

结直肠癌外周血肿瘤标志物的研究进展

张会涛, 刘晓珺, 沈滨, 杜雅菊

张会涛, 刘晓珺, 杜雅菊, 哈尔滨医科大学附属第二医院消化内科 黑龙江省哈尔滨市 150086

沈滨, 哈尔滨医科大学附属第二医院普外科 黑龙江省哈尔滨市 150086

杜雅菊, 教授, 主任医师, 主要从事消化系肿瘤的临床和基础研究。黑龙江省卫生厅科研课题基金资助项目, No. 2007-303

作者贡献分布: 本文综述由张会涛、刘晓珺及沈滨完成; 杜雅菊审校。

通讯作者: 杜雅菊, 教授, 主任医师, 150086, 黑龙江省哈尔滨市南岗区保健路148号, 哈尔滨医科大学附属第二医院消化内科。

duyaju@medmail.com.cn

电话: 0451-86605143

收稿日期: 2010-12-15 修回日期: 2011-03-12

接受日期: 2011-03-16 在线出版日期: 2011-04-08

Progress in research of tumor markers in peripheral blood of patients with colorectal cancer

Hui-Tao Zhang, Xiao-Jun Liu, Bin Shen, Ya-Ju Du

Hui-Tao Zhang, Xiao-Jun Liu, Ya-Ju Du, Department of Gastroenterology, the Second Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150086, Heilongjiang Province, China

Bin Shen, Department of General Surgery, the Second Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150086, Heilongjiang Province, China

Supported by: the Medical Science and Technology Project of Health Department of Heilongjiang Province, No. 2007-303

Correspondence to: Professor Ya-Ju Du, the Second Affiliated Hospital of Harbin Medical University, 148 Baojian Road, Nangang District, Harbin 150086, Heilongjiang Province, China. duyaju@medmail.com.cn

Received: 2010-12-15 Revised: 2011-03-12

Accepted: 2011-03-16 Published online: 2011-04-08

Abstract

Colorectal cancer is one of the most common malignant tumors. It can be cured if found and treated early. Advances in molecular biology make it possible to screen colorectal cancer using tumor markers in peripheral blood of patients. However, the relationship between tumors and tumor markers is very complicated, and more tumor markers need to be found. The aim of this paper is to review the recent progress in research of tumor markers in peripheral blood of patients with colorectal cancer.

Key Words: Tumor markers; Colorectal cancer; Pe-

ripheral blood

Zhang HT, Liu XJ, Shen B, Du YJ. Progress in research of tumor markers in peripheral blood of patients with colorectal cancer. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2011; 19(10): 991-995

摘要

结直肠癌是临幊上常见的恶性肿瘤之一, 如能早期发现、早期治疗, 则有可能治愈。随着分子生物学的发展, 外周血中检测肿瘤标志物在结直肠癌筛查中的应用, 结直肠癌的早期发现成为可能。然而, 肿瘤与其标志物之间的关系错综复杂, 这就需要我们寻找相关的肿瘤标志物来进行检测。本文就常用及新发现的外周血肿瘤标志物综述如下。

关键词: 肿瘤标志物; 结直肠癌; 外周血

张会涛, 刘晓珺, 沈滨, 杜雅菊. 结直肠癌外周血肿瘤标志物的研究进展. 世界华人消化杂志 2011; 19(10): 991-995

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/991.asp>

0 引言

结直肠癌是临幊上常见的恶性肿瘤之一。在美国, 由于一系列筛查项目的开展, 其发病率逐年下降^[1]。然而, 在我国, 随着人民生活饮食习惯的改变、人口老龄化的发展及卫生资源分配的不合理, 结直肠癌发病率却逐年上升^[2]。这就需要我们寻找一种简单、经济而有效的方法来进行结直肠癌的筛查。而肿瘤标志物成为目前研究的热点, 其对于临幊上诊断肿瘤、检测肿瘤的复发和转移、判断肿瘤诊断治疗效果和预后以及群体随访观察等均有较大的实用价值。

自1869年Thomas Ashworth首次在外周血中发现癌细胞以来, 肿瘤微转移逐步引起人们的重视。在前人研究的基础上, 检测循环中的肿瘤细胞成为可能, 其在癌转移中所起的关键作用已被证实^[3], 微转移是肿瘤转移、复发的基础。检测微转移肿瘤细胞已成为目前研究的热点。Ntouropoulos^[4]应用自动扫描荧光显微镜发现92%结直肠癌患者外周血中存在肿瘤细胞。而在

■背景资料

结直肠癌是临幊上常见的恶性肿瘤之一, 如能早发现早治疗, 有可能治愈。在患者外周血中寻找分子标志物成为目前研究的热点, 多项标志物联合检测可大大提前结直肠癌的确诊时间。

■同行评议者

郝立强, 副教授, 上海长海医院普外二科; 关玉盘, 教授, 首都医科大学附属北京朝阳医院消化科

■研发前沿

微转移是肿瘤转移、复发的基础。检测微转移肿瘤细胞已成为目前研究的热点。

胃肠道的治疗中，复发和转移是影响其远期疗效的主要原因。为了防止肿瘤转移，降低肿瘤患者死亡率，必须寻找肿瘤转移相关生物学标志。本文就结直肠癌外周血肿瘤标志物研究进展综述如下。

1 细胞角蛋白20

正常情况下，肿瘤细胞分泌一些蛋白质，通过分析这些蛋白质，可研究相关肿瘤的活性。细胞角蛋白(cytokeratin, CK)是分布于上皮细胞的中间纤维，是细胞结构的重要组成成分，表达于胃肠道及其肿瘤的上皮细胞，其包含许多个成员，CK20 mRNA是一种组织特异性基因，首先被用于检测结直肠癌患者骨髓的癌细胞，且证明具有高度特异性^[5]。CK的表达与肿瘤转移有关，而与年龄及性别无关^[6]。通过RT-PCR检测CK20 mRNA的表达来诊断结直肠癌微转移的方法，由于其高度的敏感度和特异度，已成为术前判断结直肠癌患者是否发生微转移、识别高危患者以及判断临床治疗效果的指标。CK20在正常人血循环中检测不到，而在癌症患者外周血中阳性表达率为44.8%-69.0%，在骨髓中阳性表达率为77.6%，在门静脉中阳性表达率为74.1%，三者之间表达相似^[7]。因此仅通过外周血的检测即可获得同骨髓或门静脉同样高的敏感性和特异性。然而Yu等^[8]通过分析44例结直肠癌患者及18例良性病变者外周血及门静脉中CK20的表达，发现CK20在门静脉中的表达较外周血中明显升高，外周血中表达率越高，术后复发率越高，仅门静脉中表达阳性的患者复发率将明显下降。另有研究表明^[9]，CK20在结直肠癌组的表达与腺瘤中重度不典型增生、腺瘤轻度不典型增生及炎性息肉组之间没有明显差别，与正常组间有差别，因此认为CK20作为结直肠癌分子标志物的证据不够充分，但对结直肠癌及增生性疾病监测尚有一定意义。

2 血管内皮生长因子

血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)最早于1989年由Ferrara等从牛脑垂体滤泡星状细胞的条件培养基中提纯，由于VEGF可以增加血管通透性，故又成为血管通透因子，也称为血管调理素，是一种相对分子质量为34 000-42 000 Da的二聚糖蛋白。实验证实，实体瘤只有具备了血管生成表型后，才能恶性生长和发生转移^[10]。VEGF可以刺激毛细血管

形成、上皮细胞增生、肿瘤侵袭和转移，因此在肿瘤的发生发展中起了关键的作用。VEGF家族受体与配体包括VEGF-A、VEGF-B、VEGF-C、VEGF-D、血小板源性生长因子及VEGFR1、VEGFR2、VEGFR3和神经磷脂1、神经磷脂2。其中VEGF-A、VEGFR1、VEGFR2已被国外学者证实与肿瘤分期及预后有关^[11]。另有研究报道^[12]，与正常对照组相比，结直肠癌患者血中VEGF-C并没有明显升高，但与肿瘤浸润深度及淋巴转移有关。因此对于结直肠癌治疗方式的选择具有重要意义。

3 癌胚抗原

癌胚抗原(carcinoembryonic antigen, CEA)在1965年首先由Gold和Freeman等从结直肠癌中发现。由于此抗原也出现在胚胎细胞上，故称癌胚抗原。CEA属细胞表面的糖蛋白家族，位于19号染色体，有10个基因组成，可分泌36种不同的糖蛋白，其中最主要的一种是CEA，CEA含45%-55%碳水化合物，蛋白约40%，相对分子质量大约为200 000 Da，由641个氨基酸组成。他既存在于正常组织，如结肠、胃、唾液腺、食管、宫颈、汗腺及前列腺等，在良性疾病如肝硬化、溃疡性结肠炎、胰腺炎、梗阻性黄疸中也有一定量的表达。有报道称，约90%的结肠癌中其表达增加，但在其他肿瘤中如胃癌、肺癌、壶腹周围癌、卵巢癌等^[13]表达也增加。由于其低敏感性及特异性，已不单独作为一种癌症筛查的肿瘤标志物。他与生存素(Survivin)或CK20联合检测，可使敏感性明显提高(60.9% vs 39.1%)^[14]。陈恺杰^[15]亦报道了CEA与CA199、CA242联合检测可使其敏感性提高(83.6% vs 46.7%)。他亦可用于无症状但CEA较正常人高的人群的筛查，通过筛查和随访可发现约16.59%的癌症患者，其阳性率明显高于一般人群的癌症发生率^[13]。由于CEA是一种细胞黏附分子，与肿瘤的浸润和转移有关，直接关系患者预后，术前高CEA水平、术后CEA清除率指数下降的较非指数下降的群组有更高的生存率^[16]，因此可用于评估患者预后及术后复发^[17]。

4 生存素

Survivin是凋亡抑制蛋白(inhibitor of apoptosis proteins, IAP)家族的成员之一，1997年由Ambrosini等利用效应细胞蛋白酶受体1 cDNA在人类基因组库的杂交筛选中将其分离出来，表达于细胞周期的G₂/M期，其相对分子

质量为14 700 Da, 由 1.5×10^3 个碱基对组成, 基因定位于染色体17q25, 含3个内含子和4个外显子, 蛋白含有142个氨基酸。Survivin具有抑制细胞凋亡和调节细胞有丝分裂的双重功能, 是联系细胞周期和细胞凋亡的重要因子。Survivin在正常人中几乎不表达, 但在癌症患者中, 有学者研究^[18], 应用qRT-PCR每10 mL外周血中可发现1-10个肿瘤细胞。另有报道, 外周血中Survivin mRNA在结直肠癌中的表达较良性病变或健康志愿者明显增高, 而与在其他实体瘤患者中的表达无明显差异。在检测微转移肿瘤细胞中, Survivin的表达是一个渐进的过程, 随着癌前细胞向癌细胞的转化, Survivin的表达逐渐升高^[19]。但Ranade等^[19]研究Survivin在乳腺癌中的表达显示, 在良性乳腺疾病中Survivin表达率为53%, 在恶性肿瘤中表达率为70%-90%, 随着癌前细胞向癌细胞的转化, Survivin的表达逐渐降低, 可能与人体激素或所选标本较少有关, 但总的来说, 癌组织较正常或良性病变明显增加。

5 人端粒酶逆转录酶

端粒是真核细胞染色体末端的特殊DNA-蛋白质结构, 是含有大量的(TTAGGG)n串联重复并富含G的重复序列, 这些序列在进化中高度保守。大多数普通体细胞的端粒会随周期性复制而逐渐缩短, 最终达到一个使染色体完整性丧失的临界点, 细胞增殖停止。而端粒酶抑制端粒的缩短, 使得端粒永生, 其激活被认为是细胞癌变的重要一步。肿瘤细胞中普遍存在端粒酶活性, 且与肿瘤预后有关。有研究表明^[20], 活化端粒酶及长端粒者肿瘤的预后较差。端粒酶亦在分裂旺盛的组织如外周血淋巴细胞、造血干细胞、生殖细胞、胚胎体细胞、毛发、皮肤、子宫内膜等组织中表达, 其作用仅是部分补偿末端复制问题造成的端粒进行性缩短。端粒酶结构上主要包括三部分: 端粒RNA成分(hTR)、端粒酶相关蛋白(TP1/TP2)和人端粒酶逆转录酶(human telomerase reverse transcriptase, hTERT)。hTR是端粒酶延长端粒的模板, TP1可介导端粒酶与端粒之间相互作用; hTERT其N-端包含一个DNA-结合区域, 对端粒酶活性的表达调节具有重要意义, 是端粒酶活性的决定性因素^[21]。Terrin等^[22]通过实验证实hTERT在结直肠癌中的阳性表达率为96%, 敏感度和特异度分别为92%和100%, 在I、II期肿瘤中hTERT表达水平较III、IV期明显降低。另外Terrin还首次报道了肿

瘤分期与hTERT转录及翻译拷贝数的关系, 使人们对于hTERT的研究进入分子水平。

6 斯钙素

斯钙素(stanniocalcin, STC)是一种糖蛋白激素, 最早在硬骨鱼中发现, 在鱼的腮和肠抑制钙的摄取, 促进肾对磷酸盐的吸收, 防止血钙过多。1995年发现在人中也存在STC样蛋白(以后命名为STC1), 随后在人和小鼠上克隆出了编码STC的cDNA。3年后又从人类骨肉瘤cDNA文库中克隆了哺乳动物第2个STC(STC2)。前者定位于染色体8p11.2-p21, 由4个外显子约13 kb组成, 后者定位于染色体5q35, 含有与STC1相同的外显子-内含子分界线。在正常组织中, STC不表达^[23]。近年来人们发现, STC与人类肿瘤的发生发展也有着密切的关系。尤其对于胃肠道的肿瘤具有较高的敏感性和特异性。吴平平等^[24]发现外周血中hSTC1 mRNA的表达与肿瘤的浸润深度、临床病理分期、淋巴结转移有显著相关性; 对于有无远处转移, 只有结直肠癌与之有相关性, 而食管癌和胃癌则没有, 因此对于结直肠癌治疗方案的选择及预后有重要意义。

7 肿瘤抑制候选基因4

结直肠癌的发生、发展是由于一系列癌基因的激活和抑癌基因的失活引起的。肿瘤抑制候选基因4(tumor suppressor candidate 4, TUSC4), 是近年新发现的一个抑癌基因, 目前国内对其研究较少, 无论在体内还是体外均能抑制肿瘤的活性^[25], 亦称为NPRL2(nitrogen permease regulator-like 2)。该基因定位于人染色体3p21.3区, 其cDNA全长1 351 bp, 有11个外显子和10个内含子, 编码380个氨基酸的蛋白质, 从低级生物酵母到人类都具有一个高度保守的序列^[26]。人类TUSC4基因表达于许多正常组织(包括心脏、脑、骨骼肌、肝脏、肾脏、胰腺和肺等), 而在人类多种肿瘤组织中的表达却明显降低(如肾癌、肺癌、宫颈癌、乳腺癌、鼻咽癌、肾细胞癌和卵巢癌等)^[25]。在I期小细胞肺癌中, 100%TUSC4存在下调, 在非小细胞肺癌中73%表达下调^[27]。鉴于其高敏感性, TUSC4可作为一个选择性的基因用于临床肿瘤的筛查。顺铂可广泛应用于各种肿瘤的化疗, 但由于其耐药性的增加明显降低了临床治疗效果。Ueda等^[28]通过试验证实, TUSC4的失活可导致顺铂对非小细胞肺癌治疗的抵抗, 可能是通过调节DNA错配修

■相关报道

杜雅莉等应用RT-PCR的方法, 检测结直肠癌患者外周血中CK20、hTERT、Survivin的表达。结直肠癌患者外周血hTER-T、Survivin mRNA的表达对结直肠癌的早期诊断有意义, 可望成为早期诊断的分子标志物。

■创新盘点

本文着重从血中肿瘤标志物进行综述,为结直肠癌临床筛查提供早期、可靠、简便、安全、有效的方法。

复及凋亡信号来实现的,而TUSC4的再激活可增加顺铂的毒性作用,从而增加顺铂的敏感性。Otani等^[29]发现在肝癌组织和癌旁组织中TUSC4 mRNA的表达无差异,但其表达的上调与肿瘤大小相关,通过单因素和多因素分析发现TUSC4 mRNA的高表达是肝癌生存期的独立预后因素。目前尚无TUSC4与结直肠癌相关性的报道。

