX-2蛋白表达未见明显变化，与EGCG联合后显著下调COX-2蛋白表达。

2.3 EGCG联合5-FU抑制 PGE_2 的释放 BEL-7402细胞经各处理因素处理24 h后，上清液 PGE_2 的测

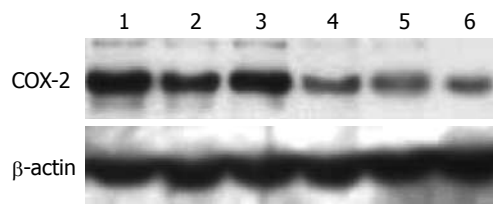


图1 EGCG下调BEL-7402细胞COX-2蛋白的表达。1: 对照组；2: 10 $\mu\text{mol/L}$ 5-FU；3: 10 $\mu\text{mol/L}$ EGCG；4: 25 $\mu\text{mol/L}$ EGCG；5: 50 $\mu\text{mol/L}$ EGCG；6: 5-FU+25 $\mu\text{mol/L}$ EGCG。

定值如下：单药10 $\mu\text{mol/L}$ 5-FU组：66.76 $\mu\text{g/L} \pm 2.60 \mu\text{g/L}$ ；25 $\mu\text{mol/L}$ EGCG组：26.22 $\mu\text{g/L} \pm 2.29 \mu\text{g/L}$ ；联合用药组(25 $\mu\text{mol/L}$ EGCG+10 $\mu\text{mol/L}$ 5-FU)：9.08 $\mu\text{g/L} \pm 1.10 \mu\text{g/L}$ ；阳性(50 $\mu\text{mol/L}$ Celecoxib)对照组：31.62 $\mu\text{g/L} \pm 3.72 \mu\text{g/L}$ ；对照组(0.1% DMSO)：72.64 $\mu\text{g/L} \pm 3.72 \mu\text{g/L}$ ；这些处理组均显著低于对照组。根据各处理组对BEL-7402细胞 PGE_2 释放的抑制率($q = 1.30$)，这表明联合用药有协同作用。

2.4 COX-2表达下调参与联合用药的协同作用 如图2A所示，我们利用特异性COX-2 siRNA敲出COX-2的高表达状态，而非特异性Cont siRNA对COX-2的表达与对照组相比未见明显改变。敲出COX-2蛋白后的细胞生存率为70.50% \pm 5.62%，与5-FU联合后的细胞生存率为47.01% \pm 6.75%($q = 1.18$)。这些数据表明特异性敲出COX-2蛋白的表达参与了联合用药(5-FU+COX-2 siRNA组)对BEL-7402细胞的生长抑制作用，并显示出协同效应(图2B)。这些数据表明EGCG下调BEL-7402细胞COX-2的表达参与了联合用药的协同效应。

3 讨论

EGCG是茶叶中所提取的儿茶素单体成分，具有抗氧化、抗炎、抗病毒、清除自由基以及抗肿瘤等生物学作用。化疗是肿瘤综合治疗的有效手段之一，对于晚期肝癌，尤其是伴有门脉癌栓者，被证明是有效的。然而，化疗最大的障碍是肿瘤细胞的耐药。业已证实，当前临床上使用的化疗药物是通过抑制肿瘤细胞增殖，诱导细胞凋亡以达到杀死肿瘤细胞为目的。然而，当恶性肿瘤细胞接触一种抗癌药物后，肿瘤细胞本身可获得抗增殖、抗凋亡的抗药性，甚至产生了对多种结构不同、作用机制不同的其他抗癌药的抗药性，这些就成为肿瘤耐药的主要原因之一^[9,10]。5-FU是临床上常用的化疗药，也是肝癌化学治疗不可缺少的药物之一。5-FU在体内

■创新盘点

本研究发现，EGCG能够下调人肝癌细胞系BEL-7402细胞中COX-2蛋白的表达，减少 PGE_2 分泌，增强5-FU抗肝癌作用，产生协同效应，从而揭示了EGCG协同5-FU抑制肝癌细胞生长的机制。

■应用要点

本研究通过体外实验证实了EGCG增强5-FU抑制肝癌细胞生长的作用,揭示了EGCG可能成为晚期肝癌可供选择的化疗药物之一,也为EGCG抗肝癌治疗提供理论依据.其临床疗效仍需要进一步验证.

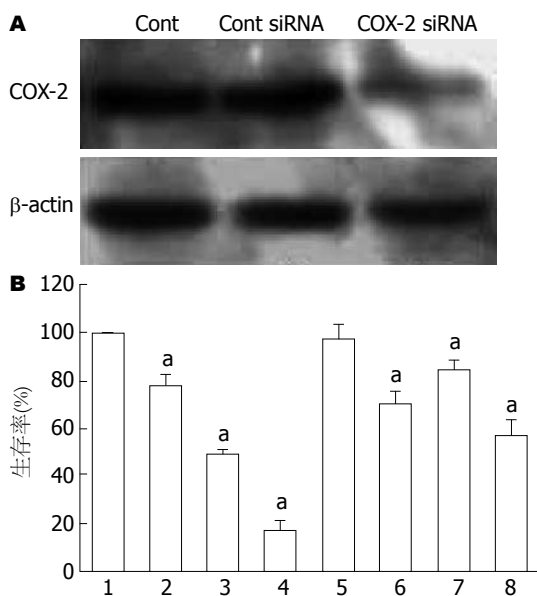


图2 COX-2表达下调参与联合用药的协同作用. A: Western blot显示COX-2蛋白被敲出; B: BEL-7402细胞经各处理因素处理后的生存率. 1: 对照组; 2: 5-FU; 3: EGCG; 4: EGCG+5-FU; 5: Cont siRNA; 6: COX-2 siRNA; 7: 5-FU+Cont siRNA; 8: 5-FU+COX-2 siRNA. ^a $P < 0.05$ vs 对照组.

必须转化为相应的核苷酸才能发挥其抑制肿瘤生长的作用. 他在体内首先转变成5-氟-2-脱氧尿嘧啶核苷酸, 抑制胸腺嘧啶核苷酸合成酶, 阻断脱氧尿嘧啶核苷酸转变为脱氧胸腺嘧啶核苷酸, 从而抑制DNA的生物合成; 此外, 还能渗入RNA, 阻止尿嘧啶渗入RNA以抑制RNA的合成. 5-FU代谢后主要生成两种活性物质: 一个为尿氟三磷(FUTP), 结合到RNA上, 干扰其功能; 另一个是通过尿苷激酶的作用, 生成氟去氧尿一磷(FdUMP), 他抑制胸苷酸合成酶而阻止DNA的合成, 后者是其抗肿瘤的主要原因^[11,12]. 由于5-FU的耐药导致化疗效果较差, 因此有必要寻找一个能够增强5-FU抗肿瘤作用的药物. 我们实验结果结果显示: EGCG联合5-FU具有显著地抑制肝癌细胞生长作用, 并具有协同效应, 这在国内外未见报道.

COX是花生四烯酸代谢途径中的关键限速酶, 也是前列腺素合成过程中主要限速酶. 包括两种亚型: COX-1和COX-2. COX-1在正常组织中表达, 维持正常前列腺素的合成, 发挥正常的生理功能. COX-2在组织正常的生理状态下一般检测不到, 但在细胞因子、炎性介质、促癌剂等作用下, 表达迅速上调. PGE₂作为COX-2的主要代谢产物, 具有促进细胞生长增殖作用, COX-2表达上调, PGE₂产生增加, 形成一种COX-2/PGE₂生物轴, 调节细胞的生长, 其

中也包括肿瘤细胞^[13,14]. 李刚等^[15]报道EGCG诱导肝癌SMMC-7721细胞早期凋亡, 涉及多种基因和蛋白的表达变化. 陈锡林等^[2]报道, EGCG能够抑制肝癌HepG2和SMMC-7721细胞生长, 并能下调COX-2和Bcl-2蛋白的表达, 这一点与我们的结果相似. 此外研究结果还发现, EGCG下调COX-2的表达具有剂量依赖性. 同时, 应用25 μmol/L EGCG与10 μmol/L 5-FU联合显著抑制PGE₂的释放, 并具有协同效应. 特异性地敲出COX-2蛋白的表达参与了联合用药(5-FU+COX-2 siRNA组)对BEL-7402细胞的生长抑制作用, 并显示出协同效应. 进一步说明EGCG下调BEL-7402细胞COX-2的表达参与了联合用药(EGCG+5-FU)的协同效应. 近来的研究也报道^[16,17], 抑制COX-2的表达, 提高肿瘤化疗或放疗的疗效.

总之, EGCG通过下降肝癌细胞中COX-2蛋白的表达, 抑制PGE₂分泌, 增强5-FU抗肝癌作用, 产生协同效应, 为晚期肝癌的化疗提供新的治疗靶点, 也为EGCG抗肝癌治疗提供理论依据.

4 参考文献

- 1 Zhen MC, Wang Q, Huang XH, Cao LQ, Chen XL, Sun K, Liu YJ, Li W, Zhang LJ. Green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate inhibits oxidative damage and preventive effects on carbon tetrachloride-induced hepatic fibrosis. *J Nutr Biochem* 2007; 18: 795-805
- 2 陈锡林, 汪谦, 曹良启, 黄晓卉, 傅新晖, 谭浩翔, 甄茂川, 陈劲松. 没食子儿茶素没食子酸酯诱导人肝癌细胞凋亡. *中华医学杂志* 2008; 88: 2524-2528
- 3 Zhen MC, Huang XH, Wang Q, Sun K, Liu YJ, Li W, Zhang LJ, Cao LQ, Chen XL. Green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate suppresses rat hepatic stellate cell invasion by inhibition of MMP-2 expression and its activation. *Acta Pharmacol Sin* 2006; 27: 1600-1607
- 4 Vitale FV, Romeo P, Vasta F, Panebianco V, Cali S, Rotondo S, Ferraù F, La Greca M. Hepatic intra-arterial interferon alpha 2b-based immunotherapy combined with 5-fluorouracil (5-FU)-based systemic chemotherapy for patients with hepatocellular carcinoma (HCC) not responsive and/or not eligible for conventional treatments: a pilot study. *Anticancer Res* 2007; 27: 4077-4081
- 5 Zhang YQ, Tang XQ, Sun L, Dong L, Qin Y, Liu HQ, Xia H, Cao JG. Rosiglitazone enhances fluorouracil-induced apoptosis of HT-29 cells by activating peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 1534-1540
- 6 金正均. 合并用药中的相加. *中国药理学报* 1980; 1: 70-76
- 7 俞谦, 孙为豪, 刘顺英, 欧希龙, 曹大中, 苏茵, 江洁, 俞婷. 奥曲肽联合特异性COX-2抑制剂对肝癌细胞的抑制作用. *东南大学学报(医学版)* 2005; 24: 363-367
- 8 Cao LQ, Shao ZL, Peng HP, Xiao JB, Xia T. Rosiglitazone enhances 5-fluorouracil-induced cell growth inhibition in hepatocellular carcinoma cell line

- Hep3B. *Chin J Cancer* 2010; 29: 741-746
- 9 Huang G, Zhong X, Cao Y, Chen Y. Antiproliferative effects of conjugated linoleic acid on human colon adenocarcinoma cell line Caco-2. *Asia Pac J Clin Nutr* 2007; 16 Suppl 1: 432-436
- 10 刘景, 徐晶, 丁剑午. ATRA联合奈达铂对人肝癌细胞株Huh-7增殖与凋亡的影响. *世界华人消化杂志* 2010; 18: 2538-2544
- 11 Al-Batran SE, Hartmann JT, Probst S, Schmalenberg H, Hollerbach S, Hofheinz R, Rethwisch V, Seipelt G, Homann N, Wilhelm G, Schuch G, Stoecklacher J, Derigs HG, Hegewisch-Becker S, Grossmann J, Paulig C, Atmaca A, Bokemeyer C, Knuth A, Jäger E. Phase III trial in metastatic gastroesophageal adenocarcinoma with fluorouracil, leucovorin plus either oxaliplatin or cisplatin: a study of the Arbeitsgemeinschaft Internistische Onkologie. *J Clin Oncol* 2008; 26: 1435-1442
- 12 Takeda K, Suyama H, Igishi T, Shigeoka Y, Matsu-moto S, Yamasaki A, Hashimoto K, Sumikawa T, Morita M, Ueda Y, Shimizu E. Sequential treatment with SN-38 followed by 5-fluorouracil shows synergistic cytotoxic activity in small cell lung cancer cells. *Oncol Rep* 2008; 19: 945-951
- 13 许东奎, 蔡建春. COX-2、NSAIDs与肝癌. *中华肝胆外科杂志* 2008; 14: 587-589
- 14 梁熹, 胡雅楠, 和水祥, 邓元, 李晓峰, 张雅欣, 侯和磊, 朱占芳. COX-2与C/EBP β 在人肝细胞肝癌中的表达及其临床意义. *世界华人消化杂志* 2010; 18: 3040-3044
- 15 李刚, 容敏华, 钟艳平, 丁兰芳, 覃健, 廖明, 萧浩, 何敏. EGCG诱导人肝癌SMMC-7721细胞早期凋亡以及基因和蛋白谱的变化研究. *中国药理学通报* 2009; 25: 1482-1486
- 16 Xia W, Zhao T, Lv J, Xu S, Shi J, Wang S, Han X, Sun Y. Celecoxib enhanced the sensitivity of cancer cells to anticancer drugs by inhibition of the expression of P-glycoprotein through a COX-2-independent manner. *J Cell Biochem* 2009; 108: 181-194
- 17 Kim BM, Won J, Maeng KA, Han YS, Yun YS, Hong SH. Nimesulide, a selective COX-2 inhibitor, acts synergistically with ionizing radiation against A549 human lung cancer cells through the activation of caspase-8 and caspase-3. *Int J Oncol* 2009; 34: 1467-1473

■同行评价

本文选题较好, 具有较好的创新性和实用性.

编辑 曹丽鸥 电编 何基才

ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) CN 14-1260/R 2011年版权归世界华人消化杂志

●消息●

《世界华人消化杂志》正文要求

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

根除幽门螺杆菌前后对痘疹样胃炎治疗效果的比较

张彦敏, 姜葵, 王邦茂, 章明放, 王锐

■背景资料

痘疹样胃炎又称疣状胃炎, 1990年悉尼会议又将其定义为隆起糜烂性胃炎, 其病因及发病机制至今尚未完全阐明。国内外有关研究显示痘疹样胃炎与胃癌发生密切相关。第十届世界胃肠病大会视为高危癌前病变。目前对该病治疗尚无统一的治疗方案。

张彦敏, 姜葵, 王邦茂, 王锐, 天津医科大学总医院消化科 天津市 300052

章明放, 天津医科大学第二附属医院病理科 天津市 300052
作者贡献分布: 张彦敏进行此课题的数据采集、统计分析、总结、论文撰写与修改等; 姜葵对此课题的设计、知识性内容的批评性审阅与修改; 王邦茂、章明放及王锐实施操作、技术资料支持等。

通讯作者: 姜葵, 主任医师, 教授, 300052, 天津市和平区鞍山道154号, 天津医科大学总医院消化科。jiangkui66@sohu.com
收稿日期: 2010-11-16 修回日期: 2010-12-28
接受日期: 2011-01-06 在线出版日期: 2011-02-28

Varioliform gastritis: comparative therapy between patients with and without eradication of *Helicobacter pylori*

Yan-Min Zhang, Kui Jiang, Bang-Mao Wang, Ming-Fang Zhang, Rui Wang

Yan-Min Zhang, Kui Jiang, Bang-Mao Wang, Rui Wang, Department of Gastroenterology, Tianjin Medical University General Hospital, Tianjin 300052, China

Ming-Fang Zhang, Department of Pathology, Tianjin Medical University General Hospital, Tianjin 300052, China

Correspondence to: Professor Kui Jiang, Department of Gastroenterology, Tianjin Medical University General Hospital, 154 Anshan Road, Heping District, Tianjin 300052, China. jiangkui66@sohu.com

Received: 2010-11-16 Revised: 2010-12-28

Accepted: 2011-01-06 Published online: 2011-02-28

Abstract

AIM: To compare the efficacy of therapy of varioliform gastritis between patients with and without eradication of *Helicobacter pylori* (*H.pylori*).

METHODS: Three hundred and twenty-five patients with varioliform gastritis were divided into two groups: patients with and without *H.pylori* infection. Patients with *H.pylori* infection were treated by standard triple or quadruple therapy and simultaneously with H₂-receptor blockers or proton pump inhibitors, while those without *H.pylori* infection were treated simply with H₂-receptor blockers or proton pump inhibitors. Treatment efficacy and pathological alterations were compared between patients received *H.pylori* therapy and those who did not as well as between *H.pylori*-infected patients with and

without eradication of *H.pylori*.

RESULTS: There was no significant difference in the total response rate between patients with and without *H.pylori* infection (73.68% vs 72.50%, $P > 0.05$). The total response rate was significantly higher in *H.pylori*-infected patients with *H.pylori* eradication than those without *H.pylori* eradication (89.02% vs 37.84%, $P < 0.01$). There were significant differences in the percentages of patients achieving improvement in atrophic inflammation, intestinal metaplasia and dysplasia between patients with and without *H.pylori* eradication.

CONCLUSION: *H.pylori* eradication is associated with a better therapeutic efficacy in patients with varioliform gastritis and more significant improvement in atrophic inflammation, intestinal metaplasia and dysplasia.

Key Words: Varioliform gastritis; *Helicobacter pylori*; Intestinal metaplasia; Dysplasia; Atrophic inflammation

Zhang YM, Jiang K, Wang BM, Zhang MF, Wang R. Varioliform gastritis: comparative therapy between patients with and without eradication of *Helicobacter pylori*. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(6): 624-627

摘要

目的: 评价痘疹样胃炎根除幽门螺杆菌(*H.pylori*)后的治疗效果以及病理变化情况, 明确根除*H.pylori*对痘疹样胃炎的治疗意义。

方法: 325例痘疹样胃炎患者根据*H.pylori*检测结果分为阳性组(标准三联或四联疗法)与阴性组(单纯抑酸), 比较治疗效果; 阳性组根据复查胃镜和*H.pylori*的结果再分为两组, 比较病理情况的改善。

结果: *H.pylori*阳性组总有效率(73.68%)与*H.pylori*阴性组总有效率(72.50%)差异无统计学意义($P > 0.05$); *H.pylori*根除后痘疹样胃炎治疗总有效率优于未根除者, 差异有统计学意义(89.02% vs 37.84%, $P < 0.05$); 根除*H.pylori*与否对萎缩性炎症、肠化生、不典型增生的病理

■同行评议者

张小晋, 主任医师, 北京积水潭医院消化内科

改善情况差异有统计学意义(均 $P<0.05$).

结论: 根除*H.pylori*对痘疹样胃炎的治疗有显著意义, 且能部分逆转肠化生、不典型增生等病理改变.

关键词: 痘疹样胃炎; 幽门螺杆菌; 肠化生; 不典型增生; 萎缩性炎症

张彦敏, 姜葵, 王邦茂, 章明放, 王锐. 根除幽门螺杆菌前后对痘疹样胃炎治疗效果的比较. 世界华人消化杂志 2011; 19(6): 624-627

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/624.asp>

0 引言

痘疹样胃炎又称疣状胃炎, 1990年悉尼会议又将其定义为隆起糜烂性胃炎, 临床上主要依据其内镜下表现诊断, 病理表现主要以淋巴细胞浸润为主. 其病因及发病机制至今尚未完全阐明, 随着研究的深入, 目前公认的看法是与幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *H.pylori*)产生的空泡毒素、免疫机制异常及高酸分泌有关. 国内外有关研究显示痘疹样胃炎与胃癌发生密切相关. 第十届世界胃肠病大会视为高危癌前病变. 因此, 寻找积极有效的措施治疗痘疹样胃炎, 以提前阻止癌变、减少胃癌发生显得尤为重要. 目前对该病治疗尚无统一的理想治疗方案.

1 材料和方法

1.1 材料 收集1999-04/2009-12在天津医科大学总医院初次行胃镜检查诊断为痘疹样胃炎, 经过治疗后复查胃镜, 并且治疗前后行*H.pylori*检查的病例. 符合入选标准的患者325例, 其中男150例, 女175例. 年龄21-79(平均 55.6 ± 12.0)岁, 主要以上腹痛或不适及胸骨后疼痛就诊, 部分伴有反酸、烧心的症状.

1.2 方法

1.2.1 入选标准: 所有入选对象必须同时符合以下两个条件: (1)内镜诊断以1990-08悉尼慢性胃炎分类法中隆起糜烂性胃炎的诊断为依据, 胃黏膜出现多个疣状、膨大皱襞状或丘疹样隆起, 顶端可见黏膜缺损或脐样凹陷, 中心有糜烂; (2)*H.pylori*感染的判定标准: 1999/2007-07病例以黏膜活检进行快速尿素酶试验(rapid urease test, RUT), 2007-08/2009-12采用 ^{13}C 或 ^{14}C 尿素呼气试验, 其中一项阳性即诊断为*H.pylori*阳性, 反之则为阴性.