8 结论

到目前为止,尚未发现一个既敏感又特异的肿瘤标志物可单独应用于临床结直肠肿瘤的检测。临幊上常将几项相关的标志物组成联合标志物组,同时对某一肿瘤进行检测,应用多变量分析的方法,提高临幊诊断的准确性。肿瘤标志物联合检测可弥补单项检测的不足,提高诊断的敏感性。

9 参考文献

- 1 Jemal A, Siegel R, Xu J, Ward E. Cancer statistics, 2010. *CA Cancer J Clin* 2010; 60: 277-300
- 2 Zhao P, Dai M, Chen W, Li N. Cancer trends in China. *Jpn J Clin Oncol* 2010; 40: 281-285
- 3 Allen JE, El-Deiry WS. Circulating Tumor Cells and Colorectal Cancer. *Curr Colorectal Cancer Rep* 2010; 6: 212-220
- 4 Ntouourpi TG, Ashraf SQ, McGregor SB, Turney BW, Seppo A, Kim Y, Wang X, Kilpatrick MW, Tsipouras P, Tafas T, Bodmer WF. Detection of circulating tumour cells in peripheral blood with an automated scanning fluorescence microscope. *Br J Cancer* 2008; 99: 789-795
- 5 Soeth E, Röder C, Juhl H, Krüger U, Kremer B, Kalthoff H. The detection of disseminated tumor cells in bone marrow from colorectal-cancer patients by a cytokeratin-20-specific nested reverse-transcriptase-polymerase-chain reaction is related to the stage of disease. *Int J Cancer* 1996; 69: 278-282
- 6 Guo Y, Wang J, Huang P. [Clinical Significance of CK20, CK19, CEA mRNAs in Peripheral Blood from Lung Cancer Patients.]. *Zhongguo Feiai Zazhi* 2009; 12: 1013-1017
- 7 Zhang XW, Yang HY, Fan P, Yang L, Chen GY. Detection of micrometastasis in peripheral blood by multi-sampling in patients with colorectal cancer. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 436-438
- 8 Yu YJ, Liu YD, Xu X, Ma XW. [Diagnostic significance of cytokeratin 19 and 20 expression on micrometastasis of colorectal cancer]. *Zhonghua Weichang Waikai Zazhi* 2009; 12: 48-51
- 9 杜雅菊, 刘晓珺, 金英敏, 曲波, 李宝杰. RT-PCR寻找大肠癌患者外周血早期分子标记物的研究. 世界华人消化杂志 2006; 14: 280-286
- 10 Wang YD, Wu P, Mao JD, Huang H, Zhang F. Relationship between vascular invasion and microvessel density and micrometastasis. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 6269-6273
- 11 Eppenberger M, Zlobec I, Baumhoer D, Terracciano L, Lugli A. Role of the VEGF ligand to receptor ratio in the progression of mismatch repair-proficient colorectal cancer. *BMC Cancer* 2010; 10: 93
- 12 Miyazaki T, Okada N, Ishibashi K, Ogata K, Oh-sawa T, Ishiguro T, Nakada H, Yokoyama M, Matsuki M, Kato H, Kuwano H, Ishida H. Clinical significance of plasma level of vascular endothelial growth factor-C in patients with colorectal cancer. *Jpn J Clin Oncol* 2008; 38: 839-843
- 13 Lim YK, Kam MH, Eu KW. Carcinoembryonic antigen screening: how far should we go? *Singapore Med J* 2009; 50: 862-865
- 14 Shen C, Hu L, Xia L, Li Y. Quantitative real-time RT-PCR detection for survivin, CK20 and CEA in peripheral blood of colorectal cancer patients. *Jpn J Clin Oncol* 2008; 38: 770-776
- 15 陈恺杰. 3种血清肿瘤标志物在诊断大肠癌中的价值. 广东医学院学报 2005; 23: 384-385
- 16 Kim JY, Kim NK, Sohn SK, Kim YW, Kim KJ, Hur H, Min BS, Cho CH. Prognostic value of postoperative CEA clearance in rectal cancer patients with high preoperative CEA levels. *Ann Surg Oncol* 2009; 16: 2771-2778
- 17 Filiz AI, Sucullu I, Kurt Y, Karakas DO, Gulec B, Akin ML. Persistent high postoperative carcinoembryonic antigen in colorectal cancer patients—is it important? *Clinics (Sao Paulo)* 2009; 64: 287-294
- 18 Bertazza L, Mocellin S, Marchet A, Pilati P, Gabrieli J, Scalberta R, Nitti D. Survivin gene levels in the peripheral blood of patients with gastric cancer independently predict survival. *J Transl Med* 2009; 7: 111
- 19 Ranade KJ, Nerurkar AV, Phulpagar MD, Shirsat NV. Expression of survivin and p53 proteins and their correlation with hormone receptor status in Indian breast cancer patients. *Indian J Med Sci* 2009; 63: 481-490
- 20 Oh BK, Kim H, Park YN, Yoo JE, Choi J, Kim KS, Lee JJ, Park C. High telomerase activity and long telomeres in advanced hepatocellular carcinomas with poor prognosis. *Lab Invest* 2008; 88: 144-152
- 21 Sealey DC, Zheng L, Taboski MA, Cruickshank J, Ikura M, Harrington LA. The N-terminus of hTERT contains a DNA-binding domain and is required for telomerase activity and cellular immortalization. *Nucleic Acids Res* 2010; 38: 2019-2035
- 22 Terrin L, Rampazzo E, Pucciarelli S, Agostini M, Bertorelle R, Esposito G, DelBianco P, Nitti D, De Rossi A. Relationship between tumor and plasma levels of hTERT mRNA in patients with colorectal cancer: implications for monitoring of neoplastic disease. *Clin Cancer Res* 2008; 14: 7444-7451
- 23 Nakagawa T, Martinez SR, Goto Y, Koyanagi K, Kitago M, Shingai T, Elashoff DA, Ye X, Singer FR, Giuliano AE, Hoon DS. Detection of circulating tumor cells in early-stage breast cancer metastasis to axillary lymph nodes. *Clin Cancer Res* 2007; 13: 4105-4110
- 24 吴平平, 黄培林, 郭英, 谢维. 外周血人类斯钙素1基因表达与消化道恶性肿瘤微转移关系的研究. 南京医科大学学报(自然科学版) 2003; 24: 355-363
- 25 Li J, Wang F, Haraldson K, Protopopov A, Duh FM, Geil L, Kuzmin I, Minna JD, Stanbridge E, Braga E, Kashuba VI, Klein G, Lerman MI, Zabarovsky ER. Functional characterization of the candidate tumor suppressor gene NPRL2/G21 located in 3p21.3C. *Cancer Res* 2004; 64: 6438-6443
- 26 Ji L, Nishizaki M, Gao B, Burbee D, Kondo M, Kamabayashi C, Xu K, Yen N, Atkinson EN, Fang B, Lerman MI, Roth JA, Minna JD. Expression of several genes in the human chromosome 3p21.3 ho-

- mozygous deletion region by an adenovirus vector results in tumor suppressor activities in vitro and in vivo. *Cancer Res* 2002; 62: 2715-2720
- 27 Senchenko VN, Anedchenko EA, Kondratieva TT, Krasnov GS, Dmitriev AA, Zabarovska VI, Pavlova TV, Kashuba VI, Lerman MI, Zabarovsky ER. Simultaneous down-regulation of tumor suppressor genes RBSP3/CTDSPL, NPRL2/G21 and RASSF1A in primary non-small cell lung cancer. *BMC Cancer* 2010; 10: 75
- 28 Ueda K, Kawashima H, Ohtani S, Deng WG, Ra-
- voori M, Bankson J, Gao B, Girard L, Minna JD, Roth JA, Kundra V, Ji L. The 3p21.3 tumor suppressor NPRL2 plays an important role in cisplatin-induced resistance in human non-small-cell lung cancer cells. *Cancer Res* 2006; 66: 9682-9690
- 29 Otani S, Takeda S, Yamada S, Sakakima Y, Sugimoto H, Nomoto S, Kasuya H, Kanazumi N, Nagasaka T, Nakao A. The tumor suppressor NPRL2 in hepatocellular carcinoma plays an important role in progression and can be served as an independent prognostic factor. *J Surg Oncol* 2009; 100: 358-363

■同行评价
本文内容全面, 结构清晰, 具有较好的可读性.

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》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)

EphA2在缺氧条件下的表达及其对食管癌细胞体外三维培养的影响

王频, 王璐, 丁宗励, 曾楷峰, 金海林, 朱宏, 施瑞华

■背景资料

EphA2可以通过一系列信号转导途径促进肿瘤细胞的迁移、侵袭和周围基质的重塑, 最终导致某些高度恶性肿瘤细胞形成血管生成拟态。这种独特的血液供应方式现已成为恶性肿瘤治疗的研究热点之一, 但通过分子生物学手段探讨EphA2在食管鳞癌细胞血管生成拟态过程中的研究并不多见。

王频, 王璐, 丁宗励, 曾楷峰, 金海林, 朱宏, 施瑞华, 南京医科大学第一附属医院消化科 江苏省南京市 210029
王频, 硕士, 主要从事食管癌的分子机制研究。

国家自然科学基金资助项目, No. 30770991; No. 30800511
作者贡献分布: 王频对此文作主要贡献; 此课题由王频、朱宏及施瑞华设计; 研究过程由王频、王璐、丁宗励、曾楷峰及金海林操作完成, 研究所用新试剂及分析工具由施瑞华提供; 数据分析由王频与朱宏完成; 本论文写作由王频与施瑞华完成。
通讯作者: 施瑞华, 教授, 主任医师, 210029, 江苏省南京市, 南京医科大学第一附属医院消化内科, ruihuaishi@126.com
电话: 025-83674636

收稿日期: 2011-01-03 修回日期: 2011-03-09
接受日期: 2011-03-16 在线出版日期: 2011-04-08

Expression of EphA2 under hypoxia promotes vasculogenic mimicry in esophageal squamous cell carcinoma cells

Pin Wang, Lu Wang, Zong-Li Ding, Kai-Feng Zeng, Hai-Lin Jin, Hong Zhu, Rui-Hua Shi

Pin Wang, Lu Wang, Zong-Li Ding, Kai-Feng Zeng, Hai-Lin Jin, Hong Zhu, Rui-Hua Shi, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210029, Jiangsu Province, China
Supported by: National Natural Science Foundation of China, Nos. 30770991, 30800511

Correspondence to: Professor Rui-Hua Shi, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210029, Jiangsu Province, China, ruihuaishi@126.com

Received: 2011-01-03 Revised: 2011-03-09
Accepted: 2011-03-16 Published online: 2011-04-08

Abstract

AIM: To investigate the effect of expression of Eph receptor tyrosine kinase A2 (EphA2) under normoxia and hypoxia on vasculogenic mimicry in esophageal squamous cell carcinoma cells.

METHODS: The expression of EphA2 mRNA and protein was measured by RT-PCR and Western blot in two esophageal cancer cell lines Eca109 and TE13 incubated under normoxia and hypoxia. Eca109 and TE13 cells were then transfected with a plasmid harboring small interfering RNA (siRNA) targeting EphA2. Tubular network formation in Eca109 and TE13 cells before and after siRNA transfection was analyzed

using the three-dimensional Matrigel culture system under normoxia and hypoxia.

RESULTS: The expression of EphA2 in Eca109 and TE13 cells was obviously enhanced under hypoxia ($P < 0.05$). The numbers of tubular networks remarkably increased in both Eca109 and TE13 cells under hypoxia ($P < 0.05$). Although the numbers of tubules obviously increased under both hypoxia and normoxia, the increase was more significant under hypoxia ($P < 0.01$). Tubule-forming ability of cells transfected with a plasmid harboring small interfering RNA targeting EphA2 was significantly reduced.

CONCLUSION: Enhanced expression of EphA2 under hypoxia can increase the numbers of tubular networks in esophageal squamous cell carcinoma cells. Tubule-forming ability of cells transfected with a plasmid harboring siRNA targeting EphA2 was significantly inhibited. EphA2 may play an essential role in the formation of vasculogenic mimicry under hypoxia.

Key Words: Esophageal squamous cell carcinoma; Eph receptor tyrosine kinase A2; Vasculogenic mimicry; RNA interference

Wang P, Wang L, Ding ZL, Zeng KF, Jin HL, Zhu H, Shi RH. Expression of EphA2 under hypoxia promotes vasculogenic mimicry in esophageal squamous cell carcinoma cells. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2011; 19(10): 996-1000

摘要

目的: 探讨在正常氧分压和缺氧条件下, 食管癌细胞中上皮细胞激酶A2(EphA2)表达变化及其对体外三维培养的影响。

方法: 正常氧分压及缺氧条件下培养食管癌Eca109及TE13细胞, RT-PCR及Western blot分别监测细胞中EphA2表达的变化; EphA2 miRNA干扰质粒转染Eca109和TE13细胞后, 采用Matrigel体外三维培养观察正常氧分压和缺氧条件下, Eca109及TE13细胞在抑制EphA2表达前后管腔形成数量的变化。

结果: 缺氧条件下Eca109和TE13细胞中EphA2表达明显增加($P<0.05$). Matrigel体外培养中, 缺氧条件下其管腔形成数量明显高于正常氧分压下($P<0.05$). miRNA有效抑制EphA2表达后, 在正常氧分压和缺氧条件下, 管腔数量明显下降, 但常氧条件下数量减少更为明显($P<0.01$).

结论: 缺氧环境能诱导肿瘤细胞EphA2高表达, 并导致体外三维培养模型中管腔数量增加, 抑制EphA2表达能够阻断此现象的发生, 提示EphA2在缺氧条件下血管生成拟态形成过程中发挥重要作用.

关键词: 食管鳞癌; 上皮细胞激酶A2; 血管生成拟态; RNA干扰

王频, 王璐, 丁宗励, 曾楷峰, 金海林, 朱宏, 施瑞华. EphA2在缺氧条件下的表达及其对食管癌细胞体外三维培养的影响. 世界华人消化杂志 2011; 19(10): 996–1000

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/996.asp>

0 引言

近年来研究发现, 在部分恶性程度较高的肿瘤组织内存在一种由PAS染色阳性的细胞外基质包绕, 肿瘤细胞相互连接形成规律的袢环状结构网络. 在这种血管样结构中可以见到大量红细胞, 称为血管生成拟态(angiogenesis mimicry, VM)^[1]. 研究提示VM在肿瘤组织微循环中发挥重要作用, 其发生与上皮细胞激酶A2(Eph tyrosine kinases A2, EphA2)、血管上皮钙黏附素(VE-cadherin)、黏附斑激酶(focal adhesion kinase, FAK)、蛋白酪氨酸激酶(tyrosine kinase, TrK)等活化有关^[2-4]. 我们前期研究发现食管癌及胃癌中也存在VM现象, 并与肿瘤内部缺氧环境有关^[5]. 本研究拟采用VM的体外实验模型-体外三维培养, 观察在缺氧条件下调控EphA2基因表达对三维培养系统中细胞管腔结构形成的影响.

1 材料和方法

1.1 材料 人食管鳞癌细胞株Eca109和TE13购自中科院上海细胞所. EphA2的pcDNATM6.2-GW/EmGFPmiR miRNA及阴性对照质粒(Invitrogen), DMEM(Gibco), LipofectamineTM2000(Invitrogen), 克隆环(Sigma), 小鼠抗人EphA2 mAb(R&D), 鼠抗人的Tubulin- α mAb(Sigma), HRP标记羊抗小鼠二抗(Rockland), BCA蛋白定量试剂盒、化学发光试剂盒(Pierce), 蛋白电泳及转膜系统(Bio-Rad), 细胞培养箱(Thermo)以及人工基质Matrigel(BD公司).

1.2 方法

1.2.1 细胞培养: 细胞复苏后于含100 mL/L的胎牛血清的DMEM培养液中, 37 °C, 5% CO₂条件下培养, 或于37 °C, 10 mL/L O₂(50 mL/L CO₂, 940 mL/L N₂)的缺氧条件下培养.

1.2.2 细胞转染: 转染前1 d取对数生长期的Eca109和TE13, 细胞2.0×10⁵个接种于35 mm培养皿, 培养于不含抗生素的DMEM培养液, 次日观察细胞长至约90%聚合开始转染. 取EphA2干扰质粒4 μg和LipofectamineTM2000 10 μL分别稀释于250 μL不含抗生素的DMEM培养液, 5 min内混匀, 室温孵育20 min后加入培养皿. 6 h后更换新鲜的含100 mL/L胎牛血清DMEM培养液. 其后每2-3 d换液. 细胞转染后24 h按1:12的比例传代, 48 h后开始用含6 mg/L的杀稻瘟菌素Blasticidin(筛选浓度在转染前制杀伤曲线后获得)的选择性培养液进行筛选, 约4 wk后挑取克隆在6 mg/L的杀稻瘟菌素Blasticidin培养液中继续传代, 扩大培养. 同步转染阴性对照质粒. RT-PCR、Western blot鉴定干扰效果.

1.2.3 Western blot: 常规制备总蛋白, 超声破碎后4 °C, 12 000 r/min, 离心10 min, 取上清, 采用BCA法定量蛋白浓度. 取总蛋白40 μg于100 °C加热变性5 min后上样, 行120 V恒压SDS-PAGE电泳, 250 mA恒流冰浴电转至PVDF膜, 5%脱脂奶粉室温封闭1 h后, TBST漂洗5 min×3, 加入适当浓度一抗(EphA2 1:300, Tubulin- α 1:5 000)4 °C孵育过夜. 次日TBST漂洗5 min×3后再加HRP标记的二抗(羊抗鼠1:4 000)室温孵育1 h, TBST漂洗5 min×3. ECL化学发光法显影.

1.2.4 半定量RT-PCR: TRIzol一步法提取细胞总RNA, 按RNA逆转录试剂盒行逆转录合成cDNA. 引物以Primer 5软件自行设计, 交由上海申能博彩公司合成, EphA2上游引物5'-CTCACACACCCGTATGGCAAAG-3', 下游引物5'-TCCTGGTCGCCAGACATCAC-3', 扩增片段长度104 bp. 扩增结束后取PCR产物上样, 2%琼脂糖凝胶电泳, EB染色, Tanon凝胶成像系统摄片并分析结果.

1.2.5 体外三维培养: 取24孔培养板每孔加入300 μL Matrigel原液(以上操作在冰浴上进行), 37 °C培养箱内孵育30 min待其凝固后, 再往每孔内添加1 mL浓度为5×10⁸/L的各组细胞悬液, 继续分别在常规环境氧浓度或于10 mL/L O₂(50 mL/L CO₂, 940 mL/L N₂)的缺氧条件下培养12 h, 观察各组食管癌细胞的管状结构排列情况及完整

■创新点

本文通过基因干扰技术调控EphA2表达, 进而观察EphA2表达变化对缺氧条件下食管癌血管生成拟态的影响, 证实EphA2是这一过程的重要环节.

■应用要点

EphA2对于肿瘤转移及血管生成拟态均具有重要意义,阐明他在肿瘤发病中的作用机制,将有助于发现针对肿瘤转移和血管生成拟态的治疗新靶点。

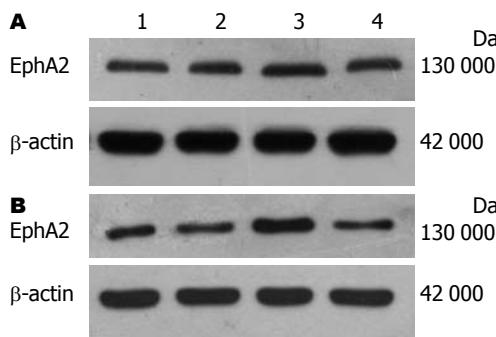


图1 Western blot检测Eca109和TE13细胞在缺氧条件下EphA2蛋白表达变化。A: Eca109; B: TE13. 1: 正常氧分压; 2: 缺氧6 h; 3: 缺氧12 h; 4: 缺氧24 h.

程度。随机于倒置显微镜下($\times 200$),取上、下、左、右、中心5个视野,计数管状结构数量,取每个视野的平均值,重复实验3次。

统计学处理采用SPSS11.0统计软件处理数据。Tanon Gis软件对感光胶片条带进行灰度值分析,以目的条带与内参照条带的比值代表目的基因蛋白的表达水平。 $P<0.05$ 为有统计学意义。

2 结果

2.1 缺氧对EphA2表达的影响 缺氧条件下Eca109和TE13中EphA2 mRNA和蛋白表达随着缺氧时间的延长逐步增加,到缺氧12 h达顶峰,后逐渐减弱。选定以缺氧12 h作为后续实验缺氧时间(图1)。

2.2 细胞转染 Eca109/7、TE13/6转染效率高,RT-PCR及Western blot证实EphA2 mRNA及蛋白表达均被显著抑制($P<0.01$,图2,3),转染阴性对照质粒的细胞EphA2 mRNA和蛋白水平表达与未转染的细胞无明显差异。

2.3 三维培养 常氧情况下,Eca109、TE13及空载体组细胞在Matrigel上均能模拟血管内皮细胞的特性并相互连接,约12 h后形成典型的血管网状样结构,呈单个环状或多个环相连的网格状。缺氧后细胞变形能力加强,形成管状结构数目较常氧时明显增加($P<0.05$)。转染组细胞在常氧和缺氧情况下下体外管道形成能力均被显著抑制,环状结构断裂,多为不完全封闭环形及线状结构,管状结构数目明显少于对照组($P<0.05$,图4)。

3 讨论

恶性肿瘤组织内部的缺氧环境是肿瘤内环境的一大特点,同时也是促使肿瘤血管生成、侵袭、转移、耐药等恶性行为的诱因。实体恶性肿瘤为了维持上述恶性行为必须获得血液供应。

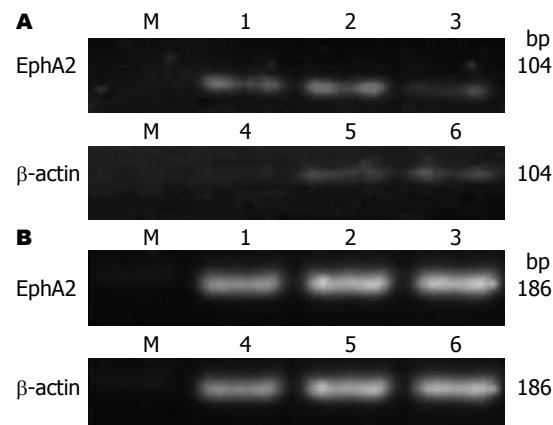


图2 RT-PCR检测Eca109和TE13细胞转染EphA2 miRNA后EphA2 mRNA表达变化。A: Eca109; B: TE13. M: Marker; 1: Eca109; 2: Eca109/Neo; 3: Eca109/miEphA2; 4: TE13/miEphA2; 5: TE13/Neo; 6: TE13.

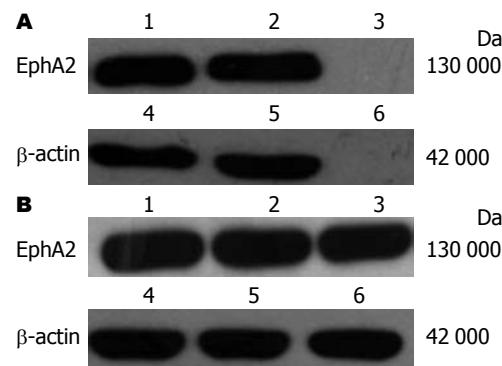


图3 Western blot检测Eca109和TE13细胞转染EphA2 miRNA后EphA2蛋白表达变化。A: Eca109; B: TE13. 1: Eca109; 2: Eca109/Neo; 3: Eca109/miEphA2; 4: TE13; 5: TE13/Neo; 6: TE13/miEphA2.

人们长期认为血管发生是肿瘤获得血液供应的唯一途径,直到1999年,Maniotis等^[1]在对眼葡萄膜色素瘤及转移性皮肤黑色素瘤的研究中发现一种全新的肿瘤微循环方式-VM。相继研究发现,肝癌、卵巢癌、结肠癌、骨肉瘤等多种恶性肿瘤中均存在VM现象^[6-11]。缺氧环境能够显著促进VM发生。Hendrix等^[12,13]在人皮肤黑色素瘤的裸鼠移植瘤模型中通过诱导移植瘤的缺氧环境,发现VM现象明显增加。缺氧环境似乎可以诱导高侵袭性的黑色素瘤细胞及其他能形成VM的恶性细胞基因型发生改变,选择性表达某些血管内皮相关细胞基因,从而能够作为血管内皮细胞样细胞参与VM。我们通过改变细胞培养的环境氧浓度,也证实低氧环境能够促进三维培养中食管癌细胞形成管腔趋势^[14]。

目前认为参与VM的基因包括EphA2、VE-cadherin、FAK、TrK等^[15-18]。其中EphA2又称上皮细胞激酶(epithelium cell kinase, ECK),是

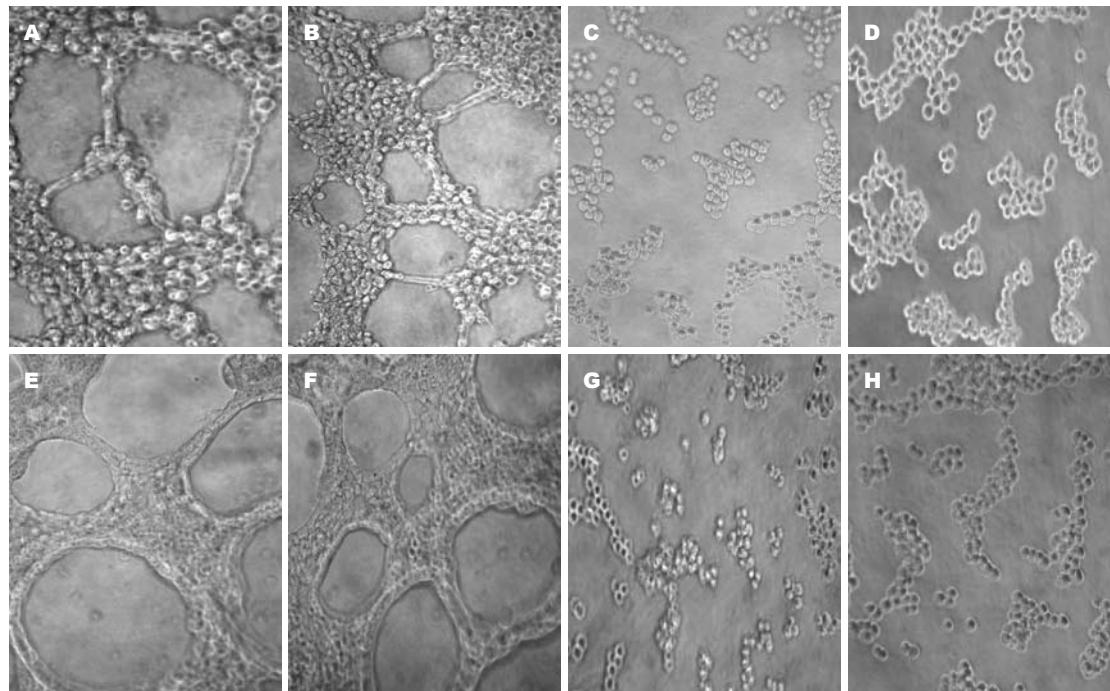


图 4 在不同氧浓度下Eca109和TE13细胞转EphA2 miRNA后三维培养管状结构形成。A: Eca109, 常氧; B: Eca109, 缺氧; C: Eca109/miEphA2, 常氧; D: Eca109/miEphA2, 缺氧; E: TE13, 常氧; F: TE13, 缺氧; G: TE13/miEphA2, 常氧; H: TE13/miEphA2, 缺氧。

Eph受体酪氨酸激酶家族中的一员,他最先由Scavelli等^[9]化上皮细胞cDNA文库中筛选得到。正常低表达时,EphA2与其配体ephrin-A结合,通过Eph-ephrin信号转导机制负调节细胞的灶状黏附和增殖^[20];而当EphA2过表达或功能异常时,可以引起细胞恶变,促进肿瘤细胞的迁移、侵袭和周围基质的重塑,最终导致某些高度恶性肿瘤血管内皮细胞形成毛细血管样结构以及肿瘤细胞形成VM^[21-25]。研究发现食管癌中存在EphA2异常表达^[26],本研究应用RNAi技术有效抑制EphA2表达后,发现食管癌细胞体外管道形成能力显著抑制,提示食管癌中VM形成可能与EphA2表达有关。这与Margaryan等的研究结论一致^[16,27-29]。

本研究发现缺氧能够同时促进EphA2表达和VM的形成。为了明确在缺氧条件下EphA2表达增强是作为VM增加的始动因素还是伴随现象,我们设计了EphA2 miRNA干扰质粒并成功转染食管癌细胞中。发现在有效抑制EphA2表达后,无论在正常还是缺氧条件下,肿瘤细胞管腔形成能力均受到影响。而且食管癌细胞在抑制EphA2表达后进行缺氧培养,亦不能阻止VM形成能力的减弱。这进一步证实EphA2表达是食管癌VM的重要环节,而且EphA2可能涉及到缺氧环境促进食管癌VM形成的信号途径。

缺氧诱导因子-1(hypoxia-inducible factors, HIF-1)是目前机体适应低氧环境的关键信号分子,在大多数肿瘤细胞包括食管癌中表达增加^[30-32]。本研究组前期研究发现^[33],缺氧条件下食管癌细胞株中HIF-1 α 和EphA2同时升高;而在针对HIF-1 α 的稳定干扰株中,缺氧亦不能使EphA2表达增加。Vihanto等^[34]的研究也支持这一结果,提示缺氧条件下EphA2的表达受HIF-1 α 的调控。结合本次研究结果,提示缺氧诱导肿瘤细胞VM形成过程中,HIF-1 α -EphA2通路可能发挥了关键作用。这一结果为进一步阐明食管癌VM形成机制提供了实验依据。

4 参考文献

- Maniotis AJ, Folberg R, Hess A, Seftor EA, Gardner LM, Pe'er J, Trent JM, Meltzer PS, Hendrix MJ. Vascular channel formation by human melanoma cells in vivo and in vitro: vasculogenic mimicry. *Am J Pathol* 1999; 155: 739-752.
- Hess AR, Seftor EA, Gardner LM, Carles-Kinch K, Schneider GB, Seftor RE, Kinch MS, Hendrix MJ. Molecular regulation of tumor cell vasculogenic mimicry by tyrosine phosphorylation: role of epithelial cell kinase (Eck/EphA2). *Cancer Res* 2001; 61: 3250-3255.
- Baeten CI, Hillen F, Pauwels P, de Bruine AP, Baeten CG. Prognostic role of vasculogenic mimicry in colorectal cancer. *Dis Colon Rectum* 2009; 52: 2028-2035.
- Pasquale EB. Journal club. A biologist is gratified to find reconciliation for a conflicted receptor. *Nature*