1.2.2 分组治疗: 将325例病例根据治疗前

表1 两组患者临床疗效比较 ($n=325$)

<i>H.pylori</i>	治愈(n)	有效(n)	无效(n)	总有效率(%)	χ^2 值	P 值
阳性	104	78	65	73.68	0.015	0.992
阴性	33	25	20	72.50		

*H.pylori*检查结果分为阳性组与阴性组. 阳性组均接受正规三联或四联疗法7 d, 再予 H_2 受体拮抗剂或质子泵抑制剂单纯抑酸对症治疗2-4 wk, 停药4 wk后复查; 阴性组予 H_2 受体拮抗剂或质子泵抑制剂单纯抑酸对症治疗4-6 wk, 停药4 wk后复查. 治疗后再根据复查胃镜及*H.pylori*的情况分组.

1.2.3 疗效判定标准^[1]: 采治愈: 内镜下疣状隆起消失, 单纯表现为胃黏膜光滑, 蠕动正常, 色泽红白相间; 有效: 疣状隆起消失, 但仍有不典型增生和/或肠化及萎缩; 无效: 疣状隆起未消失, 不典型增生和/或肠化萎缩无变化. 病理结果: 萎缩性炎症、肠化生和不典型增生消失者称为逆转; 重度转为轻中度或中度转为轻度者称为减轻; 程度无变化者称为无变化; 轻度转为中重度或中度转为重度者称为加重. 根除*H.pylori*疗效判断: (1)根除*H.pylori*成功: 治疗结束后, 以RUT、 ^{13}C 或 ^{14}C 尿素呼气试验其中一项阴性者; (2)根除*H.pylori*失败: 治疗结束后复查胃镜实行RUT、 ^{13}C 或 ^{14}C 尿素呼气试验其中一项阳性.

统计学处理 所有数据资料用SPSS11.5软件处理, 采用 χ^2 检验, $P<0.05$ 认为有统计学意义.

2 结果

2.1 临床疗效比较 *H.pylori*阳性组总有效率为73.68%, *H.pylori*阴性组总有效率72.50%, *H.pylori*阳性组经标准三联疗法治疗后的总有效率与*H.pylori*阴性组经单纯抑酸对症治疗差异无统计学意义(表1, $P>0.05$). 治疗后复查胃镜及*H.pylori*, *H.pylori*阳性组中根除组总有效率为89.02%, 未根除组总有效率37.84%, *H.pylori*根除后痘疹样胃炎治疗总有效率优于未根除者, 差异有统计学意义(表2, $P<0.05$).

2.2 病理结果比较

2.2.1 萎缩性炎症病理结果比较: *H.pylori*阳性组中, 治疗后复查胃镜及*H.pylori*, 根除组与未根除组萎缩性炎症改善情况的病理表现差异有统计学意义(表3, $P<0.05$), 即根除*H.pylori*对萎缩性炎症的程度有较明显改善.

2.2.2 肠化生病理结果比较: *H.pylori*阳性组中,

■研发前沿
*H.pylori*对痘疹样胃炎的发病机制一直是研究热点.

■相关报道
金海等观察到痘疹样胃炎不仅*H.pylori*感染率高, 而且中度以上的肠化生及异型增生均明显增高; 程秀莲等进一步发现痘疹样胃炎*H.pylori*感染者肠化生及异型增生有一定相关性.

■应用要点

由于病因不明确,目前尚无统一的理想治疗方案。通过本实验可对治疗提供一定启发,对*H.pylori*阳性者根除*H.pylori*治疗,*H.pylori*阴性者单纯抑酸治疗亦有一定疗效。

表 2 *H.pylori*根除组与未根除组患者临床疗效比较 ($n = 247$)

分组	治愈(n)	有效(n)	无效(n)	总有效率(%)	χ^2 值	P 值
根除组	98	56	19	89.02	80.71	0.000
未根除组	6	22	46	37.84		

表 3 *H.pylori*阳性组患者治疗后萎缩性炎症病理结果改善比较 (n)

分组	逆转	减轻	无变化	加重	χ^2 值	P 值
根除组	13	9	13	3	13.550	0.004
未根除组	2	6	19	10		

表 4 *H.pylori*阳性组患者治疗前后肠化生病理结果改善比较 (n)

分组	逆转	减轻	无变化	加重	χ^2 值	P 值
根除组	16	19	6	4	8.247	0.041
未根除组	5	4	12	4		

表 5 *H.pylori*阳性组患者治疗前后不典型增生病理结果改善比较 (n)

分组	逆转	减轻	无变化	加重	χ^2 值	P 值
根除组	19	9	4	6	8.362	0.039
未根除组	7	2	7	8		

治疗后复查胃镜及*H.pylori*, 根除组与未根除组肠化生改善情况的病理表现差异有统计学意义(表4, $P < 0.05$), 即根除*H.pylori*对肠化生的程度有较明显改善。

2.2.3 不典型增生病理结果比较: *H.pylori*阳性组中, 治疗后复查胃镜及*H.pylori*, 根除组与未根除组不典型增生改善情况的病理表现差异有统计学意义(表5, $P < 0.05$), 即根除*H.pylori*对不典型增生的程度有较明显改善。

3 讨论

痘疹样胃炎是1990年悉尼国际胃肠病大会确认的特殊类型的慢性胃炎之一。随着纤维内镜的推广及人们认识的提高, 痘疹样胃炎有越来越高的检出率。其临床表现缺乏特异性, 以上腹痛或胸骨后疼痛为主^[2], 常伴有反酸、烧心或不适感, 有部分以水肿为主要表现^[3], 为一种蛋白丢失性胃肠病。内镜下主要表现为胃窦和/或胃体黏膜的1个或多个直径约0.3-1.0 cm的隆起, 最大

直径可达2 cm, 中央凹陷呈脐样, 凹陷充血, 糜烂, 部分可附血痂, 少数附薄白苔。病理特点是胃上皮细胞与基底膜间有大量淋巴细胞浸润, 常伴有萎缩性炎症、肠化生或不典型增生。依内镜下表现痘疹样胃炎分为不成熟性和成熟型。研究显示痘疹样胃炎与胃癌发生的关系密切^[1]。日本学者广田甚至提出了痘疹样胃炎→增生→胃癌的假说。有研究采用蛋白印记法对痘疹样胃炎和正常胃黏膜的21种不同蛋白表达做了测定和比较, 并且这些蛋白都与代谢、氧化、细胞骨架、凋亡等相关, 发现11种蛋白表达上调和10种蛋白表达下调, 其中包括脑磷脂结合蛋白-1的下调和硫氧还蛋白结构域结合蛋白-5的上调^[4]。在第十届世界胃肠病大会上, 已认定痘疹样胃炎为胃癌的危险因素之一。因此, 探讨治疗痘疹样胃炎的病因及发病机制以指导其治疗十分重要。

目前多数学者认为本病与*H.pylori*感染密切相关^[5,6]。国内外报道的痘疹样胃炎患者*H.pylori*感染率不一, 波动在57.1%-97.0%, 且与糜烂程度成正相关。本次研究*H.pylori*阳性者247例(76.00%), 伴有急性炎症者77例(23.69%), 同时合并十二指肠溃疡者43例(13.23%), 合并胃溃疡者9例(2.77%), 合并十二指肠球炎者27例(8.31%), 合并食管炎者56例(17.23%), 合并胃息肉或十二指肠息肉者18例(5.54%), 单纯痘疹样胃炎者132例(40.62%)。 *H.pylori*根除与否与痘疹样胃炎治疗的总有效率密切相关($P < 0.05$), 可见*H.pylori*感染在疣状胃炎的致病过程中起着至关重要的作用, 其机制可能是*H.pylori*产生的各种酶和毒素(VaCA、VagA、LPs)使胃黏膜上皮退变、坏死产生炎症, 影响胃黏膜上皮细胞的增殖和凋亡, 并在局部产生免疫反应, 使炎症转变为糜烂, 进一步引起糜烂处的腺管及腺体增生和腺颈部延长, 从而使周边隆起, 形成中央坏死凹陷的疣状物。 *H.pylori*感染后参与胃黏膜的免疫反应, 产生细胞因子, 如白介素, 肿瘤坏死因子等能刺激细胞释放胃泌素, 高胃泌素血症又刺激壁细胞分泌胃酸增多, 损害胃黏膜。另外, *H.pylori*感染后引起胃液表皮生长因子的降低, 在疣状胃炎的形成过程中可能起一定作用^[7]。在痘疹样胃炎中, 不仅*H.pylori*感染率高, 而且其肠化生、不典型增生均占有较高比例。有研究发现痘疹样胃炎组有较高的*ras*基因, P21蛋白、癌抗原CEA的表达水平^[8], 说明痘疹样胃炎是一种具有一定转化趋势的胃黏膜慢性增生性病变,

痘疹样胃炎与胃癌有相关性. Moss等^[9]研究证实: *H.pylori*感染患者胃黏膜同时存在细胞凋亡增加和上皮高增殖状态, *H.pylori*被根除后细胞凋亡及上皮高增殖均恢复至正常. 因此, 对于痘疹样胃炎伴有*H.pylori*感染的患者, 根除*H.pylori*是必要的. 在我们的研究中, 有效的根除*H.pylori*对慢性萎缩性炎症、肠化生和不典型增生均有显著意义($P<0.05$), 能有效的逆转肠化生及不典型增生.

但*H.pylori*阳性组予标准三联治疗与*H.pylori*阴性组予单纯抑酸对症治疗的总有效率无统计学显著差异, 提示酸与痘疹样胃炎有一定相关性. 如陈建芝等^[10]报道雷尼替丁加硫糖铝以及奥美拉唑胶囊加麦滋林-S颗粒均能有效地治疗痘疹样胃炎. 但有研究认为, 单纯痘疹样胃炎胃酸分泌、壁细胞密度、空腹血清胃泌素水平与对照组相比均无显著差异, 说明虽然痘疹样胃炎常伴胃酸相关疾病, 但尚未发现痘疹样胃炎与胃酸分泌异常有明确的关系^[11]. 有研究发现, 在肝硬化患者中, 痘疹样胃炎也有较高的发病率, 警示医师在发现痘疹样胃炎的患者时应考虑是否合并肝硬化^[12].

因此, 根除*H.pylori*是治疗*H.pylori*阳性的痘疹样胃炎的重要手段, 目前多采用三联或四联疗法. 单纯*H.pylori*根除疗法对未成熟型痘疹样胃炎的疗效好^[13,14]. 有研究采用胃镜下高频电凝消除痘疹样突起配合西药抗*H.pylori*和中药保护胃黏膜改善临床症状, 经过对比观察有一定临床意义, 认为高频电凝、抗*H.pylori*治疗、中药序贯治疗不失为一种安全有效的方法^[1]. 有研究认为单纯*H.pylori*根除疗法对成熟型痘疹样隆起的逆转疗效差, 胃镜下高频电凝联合*H.pylori*根除疗法治疗成熟型痘疹样隆起近期和远期疗效显著^[15].

本文主要针对*H.pylori*根除后痘疹样胃炎的

治疗情况进行了一定的探讨, 此外, 还有多种因素可能与痘疹样胃炎的发病有一定关联, 如胃酸、过敏, 且有研究认为与胆汁有一定相关性, 尚须进一步探讨以指导治疗. 另外, 因为本研究为回顾性研究, 入选例数较少, 尚须进一步完善.

4 参考文献

- 1 郭永泽, 李校天, 李淑霞, 葛素兰, 王建华. 高频电凝联合中西药治疗幽门螺杆菌阳性的成熟型疣状胃炎. 世界华人消化杂志 2008; 16: 4102-4104
- 2 程秀莲, 王丙信, 任清华, 郝波. 疣状胃炎胃镜及病理学检查. 中华实用诊断与治疗杂志 2008; 22: 930-931
- 3 Montagnac R, Blaison D, Ciupea A, Für A, Pradel J, Schillinger F. [A rare cause of peripheral edema: exudative lymphocytic gastritis induced hypoproteinemia]. *Nephrol Ther* 2007; 3: 107-112
- 4 Zhang L, Hou YH, Wu K, Zhai JS, Lin N. Proteomic analysis reveals molecular biological details in varioliform gastritis without *Helicobacter pylori* infection. *World J Gastroenterol* 2010; 16: 3664-3673
- 5 金海, 於云燕. 367例疣状胃炎与幽门螺杆菌及病理关系的探索. 中华消化杂志 2005; 25: 495
- 6 池肇春. 幽门螺杆菌研究现状. 中国医师进修杂志 2008; 31: 1-3
- 7 饶正伟, 冯远碧, 冯刚, 胡晓松, 王克兵. 疣状胃炎与幽门螺杆菌关系探讨及组织学观察. 贵州医药 2006; 30: 71-72
- 8 柯昌庶, 李道芬, 王伟, 王一鸣. 慢性糜烂性胃炎的临床病理学与免疫组化研究. 世界华人消化杂志 1997; 5: 241-242
- 9 Moss SF, Calam J, Agarwal B, Wang S, Holt PR. Induction of gastric epithelial apoptosis by *Helicobacter pylori*. *Gut* 1996; 38: 498-501
- 10 陈建芝, 黄晓生, 黄燕媚. 雷尼替丁加硫糖铝治疗疣状胃炎疗效观察. 人民军医 2007; 50: 332-333
- 11 徐三平, 易粹琼, 张锦坤. 隆起糜烂性胃炎的临床及与酸相关性的研究. 中华消化内镜杂志 1998; 4: 238-239
- 12 Roblero JP, Iturriaga H, Estela R. [Association between varioliform gastritis and cirrhosis]. *Rev Med Chil* 2010; 138: 951-956
- 13 林国伟, 黄跃, 李剑英, 吴联辉. 疣状胃炎1897例临床分析. 中国内镜杂志 2005; 11: 1320-1321
- 14 王长洪, 杨卓, 王立新, 麻树人, 陆宇平, 张宁, 林一帆, 陈山泉, 高文艳, 朱虹. 内镜介入加中药治疗疣状胃炎220例疗效观察. 中国中西医结合消化杂志 2005; 13: 23-25
- 15 黄家淼, 王利娜, 胡维杰, 汪晓俊. 胃镜下高频电凝联合幽门螺杆菌根除疗法治疗疣状胃炎的疗效观察. 中国内镜杂志 2007; 13: 731-734

■同行评价

本文设计合理, 方法科学, 对临床消化内镜医生有一定的帮助.

编辑 曹丽鸥 电编 李薇

胃、十二指肠溃疡幽门螺杆菌感染及相关病因回顾性分析204例

孙保华, 卢世云, 陈登登, 潘秀珍

■背景资料

胃、十二指肠溃疡是消化系统常见病、多发病,其病因主要是胃酸分泌过多或胃黏膜防御机制缺陷,其中造成防御机制缺陷的主要原因是幽门螺杆菌(*H.pylori*)感染和非甾体类药物的长期服用。

孙保华, 卢世云, 陈登登, 潘秀珍, 福建省立医院 福建省福州市 350001

通讯作者: 孙保华, 副主任医师, 350001, 福建省福州市东街134号, 福建省立医院. sunbaohua.fj@163.com

收稿日期: 2010-11-21 修回日期: 2011-02-08

接受日期: 2011-02-18 在线出版日期: 2011-02-28

***Helicobacter pylori* infection and other risk factors associated with peptic ulcers: an analysis of 204 cases**

Bao-Hua Sun, Shi-Yun Lu, Deng-Deng Chen, Xiu-Zhen Pan

Bao-Hua Sun, Shi-Yun Lu, Deng-Deng Chen, Xiu-Zhen Pan, Fujian Provincial Hospital, Fuzhou 350001, Fujian Province, China

Correspondence to: Bao-Hua Sun, Fujian Provincial Hospital, 134 East Avenue, Fuzhou 350001, Fujian Province, China. sunbaohua.fj@163.com

Received: 2010-11-21 Revised: 2011-02-08

Accepted: 2011-02-18 Published online: 2011-02-28

Abstract

AIM: To study the impact of *Helicobacter pylori* (*H.pylori*) infection and other risk factors on the development of gastric ulcer (GU) and duodenal ulcer (DU).

METHODS: A total of 204 patients who were treated at our hospital from 2003 to 2008 were included. The association of *H.pylori* infection status (¹⁴C-UBT), endoscopic findings, personal habits (smoking, alcohol intake), and medication (non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs), aspirin intake) with the development of GU and DU was investigated using multi-way frequency analysis.

RESULTS: GU in the presence of *H.pylori* had significant association with aspirin ($P = 0.0010$), alcohol ($P = 0.0091$) and NSAIDs ($P = 0.0321$). DU in the presence of *H.pylori* had significant association with aspirin/smoking/NSAIDs ($P = 0.0256$), aspirin/alcohol ($P = 0.0020$) and aspirin/smoking ($P = 0.0221$). In the absence of

H.pylori, GU had significant association with alcohol/NSAIDs ($P = 0.0435$) and NSAIDs ($P = 0.0431$), while DU had significant association with smoking/alcohol/NSAIDs ($P = 0.0014$), aspirin/NSAIDs ($P = 0.0331$), and aspirin/alcohol ($P = 0.0032$).

CONCLUSION: In the presence of *H.pylori*, intake of aspirin, alcohol or NSAIDs acts as independent risk factors for the occurrence of GU but affects the occurrence of DU only when combined together.

Key Words: *Helicobacter pylori*; Peptic ulcers; Risk factors

Sun BH, Lu SY, Chen DD, Pan XZ. *Helicobacter pylori* infection and other risk factors associated with peptic ulcers: an analysis of 204 cases. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2011; 19(6): 628-630

摘要

目的: 研究福建省立医院胃、十二指肠溃疡患者幽门螺杆菌(*H.pylori*)感染及其他致病因素对疾病发生的作用。

方法: 选取2003-2008年福建省立医院胃镜中心进行检查并确诊为消化性溃疡的患者204例,所有患者在胃镜检查前记录详细情况,包括*H.pylori*感染,胃黏膜活检尿素酶法(¹⁴C-UBT),吸烟史(每日>10支),饮酒史,非甾体类药物服用史。

结果: *H.pylori*阳性的胃溃疡患者与阿司匹林($P = 0.0010$)、饮酒($P = 0.0091$)和其他非甾体类服用($P = 0.0321$)单独因素间呈显著性相关;*H.pylori*阳性的十二指肠溃疡与吸烟、饮酒、其他非甾体类服用三者共同作用呈显著性相关($P = 0.0256$),与阿司匹林、饮酒共同作用呈显著性相关($P = 0.0020$),与阿司匹林/吸烟共同作用呈显著性相关($P = 0.0221$);*H.pylori*阴性的胃溃疡患者与饮酒/其他非甾体类服用共同作用呈显著性相关($P = 0.0435$),与单纯非甾体类服用呈显著性相关($P = 0.0431$);*H.pylori*阴性的十二指肠溃疡患者与吸烟、饮

■同行评议者

白爱平, 副教授, 南昌大学第一附属医院消化内科

酒、其他非甾体类服用共同作用呈显著性相关($P = 0.0014$), 与阿司匹林、非甾体类服用呈显著性相关($P = 0.0331$), 与阿司匹林、饮酒显著性相关($P = 0.0032$).

结论: *H.pylori*感染、服用阿司匹林、饮酒和服用非甾体药物均是加重胃溃疡的发生的独立因素, 而对于十二指肠溃疡, 只有以上病因联合作用才能加重溃疡发生.

关键词: 幽门螺杆菌; 胃十二指肠溃疡; 风险因素

孙保华, 卢世云, 陈登登, 潘秀珍. 胃、十二指肠溃疡幽门螺杆菌感染及相关病因回顾性分析204例. 世界华人消化杂志 2011; 19(6): 628-630

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/628.asp>

0 引言

胃、十二指肠溃疡是消化系统常见病、多发病, 其病因主要是胃酸分泌过多或胃黏膜防御机制缺陷, 其中造成防御机制缺陷的主要原因就是幽门螺杆菌(*H.pylori*)感染和非甾体类药物的长期服用. 近期有美国学者发现^[1], 除了*H.pylori*感染外, 患者的年龄及经济状况、吸烟和受教育水平也是导致胃、十二指肠溃疡的原因, 挪威学者也有同样的报道^[2]. 鉴于*H.pylori*的感染受地域和人种的影响而分布不同, 本研究主要针对福州市及周边地区胃、十二指肠溃疡*H.pylori*感染情况及其他可能的致病因素进行回顾性分析, 结果报道如下.

1 材料和方法

1.1 材料 病例选自2003-2008年以腹胀、上腹痛、嗝气、反酸等症状就诊, 并经福建省立医院胃镜检查确诊的消化性溃疡204例, 其中去除服用抗生素、质子泵抑制剂等治疗2 mo以上和同时患有十二指肠溃疡和胃溃疡患者. 年龄16-83(平均 48.3 ± 14.7)岁, 其中女性占48.3%. 全部患者在胃镜检查前均详细记录病史, 包括吸烟史(每日>10支香烟), 饮酒史(每日饮用酒中的乙醇总量>40 g, 相当于58度白酒69 g), 非甾体类药物服用史. 并进行*H.pylori*检测, 胃黏膜活检尿素酶法(^{14}C -UBT).