■同行评价
本文选题恰当,设计合理,具有较好的创新性。

- 2009; 461: 149
- 5 华杰, 施瑞华, 张红杰, 于莲珍, 朱宏, 肖斌, 张国新, 郝波. RNA干扰HIF-1 α 对血管生成拟态相关基因表达的影响. 世界华人消化杂志 2009; 17: 1913-1918
- 6 Sun T, Zhao N, Zhao XL, Gu Q, Zhang SW, Che N, Wang XH, Du J, Liu YX, Sun BC. Expression and functional significance of Twist1 in hepatocellular carcinoma: its role in vasculogenic mimicry. *Hepatology* 2010; 51: 545-556
- 7 Kuwai T, Kitadai Y, Tanaka S, Onogawa S, Matsutani N, Kaio E, Ito M, Chayama K. Expression of hypoxia-inducible factor-1alpha is associated with tumor vascularization in human colorectal carcinoma. *Int J Cancer* 2003; 105: 176-181
- 8 Millimaggi D, Mari M, D' Ascenzo S, Giusti I, Pavan A, Dolo V. Vasculogenic mimicry of human ovarian cancer cells: role of CD147. *Int J Oncol* 2009; 35: 1423-1428
- 9 Scavelli C, Nico B, Cirulli T, Ria R, Di Pietro G, Mangieri D, Bacigalupo A, Mangialardi G, Coluccia AM, Caravita T, Molica S, Ribatti D, Dammacco F, Vacca A. Vasculogenic mimicry by bone marrow macrophages in patients with multiple myeloma. *Oncogene* 2008; 27: 663-674
- 10 Cai XS, Jia YW, Mei J, Tang RY. Tumor blood vessels formation in osteosarcoma: vasculogenesis mimicry. *Chin Med J (Engl)* 2004; 117: 94-98
- 11 袁禧先, 马晓颖, 王凤荣, 王哲, 王晓, 王树鸿. 骨桥蛋白与缺氧诱导因子-1在大肠腺瘤及癌组织中的表达及意义. 世界华人消化杂志 2009; 17: 3174-3179
- 12 Hendrix MJ, Seftor RE, Seftor EA, Gruman LM, Lee LM, Nickoloff BJ, Miele L, Sheriff DD, Schatteman GC. Transendothelial function of human metastatic melanoma cells: role of the microenvironment in cell-fate determination. *Cancer Res* 2002; 62: 665-668
- 13 Hendrix MJ, Seftor EA, Kirschmann DA, Quaranta V, Seftor RE. Remodeling of the microenvironment by aggressive melanoma tumor cells. *Ann N Y Acad Sci* 2003; 995: 151-161
- 14 金海林, 施瑞华, 朱宏, 张伟峰, 曾楷峰, 郝波. 缺氧诱导因子-1 α 与EphA2在食管鳞状细胞癌中的表达及其相关性研究. 中华消化杂志 2010; 30: 184-188
- 15 Hess AR, Seftor EA, Gruman LM, Kinch MS, Seftor RE, Hendrix MJ. VE-cadherin regulates EphA2 in aggressive melanoma cells through a novel signaling pathway: implications for vasculogenic mimicry. *Cancer Biol Ther* 2006; 5: 228-233
- 16 Margaryan NV, Strizzi L, Abbott DE, Seftor EA, Rao MS, Hendrix MJ, Hess AR. EphA2 as a promoter of melanoma tumorigenicity. *Cancer Biol Ther* 2009; 8: 279-288
- 17 Hess AR, Hendrix MJ. Focal adhesion kinase signaling and the aggressive melanoma phenotype. *Cell Cycle* 2006; 5: 478-480
- 18 Paulis YW, Soetekouw PM, Verheul HM, Tjan-Heijnen VC, Griffioen AW. Signalling pathways in vasculogenic mimicry. *Biochim Biophys Acta* 2010; 1806: 18-28
- 19 Lindberg RA, Hunter T. cDNA cloning and characterization of eck, an epithelial cell receptor protein-tyrosine kinase in the eph/elk family of protein kinases. *Mol Cell Biol* 1990; 10: 6316-6324
- 20 Miao H, Wei BR, Peehl DM, Li Q, Alexandrou T, Schelling JR, Rhim JS, Sedor JR, Burnett E, Wang B. Activation of EphA receptor tyrosine kinase inhibits the Ras/MAPK pathway. *Nat Cell Biol* 2001; 3: 527-530
- 21 Mitra S, Duggineni S, Koolpe M, Zhu X, Huang Z, Pasquale EB. Structure-activity relationship analysis of peptides targeting the EphA2 receptor. *Biochemistry* 2010; 49: 6687-6695
- 22 Himanen JP, Goldgur Y, Miao H, Myshkin E, Guo H, Buck M, Nguyen M, Rajashankar KR, Wang B, Nikolov DB. Ligand recognition by A-class Eph receptors: crystal structures of the EphA2 ligand-binding domain and the EphA2/ephrin-A1 complex. *EMBO Rep* 2009; 10: 722-728
- 23 Miao H, Li DQ, Mukherjee A, Guo H, Petty A, Cuttler J, Basilion JP, Sedor J, Wu J, Danielpour D, Sloan AE, Cohen ML, Wang B. EphA2 mediates ligand-dependent inhibition and ligand-independent promotion of cell migration and invasion via a reciprocal regulatory loop with Akt. *Cancer Cell* 2009; 16: 9-20
- 24 Salaita K, Nair PM, Petit RS, Neve RM, Das D, Gray JW, Groves JT. Restriction of receptor movement alters cellular response: physical force sensing by EphA2. *Science* 2010; 327: 1380-1385
- 25 Trinidad EM, Zapata AG, Alonso-Colmenar LM. Eph-ephrin bidirectional signaling comes into the context of lymphocyte transendothelial migration. *Cell Adh Migr* 2010; 4: 363-367
- 26 叶翥飞, 李惠武, 庞作良, 李卉, 田勍, 陈艳, 郭文佳, 李秀梅, 王洪江. EphA2、hMLH1、hMSH2 mRNA在新疆维吾尔及汉族食管鳞癌中的表达及意义. 世界华人消化杂志 2009; 17: 3635-3639
- 27 Merritt WM, Kamat AA, Hwang JY, Bottsford-Miller J, Lu C, Lin YG, Coffey D, Spannuth WA, Nugent E, Han LY, Landen CN, Nick AM, Stone RL, Coffman K, Bruckheimer E, Broaddus RR, Gershenson DM, Coleman RL, Sood AK. Clinical and biological impact of EphA2 overexpression and angiogenesis in endometrial cancer. *Cancer Biol Ther* 2011; 10: 1306-1314
- 28 Lee JW, Stone RL, Lee SJ, Nam EJ, Roh JW, Nick AM, Han HD, Shahzad MM, Kim HS, Mangala LS, Jennings NB, Mao S, Gooya J, Jackson D, Coleman RL, Sood AK. EphA2 targeted chemotherapy using an antibody drug conjugate in endometrial carcinoma. *Clin Cancer Res* 2010; 16: 2562-2570
- 29 Kung B, Zhao H, Hicks SL, Tang XX, Ikegaki N. Biological significance of EPHA2 expression in neuroblastoma. *Int J Oncol* 2009; 35: 845-850
- 30 Henze AT, Acker T. Feedback regulators of hypoxia-inducible factors and their role in cancer biology. *Cell Cycle* 2010; 9: 2749-2763
- 31 Seeber LM, Horree N, van der Groep P, van der Wall E, Verheijen RH, van Diest PJ. Necrosis related HIF-1 α expression predicts prognosis in patients with endometrioid endometrial carcinoma. *BMC Cancer* 2010; 10: 307
- 32 Tzao C, Lee SC, Tung HJ, Hsu HS, Hsu WH, Sun GH, Yu CP, Jin JS, Cheng YL. Expression of hypoxia-inducible factor (HIF)-1 α and vascular endothelial growth factor (VEGF)-D as outcome predictors in resected esophageal squamous cell carcinoma. *Dis Markers* 2008; 25: 141-148
- 33 杜琰萍, 施瑞华, 肖斌, 朱宏, 凌亭生, 张国新, 郝波. 食管鳞癌细胞系EC-109中缺氧诱导因子-1 α 的表达意义. 世界华人消化杂志 2006; 14: 1247-1251
- 34 Vihanto MM, Plock J, Erni D, Frey BM, Frey FJ, Huynh-Do U. Hypoxia up-regulates expression of Eph receptors and ephrins in mouse skin. *FASEB J* 2005; 19: 1689-1691

弹簧幽门植入术结合高盐热淀粉糊灌胃诱导大鼠萎缩性胃炎模型的方法及评价

史瑞, 李晓红, 方蕾, 李健, 蔡大勇, 李军祥, 刘礼剑

史瑞, 李晓红, 李军祥, 刘礼剑, 北京中医药大学东方医院 北京市 100078

方蕾, 蔡大勇, 中国医学科学院 中国协和医科大学药用植物研究所 北京市 100193

李健, 北京中医药大学基础医学院组织与胚胎学教研室 北京市 100029

史瑞, 在读博士研究生, 主要从事中医脾胃病方面的研究.

国家自然科学基金资助项目, No. 30973741

作者贡献分布: 本课题由史瑞、李军祥及李健共同设计; 研究过程由史瑞、李晓红及刘礼剑共同完成; 数据分析由史瑞、方蕾及蔡大勇共同完成; 写作由史瑞完成、李健及李军祥指导.

通讯作者: 李军祥, 教授, 主任医师, 博士生导师, 100078, 北京丰台区方庄芳星园一区6号, 北京中医药大学东方医院消化内科. lijx970508@sohu.com

电话: 010-67689766

收稿日期: 2010-12-23 修回日期: 2011-02-18

接受日期: 2011-03-02 在线出版日期: 2011-04-08

Development of a rat model of atrophic gastritis by implantation of a spring into the pylorus in combination with intragastric administration of hot salty starch paste

Rui Shi, Xiao-Hong Li, Lei Fang, Jian Li, Da-Yong Cai, Jun-Xiang Li, Li-Jian Liu

Rui Shi, Xiao-Hong Li, Jun-Xiang Li, Li-Jian Liu, Dongfang Hospital, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100078, China

Lei Fang, Da-Yong Cai, Institute of Medicinal Plant Development, Peking Union Medical College, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100193, China

Jian Li, Department of Histology, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30973741

Correspondence to: Professor Jun-Xiang Li, Department of Gastroenterology, Dongfang Hospital, Beijing University of Chinese Medicine, No.6 in 1st District, Fangxingyuan, Fangzhuang, Fengtai District, Beijing 100078, China. lijx970508@sohu.com

Received: 2010-12-23 Revised: 2011-02-18

Accepted: 2011-03-02 Published online: 2011-04-08

Abstract

AIM: To establish a novel rat model of atrophic gastritis according to the characteristics of the disease in Chinese patients.

METHODS: Fifty-one healthy male Wistar

rats were randomized into five groups: control group ($n = 10$), sham operation group ($n = 10$), 2-mo model group ($n = 10$), 3-mo model group ($n = 10$), and 4-mo model group ($n = 11$). Atrophic gastritis was induced in rats of the three model groups by implanting a spring into the pylorus and intragastrically administering hot salty starch paste. The control group did not undergo any operation and was treated with saline twice a week, i.g., for 4 wk, while the sham operation group underwent the same operation as model rats except for spring implantation and was treated with saline for the same duration. Serum levels of PGE2 and gastrin were measured by radioimmunoassay. Pathological assessment of gastric changes was performed after intragastric administration.

RESULTS: Serum levels of PGE2 and gastrin in the 4-mo model group were lower than those in the control and sham operation groups (all $P < 0.05$ or 0.01). All the rats of the model groups had histological manifestations in gastric mucosa mimicking atrophic gastritis. These pathological changes deteriorated in a time-dependent manner. The 4-mo model group had the highest constituent ratio of gastric mucosal volume (relative to the control group), followed by the 3- and 2-mo model groups and sham operation group (20.44%, 17.28%, 9.82 %, 3.30 %). The 4-mo model group also had the highest potency unit of gastric mucosa volume, followed by the 3- and 2-mo model groups, sham operation group and control group (1.00, 0.868, 0.527, 0.1884, 0.000). Time-response curve equation of gastric mucosa atrophy potency (Y, volume change relative percentage) and logarithmic time required to induce model (X, h) was $Y = 0.1882 + 0.9108 / [1 + 10^{(11.8280 - 1.3709X)}]$ ($R = 0.9992$), and half atrophy time was 1 545 h (95% CI: 618.4 h - 3 858 h) (approximately 2 mo).

CONCLUSION: A rat model of atrophic gastritis was successfully established by implanting a spring into the pylorus and intragastrically administering hot salty starch paste.

■背景资料

萎缩性胃炎属慢性胃炎, 是消化系统的常见病和疑难病之一, 也是常见的胃癌前疾病之一.

■同行评议者
陈治水, 主任医师, 中国人民解放军第211医院中医科

■研发前沿
研究符合我国人群AG发病特点且稳定便捷的一系列动物模型是目前研究的热点。通过模拟胆汁反流、进食高热高盐食物来制备AG动物模型也是众多研究者探索的热点。

Key Words: Atrophic gastritis; Model; Rat; Prostaglandin E2; Gastrin

Shi R, Li XH, Fang L, Li J, Cai DY, Li JX, Liu LJ. Development of a rat model of atrophic gastritis by implantation of a spring into the pylorus in combination with intragastric administration of hot salty starch paste. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2011; 19(10): 1001-1008

入术结合高盐热淀粉糊灌胃诱导大鼠萎缩性胃炎模型的方法及评价. 世界华人消化杂志 2011; 19(10): 1001-1008
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/1001.asp>

摘要

目的: 建立及改良符合我国萎缩性胃炎(atrophic gastritis, AG)发病特点的大鼠模型并对模型进行评价。

方法: 健康、清洁级、♂、Wistar大鼠51只, 随机分为空白对照组(10只), 假手术组(10只), 造模2 mo组(10只), 造模3 mo组(10只), 造模4 mo组(11只), 空白组大鼠常规饲养, 待造模组大鼠手术完成后, 生理盐水灌胃2次/wk, 共4 wk. 假手术组手术过程同造模组但不植入弹簧, 术后生理盐水灌胃2次/wk, 共4 wk. 造模2、3、4 mo组行弹簧幽门植入术后, 予高盐热淀粉糊灌胃2次/wk, 分别在灌胃2、3、4 mo末取材, 放射免疫法测定灌胃4 mo末时血清PGE2、胃泌素(gastrin)水平, HE染色法连续观察灌胃2、3、4 mo时胃黏膜的病理变化。

结果: 造模4 mo时, 与空白对照组和假手术组比较, 其血清PGE2、gastrin水平均明显下降($P<0.05$ 或 0.01), 造模组胃黏膜符合AG表现, 且病变随造模时间延长逐渐加重; 与空白对照组比较, 假手术组、造模2、3、4 mo组的胃黏膜体积构成比依次降低3.30%($P>0.05$)、9.82%($P<0.05$)、17.28%($P<0.01$)、20.44%($P<0.01$); 胃黏膜体积构成比效能单位由低到高为空白对照组(0.000), 假手术组(0.1884), 模型2 mo组(0.527), 模型3 mo组(0.868), 模型4 mo组(1.000), 胃黏膜萎缩效能(Y, 体积变化相对百分比)与对数造模时间(X, h)的时效曲线方程为 $Y=0.1882+0.9108[1+10^{(11.828001-3.709X)}](R=0.9992)$, 胃黏膜萎缩半效时间为1 545 h(95%CI: 618.4 h-3 858 h), 约2 mo。

结论: 采用弹簧幽门植术配合高盐热淀粉糊灌胃法制备的大鼠AG模型, 符合长期胆汁反流、饮食过热过咸造成AG, 是一种符合我国人群AG发病特点、稳定而便捷的大鼠AG模型。

关键词: 萎缩性胃炎; 模型; 大鼠; 前列腺素E2; 胃泌素

史瑞, 李晓红, 方蕾, 李健, 蔡大勇, 李军祥, 刘礼剑. 弹簧幽门植

0 引言

萎缩性胃炎(atrophic gastritis, AG)是消化系统的常见病和疑难病之一, 由于AG调整患病率与胃癌调整死亡率呈明显正相关^[1], 研究逆转AG的方法对预防胃癌的发生具有非常重要的意义, 故亟待建立一种稳定、便捷、符合我国人群AG发病特点的AG动物模型, 这是进一步深入研究该领域的基础。我国人群AG多见B型萎缩, 即以胃窦黏膜萎缩为主, 胃体无明显萎缩, 而以自身免疫为基础的A型AG只有少数病例报道, 且极少数中重度AG患者经长期的演变可发展成胃癌^[2]。目前AG的动物模型主要有: (1)生物法: 如幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *H.pylori*)感染造模法^[3-6]; (2)免疫法: 如主动免疫法^[7]; (3)化学刺激法: 如水杨酸钠^[8]、氨水^[9]、去氧胆酸钠^[10]、阿司匹林^[11]、致癌剂^[12-14]、乙醇^[13]、雷尼替丁^[12,14]、热盐水^[15]灌胃; (4)放射法, 如运用放射元素⁶⁰Co分次照射腹部^[16]; (5)胃肠吻合术法^[17,18]; (6)基因工程法^[19,20]。但大多耗时较长, 造模时间大多在6 mo以上; 有些模型并不符合AG临床发病特点, 如以N-甲基-N'-硝基-N-亚硝基胍(N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine, MNNG)诱导的AG模型致瘤率过高, 主动免疫法制备的自身免疫型AG不符合我国AG患者发病特点。故研究一种符合我国人群AG患病特点, 且稳定、便捷的动物模型很有必要。本AG模型的造模方法从1993年开始摸索, 经过多次改进, 逐步摸索而成^[21-25]。本模型采用幽门弹簧植术配合高盐热淀粉糊灌胃造模, 符合长期胆汁反流、过多摄入过热过咸食物而致AG的特点。本次实验在造模过程中动态观察胃黏膜病理, 旨在摸索该模型的最适造模时间、稳定性和血清学特点, 为今后更深入研究AG奠定坚实的基础。

1 材料和方法

1.1 材料 Wistar大鼠51只, ♂, 体质量200 g±20 g, 清洁级, 由北京维通利华实验动物技术有限公司提供, 实验动物许可证编号: SCXK(京)2006-0009。大鼠饲养于清洁级实验室, 恒温(20 ℃±1 ℃)恒湿(50%-60%), 分笼饲养, 常规喂养清洁级标准颗粒饲料, 自由饮用除菌水。前列腺素E2(prostaglandin E2, PGE2)放射免疫测定试剂盒(北京华英生物技术研究所)、胃泌素(gastrin)

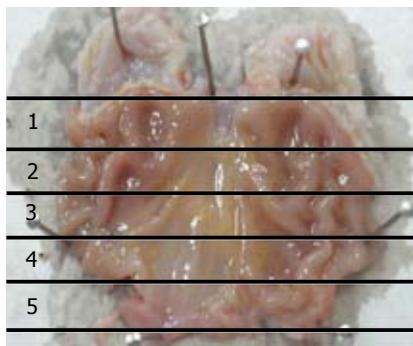


图1 取材部位示意图.