1.2 方法 两变量间比较采用 χ^2 检验, 多个变量间比较采用多重率比较和相关性分析.

2 结果

2.1 胃溃疡和十二指肠溃疡患者*H.pylori*、吸烟、饮酒、阿司匹林及非甾体类药物服用比率

表 1 胃溃疡和十二指肠溃疡患者*H.pylori*、吸烟、饮酒、阿司匹林及非甾体类药物服用比率(%)

	<i>H.pylori</i> 阳性	吸烟	饮酒	服用其他非 甾体类药物	阿司 匹林
十二指肠溃疡	75.6	27.8	8.1	24.6	5.3
男	73.3	35.2	11.2	24.6	6.6
女	78.6	16.0	1.3	24.5	3.2
胃溃疡	60.6	27.6	9.3	25.0	9.3
男	58.6	31.6	14.5	21.2	10.7
女	62.4	18.2	2.1	38.1	4.2
胃炎	71.7	19.6	5.2	21.5	2.6
男	58.6	26.5	10.6	19.1	3.3
女	11.5	14.0	1.1	23.9	2.1
合计	62.7	21.8	6.2	22.5	4.2
男	63.2	32.5	12.6	25.3	7.3
女	35.0	14.5	1.3	26.8	3.3

204例检查的患者中, ^{14}C -UBT测定*H.pylori*阳性率为62.7%(表1). 十二指肠溃疡患者*H.pylori*阳性比例大于胃溃疡患者(75.6% vs 60.6%), 男性消化性溃疡患病率大于女性(67.2% vs 36.2%); 男性吸烟与饮酒的比率大于女性(32.5% vs 14.5%; 12.6% vs 1.3%), 男性服用阿司匹林的比率大于女性(7.3% vs 3.3%), 但是其他非甾体类药物男女间无差别(25.3% vs 28.6%), 十二指肠溃疡和胃溃疡间以上病因无显著性差异(表1).

2.2 几种致病因素与胃溃疡和十二指肠溃疡的相关性 *H.pylori*阳性的胃溃疡患者与阿司匹林、饮酒和其他非甾体类服用单独因素间呈显著性相关($P < 0.01$ 或 0.05); *H.pylori*阳性的十二指肠溃疡患者与吸烟、饮酒及其他非甾体类服用三者共同作用呈显著性相关($P = 0.0256$), 与阿司匹林和饮酒共同作用呈显著性相关($P = 0.0020$), 与阿司匹林和吸烟共同作用呈显著性相关($P = 0.0221$, 表2, 3); *H.pylori*阴性的胃溃疡患者与饮酒和其他非甾体类服用共同作用呈显著性相关($P = 0.0435$), 与单纯非甾体类服用呈显著性相关($P = 0.0431$); *H.pylori*阴性十二指肠溃疡患者与吸烟、饮酒及其他非甾体类服用共同作用呈显著性相关($P = 0.0014$), 与阿司匹林和非甾体类服用呈显著性相关($P = 0.0331$), 与阿司匹林和饮酒显著性相关($P = 0.0032$, 表2, 3).

3 讨论

*H.pylori*感染明显增加胃、十二指肠溃疡发病的危险. 日本科学家研究证明, 由于日本人感染*H.pylori*较多, 其消化性溃疡的发病率较其他人种高, 因此*H.pylori*感染是消化性溃疡发病的重

■ 相关报道

Smith等认为, 少量摄入乙醇可以降低*H.pylori*的繁殖, 但是大量乙醇的摄入将会导致消化性溃疡, 每日饮用的乙醇总量>40 g, 消化性溃疡出血的发病率将高于无饮酒者.

■同行评价

本文对临床医师有一定的参考价值,但此类研究应为多中心、大样本,这样的研究结果更具有临床指导意义。

表 2 胃溃疡与几种致病因素的相关性

胃溃疡	G ²	P值
<i>H.pylori</i> +, 阿司匹林	14.56	0.0001
<i>H.pylori</i> +, 饮酒	6.78	0.0091
<i>H.pylori</i> +, NSAID	4.32	0.0321
<i>H.pylori</i> -, 饮酒, NSAID	4.09	0.0435
<i>H.pylori</i> -, NSAID	4.05	0.0431

G²: 卡方检验似然比; NSAID: 非甾体类抗炎药物。

表 3 十二指肠溃疡与几种致病因素的相关性

十二指肠溃疡	G ²	P值
<i>H.pylori</i> +, 饮酒, 吸烟, NSAID	4.89	0.0256
<i>H.pylori</i> +, 阿司匹林, 饮酒	13.58	0.0020
<i>H.pylori</i> +, 阿司匹林, 吸烟	5.24	0.0221
<i>H.pylori</i> -, 饮酒, 吸烟, NSAID	10.34	0.0014
<i>H.pylori</i> -, 阿司匹林, NSAID	4.56	0.0331
<i>H.pylori</i> -, 阿司匹林, 饮酒	4.60	0.0032

G²: 卡方检验似然比; NSAID: 非甾体类抗炎药物。

要原因之一。但是也有学者研究发现, *H.pylori*感染只有很少一部分人患胃、十二指肠溃疡。

研究表明, 长期吸烟、大量饮酒、服用非甾体类抗炎药物均可以引起消化性溃疡发生, 而这些因素的致病作用会随着人口和地域的不同而异^[3]。有研究发现^[4], 长期大量吸烟的患者容易发生消化性溃疡, 并且药物治疗溃疡后不易愈合, 且易发生溃疡穿孔。虽然吸烟可能不是导致消化性溃疡的直接原因, 但是吸烟可以通过促进*H.pylori*感染, 削弱消化系黏膜的防御机制, 起协同、放大*H.pylori*的致病作用。有报道, 每天吸烟>15支以上的消化性溃疡患者发生溃疡穿孔的机率是不吸烟患者的3倍^[5]。也有报道认为, 吸烟只能增加合并*H.pylori*感染的消化性溃疡的危险, 而对正常人或无*H.pylori*感染的消化性溃疡者影响很小。本研究结果也提示, 对于消化性溃疡患者, 吸烟与*H.pylori*的感染之间无必然联系, 吸烟不会直接导致消化系黏膜的损伤, 也不是抑制消化系黏膜修复的独立因素。另外, 吸烟虽然不是导致消化性溃疡的独立因素, 但他可以与其他致溃疡因素协同作用。

有学者发现^[6], 12%的早期十二指肠溃疡患者, 虽然*H.pylori*为阴性, 但其临床表现和症状与*H.pylori*阳性的十二指肠溃疡患者是一致的, 这些患者后来被证实以前曾服用非甾体类

药物。也有学者报道, 服用非甾体类药物是消化系出血的病因之一, 但还尚未有关非甾体类药物促进*H.pylori*增殖的证据。本研究提示, 在有无*H.pylori*感染的胃溃疡患者中, 非甾体类药物均是独立或者与其他病因一起协同作用于胃黏膜导致胃溃疡的病因之一; 而对于有无*H.pylori*感染的十二指肠溃疡患者, 非甾体类药物只与其他病因一起协同作用于十二指肠黏膜导致溃疡。

服用阿司匹林也是导致消化性溃疡的原因之一。研究发现^[7], 低剂量阿司匹林的长期使用可以导致上消化道出血。本研究结果亦提示, *H.pylori*阳性的胃溃疡患者, 服用阿司匹林是独立加重胃溃疡致病原因; 而对于是否有*H.pylori*感染的十二指肠溃疡患者, 服用阿司匹林只有和其他病因一起才能促进十二指肠溃疡的发生。

早期有报道, 酒精的摄入可以降低消化性溃疡的发生, 但是随即就被许多学者否认。Smith等^[7]认为, 少量摄入乙醇可以降低*H.pylori*的繁殖, 但是大量乙醇的摄入将会导致消化性溃疡, 每日饮用的乙醇总量>40 g, 消化性溃疡出血的发病率将高于无饮酒者。本研究表明, 大量饮酒不是一个独立的导致消化性溃疡的原因, 而是能够促发消化性溃疡的原因之一。

由于本研究选取的病例尚少, 今后将进一步加大样本量, 进行详细的流行病学调查, 以期为临床诊治提供有用数据。

4 参考文献

- Kochhar R, Kochhar S. Endoscopic balloon dilation for benign gastric outlet obstruction in adults. *World J Gastrointest Endosc* 2010; 2: 29-35
- Yetkin G, Uludağ M, Akgün I, Citgez B, Karakoç S. Late results of a simple closure technique and Helicobacter pylori eradication in duodenal ulcer perforation. *Acta Chir Belg* 2010; 110: 537-542
- Rodriguez-Diaz E, Bigio IJ, Singh SK. Integrated optical tools for minimally invasive diagnosis and treatment at gastrointestinal endoscopy. *Robot Comput Integr Manuf* 2011; 27: 249-256
- Senadhi V, Brown JC, Arora D, Shaffer R, Shetty D, Mackrell P. A Mysterious Cause of Gastrointestinal Bleeding Disguising Itself as Diverticulosis and Peptic Ulcer Disease: A Review of Diagnostic Modalities for Aortoenteric Fistula. *Case Rep Gastroenterol* 2010; 4: 510-517
- Sundquist M, Quiding-Järbrink M. Helicobacter pylori and its effect on innate and adaptive immunity: new insights and vaccination strategies. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol* 2010; 4: 733-744
- den Hoed CM, Kuipers EJ. Esomeprazole for the treatment of peptic ulcer bleeding. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol* 2010; 4: 679-695
- Smith BR, Wilson SE. Impact of nonresective operations for complicated peptic ulcer disease in a high-risk population. *Am Surg* 2010; 76: 1143-1146

大肠息肉的发生与青岛地区生活方式及饮食习惯的相关性

于亚男, 张琪, 田字彬, 赵清喜, 孔心涓, 张翠萍, 魏良洲

于亚男, 张琪, 田字彬, 赵清喜, 孔心涓, 张翠萍, 魏良洲, 青岛大学医学院附属医院消化内科 山东省青岛市 266003

作者贡献分布: 于亚男与田字彬对此文贡献均等; 此课题由于亚男与田字彬设计; 研究过程由于亚男操作完成; 研究所用病例由张琪、田字彬、赵清喜、孔心涓、张翠萍及魏良洲提供; 数据分析及本论文写作由于亚男与田字彬完成。

通讯作者: 田字彬, 教授, 266003, 山东省青岛市江苏路16号, 青岛大学医学院附属医院消化内科. tianzb@qdumh.qd.sd.cn
电话: 0532-82911302

收稿日期: 2010-11-29 修回日期: 2010-01-14

接受日期: 2011-01-21 在线出版日期: 2011-02-28

Correlation of lifestyles and dietary habits with risk of colorectal polyps in Qingdao

Ya-Nan Yu, Qi Zhang, Zi-Bin Tian, Qing-Xi Zhao, Xin-Juan Kong, Cui-Ping Zhang, Liang-Zhou Wei

Ya-Nan Yu, Qi Zhang, Zi-Bin Tian, Qing-Xi Zhao, Xin-Juan Kong, Cui-Ping Zhang, Liang-Zhou Wei, Department of Gastroenterology, the Affiliated Hospital of Medical College of Qingdao University, Qingdao 266003, Shandong Province, China

Correspondence to: Professor Zi-Bin Tian, Department of Gastroenterology, the Affiliated Hospital of Medical College of Qingdao University, 16 Jiangsu Road, Qingdao 266003, Shandong Province, China. tianzb@qdumh.qd.sd.cn

Received: 2010-11-29 Revised: 2010-01-14

Accepted: 2010-01-21 Published online: 2011-02-28

Abstract

AIM: To analyze the clinical and pathological characteristics of colorectal polyps, and to explore the correlation of lifestyles and dietary habits with risk of colorectal polyps in Qingdao.

METHODS: An investigation of general information, lifestyles, and dietary habits was carried out in 1 331 patients with colorectal polyps using a uniform questionnaire. Of all patients investigated, 1 164 patients who had complete data were included for statistical analysis.

RESULTS: The total detection rate of colorectal polyps was 26.67%. Males were more likely to suffer from colorectal polyps than females. Most patients with colorectal polyps were 50 to 69 years old. In males, cigarette smokers or alcohol users had a higher risk of polyps and adenomas

($P < 0.01$). Overweight people and obese people accounted for 72.17% and 20.53%, respectively. People whose diet was characterized by imbalanced nutrition, high animal protein, lack of vegetables and fruits, or insufficient Laminaria japonica and nori had a higher risk of polyps. People who were obese or ate a high-animal-protein diet were more likely to suffer from polyps and adenomas ($P < 0.01$).

CONCLUSION: Cigarette smokers, alcohol users, obese people, and those eating a high-animal-protein diet are more likely to suffer from colorectal polyps and adenomas.

Key Words: Colorectal polyps; Smoking; Alcohol; Obesity; High-animal-protein diet

Yu YN, Zhang Q, Tian ZB, Zhao QX, Kong XJ, Zhang CP, Wei LZ. Correlation of lifestyles and dietary habits with risk of colorectal polyps in Qingdao. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(6): 631-635

摘要

目的: 分析青岛地区大肠息肉发生的临床病理特点及其与生活方式和饮食习惯的相关性。

方法: 收集2009-08/2010-04青岛地区三甲医院大肠息肉患者共1 331例, 采用统一设计问卷, 调查一般情况、生活方式、饮食习惯等, 对1 164例获取完整资料者进行多项指标统计学分析。

结果: 大肠息肉总检出率26.67%, 男多于女, 年龄集中在50-69岁。72.17%患者超重, 20.53%患者达到肥胖标准。男性吸烟、饮酒者息肉(腺瘤)多发(均 $P < 0.01$)。饮食中营养欠均衡、多食高动物蛋白、缺乏蔬菜水果及海带紫菜类者均占有很高比例。肥胖及高动物蛋白饮食者大肠息肉(腺瘤)多发(均 $P < 0.01$)。

结论: 吸烟、饮酒、肥胖、高动物蛋白饮食者大肠息肉及腺瘤多发。

关键词: 大肠息肉; 吸烟; 酒精; 肥胖; 高动物蛋白饮食

■背景资料

随着环境因素及生活习惯的改变, 结直肠癌(CRC)的发病率日渐增高, 其主要癌变途径是经典的腺瘤-腺癌途径。了解大肠息肉发生的相关危险因素对于预防CRC的发生具有重要意义, 但目前此类研究尚缺乏。

■同行评议者

房静远, 教授, 上海交通大学医学院附属仁济医院消化内科, 上海市消化疾病研究所

■相关报道

Ramadas等认为大肠息肉的发生与饮食因素相关,豆类、蔬菜水果可降低大肠腺瘤性息肉和结直肠癌的风险,红肉及鱼类摄入过多可增加其风险。

于亚男, 张琪, 田宇彬, 赵清喜, 孔心涓, 张翠萍, 魏良洲. 大肠息肉的发生与青岛地区生活方式及饮食习惯的相关性. 世界华人消化杂志 2011; 19(6): 631-635

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/631.asp>

0 引言

大肠息肉尤其是大肠腺瘤性息肉(colorectal adenoma, CRA)被认为是结直肠癌(colorectal cancer, CRC)的癌前病变,其发病率与地理位置、生活习惯、饮食因素、遗传因素等有关。随着CRC的发病率不断增加,了解其癌前病变-大肠息肉的流行病学及临床病理特点,对于防治CRC具有重要意义。目前关于CRC危险因素的研究则相对不足。我们对青岛市所有三级甲等医院自2009-08/2010-04经结肠镜及病理证实的大肠息肉患者进行了生活方式及饮食习惯的回访,并对多项指标进行统计学归纳和分析,以期总结分析青岛地区大肠息肉的发生与生活方式及饮食习惯的关系。

1 材料和方法

1.1 材料 2009-08/2010-04期间青岛市三级甲等医院(青岛大学医学院附属医院、市立医院、中心医院)行电子结肠镜检查检出的大肠息肉患者,范围覆盖青岛各市区及所辖县级城市。所有大肠息肉均根据电子结肠镜及活检病理确定诊断并分型。本调查在患者知情同意下进行,并通过医院伦理委员会的批准。

1.2 方法 采用统一设计的调查问卷,对1 331例检出大肠息肉患者进行同期(结肠镜检查5 d内)当面采访或电话回访,由同一研究者填写收集完整资料。调查主要内容有:一般状况(性别、年龄、身高、体质量、地址),个人生活嗜好(吸烟、饮酒),饮食习惯(营养均衡、蛋白类、海鲜、海带紫菜类、蔬菜、水果等)及家族史。记录大肠息肉的分布部位、大小及病理类型,病理类型根据病理科医师诊断分为炎性息肉、炎性增生性息肉、增生性息肉、管状腺瘤、管状绒毛状腺瘤、绒毛状腺瘤、幼年性息肉及潴留性息肉。其中CRA包括管状腺瘤、管状绒毛状腺瘤及绒毛状腺瘤,其余类型息肉列为非腺瘤性息肉。调查原则上由被调查者回答,特殊情况下由配偶和子女回答,共获得完整资料1 164例,男726例,女438例。

统计学处理 病例的所有资料存入SPSS13.0数据库,计量资料以mean±SD描述,计数资料以

例数和百分率描述。 t 检验用于两个均数之间的比较, χ^2 检验用于计数资料的各组间率的比较。 $P<0.05$ 认为有统计学意义。

2 结果

2.1 性别 4 991例行结肠镜检查者共检出大肠息肉1 331例,检出率26.67%,其中2 560例男性受检者检出810例,2 431例女受检者检出521例,男女之比1.55:1。

2.2 年龄 1 164例获取完整资料的大肠息肉患者年龄3-89岁,男平均年龄 58.49 ± 13.78 岁,女平均年龄 58.89 ± 12.01 岁。按年龄大小分为<30岁组,30-39岁组,40-49岁组,50-59岁组,60-69岁组,70-79岁组, ≥ 80 岁组。各年龄组例数依次为31、77、169、392、365、255和42例。患者年龄集中在50-69岁,占总人数的56.87%,40岁以上者高达91.89%。

2.3 总体病理特点 1 164例大肠息肉患者中多发息肉634例(54.47%),男442例,女192例。统计除外16例结肠息肉病及2例P-J息肉综合征后共3 047枚息肉,其分布以直肠最多为762例,占25.01%,其余依次为乙状结肠(22.43%),横结肠(16.86%),升结肠(15.54%),降结肠(15.37%),盲肠(4.79%)。病理类型以管状腺瘤最多为1 755例,占57.60%,其余依次为炎性息肉(21.53%),炎性增生性息肉(10.24%),管状-绒毛状腺瘤(6.50%),增生性息肉(2.10%),绒毛状腺瘤(1.87%),幼年性息肉(0.13%),潴留性息肉(0.03%)。检出CRA共2 010枚,其中男1 677枚,女3 33枚;检出进展型CRA 390枚,占总息肉数的12.80%,其中8枚(2.05%)进展型CRA伴有高级别上皮内瘤变。134例息肉合并CRC,其伴癌发生率为11.51%。病理证实癌变的息肉18例(1.55%),均为进展型CRA,其中管状腺瘤1例,管状-绒毛状腺瘤4例,绒毛状腺瘤13例。癌变CRA中仅1例为直径在10-19 mm的绒毛状腺瘤,其余17例均直径 ≥ 20 mm,直径 ≥ 20 mm的CRA癌变率16.04%。

2.4 疾病史 1 164例获取完整资料患者中148例有CRC或大肠息肉家族史,其中家族性结肠息肉病(familial polyposis coli, FPC)12例,家族性腺瘤性息肉病(familial adenomatous polyposis, FAP)2例,Peutz-Jeghers息肉综合征2例,一级直系亲属CRC患者74例(未具体区分遗传性非息肉病性CRC和散发性CRC),一级直系亲属患大肠息肉者58例。伴有溃疡性结直肠炎病史者22例(1.89%)。既往有大肠息肉病史者177例,息肉再

发率15.21%, 其中142例(80.23%)为CRA. 合并糖尿病、高血压、冠心病、高脂血症、脂肪肝及胆囊疾病者分别为117例, 160例, 76例, 110例, 80例及89例.

2.5 生活方式 吸烟者467例, 男466例, 女1例. 男吸烟者息肉多发309例, 单发157例; 不吸烟者多发133例, 单发127例. 吸烟时间长达30年以上者高达80.24%息肉多发. 男吸烟者共有息肉1 691枚, 腺瘤1287枚; 不吸烟者共有息肉626枚, 腺瘤390枚; 吸烟者比不吸烟者更易多发大肠息肉, 且腺瘤多见(均 $P<0.01$). 有饮酒习惯者(指饮酒 ≥ 20 年且摄入酒精 ≥ 50 g/d)354例, 男346例, 女8例. 男饮酒者息肉多发272例, 单发74例; 不饮酒或偶尔少量饮酒者多发170例, 单发210例. 男饮酒者共有息肉1 497枚, 腺瘤1178枚; 不饮酒或偶尔少量饮酒者共有息肉820枚, 腺瘤499枚; 饮酒者更易多发大肠息肉, 且腺瘤多见(均 $P<0.01$). 根据身高、体质量计算体质量指数(BMI, kg/m^2), 采用中国肥胖问题工作组2003年建议的肥胖诊断标准, 即 $24 \text{ kg}/\text{m}^2 \leq \text{BMI} < 28 \text{ kg}/\text{m}^2$ 为超重, $\text{BMI} \geq 28 \text{ kg}/\text{m}^2$ 为肥胖, 819例(70.36%)患者超重, 达到肥胖标准的有223例男(30.72%)和57例女(13.01%). 男肥胖患者共有息肉852枚, 腺瘤701枚; 未达到肥胖标准者共有息肉1294枚, 腺瘤976枚. 经 χ^2 检验结果显示达到肥胖标准的男性更易多发腺瘤($P<0.01$).

2.6 饮食习惯 不注意营养均衡者716例(61.51%), 男586例, 女130例. 956(82.13%)例大肠息肉患者几乎每日均摄入鱼、蛋、豆制品, 男676例, 女280例. 385例男和153例女患者每日动物蛋白摄入量超过100 g/d, 占总人数的46.22%, 共有息肉1 857枚, 腺瘤1 326枚; <100 g/d的684例患者共有息肉1 190枚, 腺瘤684枚; 摄入量超过100 g/d比低于100 g/d的患者更易发生腺瘤($P<0.01$). 每日蔬菜摄入量 <200 g者284例, 200 g-500 g者662例, ≥ 500 g者218例. 每周蛤蜊、虾、螃蟹等海鲜类摄入量 ≥ 500 g者621例, 是摄入 <250 g者的2.77倍. 每周水果摄入量 <500 g者792例, 是摄入 ≥ 500 g者的2.13倍. 每周海带、紫菜类摄入量 <250 g者963例, 是摄入 ≥ 250 g者的4.79倍. 男性患者饮食中以肉类、海鲜类、禽蛋类为主, 而蔬菜、水果以及海带和紫菜类的摄入较少. 女性患者饮食中蔬菜、水果以及海带和紫菜类的摄入多于男性患者, 但肉类摄入较男性患者少. 每周海鲜摄入量 <250 g的224例大肠息肉患者共有息肉361枚, 腺瘤72枚; 摄入量 ≥ 500 g的621例患者共

有息肉1 957枚, 腺瘤1 581枚. 海鲜类摄入量 ≥ 500 g者较 <250 g者更易发生腺瘤($P<0.01$).

3 讨论

本文结果提示青岛地区大肠息肉的检出率26.67%, 符合文献报道的10%-60%^[1], 男性多于女性. 大肠息肉在各年龄段均可发病, 但随着年龄的增长, 其发生率呈增加趋势, 有研究者认为年龄 >50 岁为危险因素^[2]. 本调查显示50-69岁为大肠息肉高发年龄, 40岁以上者达到90%以上, 男女年龄无显著性差异. 对于40岁以上尤其是有腹部症状的就诊者应尽量提倡结肠镜检查, 以早期检出大肠息肉. 直肠是大肠息肉最常见的部位, 也是各病理类型的好发部位. 近2/3的大肠息肉病理类型为CRA, 进展型CRA占息肉总数的12.80%, 合并CRC的大肠息肉患者占11.51%; 息肉再发率15.21%, 其中80.23%为CRA. CRA的癌变率为8.96%, 且均为进展型CRA, 直径 ≥ 20 mm的CRA癌变率高达16.04%. 进展型CRA定义为: 息肉或病变直径 ≥ 10 mm; 绒毛状腺瘤或混合性息肉中绒毛样结构超过25%; 伴有高级别上皮内瘤变. 目前普遍认为进展型CRA在CRA至CRC的发展过程中具有较高的危险性. 对于内镜发现进展型CRA者应早期结肠镜下完全切除, 并定期复查结肠镜. CRC家族史和大肠息肉史被认为是大肠息肉发生的危险因素^[3]. 本调查中12.71%的患者有一级直系亲属患CRC或大肠息肉的家族史, 1.89%的患者有溃疡性结肠炎病史, 15.21%的患者既往患大肠息肉切除后再发, 对于这些患者应提高警惕, 定期随访结肠镜检查, 早期发现大肠息肉并切除以预防CRC的发生.

本研究重点分析生活方式及饮食习惯与大肠息肉发生的相关性, 并比较其在CRA及非腺瘤性息肉发生中的异同, 发现64.18%的男大肠息肉患者吸烟, 吸烟者比不吸烟者更易息肉多发, 且更易发生腺瘤. 许多研究资料^[4-7]均支持吸烟是大肠腺瘤发生的危险因素, 并表明吸烟年数、量与腺瘤发病危险间的剂量反应呈显著阳性. 香烟的烟雾中含有多环芳烃类致癌物和亚硝胺, 可能与其致病有关. 饮酒是大肠息肉发生的独立危险因素^[8]. 酒精摄入可增加大肠增生性息肉和腺瘤的发生^[9], 其摄入量 >51.3 g/d与直肠腺瘤的发病率有阳性联系^[9-11]. 更有学者细化不同类型的酒, 发现摄入啤酒比葡萄酒和烈酒与CRC的关系更为密切. 本研究显示47.66%的男

■创新盘点

本文在临床资料基础上调查大肠息肉患者的生活方式及饮食习惯, 并进一步分析其在腺瘤及非腺瘤性息肉中的异同.

■应用要点

本研究通过流行病学调查分析青岛沿海地区大肠息肉的临床病理特征及其与生活方式和饮食因素的相关性,发现吸烟、饮酒、肥胖、高动物蛋白饮食者大肠息肉及腺瘤多发,如在分子生物学水平上深入研究,有望为大肠息肉乃至结肠癌的化学预防提供新的思路。

大肠息肉患者饮酒(饮酒 ≥ 20 年且摄入酒精 ≥ 50 g/d),且饮酒者更易多发大肠息肉和腺瘤,也支持了上述观点。另外,青岛地区为啤酒产地,本地居民饮酒类型以啤酒为主且摄入量较高,这可能会增加大肠息肉的癌变几率。

国内学者也做了肥胖与大肠腺瘤的相关研究,认为二者的发生存在显著相关性。BMI升高者发生大肠腺瘤的危险性明显增高,尤其是BMI ≥ 28 kg/m²的肥胖人群,其患大肠腺瘤的危险度为正常人的2.48倍;而肥胖男性的患病风险显著高于女性,其患大肠腺瘤的危险度是正常人的4.10倍^[12]。他们通过基因芯片技术研究发现Foxa2在肥胖人群的大肠腺瘤组织中mRNA水平表达增高,并推测其可能机制为肥胖人群中存在胰岛素抵抗时,激活了Foxa2,从而可能进一步参与PI-3K信号通路的传导,促进细胞增殖。本研究显示近三分之一的男性患者达到肥胖标准(BMI ≥ 28 kg/m²),男性多于女性,息肉病理类型以腺瘤为主。

日本的一项饮食因素与肿瘤死亡率的研究中发现高动物性食物(肉类、鱼类、禽蛋、牛奶等)及高动物蛋白的摄入与CRC的发生有明显正相关作用,而植物性食物(蔬菜、水果、谷物)呈负相关^[13]。马来西亚的学者也有类似的研究报道^[14]。青岛与日本的相同之处在于都为沿海地区,居民日常饮食结构中动物性食物所占比例较大,而谷物等碳水化合物的比例相对降低。本研究中高达82.13%的大肠息肉患者几乎每日均摄入鸡蛋、鱼、海鲜、贝类、虾及肉类等动物蛋白,近一半患者动物蛋白摄入量超过100 g/d,摄入量超过100 g/d的患者比低于100 g/d者更易发生腺瘤。高动物蛋白饮食与大肠腺瘤及CRC的发生关系密切,可能是由于高动物蛋白加重了肠道负担,延长了内容物在肠道中的滞留时间,或其代谢物对肠道产生不良反应,促进了细胞增殖。增加膳食中纤维素的摄入能降低大肠息肉及CRC发生的风险。纤维素在大肠中经厌氧菌酵解可产生短链脂肪酸,后者具有抑制细胞增殖、诱导细胞分化和凋亡的作用^[15]。蔬菜和水果的抗癌机制主要有:(1)含有纤维素成分,减少结肠蛋白酵解;(2)含有支持细菌酵解的纤维,保护上皮细胞屏障;(3)含有叶酸,影响DNA甲基化,减少细胞增殖,降低突变频率;(4)含有大量抗氧化剂,抑制自由基反应而防止对DNA的氧化损伤,阻止结肠上皮过度增生^[14,16]。海带紫菜类也是CRC发生的保护性因素^[17,18],其含有丰富

的钙、硒等微量元素。钙可与脂肪酸及胆汁酸结合,延迟他们刺激的过度增殖;也可以干预细胞增殖分化、凋亡、血管形成和调控细胞周期^[19,20]。硒可改变致癌原代谢,抑制细胞增殖,保护机体免受氧化剂损害^[21]。本研究中男性患者饮食以高动物蛋白类为主,而蔬菜、水果以及海带和紫菜类的摄入减少,女性患者中注意均衡饮食者明显多于男性。该调查结果倾向于日本的研究,提示女性大肠息肉的发生与饮食因素的关系弱于男性,可能女性较男性更注意营养均衡饮食,同时出于对身材和健康的要求,有意识的减少了油脂和动物蛋白等高能量食物的摄入并增加了蔬菜、水果和海带紫菜类等低能量食物的摄入。

本研究通过调查青岛地区大肠息肉患者的临床病理、生活方式及饮食习惯,发现吸烟、饮酒、肥胖及高动物蛋白饮食的男患者更易多发大肠息肉及腺瘤。女性较男性更注意均衡饮食,大肠息肉的检出率少于男性。应重视生活方式及均衡饮食在大肠息肉发生中的作用。

4 参考文献

- 1 郑芝田. 胃肠病学. 第3版, 北京: 人民卫生出版社, 2000: 846-872
- 2 Barreda B F, Combe G J, Valdez P LA, SÁnchez L J. [Clinical aspects in polyps of the colon]. *Rev Gastroenterol Peru* 2007; 27: 131-147
- 3 Wark PA, Wu K, van 't Veer P, Fuchs CF, Giovannucci EL. Family history of colorectal cancer: a determinant of advanced adenoma stage or adenoma multiplicity? *Int J Cancer* 2009; 125: 413-420
- 4 Shrubsole MJ, Wu H, Ness RM, Shyr Y, Smalley WE, Zheng W. Alcohol drinking, cigarette smoking, and risk of colorectal adenomatous and hyperplastic polyps. *Am J Epidemiol* 2008; 167: 1050-1058
- 5 Toyomura K, Yamaguchi K, Kawamoto H, Tabata S, Shimizu E, Mineshita M, Ogawa S, Lee KY, Kono S. Relation of cigarette smoking and alcohol use to colorectal adenomas by subsite: the self-defense forces health study. *Cancer Sci* 2004; 95: 72-76
- 6 Hoffmeister M, Schmitz S, Karmrodt E, Stegmaier C, Haug U, Arndt V, Brenner H. Male sex and smoking have a larger impact on the prevalence of colorectal neoplasia than family history of colorectal cancer. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2010; 8: 870-876
- 7 Hassan C, Pickhardt PJ, Marmo R, Choi JR. Impact of lifestyle factors on colorectal polyp detection in the screening setting. *Dis Colon Rectum* 2010; 53: 1328-1333
- 8 Kahn HS, Tatham LM, Thun MJ, Heath CW Jr. Risk factors for self-reported colon polyps. *J Gen Intern Med* 1998; 13: 303-310
- 9 Nagata C, Shimizu H, Kametani M, Takeyama N, Ohnuma T, Matsushita S. Cigarette smoking, alcohol use, and colorectal adenoma in Japanese men and women. *Dis Colon Rectum* 1999; 42: 337-342
- 10 Tiemersma EW, Wark PA, Ocké MC, Bunschoten A, Otten MH, Kok FJ, Kampman E. Alcohol consump-

- tion, alcohol dehydrogenase 3 polymorphism, and colorectal adenomas. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2003; 12: 419-425
- 11 周晓东, 吕农华. 大肠癌的流行病学研究现状. 现代消化及介入诊疗 2006; 11: 149-151
 - 12 王娜, 黄志刚, 陈锡美, 叶荣菊, 王伟, 张霞, 张建培. 肥胖与大肠腺瘤关系的临床及分子机制. 世界华人消化杂志 2008; 16: 3283-3288
 - 13 Cai YQ, Aoshima K, Katoh T, Teranishi H, Kasuya M. The relationship between diet and morality of cancer and Non-communicable disease in Japan. *Journal of Nanjing Medical University* 2003; 17: 10-17
 - 14 Ramadas A, Kandiah M. Food intake and colorectal adenomas: a case-control study in Malaysia. *Asian Pac J Cancer Prev* 2009; 10: 925-932
 - 15 房静远. 纤维素饮食及其代谢产物与结直肠癌的化学预防. 胃肠病学 2008; 13: 707-709
 - 16 陈坤. 国人结直肠癌的病因学及综合防治策略. 国外医学·流行病学, 传染病学分册 2005; 32: 193-195
 - 17 杨工, 高玉堂, 季步天, 金凡, 高汝慧, 郑树. 结、直肠癌与营养因素的流行病学研究. 中华流行病学杂志 1994; 15: 299-303
 - 18 Lynch MB, Sweeney T, Callan JJ, O'Sullivan JT, O'Doherty JV. The effect of dietary Laminaria-derived laminarin and fucoidan on nutrient digestibility, nitrogen utilisation, intestinal microflora and volatile fatty acid concentration in pigs. *J Sci Food Agric* 2010; 90: 430-437
 - 19 陆嵘, 房静远. 钙和维生素D预防结直肠癌的机制及其临床应用. 世界华人消化杂志 2005; 13: 2360-2363
 - 20 Pufulete M. Intake of dairy products and risk of colorectal neoplasia. *Nutr Res Rev* 2008; 21: 56-67
 - 21 陆嵘, 房静远. 饮食因素与结肠癌. 肠外与肠内营养 2006; 13: 316-319

同行评价

本文可读性较好, 有一定的临床实用价值.

编辑 李薇 电编 李薇

ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) CN 14-1260/R 2011年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

《世界华人消化杂志》外文字符标准

本刊讯 本刊论文出现的外文字符应注意大小写、正斜体与上下角标. 静脉注射iv, 肌肉注射im, 腹腔注射ip, 皮下注射sc, 脑室注射icv, 动脉注射ia, 口服po, 灌胃ig. s(秒)不能写成S, kg不能写成Kg, mL不能写成ML, lcpm(应写为1/min)÷E%(仪器效率)÷60=Bq, pH不能写PH或P^H, *H pylori*不能写成HP, T_{1/2}不能写成tl/2或T_{1/2}¹, 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.

β -catenin与VEGF-C和-D在结直肠癌中的表达及其相关性

牟江洪, 向德兵, 肖华亮, 林俐

■背景资料

淋巴管生成是肿瘤淋巴转移的一个重要因素。研究表明, 多种肿瘤VEGF-C/-D表达显著增加, 结合并激活受体VEGFR-3, 诱导肿瘤周围和/或肿瘤内部淋巴管生成, 促进肿瘤淋巴转移。

牟江洪, 向德兵, 肖华亮, 林俐, 中国人民解放军第三军医大学附属大坪医院野战外科研究所病理科 重庆市 400042

国家自然科学基金资助项目, No. 30801096

作者贡献分布: 此课题由牟江洪、向德兵及肖华亮设计; 研究过程由牟江洪及林俐完成; 研究所用新试剂及分析工具由向德兵提供; 数据分析由牟江洪与向德兵完成; 本论文写作由牟江洪完成。

通讯作者: 牟江洪, 主治医师, 400042, 重庆市, 中国人民解放军第三军医大学附属大坪医院野战外科研究所病理科. mjh945@hotmail.com
电话: 023-68757649

收稿日期: 2010-11-19 修回日期: 2011-01-15

接受日期: 2011-01-21 在线出版日期: 2011-02-28

Expression of β -catenin and VEGF-C/-D in colorectal cancer

Jiang-Hong Mou, De-Bing Xiang, Hua-Liang Xiao, Li Lin

Jiang-Hong Mou, De-Bing Xiang, Hua-Liang Xiao, Li Lin, Department of Pathology, Research Institute of Surgery, Daping Hospital, the Third Military Medical University, Chongqing 400042, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30801096

Correspondence to: Jiang-Hong Mou, Department of Pathology, Research Institute of Surgery, Daping Hospital, the Third Military Medical University, Chongqing 400042, China. mjh945@hotmail.com

Received: 2010-11-19 Revised: 2011-01-15

Accepted: 2011-01-21 Published online: 2011-02-28

Abstract

AIM: To investigate the expression of β -catenin and vascular endothelial growth factor-C/-D (VEGF-C/-D) in colorectal cancer (CRC) and to analyze their significance.

METHODS: The expression of β -catenin and VEGF-C/-D in 96 CRC specimens were detected by immunohistochemistry.

RESULTS: In normal colonic mucosa, β -catenin was detected on the plasma membrane of epithelial cells. Reduced membrane expression of β -catenin was noted in CRC, and 67.71% of cases of CRC showed cytoplasmic and nuclear expression of β -catenin. The positive rates of VEGF-C/-D expression were significantly higher in tumor tissue than in normal mucosa (43.75% vs 19.79%; 38.54% vs 13.54%, both $P < 0.01$). The expression

of β -catenin had a significantly positive correlation with that of VEGF-C/-D (both $P < 0.01$).

CONCLUSION: Cytoplasmic and nuclear β -catenin expression may induce VEGF-C/-D overexpression in CRC, which may play an important role in lymphangiogenesis in CRC.