表1 造模对血清PGE2和血清胃泌素水平的影响 ($\mu\text{g/L}$, $n = 8$, mean \pm SD)

分组	PGE2	胃泌素
空白对照组	41.23 ± 6.17	92.88 ± 17.98
假手术组	41.14 ± 4.16	96.04 ± 19.13
模型组	$35.46 \pm 2.24^{\text{ac}}$	$68.37 \pm 5.83^{\text{eh}}$

■ 相关报道

Kato等研究发现增加淀粉类蔬菜的摄入, 使癌前病变进展加速, 淀粉类蔬菜在肠化生及胃萎缩方面影响较大。

放射免疫测定试剂盒(北京华英生物技术研究所). 活性金属环型165宫内节育器(上海医用缝合针厂); 氯化钠(分析纯, 北京化工厂); 可溶性淀粉(分析纯, 天津福晨化学试剂厂); 温度计; 防干烧电热杯; 分析天平(上海精密科学仪器有限公司天平仪器厂制造, 型号JA2003N); r-911全自动放免计数仪(中国科技大学实业总公司生产); SLEE MTM-全密闭真空组织处理机; SLEE石蜡切片机; 蔡司荧光正置显微镜(型号AXIO IMAGER A1)系统.

1.2 方法

1.2.1 AG模型制备: (1)制备幽门弹簧: 将活性金属环型165宫内节育器中硅橡胶和铜丝去掉, 拉直, 使弹簧螺距约0.02-0.03 cm, 并剪成约2 cm长的小段弹簧, 将该小段弹簧的两边断端弯入弹簧内, 确保其两端光滑, 不损伤胃黏膜. 所有弹簧高温蒸汽(137.3 kPa , 120°C , 30 min)灭菌后备用; (2)弹簧幽门植人术: 将♂Wistar大鼠(体质量240-260 g)禁食不禁水16 h后, 称质量, 以3.5%(10 mL/kg)的水合氯醛腹腔注射麻醉, 固定大鼠四肢及头部, 在无菌条件下开腹, 暴露胃, 在腺胃胃前壁距幽门环0.2 cm无或少血管处切一小口, 将一长约2 cm, 直径约0.2 cm的金属弹簧前1/3插入其幽门环进入十二指肠, 用缝线将弹簧两端及中央固定, 按手术常规逐层缝合胃及腹壁切口. 手术后禁食不禁水24 h, 连续3 d予青霉素(每只40万U/d)腹腔注射, 预防术后感染, 恢复性饲养1 wk; (3)药物造模方法: 术后第2周开始药物造模. 给予高盐热淀粉糊(含15%氯化钠, 25%可溶性淀粉, 60-70 °C)灌胃, 每只2 mL/d; 每周2次(周二、周五), 连续4 mo.

1.2.2 取材: (1)血清: 分别在造模2 mo末、3 mo末、4 mo末随机抽取10只大鼠和相应的空白组、假手术组大鼠, 常规麻醉, 腹主动脉取血, 室温静置1 h以上, 常温3 000 r/min离心10 min, 取血清备用; (2)胃组织: 取血后, 沿贲门、幽门剪开, 取出胃, 沿胃大弯剪开, 用自来水冲洗干

PGE2, 单因素方差分析, $F = 4.340$, ${}^{\text{a}}P = 0.018$ vs 空白对照组; ${}^{\text{c}}P = 0.019$ vs 假手术组; 胃泌素, 单因素方差分析, $F = 5.856$, ${}^{\text{e}}P = 0.011$ vs 空白对照组; ${}^{\text{h}}P = 0.005$ vs 假手术组.

净后, 取幽门与前胃与腺胃交界线连线的2/5部分(图1, 4号码所示区域为取材部位), 40 g/L中性甲醛固定24 h后换成PBS后备用.

1.2.3 放射免疫法测定: 运用放射免疫法测定大鼠血清中PGE2、胃泌素的水平.

1.2.4 肉眼观察: 按动物病理解剖规范, 观察记录标本的大体形态和解剖病变.

1.2.5 苏木素-伊红染色及形态计量: 常规梯度酒精脱水, 石蜡包埋, 6 μm 切片, HE染色, 20倍物镜下光镜观察质控苏木素分化时间(4 s最清晰), 光镜下观察记录的组织结构和细胞病变. 针对模型动物病变, 各组10倍物镜下随机采图10张, 使用Image-Pro Plus6.0图像分析系统, 对胃黏膜体积构成比进行形态计量; Prism软件计算取材部位所代表胃黏膜萎缩效能(Y, 体积变化相对百分比)与对数造模时间(X, h)的时效曲线方程, 得出胃黏膜萎缩半效时间.

统计学处理 计量资料采用mean \pm SD表示, 采用单因素方差分析, 数据采用SPSS16.0统计软件包进行统计分析.

2 结果

2.1 放射免疫法测定血清中PGE2、胃泌素水平

2.1.1 PGE2: 弹簧幽门植人术后高盐热淀粉糊灌胃4 mo即为模型组, 模型组血清中PGE2水平明显低于空白对照组($F = 4.34$, $P = 0.018$)和假手术组($F = 4.34$, $P = 0.019$, 表1, 图2).

2.1.2 胃泌素: 弹簧幽门植人术后高盐热淀粉糊灌胃4 mo即为模型组, 模型组血清中胃泌素水平明显低于空白对照组($F = 5.856$, $P = 0.011$)和假手术组($F = 5.856$, $P = 0.005$, 表1, 图3).

2.2 肉眼观察 空白对照组和假手术组: 前胃无明显变化, 腺胃黏膜被覆较多黏液; 模型组: 前胃无明显变化, 腺胃黏膜表面黄染, 胃窦小弯侧及其邻近前后壁黏膜皱襞略显平坦, 胃小凹密度增加, 肌层明显增厚(表2).

■创新盘点

目前符合中国人群AG发病特点、便捷稳定的动物模型较少,本模型模拟了人体长期胆汁反流,饮食过热、过咸造成的AG,其血清PGE2和胃泌素的水平符合人AG发病特点,而且通过连续取材,对不同造模时间模型的胃黏膜的形态学进行量化观察,并找到萎缩半效时间,使该模型的稳定性提高,可控性增强,减少造模周期。

表 2 AG模型大鼠大体病理变化汇总表(*n*)

分组	<i>n</i>	黏膜变薄	瘀点	溃疡
空白对照组	10	0	0	0
假手术组	10	0	0	0
造模2 mo组	10	5	0	0
造模3 mo组	10	10	4	0
造模4 mo组	11	11	5	2

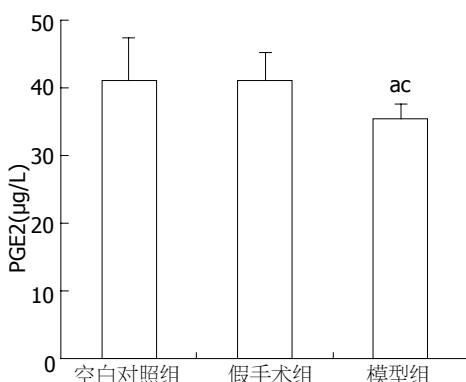


图2 造模对血清PGE2水平的影响。^a*P* = 0.018 vs 空白对照组; ^b*P* = 0.019 vs 假手术组。

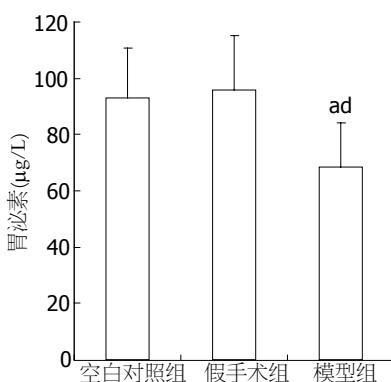


图3 造模对血清胃泌素水平的影响。^a*P* = 0.011 vs 空白对照组; ^b*P* = 0.005 vs 假手术组。

2.3 苏木素-伊红染色光镜观察组织结构 大鼠胃组织结构清楚。取材、固定、切片、染色等技术操作合格;无组织缺失。按照胃大弯、胃大弯与胃小弯之间、胃小弯的顺序观察(图4)。(1)空白对照组:正常胃黏膜,胃黏膜分为上皮、固有层、黏膜肌层,层次分明,结构清晰;固有层胃底腺主细胞、壁细胞结构正常(图5A, B, C);(2)假手术组:正常胃黏膜,胃黏膜分为上皮、固有层、黏膜肌层,层次分明,结构清晰;固有层胃底腺主细胞、壁细胞结构正常(图5D, E, F);(3)模型2 mo组:10倍物镜下,从黏膜肌层到被覆上皮的腺体厚度变薄,腺腔扩大而腺体变小,腺腔

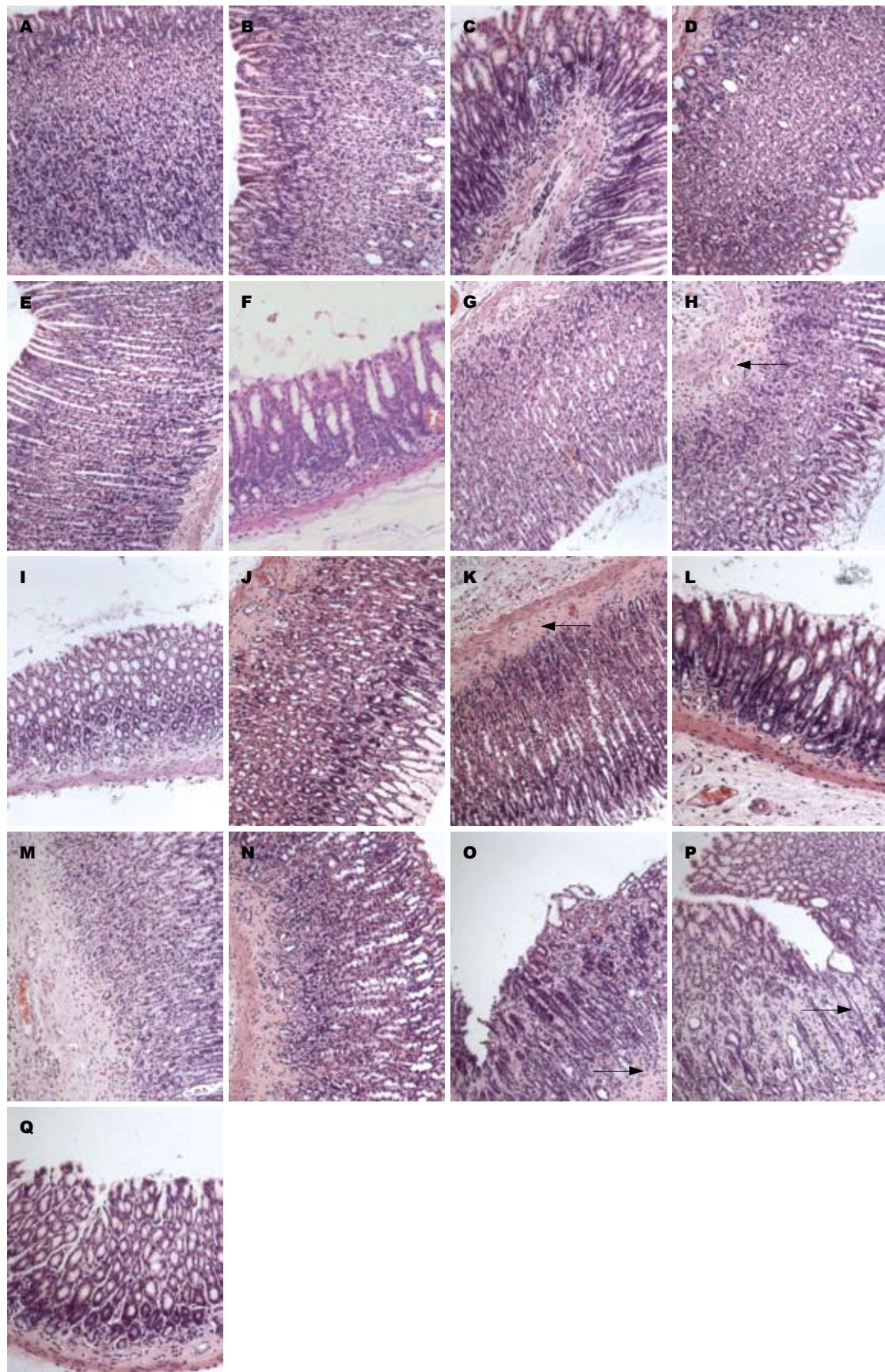


图4 胃黏膜组织(HE染色×12.5)。

内容物质稀薄,黏膜肌层轻度增厚,并向固有层伸延。40倍物镜下,被覆上皮可找到杯状细胞样细胞和刷状缘明显的小肠样柱状上皮,管状腺体体部的壁细胞和主细胞减少;固有层和黏膜下层有浆细胞与淋巴细胞散在浸润,很少见到淋巴滤泡样结构(图5G, H, I);(4)模型3 mo组:病变随造模时间有加重的趋势,10倍物镜下,从黏膜肌层到被覆上皮的腺体厚度变薄,腺腔扩大而腺体变小,腺腔内容物质稀薄,黏膜肌层及黏膜下层增厚且血管有不同程度玻璃样变;40倍物镜下,管状腺体体部的壁细胞和主细胞显著减少,管状腺体颈部的未分化细胞数量有增多趋势,管状腺体底部的增生细胞构成比有增大趋势;固有层和黏膜下层有浆细胞与淋巴细胞散在浸润,很少见到淋巴滤泡样结构(图5J, K, L);(5)模型4 mo组:与模型3 mo组病变程度相似,病变随造模时间有加重的趋势。10倍物镜下,从黏膜肌层到被覆上皮的腺体厚度显著变薄,腺腔扩大而腺体变小,腺腔内容物质稀薄,黏膜肌层及黏膜下层增厚且血管玻璃样变明显;40倍物镜下,管状腺体体部的壁细胞和主细胞显著减少,管状腺体颈部的未分化细胞数量有增多趋势,管状腺体底部的增生细胞构成比有增大趋势;固有层和黏膜下层见浆细胞与淋巴细胞浸润(图5M, N, O, P, Q)。

2.4 形态计量 针对模型动物病变,各组10倍物镜下随机采图10张,使用Image-Pro Plus图像分析系统,对胃黏膜体积构成比进行形态计量。

2.4.1 胃黏膜体积构成比:与空白组比较,假手术组、造模2、3、4 mo组的胃黏膜体积构成比依次降低3.30%(*P*>0.05)、9.82%(*P*<0.05)、17.28%(*P*<0.01)、20.44%(*P*<0.01)。与假手术组比较,造模2、3、4 mo组的胃黏膜体积构成比依次降低6.31%(*P*>0.05)、13.53%(*P*<0.01)、16.59%(*P*<0.01)。与模型2 mo组比较,模

**■应用要点**

本AG模型可以用于研究针对胆汁反流、饮食过热过咸造成的萎缩性胃炎的药效学评价。

图 5 各组大鼠胃黏膜病理表现(HE $\times 100$)。A: 空白组胃大弯处胃黏膜; B: 空白组胃大弯与胃小弯之间胃黏膜; C: 空白组胃小弯处胃黏膜; D: 假手术组胃大弯处胃黏膜; E: 假手术组胃大弯与胃小弯之间胃黏膜; F: 假手术组胃小弯处胃黏膜; G: 造模2 mo组胃大弯处胃黏膜; H: 造模2 mo组胃大弯与胃小弯之间胃黏膜; I: 造模2 mo组胃小弯处胃黏膜; J: 造模3 mo组胃大弯处胃黏膜; K: 造模3 mo组胃大弯与胃小弯处胃黏膜; L: 造模3 mo组胃小弯胃黏膜; M: 造模4 mo组胃大弯处胃黏膜; N, O, P: 造模4 mo组胃大弯与胃小弯之间胃黏膜; Q: 造模4 mo组胃小弯胃黏膜。

■名词解释

胃黏膜萎缩：胃黏膜固有腺体丧失，分为非化生性萎缩和化生性萎缩，前者特点是腺体丧失伴黏膜固有层中纤维化或纤维肌性增生，后者特点是胃黏膜正常的腺体被化生的腺体所替换。

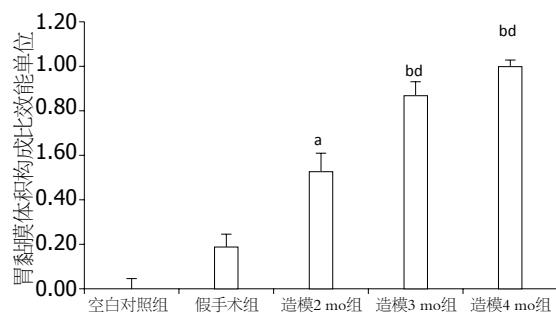


图6 各组大鼠胃黏膜体积构成比效能单位变化。^a $P<0.05$,
^b $P<0.01$ vs 空白对照组; ^d $P<0.01$ vs 假手术组。

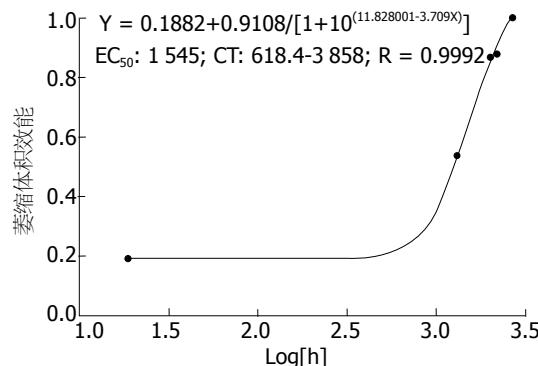


图7 胃黏膜萎缩效能与对数造模时间的时效曲线。

型3、4 mo组的胃黏膜体积构成比依次降低6.79%($P>0.05$)、9.67%($P>0.05$)。与模型3 mo组比较，模型4 mo组的胃黏膜体积构成比降低2.70%($P>0.05$ ，表3，图6)。

2.4.2 效能单位：效能单位数据分析结果表明：胃黏膜体积构成比效能单位由低到高为空白组(0.000)、假手术组(0.1884)、模型2 mo组(0.527)、模型3 mo组(0.868)、模型4 mo组(1.000)(图6)。

2.4.3 时效曲线：Prism软件计算取材部位所代表胃黏膜萎缩效能(Y, 体积变化相对百分比)与对数造模时间(X, h)的时效曲线方程为 $Y = 0.1882 + 0.9108/[1+10^{(11.828001-3.709X)}]$ ($R = 0.9992$)，胃黏膜萎缩半效时间为1 545 h(95%CI: 618.4 - 3 858 h)，约为2 mo(图7)。

3 讨论

依据Correa等提出了肠型胃癌的发病模式： $AG \rightarrow$ 肠上皮化生(intestinal metaplasia, IM) \rightarrow 异型增生(dysplasia, Dys) \rightarrow 浸润性癌^[26,27]，AG属胃癌前状态，其发生与胃癌发生的高危因素相似，治疗AG是胃癌二级预防的重要组成部分，故建立一种符合我国AG发病特点、稳定、便捷的动物模型是进行AG防治研究的基础，降低胃癌发病率。

表3 胃黏膜体积构成比(mean ± SD)

分组	n	体积构成比
空白对照组	10	0.87 ± 0.03
假手术组	10	0.84 ± 0.04
造模2 mo组	10	0.79 ± 0.06 ^a
造模3 mo组	10	0.74 ± 0.05 ^{bd}
造模4 mo组	11	0.72 ± 0.02 ^{bd}

单因素方差分析， $F = 22.773$, ^a $P<0.05$, ^b $P<0.01$ vs 空白对照组;
^d $P<0.01$ vs 假手术组。

率的有效途径。

AG发病与幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *H.pylori*)感染、高盐高热饮食、胆汁反流等密切相关。经常吃过热的食物可损伤消化道黏膜，过热饮食是胃炎的重要的致病原因之一，同时过热饮食刺激和损伤消化道黏膜可导致其细胞癌变^[28]，实验室研究发现60-80 °C的热水可导致动物胃黏膜损伤^[29]。故本实验灌胃温度为60-70 °C。高浓度的氯化钠能破坏胃黏膜屏障和延长胃排空时间，间接促进致癌物进入胃黏膜上皮靶细胞，直接损伤胃黏膜上皮，导致上皮再生性增殖，故高盐饮食既是帮助致癌物渗透的辅助致癌因素，也是促进癌变细胞增殖的促癌因素^[28]。摄入盐或用盐加工的食物可以促进胃癌的发生，平时喜欢食盐或者喜欢食用用盐加工肉类的人的胃癌发生率高出普通人群的3倍，高盐饮食作为胃恶性疾病的促进因素已经广泛地应用于胃癌及癌前病变模型制作过程^[30]，本实验采用15%氯化钠溶液灌胃，模拟高盐饮食习惯。同时在灌胃溶液中加入25%的可溶性淀粉，不仅可以使灌胃溶液在胃内停留时间延长，强化灌胃溶液对胃黏膜的损伤，更重要的是，Kato等^[31]研究发现增加淀粉类蔬菜的摄入，使癌前病变进展加速，淀粉类蔬菜在肠化生及胃萎缩方面影响较大，游伟程等^[28]在山东省临朐县进行的人群对照也研究发现，高淀粉食物可能增加胃癌的危险性，故在灌胃液中掺入淀粉，不仅仅是辅助作用，而是AG形成的一个独立的刺激因素。临床中发现一部分AG患者并无*H.pylori*感染，但胃镜下可见胆汁反流。胆汁反流与胃黏膜腺体萎缩和IM呈正相关，是胃癌发生的启动因素之一^[32,33]。其机制与连续诱导SHP和CDX1转录，使COX-2基因表达上调相关^[34]。本实验采用手术法将弹簧由胃穿过幽门进入十二指肠后固定，强制使幽门括约肌功能失常，导致持续胆汁反流。所以本模型的

刺激因素包括高热、高盐、淀粉、胆汁反流、弹簧刺激等多种因素, 符合我国一部分人群AG的发病特点。不仅如此, 本次实验在前几次实验的基础上做出若干改进, 使本手术成功率显著提高, 更有利于推广。具体改进如下: (1)改变弹簧制作方法: 原来制备弹簧为将避孕环彻底拉成直线后手工缠绕而成, 这样制作的弹簧直径大小不好控制, 本次实验直接轻微拉直避孕环, 使螺距为0.2-0.3 mm, 这样的弹簧直径均为避孕环出厂的直径0.2 mm, 大小统一且表面光滑, 对大鼠的物理刺激明显减小, 故出现胃黏膜溃疡糜烂的数量和比例显著减少, 模型组大部分胃黏膜发白, 无明显糜烂红肿等急性炎症病变, 更符合人类AG特点。而且弹簧在造成胆汁反流的同时, 其直径大小足以通过胃内容物, 100%不发生梗阻, 大鼠大便通畅; (2)放入弹簧前用无菌纱布将胃壁开口包紧, 将胃内容物全部排空到无菌纱布上, 严禁胃内容物流入腹腔引起腹膜炎, 使术后腹膜炎发生率下降至2%。经过以上改进, 大鼠术后成活率达97%以上。由于弹簧直径较前减小, 三处缝线在胃酸及胃蛋白酶的作用下逐渐被消化, 术后2 mo时50%的弹簧已经脱落, 术后4 mo弹簧脱落率约为100%, 进入治疗期后弹簧物理支撑及刺激的作用完全消除, 所有胃黏膜损伤因素消除, 功能异常的幽门括约肌在药物的治疗作用下逐渐恢复, 这与以前弹簧即使在治疗阶段也无法除去相比是一个进步。

在模型评价方面, 我们采用了动态分析方法, 从造模2 mo开始每个月取10只进行形态学评价, 并借用药理学的公式算出半数萎缩有效时间, 建立胃黏膜萎缩效能与对数造模时间的时效曲线方程, 使研究者对该模型病理的进展更加清晰可控。如果将术后灌胃4 mo的大鼠萎缩效能设为1, 空白组大鼠胃黏膜萎缩效能设为0, 那么在术后灌胃2 mo时大鼠胃黏膜萎缩效能达到0.5, 得出胃黏膜萎缩半效时间为2 mo。

PGE2保护胃黏膜的作用机制几乎涉及了与黏膜损伤可能有关的所有因素^[35]: (1)增加胃黏膜血流; (2)促进胃黏液和碳酸氢根的分泌; (3)刺激胃基底细胞向表面迁移, 促进细胞更新, 加快胃黏膜修复; (4)提高胃黏膜磷脂含量, 防止水溶性攻击因子对黏膜的损害; (5)可介导适应性细胞保护作用^[36]。本AG模型血清PGE2水平显著低于空白对照组, 说明该模型的制备方法干扰了胃黏膜保护因子PGE2的合成或释放, 其具体机制有待于进一步研究。

胃泌素是由胃窦G细胞分泌的胃肠激素, 90%以上为17肽的蛋白, AG患者胃窦黏膜萎缩, G细胞的数量减少, 胃泌素的分泌也下降^[37], 在其他刺激因素下, 胃泌素的分泌不增加或增加不多^[38], 低血清胃泌素是胃窦AG的生物标志^[39], 故血清胃泌素的分泌可反映胃黏膜萎缩的情况^[40]。本大鼠AG模型的血清胃泌素水平显著低于空白对照组和假手术组, 这一特点与其他AG大鼠模型的结果相似^[41,42]。

总之, 幽门弹簧植入术配合高盐热淀粉糊灌胃法制作的AG大鼠模型以胃窦黏膜萎缩为主, 其血清PGE2、胃泌素水平低于正常大鼠, 符合我国人群AG发病特点。该模型综合了高热、高盐、高淀粉、胆汁反流、弹簧物理刺激等多种因素, 各因素之间相互作用大大缩短了单一造模所需的时间, 其萎缩半效时间为术后2 mo, 继续造模至4 mo, 胃黏膜全部萎缩, 未见典型的IM及上皮内瘤变, 模型造模成功率达96%, 是一种稳定、便捷的AG大鼠模型。

4 参考文献

- 李勇, 范立桥. 胃癌. 第1版. 北京: 科学技术文献出版社 2010: 11-12
- 王吉耀, 廖二元, 胡品津. 内科学. 第1版. 北京: 人民卫生出版社 2002: 415-416
- Yokota K, Kurebayashi Y, Takayama Y, Hayashi S, Isogai H, Isogai E, Imai K, Yabana T, Yachi A, Oguma K. Colonization of Helicobacter pylori in the gastric mucosa of Mongolian gerbils. *Microbiol Immunol* 1991; 35: 475-480
- 张占海, 杨丽彩, 危北海, 刘晋生, 赵敏. 建立萎缩性胃炎幽门螺旋杆菌感染动物模型的方法. 中国中西医结合脾胃杂志 1996; 4: 46-47
- 姚金锋, 崔东来, 姚希贤, 郝桂敏, 刘惠芝. 大鼠幽门螺杆菌感染慢性萎缩性胃炎模型的研究. 世界华人消化杂志 2000; 8: 892-895
- 迟晶, 傅宝玉, 宋敏, 展广智, 吴利波, 服部隆则. 砂土鼠胃黏膜幽门螺杆菌长期感染的病理改变. 世界华人消化杂志 2002; 10: 415-417
- 李兆申, 金山从, 许国铭, 王世祥. 综合法制作大鼠萎缩性胃炎模型的实验研究. 中华医学杂志 1992; 72: 81-83
- 范英昌, 张斌, 胡利明, 徐东琴, 高金亮. 大鼠脾气虚型慢性萎缩性胃炎动物模型的实验研究—胃粘膜病理形态及超微结构改变的研究. 天津医药 1994; 22: 86-88
- 鄢顺琴, 凤良元, 苏英豪, 陈向涛, 许家林. 胃痛灵对胃粘膜保护的实验研究. 中医杂志 1995; 36: 44-46
- 赵敏, 张占海, 危北海, 刘晋生, 杨丽彩. 胃安素防治慢性萎缩性胃炎及胃癌前病变的实验病理研究. 中国中西医结合脾胃杂志 1996; 4: 225-229
- 邹世洁, 陈小野, 王震, 邓新荣, 王丽华, 于凤华, 何俊仁, 金敬善. 大鼠CAG证病结合模型胃肠内分泌观察. 长春中医药大学学报 1997; 13: 55-56
- 李春启, 刘为纹, 房殿春. 实验动物胃粘膜癌前病变的模型建立、发生机理及其逆转治疗的研究. 第三军医大学学报 1994; 16: 5-9
- 崔儒涛, 蔡淦, 陈莲芳, 周敏, 尉萍萍, 尹兆宝, 林江, 孙克兴, 杨秋泓, 孙文善. 养胃冲剂对大鼠慢性萎缩性