Key Words: Colorectal cancer; β -catenin; Vascular endothelial growth factor-C; Vascular endothelial growth factor-D; Lymphangiogenesis

Mou JH, Xiang DB, Xiao HL, Lin L. Expression of β -catenin and VEGF-C/-D in colorectal cancer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(6): 636-639

摘要

目的: 探讨结直肠癌 β -连环素(β -catenin)与血管内皮生长因子-C和-D(VEGF-C, VEGF-D)的表达相关性及其意义。

方法: 应用免疫组织化学SP法检测96例结直肠癌及正常结直肠组织中 β -catenin与VEGF-C和-D的表达, 并分析其相关性和意义。

结果: 正常结直肠黏膜 β -catenin细胞膜阳性表达, 结直肠癌 β -catenin主要呈细胞核和/或细胞质异位表达, 异位表达率为67.70%; 结直肠癌组织VEGF-C和-D阳性率明显高于正常结直肠组织(43.75% vs 19.79%; 38.54% vs 13.54%, 均 $P < 0.01$); 而且 β -catenin与VEGF-C和-D的表达呈显著正相关(均 $P < 0.01$)。

结论: 结直肠癌 β -catenin异位表达可能是VEGF-C和-D高表达的重要原因, 其在结直肠癌淋巴管生成中可能起重要作用。

关键词: 结直肠癌; β -连环素; 血管内皮生长因子-C; 血管内皮生长因子-D; 淋巴管生成

牟江洪, 向德兵, 肖华亮, 林俐. β -catenin与VEGF-C和-D在结直肠癌中的表达及其相关性. *世界华人消化杂志* 2011; 19(6): 636-639

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/636.asp>

■同行评议者

黄培林, 教授, 东南大学

0 引言

血管内皮生长因子(vascular endothelial growth, VEGF)-C和-D是主要的淋巴管生成因子, 其可能与肿瘤发生、发展有关, 尤其是VEGF-C和-D通过其受体VEGFR-3信号传导途径诱导肿瘤淋巴管生成, 促进肿瘤淋巴结转移的潜在作用已越来越引起人们的重视^[1,2]。 β -catenin信号通路异常激活可以启动多种下游靶基因转录(如c-Myc、cyclin D1、NF- κ B、COX-2、MMP等), 在肿瘤的发生、发展、侵袭、转移中起重要作用; β -catenin胞质和/或胞核异位表达是其发挥作用的物质基础^[3,4]。新近有研究表明VEGF-C和-D基因启动子含有 β -catenin/Tcf-4复合体的结合位点, 其可能是 β -catenin信号通路的下游靶基因^[5,6]。为此, 我们拟检测结直肠癌 β -catenin异位表达和VEGF-C/D表达的相关性, 探讨 β -catenin信号通路在结直肠癌淋巴管生成中可能的潜在作用。

1 材料和方法

1.1 材料 选取中国人民解放军第三军医大学附属大坪医院1996-1998年间结直肠癌根治术石蜡标本96例, 其中男50例, 女46例, 男女比例为1:1; 年龄22-83(平均53)岁, 中位年龄57岁; 术前均未进行抗肿瘤治疗。

1.2 方法 所有标本经40 g/L中性甲醛液固定, 常规石蜡包埋, 4 μ m切片, 水化后行免疫组织化学SP法染色, 切片均采用胰酶消化和微波抗原修复, 其余步骤参照试剂盒说明进行。每例标本均对癌组织和相应正常结直肠黏膜染色。鼠抗人 β -catenin(1:200)、VEGF-C(1:50)、VEGF-D(1:200)单克隆抗体均为Novus Bio公司产品; SP试剂盒购自北京中杉生物技术公司。 β -catenin染色结果判断标准参照Maruyama等^[7]的方法, 胞质和/或胞核着色细胞比例>10%为阳性, 称为 β -catenin异位表达。VEGF-C和-D表达采用半定量计分法判定^[8], 细胞着色强弱分为四级: 不着色=0, 弱着色=1, 中等着色=2, 强着色=3; 着色细胞比例也分为四级: 无细胞着色=0、着色细胞比例<25%=1, 着色细胞比例25-50%=2, 着色细胞比例>50%=3。细胞着色强弱和着色细胞比例两者乘积 ≤ 2 为阴性表达, >2 为阳性表达。

统计学处理 应用SPSS10.0统计软件对数据进行显著性和相关性检验, 组间差异显著性采用 χ^2 或Fisher精确检验, β -catenin和VEGF-C/-D表达的相关性采用Spearman秩相关分析, $P<0.05$

表1 结直肠癌 β -catenin异位表达和VEGF-C/-D表达($n=96$)

	VEGF-C(+)	VEGF-C(-)	VEGF-D(+)	VEGF-D(-)
β -catenin	35	30	31	34
异位表达				
β -catenin	7	24	6	25
胞膜表达				

表示有显著统计学意义。

2 结果

2.1 结直肠癌 β -catenin、VEGF-C和-D表达 图1显示 β -catenin阳性物质呈棕黄色细颗粒状, 正常结直肠黏膜 β -catenin定位于黏膜上皮细胞胞膜, 结直肠癌 β -catenin胞膜表达不同程度缺失, 主要呈胞质和/或胞核表达, 异位表达率为67.70%。图2显示VEGF-C和-D阳性物质也呈棕黄色细颗粒状, 主要定位于结直肠癌癌细胞胞质。结直肠癌组织VEGF-C和-D阳性率分别为43.75%和38.54%, 经 χ^2 或Fisher精确检验, 均显著高于正常结直肠组织的表达率19.79%和13.54%($P<0.01$; $P<0.01$)。

2.2 结直肠癌 β -catenin异位表达和VEGF-C/-D表达相关性分析 结直肠癌组织中 β -catenin和VEGF-C或-D共同阳性或共同阴性的病例很多(表1), 通过Spearman秩相关分析表明 β -catenin异位表达与VEGF-C或-D表达有显著的正相关性($r=0.576$, $P<0.01$; $r=0.494$, $P<0.01$)。

3 讨论

VEGF-C和-D是目前发现的少数几个强有力的淋巴管内皮生长因子, 属于VEGF家族成员。但是与VEGF等其他家族成员不同的是, VEGF-C/-D具有双重作用: 在胚胎时期与血管内皮细胞VEGFR-2结合诱导血管生成, 而在成年主要与淋巴管内皮细胞VEGFR-3结合诱导淋巴管生成^[9]。体内体外实验已经证实, VEGF-C/-D在多种实体肿瘤中高表达, 并诱导肿瘤内和/或肿瘤周围淋巴管生成, 促进肿瘤转移^[10,11]。我们以前的研究也显示, 结直肠癌VEGF-C/-D表达较正常结直肠组织显著增加, 并与癌周淋巴管密度、淋巴结转移及远处器官转移密切相关, 提示结直肠癌VEGF-C/-D可能主要诱导癌周淋巴管生成, 进而促进结直肠癌转移^[12]。

但是到目前为止, 人们对VEGF-C/-D的调控机制还缺乏足够的认识, 一个重要原因是淋巴管生成机制与血管生成不尽相同, 缺氧等诸多影响

■ 相关报道

Katoh等通过生物信息学和人类情报库发现VEGF-C/-D基因启动子区域含有 β -catenin/Tcf-4复合体的结合位点, 首次找到了 β -catenin信号通路可能参与淋巴管生成的直接证据。

■应用要点

β -catenin信号通路对VEGF-C/-D调控机制的研究,有助于进一步阐明结直肠癌淋巴管生成和转移机制,同时拓展 β -catenin功能,为潜在的靶向 β -catenin信号通路的分子、基因治疗提供新的理论依据,具有重要的临床意义。

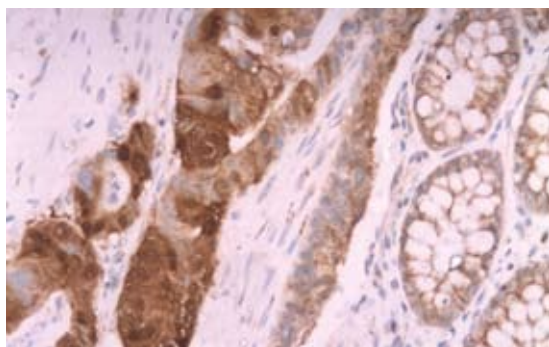


图1 结直肠癌 β -catenin阳性表达(SP \times 400)。

血管生成的因素并不调控VEGF-C/-D的表达。现有的研究仅发现细胞接触、类固醇激素以及几种细胞因子(如Heregulin- β 1)和致炎因子(如IL-1 α 、TNF)等少数VEGF-C/-D调控因素^[13,14],而且对其具体调控机制也还不甚清楚。

β -catenin信号通路是近年来发育生物学及肿瘤生物学研究的热点,在胚胎发育过程以及多种肿瘤的发生发展中起重要作用^[4]。 β -catenin信号通路致癌的关键是: β -catenin胞质累积(包括 β -catenin突变、表达激活、降解减少、E-cadherin- β -catenin复合体裂解等诱因),然后转位进入细胞核内,结合并激活Tcf-4转录因子,启动下游靶基因转录(如c-Myc、cyclin D1、NF- κ B、COX-2、MMP等),在肿瘤的发生、发展、侵袭、转移中起重要作用^[15]。大约90%的结直肠癌存在 β -catenin信号通路异常,被公认为结直肠癌发生发展过程中的关键信号通路之一。

更令我们感兴趣的是,已有研究显示 β -catenin信号通路通过调控VEGF等对血管生成具有重要的作用^[5,16],但是在淋巴管生成中是否也有类似的功能尚不清楚。新近有研究表明VEGF-C和-D基因启动子含有 β -catenin/Tcf-4复合体的结合位点,其可能是 β -catenin信号通路的下游靶基因^[5,6]。我们以前的研究发现 β -catenin异位表达与结直肠癌周淋巴管密度密切相关,可能与结直肠癌淋巴管生成有关,但其具体机制不清楚。本次实验结果显示 β -catenin异位表达和VEGF-C/-D有显著的正相关性,提示结直肠癌VEGF-C/-D可能是 β -catenin/Tcf-4信号通路的下游靶基因, β -catenin可能通过该通路直接调控VEGF-C/-D表达,进而在结直肠癌淋巴管生成中发挥作用。其具体调控机制和作用位点的进一步研究,将有助于阐明结直肠癌淋巴管生成和转移机制;同时拓展 β -catenin功能,为潜在的靶向 β -catenin信号通路的分子、基因治疗提供新

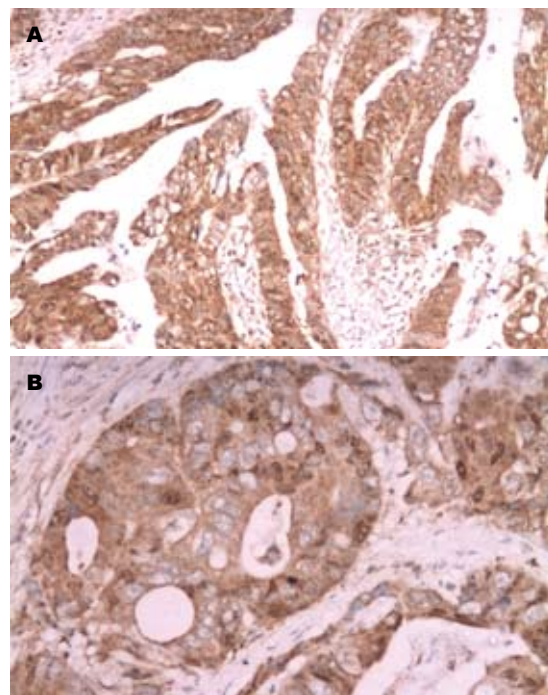


图2 结直肠癌VEGF-C/D阳性表达(SP \times 200)。A: VEGF-C; B: VEGF-D。

的理论依据。

4 参考文献

- 1 Al-Rawi MA, Jiang WG. Lymphangiogenesis and cancer metastasis. *Front Biosci* 2011; 16: 723-739
- 2 Kluger MS, Colegio OR. Lymphangiogenesis linked to VEGF-C from tumor-associated macrophages: accomplices to metastasis by cutaneous squamous cell carcinoma? *J Invest Dermatol* 2011; 131: 17-19
- 3 Katoh M. Networking of WNT, FGF, Notch, BMP, and Hedgehog signaling pathways during carcinogenesis. *Stem Cell Rev* 2007; 3: 30-38
- 4 Liu F, Millar SE. Wnt/beta-catenin signaling in oral tissue development and disease. *J Dent Res* 2010; 89: 318-330
- 5 Katoh Y, Katoh M. Comparative integromics on VEGF family members. *Int J Oncol* 2006; 28: 1585-1589
- 6 Easwaran V, Lee SH, Inge L, Guo L, Goldbeck C, Garrett E, Wiesmann M, Garcia PD, Fuller JH, Chan V, Randazzo F, Gundel R, Warren RS, Escobedo J, Aukerman SL, Taylor RN, Fantl WJ. beta-Catenin regulates vascular endothelial growth factor expression in colon cancer. *Cancer Res* 2003; 63: 3145-3153
- 7 Maruyama K, Ochiai A, Akimoto S, Nakamura S, Baba S, Moriya Y, Hirohashi S. Cytoplasmic beta-catenin accumulation as a predictor of hematogenous metastasis in human colorectal cancer. *Oncology* 2000; 59: 302-309
- 8 Mattern J, Koomägi R, Volm M. Biological characterization of subgroups of squamous cell lung carcinomas. *Clin Cancer Res* 1999; 5: 1459-1463
- 9 Joukov V, Sorsa T, Kumar V, Jeltsch M, Claesson-Welsh L, Cao Y, Saksela O, Kalkkinen N, Alitalo K. Proteolytic processing regulates receptor specificity and activity of VEGF-C. *EMBO J* 1997; 16: 3898-3911
- 10 Royston D, Jackson DG. Mechanisms of lymphatic metastasis in human colorectal adenocarcinoma. *J Pathol* 2009; 217: 608-619

- 11 Achen MG, Stacker SA. Molecular control of lymphatic metastasis. *Ann N Y Acad Sci* 2008; 1131: 225-234
- 12 Mou JH, Yan XC, Li ZP, Wang D, Duan GJ, Xiang DB, Xiao HL, Zhang QH. [Characteristic and clinicopathologic significance of lymphangiogenesis in colorectal cancer]. *Zhonghua Binglixue Zazhi* 2005; 34: 348-352
- 13 Varney ML, Singh S, Backora M, Chen Z, Singh RK. Lymphangiogenesis and anti-tumor immune responses. *Curr Mol Med* 2009; 9: 694-701
- 14 Cao Y, Zhong W. Tumor-derived lymphangiogenic factors and lymphatic metastasis. *Biomed Pharmacother* 2007; 61: 534-539
- 15 Pishvaian MJ, Byers SW. Biomarkers of WNT signaling. *Cancer Biomark* 2007; 3: 263-274
- 16 Doyle JL, Haas TL. Differential role of beta-catenin in VEGF and histamine-induced MMP-2 production in microvascular endothelial cells. *J Cell Biochem* 2009; 107: 272-283

■同行评价

本文逻辑性较好, 图片清晰, 讨论充分, 具有一定的科学性和实用性。

编辑 曹丽鸥 电编 何基才

ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) CN 14-1260/R 2011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)

上腹部中、大手术后肠道细菌易位60例

邵长春, 丁连安, 牛冬光

■背景资料

1979年Berg等提出细菌易位是指肠道内活的细菌穿过肠道黏膜层进入固有层, 继而到达肠系膜淋巴结以及更远处的器官。在严重的创伤、出血、应激、手术、感染以及休克等应激状态下, 会导致肠屏障功能障碍、细菌易位, 并由此诱发全省炎症反应综合征、脓毒症、多器官功能障碍, 甚至死亡。可见, 细菌易位极可能是SIRS及MODS发生发展中的关键环节。细菌易位理论研究已在动物模型中明确地证实, 但在人类临床研究中, 对其存在和意义仍存在较大争议。

■同行评议者

陈敬贤, 教授, 安徽医科大学微生物教研室; 李晓波, 教授, 上海交通大学药学院

邵长春, 丁连安, 牛冬光, 青岛大学医学院附属医院普外科
山东省青岛市 266003

黎介寿院士肠道屏障研究专项基金资助项目, No. LJS_201013
作者贡献分布: 此课题由丁连安、牛冬光及邵长春设计; 研究过程由丁连安、牛冬光、邵长春及相关实验室人员协助完成; 研究所用试剂由邵长春购买提供; 数据分析由邵长春完成; 本论文写作由邵长春完成, 丁连安及牛冬光指导写作。

通讯作者: 丁连安, 主任医师, 硕士生导师, 266003, 山东省青岛市, 青岛大学医学院附属医院普外科。

larryding1987@gmail.com

收稿日期: 2010-11-30 修回日期: 2011-01-18

接受日期: 2011-01-23 在线出版日期: 2011-02-28

Bacterial translocation after moderate or major upper abdominal surgery: an analysis of 60 cases

Chang-Chun Shao, Lian-An Ding, Dong-Guang Niu

Chang-Chun Shao, Lian-An Ding, Dong-Guang Niu, Department of General Surgery, the Affiliated Hospital of Medical College of Qingdao University, Qingdao 266003, Shandong Province, China

Supported by: the Fund of Intestinal Barriers Research of Academician Jie-Shou Li, No. LJS_201013

Correspondence to: Lian-An Ding, Department of General Surgery, the Affiliated Hospital of Medical College of Qingdao University, Qingdao 266003, Shandong Province, China. larryding1987@gmail.com

Received: 2010-11-30 Revised: 2011-01-18

Accepted: 2011-01-23 Published online: 2011-02-28

Abstract

AIM: To investigate the relationship between bacterial translocation and acute systemic inflammatory syndrome (SIRS) in patients who underwent moderate or major upper abdominal operations.

METHODS: Sixty patients who underwent moderate or major upper abdominal operations were observed. Blood samples were collected before surgery and 1, 3, 5 d after surgery to detect plasma *D*-lactate and isolate genomic DNA. PCR analysis was performed to amplify the β -galactosidase gene of *Escherichia coli* and 16S rRNA gene. SIRS was monitored in all patients for 10 days.

RESULTS: PCR results were negative in all the

patients before operation, while positive PCR results were obtained in 14 patients after surgery. Twelve patients who showed positive PCR results had SIRS (12/14, 85.7%), while only 21.7% of patients (10/46) with negative PCR results had SIRS ($P < 0.01$). The positive rate of PCR test was significantly higher in patients with SIRS than in those without SIRS [54.5% (12/22) vs 5.3% (2/38), $P < 0.01$], and in patients undergoing major operations than in those undergoing moderate operations [38.5% (10/26) vs 11.8% (4/34), $P < 0.05$]. Plasma level of *D*-lactate was significantly higher in patient with positive PCR results than in those with negative PCR results (5 d: 11.53 mg/L \pm 0.68 mg/L vs 5.70 mg/L \pm 2.46 mg/L, $P < 0.01$) and in patients with SIRS than in those without SIRS (5 d: 10.61 mg/L \pm 1.77 mg/L vs 5.02 mg/L \pm 1.8 mg/L, $P < 0.01$).

CONCLUSION: Increased intestinal permeability is closely related to bacterial translocation, and bacterial translocation is closely related to SIRS.

Key Words: Gut barrier dysfunction; Bacterial translocation; *D*-lactate; Systemic inflammatory response syndrome

Shao CC, Ding LA, Niu DG. Bacterial translocation after moderate or major upper abdominal surgery: an analysis of 60 cases. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(6): 640-643

摘要

目的: 探讨上腹部中、大手术后肠道细菌易位(BT)与术后全身炎症反应综合征(SIRS)的关系。

方法: 选择60例大、中型上腹部手术患者, 于术前和术后1、3、5 d采集外周血, 进行血浆*D*-乳酸, 全血细菌DNA检测。全血DNA提取后进行PCR扩增, 采用靶基因为大肠杆菌特异性 β 半乳糖苷酶基因和16SrRNA基因。观察患者术后10 d以监测SIRS情况。

结果: 术前PCR检测全血细菌DNA均为阴性, 术后共有14例阳性。PCR阳性组SIRS发生

率为85.7%(12/14), 阴性组为21.7%(10/46), 差异显著($P<0.01$); 术后出现SIRS的患者PCR阳性率为54.5%(12/22), 无SIRS组为5.3%(2/38), 差异显著($P<0.01$); 大手术组PCR阳性率为38.5%(10/26), 中手术组PCR阳性率为11.8%(4/34), 差异显著($P<0.05$). PCR阳性的患者外周血血浆D-乳酸浓度较PCR阴性者明显升高(5 d: $11.53 \text{ mg/L} \pm 0.68 \text{ mg/L}$ vs $5.70 \text{ mg/L} \pm 2.46 \text{ mg/L}$, $P<0.01$), 有SIRS的患者外周血血浆D-乳酸浓度较无SIRS患者明显升高(5 d: $10.61 \text{ mg/L} \pm 1.77 \text{ mg/L}$ vs $5.02 \text{ mg/L} \pm 1.8 \text{ mg/L}$, $P<0.01$).

结论: 上腹部大、中型手术后肠黏膜屏障损伤与BT关系密切, 术后SIRS和与BT密切相关. PCR技术对术后SIRS有较好的早期预警价值.

关键词: 肠黏膜屏障功能障碍; 细菌易位; D-乳酸; 全身炎症反应综合征

邵长春, 丁连安, 牛冬光. 上腹部中、大手术后肠道细菌易位60例. 世界华人消化杂志 2011; 19(6): 640-643
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/640.asp>

0 引言

越来越多的学者及临床工作者关注肠屏障功能的研究, 肠道作为多脏器功能障碍的始动器官^[1], 已被许多学者接受. 肠道缺血/再灌注损伤引起肠道黏膜屏障功能障碍, 使肠腔中的细菌、内毒素易位, 各种炎症介质的共同作用可触发全身炎症反应综合征(systemic inflammatory response syndrome, SIRS), 而SIRS可能是导致多器官功能障碍(multiple organ dysfunction syndrome, MODS)的重要原因^[2]. 当机体遭受创伤、出血、应激、手术、感染以及休克等损害时, 可首先造成肠黏膜的缺血、缺氧, 肠通透性增加, 寄生于肠道内的微生物和/或内毒素, 通过某种途径越过肠黏膜屏障, 大量侵入正常情况下为无菌的肠道以外的组织, 如肠系膜淋巴结、门静脉、肝、脾以及全身血液循环, 其结果可能引发肠源性感染, 并且触发SIRS, 导致脓毒症、休克、MODS, 甚至死亡^[3,4]. 这一现象可在动物实验中获得直接的证据, 临床上用以判断肠黏膜屏障损伤及肠道细菌易位(bacterial translocation, BT)的指标与方法或可行性差, 人体内难以得到直接证明. 本研究通过检测外周血D-乳酸浓度判断肠黏膜通透性, 用提取全血细菌DNA, 进行PCR扩增判断肠道BT, 探讨上腹部中大型手术后肠黏膜屏障损伤、BT与

SIRS之间的联系.

1 材料和方法

1.1 材料 选择青岛大学医学院附属医院普外科2009-12/2010-07大中型上腹部手术患者60例, 其中根治性远端胃切除术18例, 根治性近端胃切除术9例, 根治性全胃切除术8例, 胰十二指肠切除术12例, 胆肠吻合术13例. 男32例, 女28例, 平均年龄55.8(36-70)岁. 所有研究的患者均知情同意, 该研究课题已通过大学伦理委员会的批准. 术前有严重全身性疾病、脏器功能障碍及严重并发症的患者不列入本研究. 术前准备按常规进行. 所有研究的患者均常规预防性使用抗生素.

1.2 方法

1.2.1 分组: 按手术时间及术中失血量粗略地分为大手术组[手术时间>3 h和(或)术中失血>500 mL]和中等手术组; 按PCR扩增结果分为PCR阳性组与PCR阴性组. 按术后是否出现SIRS分为SIRS组及无SIRS组.

1.2.2 血D-乳酸水平的测定: 分别于术前1 d及术后1、3、5 d各取静脉血3 mL, 经肝素抗凝, 离心, 血浆置EP管中-80 °C冻存后成批检测. 血浆D-乳酸采用酶学分光光度法检测. 原理: D-乳酸与氧化型辅酶在碱性环境中与D-乳酸脱氢酶存在条件下, 可生成丙酮酸和还原型辅酶, 在反应体系中加入胍类化合物, 除去丙酮酸, 使反应向右进行, 测定还原型辅酶的吸光度即可定量D-乳酸. 简要步骤如下^[5]: 取血浆0.4 mL+5.8 mol/L高氯酸0.04 mL, 振荡20 s混匀后冰浴10 min, 4 000 r/min 4 °C离心10 min; 取上清0.2 mL+11.6 mol/L氢氧化钾0.02 mL, 混匀后冰浴10 min, 3 200 r/min 4 °C离心10 min; 取上清0.125 mL+辅酶I-甘氨酸缓冲液0.375 mL+D-乳酸脱氢酶0.025 mL, 混匀后置25 °C水浴90 min; 采用Beckman DU-7紫外分光光度计(波长340 nm)测定A值, 并以不同浓度的D-乳酸作标准曲线.

1.2.3 血细菌DNA检测: 分别于术前1 d及术后1、3、5 d各取静脉血3 mL, 经Na₂EDTA抗凝处理, 4 °C保存后成批检测. 经高速离心后, 采用血细菌DNA提取盒(Biospin细菌DNA提取盒)提取细菌DNA, 以标准菌株为阳性对照, 进行PCR扩增. 引物设计: 大肠杆菌特异性 β -半乳糖苷酶基因的高度保守区引物16SrRNA+、16SrRNA. 引物, 引物序列, 靶基因及扩增产物长度见表1.

1.2.4 观察术后SIRS情况: 观察术后10 d有无

■ 相关报道

Ono等研究了52例外科患者, 包括肝叶切除、食管切除及结肠癌化疗患者, PCR检测阳性, 大部分为肠源性细菌及少量白念珠菌, 而对对照组健康人群全部阴性. 说明肠屏障的破坏可引起细菌易位的发生, 但缺乏与术后脓毒症发生的关联.

■ 创新盘点

目前, 尚无非常可靠的方法来明确人类细菌易位的诊断, 肠系膜淋巴结培养受到多方面的限制, 而血培养阳性率较低. 本研究采用PCR技术测定细菌易位, PCR方法可检测全血细菌DNA, 可提供细菌易位的直接证据, 较传统的血培养敏感. 本研究将PCR技术应用于临床研究, 研究表明细菌易位与术后SIRS的发生有着密切的关系.

■应用要点

本研究提示上腹部中大型手术后肠通透性升高,可能发生肠黏膜屏障损伤导致细菌易位,诱发全身炎症反应综合征,PCR技术可早期诊断细菌易位,对术后SIRS有较好的早期预警价值,具有一定的理论价值和临床意义。

表 1 PCR扩增细菌DNA的引物

引物	引物序列	靶基因	扩增产物长度(bp)
BG-1(+strand)	5'-CTT TGC CTG GTT TCC GGC ACC AGA A-3' (201-225)	大肠杆菌特异性 β -半乳糖苷酶基因	762
BG-4(-strand)	5'-AAC CAC CGC ACG ATA GAG ATT CGG G-3' (963-939)		
16SrRNA(+strand)	5'-AGT TTG ATC CTG GCT CAG -3' (8-27)	16S rRNA基因	768
16SrRNA-(-strand)	5'-GGA CTA CCA GGG TAT CTA AT-3' (806-787)		

表 2 PCR技术检测全血细菌DNA结果 (n)

分组	n	PCR(+)	BG				16SrRNA			
			0 d	1 d	3 d	5 d	0 d	1 d	3 d	5 d
SIRS组	22	12	0	5	12	10	0	7	12	11
Non-SIRS组	38	2	0	2	1	0	0	2	1	0
大手术组	26	10	0	4	10	9	0	6	10	10
中手术组	34	4	0	3	2	1	0	4	3	1

SIRS发生,具备以下两项或两项以上体征可诊断为SIRS:体温 $>38^{\circ}\text{C}$ 或 $<36^{\circ}\text{C}$;心率 >90 次/min;呼吸频率 >20 次/min或 $\text{PaCO}_2<4.27$ kPa(32 mmHg);外周血白细胞计数 $>12.0\times 10^9/\text{L}$ 或 $<4.0\times 10^9/\text{L}$,或未成熟粒细胞 $>10\%$ 。

统计学处理 数各分组所得计量数据采用mean \pm SD表示,用SPSS17.0软件处理数据,计数资料采用 χ^2 检验,计量资料采用 t 检验及ANOVA分析。

2 结果

2.1 PCR结果和术后SIRS情况 术前PCR检测全血细菌DNA均为阴性,术后共出现14例PCR阳性,其中具有代表性的图谱见图1, 2。22例患者术后发生SIRS,其中有12例患者PCR阳性,有6例手术时间超过4 h,失血超过1 000 mL。PCR阳性组SIRS发生率为85.7%(12/14),阴性组为21.7%(10/46),差异有显著统计学意义($P<0.01$,表2)。术后出现SIRS的患者PCR阳性率为54.5%(12/22),无SIRS组为5.3%(2/38),差异有显著统计学意义($P<0.01$,表2)。大手术组PCR阳性率为38.5%(10/26),中手术组PCR阳性率为11.8%(4/34),差异有统计学意义($P<0.05$,表2)。

2.2 血浆D-乳酸,PCR及SIRS情况 上腹部中大型手术后,血浆D-乳酸水平较术前升高。在术后同一时间,PCR阳性组血浆D-乳酸水平显著高于PCR阴性组,有显著统计学意义($P<0.01$,表3)。在术后同一时间,SIRS组血浆D-乳酸水平显著高于无SIRS组,有显著统计学意义($P<0.01$,表3)。

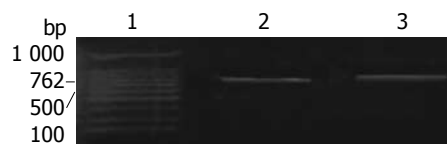


图 1 PCR检测BG阳性。1: Marker; 2: 对照; 3: 样本。



图 2 PCR检测16SrRNA阳性。1: Marker; 2: 对照; 3: 样本1; 4: 样本2。

3 讨论

BT及其并发症已在大量的动物模型中明确地证实存在,尤其在发生严重创伤或失血性休克后,但在人类临床研究中,对其存在和意义仍存在较大争议^[6-8]。

D-乳酸是肠道多种细菌发酵的代谢产物,当肠道发生急性缺血时,局部细菌大量繁殖,破坏肠黏膜生物屏障,由于肠缺血导致肠黏膜绒毛顶端上皮脱落,细胞旁路径增加而导致肠黏膜通透性增加^[9]。此时肠道中细菌产生的大量D-乳酸透过受损的肠黏膜经循环进入血液,D-乳酸在肝内不被分解,因此外周血浆D-乳酸水平与门静脉血浆D-乳酸水平相比无明显变化,通过测定外周血血液中D-乳酸水平可及时反映肠黏膜损害程度和通透性变化^[10,11]。因此,外周血

表 3 患者外周血D-乳酸的变化 ($\mu\text{g/mL}$)

分组	n	0 d	1 d	3 d	5 d
PCR(+)组	14	0.48 ± 0.11	17.98 ± 1.86 ^b	13.30 ± 0.84 ^b	11.53 ± 0.68 ^b
PCR(-)组	46	0.52 ± 0.15	9.96 ± 3.51	7.46 ± 3.17	5.70 ± 2.46
SIRS组	22	0.49 ± 0.11	16.96 ± 2.26 ^d	12.79 ± 1.20 ^d	10.61 ± 1.77 ^d
Non-SIRS组	38	0.51 ± 0.16	8.87 ± 2.69	6.52 ± 2.59	5.02 ± 1.8

^b $P < 0.01$ vs PCR阴性组; ^d $P < 0.01$ vs Non-SIRS组。

中血浆D-乳酸的测定可作为判断肠黏膜屏障功能的敏感指标。本研究采用PCR方法可检测全血细菌DNA, 较传统的血培养敏感^[12]。

本研究表明上腹部中大型手术可发生BT, 术后发生SIRS与BT有着密切的关系。术后发生BT的原因可能主要是手术中麻醉与手术创伤刺激引起内脏血管痉挛, 加之术中失血, 肠道处于缺血缺氧状态, 缺血再灌注损伤, 释放炎症介质, 导致肠屏障功能破坏, 从而易于发生BT^[13,14]。大手术组PCR阳性率较中手术组高($P < 0.05$)。在60例手术中, 有6例手术时间 >4 h, 失血超过1 000 mL, 这6例患者术后PCR结果均为阳性。这表明术后BT与手术创伤有关, 手术创伤越大, 时间越长, 术中失血越多, 肠道缺血缺氧越严重, 越容易发生BT。

本研究结果提示, 上腹部中大型手术创伤较大可引起机体缺血再灌注损伤、炎症介质释放, 肠道黏膜损伤, 使肠黏膜通透性增高, 造成肠道BT, 机体对其的反应表现为SIRS; 而SIRS启动后进一步激发大量炎症介质的全身性释放, 作用于肠道造成肠道血流的低灌注, 肠黏膜缺血缺氧, 进一步加重肠黏膜屏障的功能损害, 易于导致肠道BT发生。上腹部中大型手术术后发生SIRS与BT有着密切的关系, BT与SIRS的关系是相互的^[15]。PCR技术可早期诊断BT, 对术后SIRS有较好的早期预警价值。此外, 适度的麻醉, 缩短手术时间、减少手术创伤及术中失血有助于预防术后BT的发生。PCR有自身的局限性, PCR仅能检出细菌DNA的碎片, 并不能确定细菌是否具有活力, 另外PCR不能进行药物敏感试验来指导临床抗生素治疗而血培养可以做到这些, 故将血培养与PCR检测配合起来更有意义。

4 参考文献

- 黎介寿. 对肠功能障碍的再认识. 肠外与肠内营养 2008; 15: 321-322
- 盛新华, 石汉平. 肠道在多器官功能障碍综合征中的作用. 世界华人消化杂志 2005; 13: 2029-2032

- Deitch EA, Xu D, Kaise VL. Role of the gut in the development of injury- and shock induced SIRS and MODS: the gut-lymph hypothesis, a review. *Front Biosci* 2006; 11: 520-528
- Gatt M, Reddy BS, MacFie J. Review article: bacterial translocation in the critically ill—evidence and methods of prevention. *Aliment Pharmacol Ther* 2007; 25: 741-757
- 于勇, 盛志勇, 柴家科, 黎君友, 杨晓东, 袁仕安, 晋桦, 董宁, 孙丹. 烧伤患者血浆D-乳酸水平和肠道内IgA含量的变化. 创伤外科杂志 2003; 5: 122-124
- 郑常杰, 贾长库, 时岩. 失血性休克促进细菌移位的发生. 中华外科杂志 2000; 35: 176-178
- Ammori BJ, Fitzgerald P, Hawkey P, McMahon MJ. The early increase in intestinal permeability and systemic endotoxin exposure in patients with severe acute pancreatitis is not associated with systemic bacterial translocation: molecular investigation of microbial DNA in the blood. *Pancreas* 2003; 26: 18-22
- Balzan S, de Almeida Quadros C, de Cleve R, Zilberstein B, Cecconello I. Bacterial translocation: overview of mechanisms and clinical impact. *J Gastroenterol Hepatol* 2007; 22: 464-471
- Günel E, Çağlayan O, Çağlayan F. Serum D-lactate levels as a predictor of intestinal ischemia-reperfusion injury. *Pediatr Surg Int* 1998; 14: 59-61
- Assadian A, Assadian O, Senekowitsch C, Rotter R, Bahrami S, Fürst W, Jaksch W, Hagmüller GW, Hübl W. Plasma D-lactate as a potential early marker for colon ischaemia after open aortic reconstruction. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2006; 31: 470-474
- Song WB, Lv YH, Zhang ZS, Li YN, Xiao LP, Yu XP, Wang YY, Ji HL, Ma L. Soluble intercellular adhesion molecule-1, D-lactate and diamine oxidase in patients with inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 2009; 15: 3916-3919
- Ono S, Tsujimoto H, Yamauchi A, Hiraki S, Takayama E, Mochizuki H. Detection of microbial DNA in the blood of surgical patients for diagnosing bacterial translocation. *World J Surg* 2005; 29: 535-539
- Sakaguchi S, Furusawa S. Oxidative stress and septic shock: metabolic aspects of oxygen-derived free radicals generated in the liver during endotoxemia. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2006; 47: 167-177
- Kaneko H, Tamura A, Ishii T, Maeda T, Katagiri T, Ishii J, Kubota Y, Suzuki T, Tsuchiya M, Otsuka Y, Yamazaki K, Watanabe M, Tatsuo T. Bacterial translocation in small intestinal ischemia-reperfusion injury and efficacy of Anti-CINC antibody treatment. *Eur Surg Res* 2007; 39: 153-159
- Guarner C, Soriano G. Bacterial translocation and its consequences in patients with cirrhosis. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2005; 17: 27-31

■同行评价

本文实验设计较合理, 思路清楚, 具有一定的理论价值和临床意义。

内镜下支架置入术治疗消化道狭窄273例

孙杰, 刘文天, 王邦茂, 张庆瑜, 吕宗舜

■背景资料

消化道狭窄是临床上常见的疾病, 严重者可导致消化道梗阻, 甚至危及生命。近年来支架置入术在消化道狭窄中的应用越来越广泛。

孙杰, 刘文天, 王邦茂, 张庆瑜, 吕宗舜, 天津医科大学总医院消化科 天津市 300052

作者贡献分布: 孙杰进行此课题的数据采集、统计分析、总结、论文撰写与修改等; 刘文天负责课题的设计、论文的审阅与修改; 王邦茂、张庆瑜及吕宗舜提供资料支持并指导论文写作。

通讯作者: 刘文天, 主任医师, 教授, 300052, 天津市和平区鞍山道154号, 天津医科大学总医院消化科。lwentian@sohu.com

收稿日期: 2010-11-13 修回日期: 2011-01-20

接受日期: 2011-01-23 在线出版日期: 2011-02-28

Endoscopic stent placement for stenosis of the digestive tract: an analysis of 273 cases

Jie Sun, Wen-Tian Liu, Bang-Mao Wang, Qing-Yu Zhang, Zong-Shun Lv

Jie Sun, Wen-Tian Liu, Bang-Mao Wang, Qing-Yu Zhang, Zong-Shun Lv, Department of Gastroenterology, Tianjin Medical University General Hospital, Tianjin 300052, China

Correspondence to: Professor Wen-Tian Liu, Department of Gastroenterology, Tianjin Medical University General Hospital, 154 Anshan Road, Heping District, Tianjin 300052, China. lwentian@sohu.com

Received: 2010-11-13 Revised: 2011-01-20

Accepted: 2011-01-23 Published online: 2011-02-28

Abstract

AIM: To assess the safety, efficacy and patient satisfaction of endoscopic stent placement for stenosis of the digestive tract.

METHODS: A total of 273 patients with stenosis of the digestive tract were included in the study, of whom 242 had esophageal and cardiac stenosis, 24 had gastroduodenal stenosis, 7 had colorectal stenosis; 256 had malignant stenosis, 17 had benign stenosis; 273 had gastrointestinal obstruction symptoms; 15 suffered from esophageal fistula. Endoscopic placement of stents was performed in all patients. The safety, efficacy and patient satisfaction were evaluated after stent placement.

RESULTS: Stents were successfully placed in all patients (100%). Gastrointestinal obstruction symptoms were alleviated in 266 patients (97.4%). Esophageal fistula was successfully closed in 15 patients (100%). Stent-related ad-

verse effects occurred in 156 patients (57.1%), mainly including chest (abdominal) pain in 87 cases (31.9%) and bleeding in 39 cases. Only one patient with malignant esophageal stenosis died of gastrointestinal bleeding after esophageal stent placement. Re-stenosis was detected in 43 patients (15.8%). Approximately 93.8% of patients were satisfied with the treatment.

CONCLUSION: Endoscopic stent placement is an effective and relatively safe treatment for stenosis of the digestive tract and esophageal fistula. The rate of treatment satisfaction is high.

Key Words: Stent; Treatment; Stenosis of the digestive tract

Sun J, Liu WT, Wang BM, Zhang QY, Lv ZS. Endoscopic stent placement for stenosis of the digestive tract: an analysis of 273 cases. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(6): 644-649

摘要

目的: 探讨内镜下支架置入术治疗消化道狭窄的临床疗效、安全性及患者的治疗满意度。

方法: 273例消化道狭窄患者, 食管贲门狭窄242例, 胃十二指肠狭窄24例, 结肠直肠狭窄7例; 恶性狭窄256例, 良性狭窄17例, 所有患者均有不同程度的消化道梗阻症状, 其中15例合并食管气管瘘, 均行内镜直视下支架置入术, 术后观察临床疗效和不良反应, 并进行治疗满意度调查。

结果: 所有患者均成功置入支架, 266例(97.4%)消化道梗阻症状缓解, 15例(100%)食管气管瘘者瘘口得到有效封堵。156例(57.1%)于支架置入术后出现不良反应, 主要为胸(腹)痛87例(31.9%), 出血39例(14.3%), 其中1例食管恶性狭窄者术后当天因消化道大出血死亡。43例(15.8%)出现再狭窄。256例(93.8%)对治疗表示满意。

结论: 内镜下支架置入术是一种治疗消化道狭窄、解除梗阻、封堵瘘口非常有效的治疗方法, 手术安全性较高, 使患者获得较高的治

■同行评议者

丁士刚, 教授, 北京大学第三医院消化科; 肖恩华, 教授, 中南大学湘雅二医院放射教研室

疗满意度。

关键词: 支架; 治疗; 消化道狭窄

孙杰, 刘文天, 王邦茂, 张庆瑜, 吕宗舜. 内镜下支架置入术治疗消化道狭窄273例. 世界华人消化杂志 2011; 19(6): 644-649
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/644.asp>

0 引言

消化道狭窄通常见于消化道良恶性肿瘤以及消化道疾病手术后吻合口狭窄、食管烧灼伤后瘢痕性狭窄、贲门失弛缓症、幽门不全梗阻等, 近年来随着支架操作技术的不断成熟, 置入支架已经成为治疗消化道狭窄的一种重要方法^[1]. 本文对天津医科大学总医院2000-01/2010-05期间内镜下支架置入术治疗消化道狭窄273例进行回顾性分析, 旨在探讨其临床疗效、安全性及患者的治疗满意度, 为今后开展临床工作提供依据。

1 材料和方法

1.1 材料 273例患者, 住院157例, 门诊116例; 男211例, 女62例; 年龄17-95(平均72.9±11.0)岁. 其中食管贲门狭窄242例, 胃十二指肠狭窄24例, 结肠直肠狭窄7例. 恶性狭窄256例, 包括食管贲门癌222例, 食管癌术后吻合口复发3例, 胸腺癌1例, 胃窦癌12例, 十二指肠球部恶性肿瘤1例, 胃窦癌术后复发浸润十二指肠3例, 胃窦癌合并胆管癌、肝癌1例, 胰头癌4例, 壶腹癌2例, 结肠癌3例, 直肠癌2例, 直肠癌术后吻合口复发2例. 其中有15例食管恶性狭窄者合并食管气管瘘, 最多的1例有4个瘘口. 良性狭窄17例, 包括食管癌术后吻合口良性狭窄8例, 化学物品腐蚀2例(均为误服过氧乙酸), 食管炎4例, 短食管1例, 食管平滑肌瘤术后狭窄1例, 胃大部切除术后吻合口良性狭窄1例.

1.2 方法

1.2.1 食管贲门狭窄支架置入: 常规进入胃镜, 观察食管狭窄上口, 记录距门齿的距离, 如胃镜能够通过狭窄段, 则记录狭窄段的长度, 如胃镜不能通过狭窄段, 则进入引导钢丝, 退出胃镜, 沿引导钢丝用沙氏扩张器进行扩张0.9-1.1 cm, 再次进镜记录狭窄段长度, 根据长度及部位选择合适的支架, 沿引导钢丝进入, 到合适位置释放, 然后再次进入胃镜观察以确定支架释放是否合适. 有瘘管存在的, 要注水观察患者有无呛咳.

1.2.2 胃十二指肠狭窄支架置入: 进入胃镜至胃

腔后, 找到狭窄部位, 观察狭窄方向, 沿狭窄方向插入引导钢丝至狭窄段远端, 沿引导钢丝插入造影导管, 注入造影剂在X线透视下观察, 观察狭窄位置、程度及长度, 若狭窄明显, 则退出造影导管后沿引导钢丝置入气囊行狭窄段扩张, 然后沿引导钢丝进入支架, 到合适位置释放. 最后观察支架的位置及扩张情况.