■同行评价

本文设计合理, 结果真实, 对于推动消化病学的实验研究工作有重要的意义。

- 胃炎治疗作用的实验研究. 中国中医药科技 1998; 5: 142-143
- 14 陆为民, 单兆伟, 沈洪, 吴静, 朱云华, 朱长乐. 胃舒胶囊防治萎缩性胃炎癌前病变的实验研究. 世界华人消化杂志 1998; 6: 897-899
- 15 张沥, 张玲霞, 徐俊荣, 曹广周, 江梅, 张宁霞, 贾长河. 热盐水致大鼠萎缩性胃炎动物模型建立. 世界华人消化杂志 2002; 10: 571-574
- 16 李春越, 施新猷, 周绍娟, 张经济, 任登先, 桂郁富, 巴善锋, 孙桂华, 李兴培, 孙起文. 胃尔康治疗慢性萎缩性胃炎的临床及实验研究. 中国中西医结合杂志 1995; 15: 21-24
- 17 杨鸿, 侯家玉. 胆汁反流致慢性萎缩性胃炎的实验研究. 北京中医药大学学报 2001; 24: 26-29
- 18 王德俊, 谢强敏, 邓阳梅, 刘晓梅, 盛树青, 李瑞琴, 孙云. 养胃冲剂对大鼠慢性萎缩性胃炎胃黏膜的保护作用. 解剖学研究 2001; 23: 323-325
- 19 Wang TC, Dangler CA, Chen D, Goldenring JR, Koh T, Raychowdhury R, Coffey RJ, Ito S, Varro A, Dockray GJ, Fox JG. Synergistic interaction between hypergastrinemia and Helicobacter infection in a mouse model of gastric cancer. *Gastroenterology* 2000; 118: 36-47
- 20 Hahm KB, Lee KM, Kim YB, Hong WS, Lee WH, Han SU, Kim MW, Ahn BO, Oh TY, Lee MH, Green J, Kim SJ. Conditional loss of TGF-beta signalling leads to increased susceptibility to gastrointestinal carcinogenesis in mice. *Aliment Pharmacol Ther* 2002; 16 Suppl 2: 115-127
- 21 张旭晨, 赵凤志, 代欣, 鲁香凤, 卜益民. 大鼠胃癌前期病变模型的建立. 中国肿瘤 1993; 2: 26
- 22 张旭晨, 赵凤志, 代欣, 鲁香凤, 卜益民. 综合法复制大鼠胃癌前期病变模型. 中华实验外科杂志 1994; 11: 311-312
- 23 张旭晨, 赵凤志, 代欣, 田德录, 董建华. 消痞灵冲剂对大鼠胃癌前病变DNA含量和细胞动力学影响的定量研究. 北京中医药大学学报 1995; 18: 45-49
- 24 石雪迎, 赵凤志, 戴欣, 马连生, 董秀云, 方杰. 复方健脾益胃胶囊对大鼠慢性萎缩性胃炎胃黏膜形态与血流量的影响. 世界华人消化杂志 1998; 6: 1068-1072
- 25 张玉禄, 李军祥, 鲁香凤, 戴欣, 朱陵群, 尹军祥, 孙海芸. 幽门弹簧插入配合高盐热糊灌胃复制大鼠慢性萎缩性胃炎癌前病变模型形态学观察及早期细胞凋亡分析. 中华中医药杂志 2008; 23: 693-696
- 26 Correa P. A human model of gastric carcinogenesis. *Cancer Res* 1988; 48: 3554-3560
- 27 张荫昌. 胃癌癌前病变研究的30年进展. 中国肿瘤 2001; 26: 406-407
- 28 游伟程. 胃癌. 第1版. 北京: 中国医药科技出版社 2006: 27, 29, 30
- 29 Graham DY, Abou-Sleiman J, el-Zimaity HM, Badr A, Graham DP, Malaty HM. Helicobacter pylori infection, gastritis, and the temperature of choice for hot drinks. *Helicobacter* 1996; 1: 172-174
- 30 Dregval L, Zickute J, Strumylaite L, Dudzevicius J. Associations between gastric cancer and dietary exposures. *Epidemiology* 2006; 17: S137
- 31 Kato I, Vivas J, Plummer M, Lopez G, Peraza S, Castro D, Sanchez V, Cano E, Andrade O, Garcia R, Franceschi S, Oliver W, Muñoz N. Environmental factors in *Helicobacter pylori*-related gastric precancerous lesions in Venezuela. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2004; 13: 468-476
- 32 Sobala GM, O'Connor HJ, Dewar EP, King RF, Axon AT, Dixon MF. Bile reflux and intestinal metaplasia in gastric mucosa. *J Clin Pathol* 1993; 46: 235-240
- 33 Dixon MF, Mapstone NP, Neville PM, Moayyedi P, Axon AT. Bile reflux gastritis and intestinal metaplasia at the cardia. *Gut* 2002; 51: 351-355
- 34 Park MJ, Kim KH, Kim HY, Kim K, Cheong J. Bile acid induces expression of COX-2 through the homeodomain transcription factor CDX1 and orphan nuclear receptor SHP in human gastric cancer cells. *Carcinogenesis* 2008; 29: 2385-2393
- 35 李铁, 张席锦. 前列腺素E₂和生长抑素的胃黏膜保护作用与巯基的关系. 北京医科大学学报 1989; 21: 476-478
- 36 朱国琴, 施瑞华, 沈健, 周清清, 郝波. 荆花胃康胶丸对大鼠胃黏膜的保护机制. 世界华人消化杂志 2007; 15: 505-508
- 37 Germaná B, Di Mario F, Cavallaro LG, Moussa AM, Lecis P, Liatoupoulo S, Comparato G, Carloni C, Bertiatto G, Battiestel M, Papa N, Aragona G, Cavestro GM, Iori V, Merli R, Bertolini S, Caruana P, Franzé A. Clinical usefulness of serum pepsinogens I and II, gastrin-17 and anti-Helicobacter pylori antibodies in the management of dyspeptic patients in primary care. *Dig Liver Dis* 2005; 37: 501-508
- 38 Broutet N, Plebani M, Sakarovitch C, Sipponen P, Mégraud F. Pepsinogen A, pepsinogen C, and gastrin as markers of atrophic chronic gastritis in European dyspeptics. *Br J Cancer* 2003; 88: 1239-1247
- 39 Cao Q, Ran ZH, Xiao SD. Screening of atrophic gastritis and gastric cancer by serum pepsinogen, gastrin-17 and Helicobacter pylori immunoglobulin G antibodies. *J Dig Dis* 2007; 8: 15-22
- 40 李红涛, 吴开春, 李彩宁, 乔泰东, 郭学刚, 王新, 郝志明, 宋瑛, 丁杰, 樊代明. 血清胃泌素对老年人慢性萎缩性胃炎的诊断. 中华老年医学杂志 2004; 23: 238-240
- 41 朱方石, 妒健敏, 王良静, 王冬飞, 陈萍. 萎缩性胃炎大鼠胃黏膜主、壁细胞和G、D细胞及外周血胃泌素、生长抑素的变化. 世界华人消化杂志 2006; 14: 3261-3267
- 42 Wang LJ, Chen SJ, Chen Z, Cai JT, Si JM. Morphological and pathologic changes of experimental chronic atrophic gastritis (CAG) and the regulating mechanism of protein expression in rats. *J Zhejiang Univ Sci B* 2006; 7: 634-640

编辑 李军亮 电编 李薇

外源性血管内皮生长因子对肝硬化大鼠肝组织血管的影响

蒋伟伟, 赵金满, 于良立

蒋伟伟, 赵金满, 于良立, 中国医科大学附属第一医院消化内科 辽宁省沈阳市 110001

蒋伟伟, 在读硕士, 主要从事消化系统疾病的研究.

作者贡献分布: 蒋伟伟与赵金满对本文所作贡献均等; 此课题由赵金满与蒋伟伟设计; 研究过程由赵金满、蒋伟伟及于良立完成; 数据分析及论文撰写由蒋伟伟完成; 实验指导及论文修改由赵金满完成.

通讯作者: 赵金满, 教授, 主任医师, 110001, 辽宁省沈阳市, 中国医科大学附属第一医院消化内科. jinmanzhao@163.com

电话: 024-83282554

收稿日期: 2011-01-30 修回日期: 2011-03-19

接受日期: 2011-03-23 在线出版日期: 2011-04-08

Effect of exogenous administration of vascular endothelial growth factor on hepatic microvessel density in rats with liver cirrhosis

Wei-Wei Jiang, Jin-Man Zhao, Liang-Li Yu

Wei-Wei Jiang, Jin-Man Zhao, Liang-Li Yu, Department of Gastroenterology, the First Hospital of China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China
Correspondence to: Professor Jin-Man Zhao, Department of Gastroenterology, the First Hospital of China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China. jinmanzhao@163.com

Received: 2011-01-30 Revised: 2011-03-19

Accepted: 2011-03-23 Published online: 2011-04-08

Abstract

AIM: To investigate the effect of portal vein administration of vascular endothelial growth factor on the density of hepatic microvessels in rats with liver cirrhosis.

METHODS: Twenty-five male Sprague-Dawley rats with portal hypertension were randomly divided into two groups: treatment group ($n = 15$) and model group ($n = 10$). The treatment group was given recombinant rat vascular endothelial growth factor 165 (30 ng/d) via the portal vein for 2 weeks. The model group underwent only sham operation. Ten normal rats were used as normal controls. After treatment, liver histopathology was examined by light microscopy and sinusoidal ultrastructure was observed by transmission electron microscopy. The density of hepatic microvessels was detected by immunostaining of von Willebrand factor (vWF).

RESULTS: Light microscopy examination showed that hepatic fibrosis improved in the treatment group compared with the model group. Electron microscopy analysis showed decreased number of fenestrations in sinusoidal endothelial cells, basement membrane formation, and irregular hepatic sinus endothelial cells. These pathological changes were more severe in the model group than in the treatment group. Microvessel density was higher in fibrotic stroma (2.04 ± 0.61 vs 1.26 ± 0.30 , $P < 0.01$) but lower in liver parenchyma (0.74 ± 0.05 vs 1.32 ± 0.48 , $P < 0.01$) in the treatment group than in the model group. However, microvessel density in both liver stroma and parenchyma was higher in the treatment and model groups than in the normal control group (1.26 ± 0.30 , 2.04 ± 0.61 vs 0.70 ± 0.07 ; 1.32 ± 0.48 , 0.74 ± 0.05 vs 0.28 ± 0.08 , all $P < 0.05$).

■背景资料
门静脉高压是肝硬化失代偿期主要临床表现, 由此引起的上消化道出血及腹水等严重并发症是引起高死亡率的主要原因。目前临床治疗中外科手术、内科药物及介入手术均存在不同的风险, 且不能从根本上降低门静脉压力。

CONCLUSION: Exogenous administration of vascular endothelial growth factor is capable of increasing the number of microvessels in fibrotic stroma but decreasing that in liver parenchyma.

Key Words: Vascular endothelial growth factor; Liver cirrhosis; Portal hypertension; Hepatic microvessels

Jiang WW, Zhao JM, Yu LL. Effect of exogenous administration of vascular endothelial growth factor on hepatic microvessel density in rats with liver cirrhosis. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2011; 19(10): 1009-1014

摘要

目的: 研究外源性血管内皮生长因子对肝硬化大鼠肝脏组织内血管的影响, 以检测肝硬化大鼠肝脏微循环变化。

方法: 25只肝硬化门静脉高压造模成功SD大鼠, 体质量180-220 g, 随机分为肝硬化门静脉高压对照组(B组, $n = 10$)和肝硬化门静脉高压实验组(C组, $n = 15$), C组应用Alzet微渗泵从大鼠门静脉连续泵入血管内皮生长因子持续2 wk, 正常对照组(A组, $n = 10$)和B组开腹后关腹作对照, 2 wk后对各组大鼠在光镜和电镜下进行肝组织病理学观察, 用免疫组织化学

■同行评议者
高润平, 教授, 吉林大学第一医院
肝病科

■研发前沿
肝硬化是以缺血为特征,由此导致肝脏微循环障碍,从而引起一系列临床症状和体征。近年来血管生成疗法成为研究热点,旨在通过血管生成以改善肝脏的微循环状态。

方法,以Ⅷ因子相关抗原标记微血管数目,检测大鼠肝脏微血管变化。

结果:光镜下观察C组肝纤维化程度较B组减轻,电镜下观察B组肝窦内皮细胞形态不规则,窗孔缺失,基底膜形成,C组病变减轻。免疫组织化学显示,在肝脏间质组织中,C组肝脏微血管数目较B组数目增加(2.04 ± 0.61 vs 1.26 ± 0.30 , $P < 0.01$),在肝脏实质组织中,C组微血管数目较B组数目减少(0.74 ± 0.05 vs 1.32 ± 0.48 , $P < 0.01$)。在肝脏实质与间质组织中,B组和C组微血管数目均高于A组(1.26 ± 0.30 , 2.04 ± 0.61 vs 0.70 ± 0.07 ; 1.32 ± 0.48 , 0.74 ± 0.05 vs 0.28 ± 0.08 ,均 $P < 0.05$)。

结论:外源性血管内皮生长因子能够增加肝硬化大鼠肝脏间质组织中微血管数目,并同时减少肝脏实质组织中微血管数目,能够改善肝脏的微循环情况。

关键词: 血管内皮生长因子; 肝硬化; 门静脉高压; 肝组织血管

蒋伟伟,赵金满,于良立. 外源性血管内皮生长因子对肝硬化大鼠肝组织血管的影响. 世界华人消化杂志 2011; 19(10): 1009–1014

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

0 引言

门静脉高压(portal hypertension, PHT)是肝硬化失代偿期主要临床表现,由此引起的上消化道出血及腹水等严重并发症^[1-3],是引起高死亡率的主要原因。肝硬化是以缺血为特征,由此引起微循环障碍,导致肝脏内血管阻力增加是PHT的主要机制。我国是慢性乙型肝炎大国,研究肝硬化PHT的发生机制,改善肝脏微循环状况^[4],从而降低门静脉压力,是一种具有高可行性和价值性的研究。本文旨在通过血管生成方法,应用血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)干预肝硬化PHT大鼠后,检测肝脏微血管变化,以研究肝硬化大鼠肝脏微循环变化。

1 材料和方法

1.1 材料 SD大鼠50只,♂,体质量180-220 g,购于中国医科大学实验动物部。硫代乙酰胺(thioacetamide, TAA)购于国药集团化学试剂有限公司。重组大鼠血管内皮生长因子165(recombinant rat vascular endothelial growth factor 165, rr-

VEGF165)购于美国PeproTech公司。兔抗人第Ⅷ因子相关抗原(von willebrand factor, vWF)多克隆抗体,免疫组织化学兔二步法检测试剂盒(辣根过氧化物酶)购于北京中山生物科技有限公司。液体DAB底物显色试剂盒购于福州迈新生物技术开发公司。Alzet微渗泵(Alzet osmotic minipump, 2002型)购于美国健康医疗仪器国际公司。

1.2 方法

1.2.1 分组及造模:50只大鼠随机分为:正常对照组10只(A组, $n = 10$),给予正常饮水,正常进食;肝硬化PHT诱导组40只,采用TAA法造模^[5,6],共成模25只,1-5 wk使用0.03% TAA, 6-10 wk使用0.04% TAA作为其饮水,10 wk后^[7]随机将其分为肝硬化PHT对照组(B组, $n = 10$)和肝硬化PHT实验组(C组, $n = 15$),C组应用Alzet微渗泵通过门静脉将rr-VEGF165(30 ng/d)^[8]持续泵入门静脉2 wk,A组及B给予开腹后关腹对照处理,术后3 d每天肌注4万U青霉素预防感染。

1.2.2 肝纤维化病理光镜观察:第12周末,取各组大鼠肝左叶相同部位肝组织,大小约 $1.5 \text{ cm} \times 1.5 \text{ cm} \times 0.5 \text{ cm}$ 于40 g/L中性甲醛固定,常规石蜡包埋、脱水,切片厚4 μm ,做苏木素-伊红(HE)染色,进行肝脏组织学观察。

1.2.3 肝脏超微结构观察:第12周末,各组大鼠随机选取2例肝左叶相同部位新鲜肝组织,约1 mm \times 1 mm \times 1 mm,立即置于预冷的2.5%戊二醛中于4 °C冰箱中固定后,二甲砷酸钠缓冲液(pH7.3)洗2次后,1%四氧化锇后固定、包埋、超薄切片,然后依次染色、观察、拍照、冲片,透射电镜观察。

1.2.4 免疫组织化学检测vWF标记微血管数目^[9]:多聚赖氨酸处理的石蜡切片脱蜡至水,PBS冲洗3 \times 5 min,微波抗原修复,冷却至室温,滴加内源性过氧化物酶阻断剂50 μL ,室温10 min,PBS冲洗3 \times 5 min,滴加一抗(vWF: 1:100)50 μL 室温孵育60 min,PBS冲洗3 \times 5 min,滴加辣根过氧化物酶标记羊抗兔IgG 50 μL ,室温孵育30 min,DAB显色,显微镜下控制显色时间,自来水流水冲洗,苏木素复染,梯度酒精脱水,二甲苯透明,中性树胶封片。阴性对照以PBS代替一抗。光镜下观察染色结果,vWF标记血管染色为棕黄色,表示阳性,与背景同色为阴性。

1.2.5 免疫组织化学染色图片分析:每组大鼠各随机选取5张来自不同大鼠的切片,首先在光镜下放大100倍观察,确定待观察区域,后在400倍

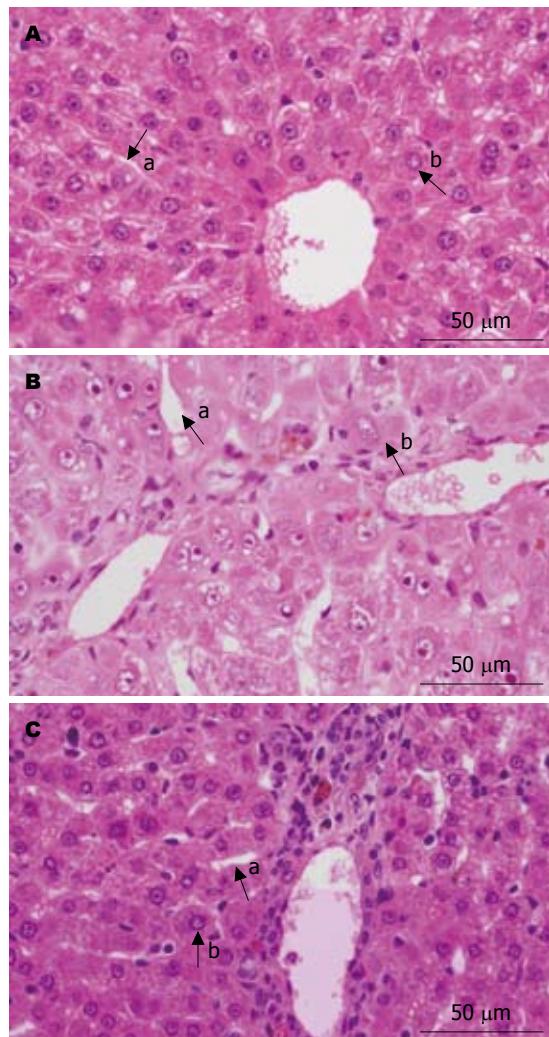


图1 肝脏组织学(HE×400). A: A组; B: B组; C: C组. a: 肝窦; b: 肝细胞.