1.2.3 结肠直肠狭窄支架置入: 结肠镜下找到狭窄口, 进入引导钢丝至狭窄段远端, 沿引导钢丝进入造影导管, 注入造影剂在X线透视下观察, 观察狭窄位置、程度及长度, 沿引导钢丝进入支架, 到合适位置后释放. 观察支架位置及扩张均正常后退出结肠镜.

1.2.4 支架选择: 我们根据病变的位置选择不同的支架, 食管贲门狭窄者选择食管支架, 其中贲门狭窄者选择带防反流瓣膜支架; 胃十二指肠狭窄者选择十二指肠支架, 结肠直肠狭窄者选择结肠支架. 根据病变长度选择不同长度的支架, 一般是病变长度加4 cm为支架长度.

1.2.5 疗效判断: 食管贲门狭窄者进行吞咽功能Stooler分级^[2]: 0级, 无吞咽困难; 1级, 能进固体食物; 2级, 能进半流质饮食; 3级, 能进流质饮食; 4级, 完全不能进食. 支架置入前后进行分级比较, 改善1个级别以上者视为有效. 合并食管气管瘘者, 呛咳症状消失为有效. 胃十二指肠狭窄者术后恶心呕吐等梗阻症状解除者视为有效. 结肠直肠狭窄者术后肠梗阻症状解除者视为有效.

1.2.6 术后随访: 术后对患者进行密切随访观察临床疗效、不良反应以及恶性狭窄患者的术后生存时间, 并进行治疗满意度调查. 随访方式为电话和门诊随访. 治疗满意度调查采用门诊问卷及电话调查的方式进行, 分为满意、基本满意、不满意3个等级, 满意率 = (满意人数+基本满意人数) × 100% / 该组人数, 评价为不满意者, 记录原因.

统计学处理 数采用SPSS17.0软件进行统计学处理, 食管狭窄患者术前术后吞咽困难评分采用t检验, $P < 0.05$ 有统计学意义.

2 结果

2.1 临床疗效 273例消化道狭窄患者均成功置入支架, 成功率100%. 其中19人分两次置入2枚支架, 2人分3次置入3枚支架, 5人1次置入2枚支架, 其余均为1次置入1枚支架, 共置入301枚支架. 支架位置及长度见表1. 有2例食管支架因患者咳嗽较剧烈第1次置入失败, 第2次置入获得成功.

■ **研发前沿**
支架置入术后的不良反应一直是临床上迫切需要解决的问题.

■相关报道

Khot等对1990-2000年发表的关于直肠结肠支架置入相关文献进行总结,发现穿孔率4%,移位率10%,再梗阻率10%。

表 1 支架的位置及长度 (n)

	0-8 cm	9-10 cm	11-12 cm	13-14 cm	15-16 cm	>16 cm
食管贲门	57	89	100	7	16	1
胃十二指肠	2	20	1	1	0	0
结肠直肠	0	6	1	0	0	0
总计	59	115	102	8	16	1

表 2 242例食管狭窄患者支架置入术前术后主要临床表现比较

分组	吞咽苦难(n)					平均级数	呛咳%(n)
	0级	1级	2级	3级	4级		
术前	0	0	53	105	84	3.13±0.74	100(15/15)
术后	2	87	116	36	1	1.78±0.72 ^b	0(0/15)

^bP<0.01 vs 术前。

功(其中1例第2次运用超细胃镜),其余均1次成功。有21例食管支架上端均距门齿20 cm以内,有1例距门齿16 cm。部分支架为扩张后置入:其中沙氏扩张器扩张后置入食管支架147例,球囊扩张后置入十二指肠支架3例。术后消化道梗阻解除者266例,有效率97.4%。242例食管狭窄患者,术前吞咽困难的平均级数由3.13±0.74改善为术后的1.78±0.72,有效236例,占97.5%,其中15例合并食管气管瘘者,支架置入后呛咳症状全部解除,有效率100%;24例胃十二指肠狭窄患者,23例梗阻症状解除,占95.8%;7例结肠直肠狭窄患者,过渡治疗4例,姑息治疗3例,支架置入术后梗阻症状均解除,占100%,详见表2,表3。无效者7例,食管支架置入术后无效6例,其中1例食管支架置入后因进食没有明显改善,应患者要求于1 wk后取出;3例术后放置胃肠营养管;1例术后行胃镜下胃造瘘术失败后放置胃肠营养管;1例应患者要求未再做进一步处理;十二指肠支架置入术后无效1例,患者拒绝进一步治疗,于术后25 d死亡。

2.2 不良反应 消化道支架置入术中术后共156例(57.1%)患者出现一项或多项不良反应,主要为:(1)胸(腹)痛:87例(31.9%)于支架放置部位疼痛,大部分能自行缓解,少部分对症处理后2-7 d症状消失;(2)出血:39例(14.3%)出现出血,其中37例术中少量出血,1例出现术后呕血,均经处理后缓解,仅1例恶性食管狭窄者于手术当天因大出血死亡;(3)支架移位:15例(5.5%)发生支架移位,均为食管支架,其中向上移位3例,向下

移位8例,掉入胃中4例;(4)肿物再生长:共36例(13.2%)出现肿物再生长,其中支架上部肿物生长14例,支架下部肿物生长8例,支架中间部肿物生长4例,支架两端都有生长5例;(5)食团(或粪团)阻塞:共发生11例(4.0%),全部为食团阻塞,均经内镜下清除;(6)呃逆:17例(6.2%)见于食管支架及十二指肠支架置入术后患者,均经对症处理后于2-7 d缓解;(7)呼吸困难:3例(1.1%)食管支架置入术后出现呼吸困难,经吸氧等处理后于7-10 d症状缓解;(8)吸入性肺炎:3例(1.1%)食管支架置入术后患者出现吸入性肺炎,均经抗生素治疗后痊愈(表3)。

2.3 术后再狭窄 食管恶性狭窄者,共36例发生再狭窄,其中支架移位11例,肿物再生长25例,治疗方法:扩张7例,调整支架位置3例,加放支架21例,重放支架3例,高频电烧灼2例。再狭窄均有效得到解除。食管良性狭窄中2例化学物品腐蚀者,因反复出现狭窄,1例共叠加3枚支架,1例共叠加2枚支架,并反复多次扩张,最后2例均选择外科姑息手术治疗,余有9例随访1年,均未发生再次狭窄。胃十二指肠恶性狭窄支架置入术后有4例分别于术后4、6、11、13 mo因肿物生长出现再狭窄,其中1例加放1枚支架,1例又选择外科姑息手术治疗,1例置入十二指肠营养管,1例拒绝任何特殊处理。3例姑息治疗的结肠直肠支架置入术患者,1例于术后4 mo又因肿物生长出现再狭窄致不完全梗阻,患者拒绝进一步治疗。

2.4 术后生存时间 术后随访,恶性狭窄患者死亡184例,其中食管恶性狭窄者死亡167例,生存时间为1 d-27 mo,平均10.5 mo;胃十二指肠恶性狭窄者死亡15例,生存时间为1-19(平均7) mo;结肠直肠恶性狭窄姑息治疗者死亡2例,分别为术后5、8 mo,平均6.5 mo。死亡主要原因为肿瘤转移和全身衰竭。

2.5 治疗满意度调查 术后进行治疗满意度调查,门诊问卷46例,电话调查227例,其中调查患者本人92例,对于部分已经死亡患者对其家人进

表 3 消化道支架置入术后不良反应及治疗满意度调查

部位	n	有效率(%)	不良反应n(%)								满意率(%)
			胸/腹痛	出血	移位	肿物再生	食管/粪团堵塞	呃逆	吸入性肺炎	呼吸困难	
食管贲门	242	97.5	79(32.6)	34(14.0)	15(6.2)	31(12.8)	11(4.5)	13(5.4)	3(1.2)	3(1.2)	93.8
胃十二指肠	24	95.8	6(25.0)	3(12.5)	0(0.0)	4(16.7)	0(0.0)	4(16.7)	0(0.0)	0(0.0)	91.7
结肠直肠	7	100.0	2(28.6)	2(28.6)	0(0.0)	1(14.3)	0(0.0)	0(0.0)			100.0
合计	273	97.4	87(31.9)	39 ¹ (14.3)	15(5.5)	36(13.2)	11(4.0)	17(6.2)	3(1.1)	3(1.1)	93.8

¹: 其中1例消化道大出血死亡。

行调查,共181例,结果对支架治疗的满意率为93.8%。详见表3。有17例表示对治疗不满意,原因有:梗阻症状没有解除(13例),术后出现不良反应(4例)。

3 讨论

目前,支架已经被广泛应用于消化道各种原因所导致的狭窄,特别是食管狭窄^[3]。食管狭窄是食管疾病尤其是晚期食管癌的常见并发症,主要引起吞咽困难等临床症状,严重者甚至无法进食、合并食管气管瘘,严重影响了患者的生活质量并可危及生命^[4-6]。放置支架后,能明显提高患者的生存质量。国内外学者报道^[4,7-9],食管支架置入后吞咽困难症状缓解率94.6%-100.0%,而食管气管瘘呛咳症状解除的有效率为100%。本组病例273例中,食管支架置入者242例,占88.6%。食管支架置入术后236例吞咽困难症状缓解,有效率97.5%,食管气管瘘呛咳症状的缓解率为100%。2例化学品腐蚀者均多次出现再狭窄,虽经反复扩张及重叠放置支架,但因效果欠佳而患者最终都选择外科手术治疗。有文献报道^[10],食管狭窄的支架治疗只适用于距门齿21 cm以下的病变,若支架位置过高,置入后易引起疼痛、异物感,甚至发生出血、穿孔等严重不良反应。而Eleftheriadis等^[11]认为支架置入术治疗高位食管狭窄同样有效、安全且患者耐受性好。本研究中,共放置了21例上端距离门齿不足20 cm的食管支架,其中1例距门齿16 cm,均耐受性好,无严重不良反应出现。也有学者^[12]认为,高龄患者应为食管扩张和支架置入的禁忌。而潘元海等^[13]则认为对80岁以上高龄老人而言,食管支架置入术也仍然是一种安全有效的治疗狭窄、解除梗阻的方法。在本研究中,242例食管狭窄患者中,年龄超过80岁的75例(其中年龄>90岁的8例),扩张27例,均顺利成功置入,未发生严

重不良反应。国内外文献报道^[14-18]胃十二指肠支架置入成功率为94%-100%,梗阻症状解除率为94%-100%。本研究中24例支架均成功置入,成功率100%,23例梗阻症状缓解,有效率为95.8%。文献^[19,20]报道结肠支架置入成功率为75%-85%,24 h内梗阻的临床缓解率为94%-95%,支架置入成功率与狭窄的位置有关,位置越高,成功率越低。本研究中,7例直肠结肠支架置入术均操作成功,成功率为100%,所有患者梗阻均解除,有效率为100%。我们认为,内镜下消化道支架置入术是治疗消化道狭窄缓解梗阻的非常有效的手段,对于食管恶性狭窄合并的食管气管瘘的封堵尤为有效,对于高龄及高位食管狭窄同样适用。操作相对简单,成功率高,部分患者不用住院就可以治疗。但对于食管腐蚀性损伤,食管扩张并支架置入术远期治疗效果较差。

消化道支架置入术的不良反应较多,常见的有疼痛、移位以及消化道大出血、穿孔等严重不良反应。Selinger等^[21]报道137例食管支架置入术患者中,41.6%的患者至少出现一种不良反应,而穿孔等严重不良反应的发生率为5.8%。Keller等^[8]报道35例食管支架置入患者中,1例死于术后消化道大出血。曾有Sanyal等^[22]报道1例食管支架移位致肠梗阻穿孔,Han等^[23]报道了1例结肠癌支架置入术后致结肠穿孔。国外文献报道^[16-18,24]胃十二指肠支架置入术主要不良反应的发生率在21%-36%。Khot等^[25]对1990-2000年发表的关于直肠结肠支架置入相关文献进行总结,发现穿孔率4%,移位率10%,再梗阻率10%。本研究中,156例出现1项或多项不良反应,发生率为57.1%,发生率最高的是胸(腹)痛,为31.9%,主要与支架对消化道扩张的机械性刺激和对肿物的压迫性缺血、周围组织挤压、牵拉有关。出血是支架置入术的严重不良反应之一,本研究中有1例晚期食管癌患者支架置入术

■应用要点

本研究对高龄、高位食管狭窄患者支架置入术安全性进行了评价,并详细分析了支架置入术不良反应的发生原因,有利于临床医生参考和借鉴。

■同行评价

本文选题尚可, 为进一步的临床研究提供线索。

后当天因消化道大出血死亡, 考虑为在置入支架的过程中机械性刺激使受肿瘤浸润的血管壁破裂而致, 这一类出血比较迅猛, 几乎没有抢救的机会^[26]。少量的出血在支架置入的过程中亦比较常见, 主要见于狭窄明显, 需要预扩张的患者, 由于操作过程中反复机械性作用引起黏膜损伤, 往往取出探条或球囊时就发现带有血迹; 有些癌组织较脆, 稍碰触即会出血。支架移位也是消化道支架置入术的一个重要不良反应, 本研究中共有15例发生, 主要由于术前扩张直径偏大、狭窄部位太短所致。肿物再生为后远期不良反应, 放置无覆膜支架, 黏膜受到不断刺激可出现过度增生, 经支架网孔向腔内生长; 全覆膜支架置入术后可发生支架两端肿物再生, 主要是由于放置支架两端超出病变较短, 肿物生长迅速所致。食团阻塞导致梗阻也是支架置入术后容易出现的问题, 本研究中, 11例出现食团的堵塞, 虽然全部经内镜清除, 但是部分患者产生了恐惧心理, 不敢进软食, 改为流质或半流质, 生活质量下降, 我们的体会是: 术后对患者的宣教以及随访非常重要, 可以有效避免食团阻塞, 对患者生活质量提高有帮助。再狭窄是支架术后最为突出的临床问题, 本研究273例中, 发生再狭窄43例, 发生率为15.8%, 除2例良性食管再狭窄外, 30例系由肿瘤组织生长、11例系由支架移位所致。对于支架置入术后再狭窄的处理, 我们的体会是: 恶性狭窄, 由支架移位所致者, 尽量通过调整支架位置来解决; 支架移位但不能拖动或者单纯由肿瘤生长所致狭窄者, 可以通过扩张、加放支架或射频烧灼来处理; 化学品腐蚀的狭窄, 扩张、加放支架有时效果欠佳, 部分最终需要外科手术治疗。再狭窄的预防很重要: 进行扩张时, 扩张直径不宜太大; 支架置入术后定期复查, 可有效避免支架移位所致再狭窄。

总之, 经内镜支架置入术是治疗消化道狭窄非常有效的手段之一, 操作简单、费用较低、创伤较小、安全性较高, 能显著提高患者的生活质量, 患者易于接受, 术后治疗满意度较高。但是术后不良反应仍是较为突出的问题, 应引起我们的重视。

4 参考文献

- 王庆才, 张琨, 胡月华, 李磊, 谢华丽, 张军, 陈立新. 带膜可回收支架治疗消化道狭窄. 中华消化内镜杂志 2007; 24: 143-144
- 牛凤环, 王要军. 食管内¹²⁵I粒子带膜支架与普通支架治疗中晚期食管癌临床治疗效果对比. 中华保健医学

杂志 2010; 12: 175-177

- 刘红云, 张德龙. 内镜下食管狭窄扩张并支架置入术32例报告. 中国内镜杂志 2008; 14: 753-754, 758
- Homs MY, Steyerberg EW, Eijkenboom WM, Tilanus HW, Stalpers LJ, Bartelsman JF, van Lanschot JJ, Wijnrdeman HK, Mulder CJ, Reinders JG, Boot H, Aleman BM, Kuipers EJ, Siersema PD. Single-dose brachytherapy versus metal stent placement for the palliation of dysphagia from oesophageal cancer: multicentre randomised trial. *Lancet* 2004; 364: 1497-1504
- 郑文棋, 林海凤, 杨长青, 龚锦容, 吴荔珊, 张美金, 翁丽贤. 被膜食管支架治疗食管贲门良性狭窄32例. 世界华人消化杂志 2010; 18: 830-833
- 任莹. 带膜支架置入术治疗晚期食管癌的临床观察. 现代消化及介入诊疗 2009; 14: 196-197
- 宛新建, 李兆申, 许国铭, 孙振兴, 王娜, 吴仁培, 姚银珍. 食管金属支架治疗125例食管狭窄和食管气管瘘临床分析. 胃肠病学 2003; 8: 353-357
- Keller R, Flieger D, Fischbach W, Christl SU. Self-expanding metal stents for malignant esophago-gastric obstruction: experience with a new design covered nitinol stent. *J Gastrointest Liver Dis* 2007; 16: 239-243
- Yang HS, Zhang LB, Wang TW, Zhao YS, Liu L. Clinical application of metallic stents in treatment of esophageal carcinoma. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 451-453
- 杨营军, 庞志锋, 刘新光. 内镜下置入带膜支架治疗食管上段癌性食管气管瘘31例疗效评价. 胃肠病学 2004; 9: 377-378
- Eleftheriadis E, Kotzampassi K. Endoprosthesis implantation at the pharyngo-esophageal level: problems, limitations and challenges. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 2103-2108
- 汪世存, 吕维富, 孙一兵, 季学斌, 张行明, 齐志刚, 张学彬. 食管良恶性狭窄及瘘的带膜内支架介入治疗. 中国癌症杂志 2001; 11: 134-136
- 潘元海, 薛萌华. 食管支架治疗80岁以上老人食管恶性狭窄9例报告. 现代消化及介入诊疗 2009; 14: 54-55
- 张宝阳, 姜昊声, 刘诗义, 李伟平, 胡奕. 内镜直视联合X线监视置入支架治疗胃十二指肠恶性肿瘤梗阻47例. 介入放射学杂志 2009; 18: 763-765
- Schiefke I, Zabel-Langhennig A, Wiedmann M, Huster D, Witzigmann H, Mössner J, Berr F, Caca K. Self-expandable metallic stents for malignant duodenal obstruction caused by biliary tract cancer. *Gastrointest Endosc* 2003; 58: 213-219
- Jeong JY, Han JK, Kim AY, Lee KH, Lee JY, Kang JW, Kim TJ, Shin SH, Choi BI. Fluoroscopically guided placement of a covered self-expandable metallic stent for malignant antroduodenal obstructions: preliminary results in 18 patients. *AJR Am J Roentgenol* 2002; 178: 847-852
- Jung GS, Song HY, Kang SG, Huh JD, Park SJ, Koo JY, Cho YD. Malignant gastroduodenal obstructions: treatment by means of a covered expandable metallic stent-initial experience. *Radiology* 2000; 216: 758-763
- Kim JH, Song HY, Shin JH, Choi E, Kim TW, Jung HY, Lee GH, Lee SK, Kim MH, Ryu MH, Kang YK, Kim BS, Yook JH. Metallic stent placement in the palliative treatment of malignant gastroduodenal obstructions: prospective evaluation of results and factors influencing outcome in 213 patients. *Gastrointest Endosc* 2007; 66: 256-264
- 樊友本, 程英升, 陈尼维, 许惠敏, 杨喆, 汪昱, 郑起, 黄玉耀, 冯昌宁. 支架植入治疗左半结肠直肠癌所致

- 的急性梗阻. 外科理论与实践 2006; 11: 496-499
- 20 Fan YB, Cheng YS, Chen NW, Xu HM, Yang Z, Wang Y, Huang YY, Zheng Q. Clinical application of self-expanding metallic stent in the management of acute left-sided colorectal malignant obstruction. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 755-759
 - 21 Selinger CP, Ellul P, Smith PA, Cole NC. Oesophageal stent insertion for palliation of dysphagia in a District General Hospital: experience from a case series of 137 patients. *QJM* 2008; 101: 545-548
 - 22 Sanyal A, Maskell GF, Hohle R, Murray IA. An unusual complication of oesophageal stent deployment. *Br J Radiol* 2006; 79: e103-e105
 - 23 Han YM, Lee JM, Lee TH. Delayed colon perforation after palliative treatment for rectal carcinoma with bare rectal stent: a case report. *Korean J Radiol* 2000; 1: 169-171
 - 24 Jung GS, Song HY, Seo TS, Park SJ, Koo JY, Huh JD, Cho YD. Malignant gastric outlet obstructions: treatment by means of coaxial placement of uncovered and covered expandable nitinol stents. *J Vasc Interv Radiol* 2002; 13: 275-283
 - 25 Khot UP, Lang AW, Murali K, Parker MC. Systematic review of the efficacy and safety of colorectal stents. *Br J Surg* 2002; 89: 1096-1102
 - 26 黄种文, 张起楷, 翁明珠, 余磊. 食管支架治疗恶性食管狭窄并发症分析与处理. *中国临床医学影像杂志* 2007; 18: 305-307

编辑 李薇 电编 李薇

ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) CN 14-1260/R 2011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 0.625

本刊讯 一年一度的中国科技论文统计结果11月26日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, 2009年《世界华人消化杂志》总被引频次3 009次, 影响因子0.625, 综合评价总分49.4分, 分别位居内科学类48种期刊的第6位、第9位、第6位, 分别位居1 946种中国科技论文统计源期刊(中国科技核心期刊)的第87位、第378位、第351位; 其他指标: 即年指标0.112, 他引率0.79, 引用刊数473种, 扩散因子15.72, 权威因子1 170.03, 被引半衰期4.0, 来源文献量752, 文献选出率0.93, 地区分布数30, 机构分布数30, 基金论文比0.39, 海外论文比0.01。

经过多项学术指标综合评定及同行专家评议推荐, 《世界华人消化杂志》再度被收录为“中国科技论文统计源期刊”(中国科技核心期刊)。(编辑部主任: 李军亮 2010-11-28)

腹腔镜手术不同体位变化对呼吸力学的影响

郝冬, 张锦

■背景资料

腹腔镜手术较传统的直视手术具有创伤小、对机体环境干扰轻、手术并发症和死亡率低、住院时间短等优点。

郝冬, 张锦, 中国医科大学附属盛京医院麻醉科 辽宁省沈阳市 110004

郝冬, 沈阳市第一人民医院麻醉科 辽宁省沈阳市 110041
作者贡献分布: 郝冬与张锦共同完成论文; 此课题张锦提供研究思路; 研究过程由郝冬完成; 研究所用的仪器设备由中国医科大学盛京医院提供; 数据分析由郝冬统计; 本论文写作由郝冬执笔、张锦修改后完成。

通讯作者: 张锦, 教授, 110004, 辽宁省沈阳市, 中国医科大学附属盛京医院麻醉科. jinzhang_cmu2h@yahoo.com.cn
收稿日期: 2010-11-29 修回日期: 2011-01-18
接受日期: 2011-01-20 在线出版日期: 2011-02-28

Impact of body position on respiratory mechanics in patients during laparoscopic surgery

Dong Hao, Jin Zhang

Dong Hao, Jin Zhang, Department of Anesthesiology, Shengjing Hospital of China Medical University, Shenyang 110004, Liaoning Province, China

Dong Hao, Department of Anesthesiology, Shenyang First People's Hospital, Shenyang 110041, Liaoning Province, China

Correspondence to: Professor Jin Zhang, Department of Anesthesiology, Shengjing Hospital of China Medical University, Shenyang 110004, Liaoning Province, China. jinzhang_cmu2h@yahoo.com.cn

Received: 2010-11-29 Revised: 2011-01-18

Accepted: 2011-01-20 Published online: 2011-02-28

Abstract

AIM: To observe the effect of body position on respiratory mechanics in patients during laparoscopic surgery.

METHODS: Reserve trendelenburg position was adopted in 20 patients undergoing laparoscopic gastrectomy, while conventional trendelenburg position was adopted in 20 patients undergoing laparoscopic enterectomy. All patients were subjected to general anaesthesia, and controlled ventilation was selected. The compliance of the lungs (Cpat) and airway pressure (Paw) were monitored with the Drager primus anesthesia machine. PaCO₂ and PaO₂ were monitored with the Siemens Rapidlab1265 Blood Gas Analyzer. Measurements were divided into five distinct phases: 5 minutes after the induction of anesthesia (T1); 5 minutes after pneumoperitoneum (T2);

5 minutes after position change (T3); 5 minutes after adjusting ventilation parameters (T4); and 5 minutes after peritoneal deflation (T5). Respiratory mechanics were analyzed using SPSS15.0 statistics software.

RESULTS: PaCO₂ and Paw at T2 in the conventional trendelenburg group were significantly higher than those in the reserve trendelenburg group (both $P < 0.05$). PaO₂ and Cpat at T2 and T3 in the conventional trendelenburg group were significantly lower than those in the reserve trendelenburg group (all $P < 0.01$).

CONCLUSION: Body position can affect respiratory parameters during laparoscopic surgery.

Key Words: Pneumoperitoneum; Body position; Respiratory mechanics; General anesthesia

Hao D, Zhang J. Impact of body position on respiratory mechanics in patients during laparoscopic surgery. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(6): 650-653

摘要

目的: 研究腹腔镜手术气腹时不同体位变化对患者动脉血二氧化碳分压(PaCO₂)、动脉血氧分压(PaO₂)、肺顺应性(Cpat)、气道压(Paw)的影响, 为术中麻醉呼吸管理提供依据。

方法: 根据体位不同分两组, 头高位组: 取头高位30-45度, 腹腔镜行胃切除术20例; 头低位组: 取头低位30-45度, 腹腔镜结肠切除术20例。全部病例采用全身麻醉。用Drager primus麻醉机监测麻醉后5 min(T0), 气腹后5 min(T1), 体位改变后5 min(T2), 呼吸参数调整后5 min(T3), 放气腹后、拔除气管插管前5 min(T4)的Cpat, Paw; 用Siemens Rapidlab1265动脉血气分析仪监测各时间点的PaCO₂、PaO₂。用SPSS15.0统计学软件进行分析、处理。

结果: T2时头低位组PaCO₂、Paw高于头高位组(均 $P < 0.05$), PaO₂、Cpat明显低于头高位组($P < 0.01$); T3时头低位组Cpat、PaO₂仍明显低于头高位组($P < 0.01$); 两组拔管前各项指标无统计学差异。

■同行评议者

蔡开琳, 副教授, 华中科技大学同济医学院附属协和医院普外科

结论:体位变化使患者呼吸参数发生改变,头低位对呼吸力学的影响更为明显,但远不及头高位。因此,腹腔镜头低位手术时,特别重视呼吸力学和氧分压的变化,应加强术中呼吸管理。

关键词:气腹;体位变化;呼吸力学;全麻

郝冬,张锦.腹腔镜手术不同体位变化对呼吸力学的影响.世界华人消化杂志 2011; 19(6): 650-653
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/650.asp>

0 引言

腹腔镜手术较传统的直视手术具有创伤小、对机体内环境干扰轻、手术并发症和死亡率低、住院时间短等优点。同时,腹腔镜气腹也可对患者呼吸,循环产生影响。如何纠正对呼吸力学的负面影响,有关此报道尚少。本文通过观察气腹时体位变化对呼吸力学影响的对比,探讨其原因,找出解决方案,为术中呼吸管理提供依据。

1 材料和方法

1.1 材料 根据手术体位的不同分2组,头高位组:行腹腔镜胃切除择期手术患者20例,年龄40-65(平均 48.3 ± 5.1)岁;头低位组:行腹腔镜结肠切除择期手术患者20例,年龄44-72(平均 50.2 ± 7.3)岁。ASA级 I - II。记录麻醉后5 min,气腹后5 min,体位改变后5 min,呼吸参数调整后5 min,放气腹后、拔除气管插管前5 min的动脉血氧分压(PaO₂)、二氧化碳分压(PaCO₂)、气道压(Paw)、肺顺应性(Cpat)。

1.2 方法

1.2.1 麻醉、手术、气腹:术前药安定注射液10 mg,阿托品注射液0.5 mg术前30 min肌注。麻醉诱导用药:舒芬太尼注射液0.3 μg/kg,丙泊酚注射液1.5 mg/kg,琥珀胆碱注射液1.5 mg/kg;术中维持用药:吸入七氟烷,气体流量2 L/min, O₂:N₂O = 1:1,瑞芬太尼0.1-0.2 μg/(kg·min)持续泵入,维库溴铵注射液间断静注。头高位组术中取头高位30-45度,头低位组术中取头低位30-45度。气腹时应用注气压力14 mmHg,流量4 L/min。

1.2.2 麻醉机和呼吸力学监测仪:Drager primus麻醉机, Siemens Rapidlab1265动脉血气分析仪。呼吸参数设定潮气量(VT) = 体质量×8,呼吸频率(RR) = 13次/分。体位改变后5 min调整呼吸参数:VT = 体质量×6、7, RR = 16-18 次/min。维持气腹前、呼吸参数调整后的PaCO₂为35-45 mmHg。

统计学处理 应用SPSS15.0统计学软件对所

观察数据进行统计学分析、处理。所得数据用mean±SD表示,计量资料采用方差分析、*t*检验,*P*<0.05为显著性统计学差异。

2 结果

2.1 PaCO₂ 麻醉后,两组PaCO₂无统计学无差异;气腹后,两组PaCO₂明显增加,头低位组由T0时的 38.24 ± 3.11 增至 44.80 ± 2.41 ,头高位组由T0时的 37.60 ± 2.47 增至 43.82 ± 2.14 ;体位改变后,头低位组增至 48.48 ± 1.78 高于头高位组(*P*<0.05);呼吸参数调整后,头低位组回落到 39.82 ± 1.82 ,头高位组回落到 38.92 ± 1.62 ;放气腹后,两组PaCO₂均回落到气腹前水平(图1A)。

2.2 Paw 麻醉后,两组Paw统计学无差异;气腹后,两组Paw明显增加,头低位组由T0时的 13.55 ± 1.64 增至 18.65 ± 2.01 ,头高位组由麻醉后时的 13.85 ± 2.11 增至 20.15 ± 3.17 ;体位改变后,头低位组增至 (22.95 ± 1.67) 高于头高位组(*P*<0.05);呼吸参数调整后,头低位组回落到 18.55 ± 1.39 ,头高位组回落到 17.25 ± 2.10 ;放气腹后,两组Paw均回落到气腹前水平(图1B)。

2.3 Cpat 麻醉后,两组Cpat统计学无差异;气腹后,两组Cpat明显下降,头低位组由麻醉后时的 54.37 ± 7.00 降至 37.84 ± 5.60 ,头高位组由麻醉后时的 56.74 ± 7.58 降至 39.97 ± 8.38 ;体位改变后,头低位组降至 31.50 ± 5.05 明显低于头高位组(*P*<0.01);呼吸参数调整后,头低位组略微降至 29.87 ± 4.81 ,仍明显低于头高位组(*P*<0.01);放气腹后,两组Cpat均回落到气腹前水平(图1C)。

2.4 PaO₂ 吸入氧浓度为50%的情况下,麻醉后,两组PaO₂统计学无差异;气腹后,两组PaO₂明显下降,头低位组由麻醉后时的 226.39 ± 25.74 降至 183.38 ± 17.05 ,头高位组由麻醉后时的 232.96 ± 28.43 降至 187.06 ± 24.03 ;体位改变后,头低位组降至 151.58 ± 15.32 明显低于头高位组(*P*<0.01);呼吸参数调整后,头低位组升至 167.40 ± 18.05 ,仍明显低于头高位组(*P*<0.01);放气腹后,两组PaO₂均回落到气腹前水平(图1D)。

3 讨论

腹腔镜技术由于创伤小、术后恢复快、住院时间短、术后疼痛轻等优点^[1],被越来越多的应用于外科手术。腹腔镜下胃肠道手术的优点也得到认同^[2-4],同时也为广大患者所接受,也是现代科技发展之必然趋势。但腹腔镜手术中有许多风险值得我们注意,国外报道腹腔镜手术并发

■**相关报道**
国外报道腹腔镜手术并发症的发生率为0.8%-2.9%。

■ 同行评价
本文对临床工作中麻醉管理具有一定的指导意义。

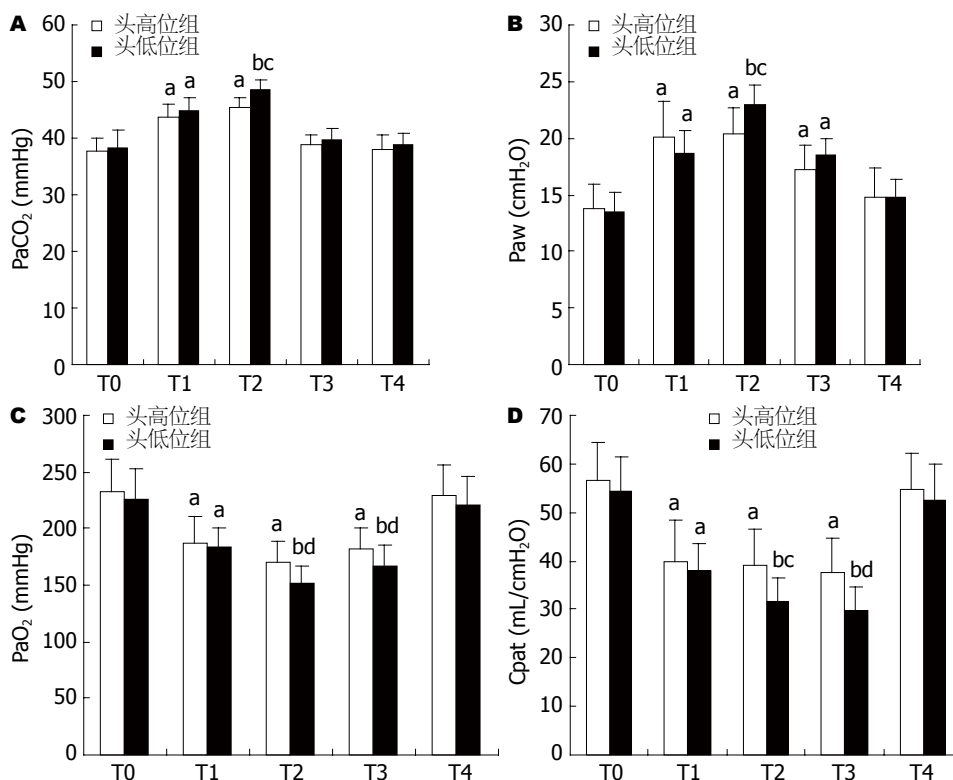


图1 腹腔镜手术不同体位变化时的PaCO₂、Paw、Cpat和PaO₂变化。A: PaCO₂; B: Paw; C: PaO₂; D: Cpat. T0: 麻醉后5 min; T1: 气腹后5 min; T2: 体位改位后5 min; T3: 呼吸参数调整后5 min; T4: 拔除气管插管前5 min。^aP<0.05, ^bP<0.01 vs T0; ^cP<0.05, ^dP<0.01 vs 头高位组。

症的发生率为0.8%-2.9%^[5]。如: 气体栓塞^[6]、皮下气肿^[6]、静脉血栓形成等^[7,8], 随时危及患者生命。除此之外, 术中不同体位变化也可致使麻醉风险增加。我们对腹腔镜下不同体位对呼吸力学的影响进行研究。研究表明麻醉后, 两组各项指标间统计学无差异($P>0.05$); 气腹后, 两组间PaCO₂、Paw均增加($P<0.05$)且增加幅度间统计学无差异($P>0.05$), Cpat、PaO₂均降低($P<0.05$), 且降低幅度间统计学无差异($P>0.05$)。而体位变化对呼吸力学有很大影响。头高位时, PaCO₂进一步增高($P<0.05$), Paw也进一步增高($P<0.05$), 而Cpat进一步下降($P<0.05$), PaO₂也进一步下降($P<0.05$); 头低位时, PaCO₂进一步增高至($P<0.01$), Paw进一步增高($P<0.01$), Cpat进一步下降($P<0.01$), PaO₂进一步下降($P<0.01$)。结果提示: 无论头高位还是头低位时, 气腹均可使PaCO₂、Paw进一步增高、Cpat、PaO₂进一步降低。同时, 头低位组PaCO₂、Paw高于头高位组($P<0.05$), Cpat、PaO₂明显低于头高位组($P<0.01$)。

这是由于气腹使腹腔压力增加、膈肌上移使胸腔容积减小, 致使气道压增高、胸肺顺应性可减少20%-30%^[9], 引起的肺泡通气量下降, 同时心输出量下降, 死腔通气增加所导致。本研

究结果表明头低位对呼吸力学影响更严重, 其发生机制可能与下列因素有关: (1)头低位内脏更易将膈肌向胸腔挤压, 胸腔压力进一步增加, 肺通气量进一步减少, 气道压上升, 呼吸系统顺应性进一步下降^[10-12]; (2)头低位时, 下肢静脉血回流增多, 肺血容量增加, 通气/血流失调, 造成PaCO₂上升、PaO₂下降^[13]。

因气腹导致腹内压、胸内压升高, 增加潮气量只能增加胸内压力加重心肺负担, 最终引起Paw和PaCO₂增加, Cpat下降, 肺泡舒缩功能降低, 呼吸阻力增大, 心率加速, 心排血功能降低。因此, 必须采取减低胸腔压力的方法来纠正^[10]。为了使两组患者肺泡通气量增加, 我们的研究采用减少原潮气量的1/8-1/4, 增加呼吸次数3-5次, 适度增加肺泡通气量的方法。呼吸参数调整后两组的PaCO₂及Paw均降至正常范围。因潮气量下降, 两组Cpat稍有下降, 但与呼吸参数改变前Cpat无统计学差异($P>0.05$)。可头低位组Cpat仍明显低于头高位组Cpat(29.87 ± 4.81 vs 37.66 ± 7.11 , $P<0.01$), 头低位组PaO₂仍明显低于头高位组PaO₂(167.40 ± 18.05 vs 182.14 ± 19.07 , $P<0.01$)。

研究结果提示头低位组Cpat、PaO₂比头高位组改变明显可能与血流改变有密切的关联。

头低位组全身血液淤积在肺, 导致肺血容量增多, 通气/流失失调, 不利于气体交换, 导致体内二氧化碳蓄积, 甚至引起酸碱平衡紊乱; 肺毛细血管受酸性代谢产物的影响通透性增强, 使液体渗漏到肺间质, 滤过的液体及蛋白量超过肺淋巴引流的代偿能力时, 则出现血管外肺水储留, 使肺内压力增加, Cpat下降^[14,15], 进而PaO₂下降。放气腹后、拔除气管插管前两组患者间PaCO₂、PaO₂、Paw, Cpat均与气腹前指标无统计学差异。

总之, 体位变化使患者呼吸参数发生变化, 头低位对呼吸力学的影响更为明显, PaCO₂、Paw、明显增高, Cpat、PaO₂明显降低; 通过呼吸参数调整, 呼吸力学得到明显改善, 但远不及头高位, 因此, 腹腔镜头低位手术时, 特别重视呼吸力学和氧分压的变化, 应加强术中呼吸管理。

4 参考文献

- 常旭飞, 杨璐. 不同体位二氧化碳气腹对呼吸参数的影响. 临床医学 2008; 28: 29-30
- 梁伟, 宁忠良, 朱志强. 腹腔镜辅助结直肠癌根治术42例临床报告. 中国临床保健杂志 2009; 12: 57-59
- Lacy AM, García-Valdecasas JC, Delgado S, Castells A, Taurá P, Piqué JM, Visa J. Laparoscopy-assisted colectomy versus open colectomy for treatment of non-metastatic colon cancer: a randomised trial. *Lancet* 2002; 359: 2224-2229
- 余佩武. 腹腔镜胃癌根治术的原则与评价. 中国普外基础与临床杂志 2009; 16: 1-5
- Yao M, Tulandi T. Current status of surgical and nonsurgical management of ectopic pregnancy. *Fertil Steril* 1997; 67: 421-433
- 冷金花, 郎景和. 腹腔镜手术并发症的诊断与治疗. 中国现代手术学杂志 2001; 5: 69-72
- Vecchio R, Cacciola E, Martino M, Cacciola RR, MacFadyen BV. Modifications of coagulation and fibrinolytic parameters in laparoscopic cholecystectomy. *Surg Endosc* 2003; 17: 428-433
- Catheline JM, Capelluto E, Gaillard JL, Turner R, Champault G. Thromboembolism prophylaxis and incidence of thromboembolic complications after laparoscopic surgery. *Int J Surg Investig* 2000; 2: 41-47
- 齐敦益, 马正良, 曾因明. 旁气流通气监测观察腹腔镜胆囊切除术对呼吸功能的影响. 临床麻醉学杂志 2000; 16: 490-492
- 张锦, 李莉, 邵娟. 腹腔镜胆囊切除术气腹对呼吸力学的影响及其呼吸参数的调整. 中国内镜杂志 2005; 11: 22-24
- Carry PY, Gallet D, François Y, Perdrix JP, Sayag A, Gilly F, Eberhard A, Bannesson V, Baconnier P. Respiratory mechanics during laparoscopic cholecystectomy: the effects of the abdominal wall lift. *Anesth Analg* 1998; 87: 1393-1397
- Puri GD, Singh H. Ventilatory effects of laparoscopy under general anaesthesia. *Br J Anaesth* 1992; 68: 211-213
- 杨云丽, 麻伟青, 李琪. 腹腔镜术中体位对呼吸循环功能的影响. 临床麻醉学杂志 2006; 22: 198-200
- 张锦, 王庆善, 陈华. 体外循环再灌注对先天性心脏病小儿呼吸力学的影响. 中华麻醉学杂志 1999; 19: 251-252
- 张锦, 韩宁, 王文祥. VSD体外循环前后血液流变学变化及其对呼吸力学的影响. 临床麻醉学杂志 1998; 14: 144-146

编辑 曹丽鸥 电编 何基才

ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) CN 14-1260/R 2011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)