镜下每张切片连续观察10个视野, 计数每视野下vWF标记的微循环血管数目, 以平均血管数目为记录结果.

统计学处理 所有数据输入计算机建立数据库, 采用SPSS16.0软件包进行数据统计分析, 计量资料以mean±SD表示, 不同组微血管数目组间比较用方差分析(ANOVA), $P<0.05$ 有统计学意义.

2 结果

2.1 光镜下肝脏组织学观察 12 wk末各组大鼠肝组织行HE染色显示, A组肝脏肝细胞索排列整齐, 肝细胞直径约13 μm, 肝窦腔隙规则可见, 宽约4 μm(图1A); B组肝脏正常肝小叶结构消失或破坏而被假小叶所取代, 部分假小叶由几个不完整的肝小叶构成, 肝细胞的排列和血窦的分布极不规则, 肝细胞可有不同程度的水肿、脂肪浸润, 直径约22 μm, 肝窦腔隙扩张, 宽约6

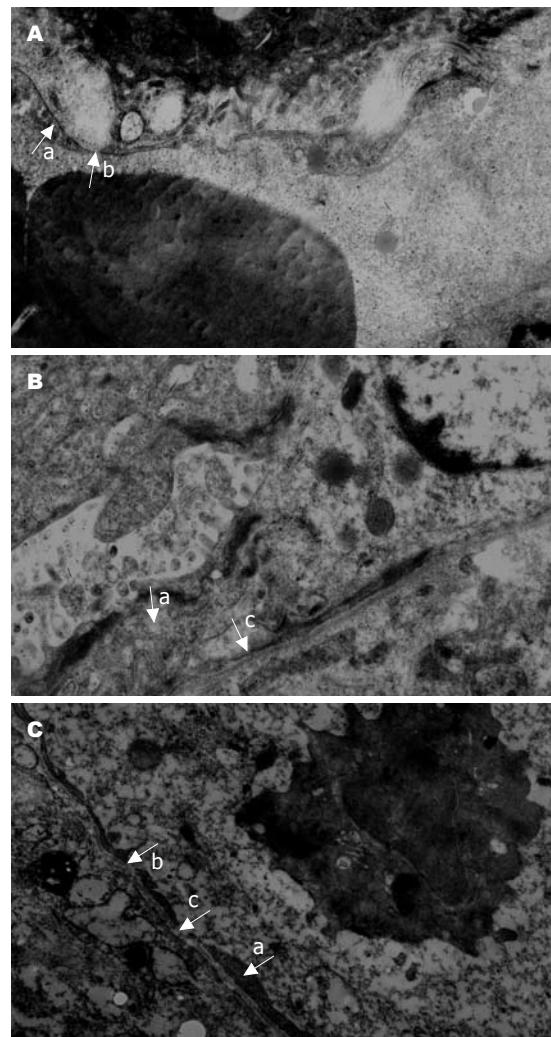


图2 肝脏组织学(电镜). A: A组($\times 10\,000$); B: B组($\times 12\,000$); C: C组($\times 12\,000$). a: 肝窦内皮细胞; b: 窗孔; c: 基底膜.

μm(图1B); C组肝脏假小叶结构不明显, 肝细胞索排列较B组规则, 肝细胞水肿减轻, 直径约16 μm, 肝窦腔隙宽约5 μm(图1C).

2.2 电镜下肝脏组织学观察 12 wk末各组大鼠肝组织标本在电镜下观察显示, A组大鼠肝窦内皮细胞扁平, 有窗孔存在, 内皮下缺乏基底膜(图2A). 在B组大鼠肝组织, 可见肝窦内皮细胞形态不规则, 增厚, 窗孔减少或缺失, 有基底膜形成(图2B). 在PHT实验组大鼠肝组织, 内皮细胞变薄, 窗孔存在但数量减少, 内皮下基底膜不连续、减少或消失(图2C).

2.3 vWF标记的微血管免疫组织化学染色 正常对照组大鼠vWF标记血管阳性表达仅见于中央静脉和汇管区门静脉血管内皮, 肝窦壁几乎未见阳性表达(图3A); B组大鼠肝组织vWF标记血管阳性表达明显增多, 在大多数纤维间隔内表达较多, 在再生的肝结节的肝窦内皮及肝小叶

■相关报道
Brodsky等表明在肝硬化早期阶段VEGF表达及微血管数目增加, 而在肝硬化晚期阶段VEGF及微血管数目减少, VEGF表达与血管数目呈正相关.

■创新盘点

本文综合分析考虑应用外源性血管内皮生长因子(VEGF),半衰期短,只有6 min,且不能过长时间应用,否则将导致血管过度增生,引起不良反应。本实验应用了Alzet微渗泵持续通过大鼠门静脉泵入VEGF 2 wk,解决了以上问题,目前国内外尚未见报道。

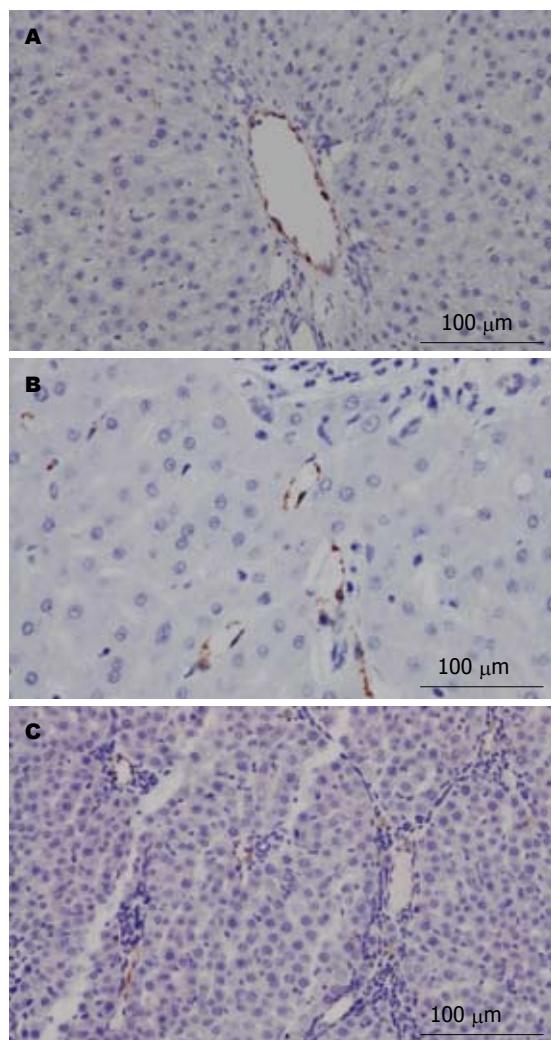


图3 vWF标记微血管数目(免疫组织化学染色). A: A组($\times 200$); B: B组($\times 400$); C: C组($\times 200$)。

中央静脉附近肝窦可见较多的微血管表达(图3B)。C组大鼠vWF标记血管在纤维间隔内表达较B组增多,但在肝窦壁微血管表达较B组表达减少(图3C)。

2.4 肝脏间质组织与实质组织中微血管数目半定量分析 在肝脏间质纤维组织中,C组微血管数目高于B组,两者相比差异有统计学意义($P<0.01$),且二者均高于A组(均 $P<0.05$,表1);在肝脏实质组织中,C组微血管数目低于B组,两者相比差异有统计学意义($P<0.01$),二者均高于A组(均 $P<0.05$,表1,图4)。

3 讨论

肝脏的微循环是以窦状隙为中心,包括流入窦状隙的门静脉、肝动脉末梢支及流出窦状隙的肝静脉末梢支。良好的肝内循环能够保证肝细胞从外界获得充足的养分,并带走代谢物质,从而维持肝脏正常的功能^[10]。肝硬化时肝内微循环障

表1 各组大鼠vWF标记微血管数目的比较 (mean \pm SD)

分组	间质组织 微血管数目	P值	实质组织 微血管数目	P值
A组	0.70 \pm 0.07		0.28 \pm 0.08	
B组	1.26 \pm 0.30	<0.05	1.32 \pm 0.48	<0.01
C组	2.04 \pm 0.61	<0.01	0.74 \pm 0.05	<0.01

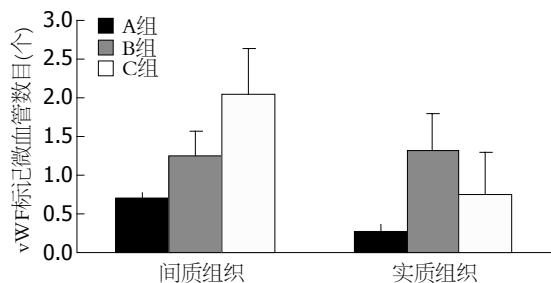


图4 各组大鼠肝脏间质组织与实质组织中微血管数目分布。

碍,引起门静脉血管阻力增加导致门静脉压升高是肝硬化PHT发生的重要机制。肝纤维化、再生结节形成和肝内血管狭窄是肝硬化引起血管阻力增加的典型机制。最新研究表明血管生成可作为门静脉分流通道“疏通”压力^[4],同时一些抑制血管生成的干预实验在临床前研究中提供了有害的证据^[11,12],改善肝硬化时血管异常可以改善肝脏微循环^[13],从而减轻肝硬化。

VEGF在促进血管生成方面的生物学作用近年受到研究者的重视^[14]。VEGF诱导内皮细胞表达的生物学特点使治疗性血管生成疗法成为研究新热点^[15-17]。最近Brodsky等^[18]表明在肝硬化早期阶段VEGF表达及微血管数目增加,而在肝硬化晚期阶段VEGF及微血管数目减少,VEGF表达与血管数目呈正相关。Ueno等^[19]的研究证明肝移植血管生成细胞具有治疗肝纤维化的作用和改善肝功能的作用。国内外应用VEGF治疗PHT少见,且大都通过大鼠尾静脉注入VEGF^[20],并已有统计学意义。由于VEGF半衰期较短,仅为6 min,考虑到通过尾静脉间断注射用药难以维持稳定的有效血药浓度,且经过体循环后影响靶器官有效药物浓度。本实验应用Alzet微渗泵通过导管持续2 wk将rr-VEGF-A直接泵入门静脉干预大鼠肝硬化门静脉压力,解决了VEGF半衰期短的问题,且目前在国内外尚未见报道。

vWF是第VIII因子相关抗原,主要由血管内皮细胞合成,并在血管基膜下与IV型胶原纤维(type IV collagen, Coll IV)构成联合体,免疫组

织化学技术中vWF及Coll IV可使血管基膜着色, 因此常被用作血管标志物计数微血管密度^[21]。最近研究表明, 肝脏疾病中vWF合成增加, 而vWF mRNA浓度在肝纤维化患者中最高, 肝组织的免疫组织化学染色证实了这一观察^[22]。郝菁华等^[23]研究发现检测vWF表达可以反映肝纤维化的程度。vWF作为血管生成的直接标志物, 可反映肝纤维化形成过程中血管生成及肝窦毛细血管化^[10]。研究表明, 肝脏实质中肝窦毛细血管化能够导致肝脏微循环障碍^[24]。

本实验应用Alzet微渗泵通过导管将VEGF直接泵入C组大鼠门静脉, 持续2 wk后, 应用vWF标记肝脏微血管数目, 并对各组大鼠微血管数目进行半定量分析, 发现在肝脏间质组织与实质组织中各组大鼠微血管数目分布特点不同, 在肝脏间质组织中, C组大鼠微血管数目较B组增加($P<0.01$), 而在肝脏实质组织中, C组较B组有明显降低($P<0.01$)。在间质组织及实质组织中, B组及C组大鼠血管数目均高于A组($P<0.05$)。我们的前期研究工作已经证实, 大鼠门静脉及肝动脉系统均有VEGF受体分布, VEGF受体2在内皮细胞增殖最终形成新生血管中起重要作用^[25]。本实验结果提示, 在肝硬化大鼠肝组织中微血管数目较A组增加, 表明肝硬化过程中, 由于缺血缺氧等原因导致血管的代偿性增生, 但这种增生会产生肝窦毛细血管化引起肝脏微循环异常^[13]。我们在应用VEGF进行干预后, 在肝脏间质组织中, C组大鼠vWF标记的微血管数目较B组增加, 表明肝硬化PHT治疗组应用VEGF后, VEGF与相应受体结合, 产生新生毛细血管, 形成分流通道, 能够疏通肝脏微循环^[4]。在肝脏实质组织中, C组大鼠微血管数目较B组减少, 表明外周间质组织新生血管能够穿过纤维隔代偿性增加肝实质细胞供血^[20], 同时我们实验中光镜及电镜下观察肝细胞水肿减轻、肝窦腔隙变窄、基底膜变薄, 说明应用VEGF后, 肝细胞形态及功能逐渐恢复, 原有的代偿性血管增生被抑制, 肝窦毛细血管化减轻。

本实验中光镜下观察C组较B组假小叶结构减轻, 肝细胞直径变小、水肿减轻、肝窦排列较规则、腔隙变小, 表明应用VEGF治疗后, 肝脏微循环血管得到“疏通”, 肝窦压力降低, 肝细胞新生及修复。电镜下观察PHT实验组比B组肝窦内皮细胞变薄、窗孔增加、基底膜减少或消失, 提示VEGF可促进内皮细胞窗孔形成^[26,27], 增加内皮细胞通透性^[28], 肝脏血管阻塞减轻, 肝

脏结构得到改善。实验结果表明, 肝脏结构发生病理改变导致微循环障碍引起门静脉血管阻力增加是肝硬化PHT发生的重要机制^[29], 应用VEGF后微循环改善, 肝脏组织新生重构, 使肝脏结构得到不同程度的恢复, 增加了肝细胞与肝窦的血流量, 最终使肝细胞获取更多的氧气和营养, 进一步改善肝脏功能^[19,30]。

本实验应用VEGF血管生成疗法检测肝硬化PHT大鼠肝组织血管数目变化, 反映肝脏微循环状况。结果显示VEGF可使肝硬化PHT大鼠肝脏微循环得到改善, 为进一步探讨在临床中应用VEGF改善肝硬化患者微循环状况提供了实验依据。

4 参考文献

- 1 Møller S, Bendtsen F. [Portal pressure should be measured on suspicion of portal hypertension]. *Ugeskr Laeger* 2010; 172: 3411-3413
- 2 Dittrich S, Mattos AA, Mattos AZ, Alves AV, Araújo FB. [Relationship between portal pressure gradient and ascites in cirrhotic patients]. *Arq Gastroenterol* 2010; 47: 174-177
- 3 Povero D, Busletta C, Novo E, di Bonzo LV, Cannito S, Paternostro C, Parola M. Liver fibrosis: a dynamic and potentially reversible process. *Histol Histopathol* 2010; 25: 1075-1091
- 4 Thabut D, Shah V. Intrahepatic angiogenesis and sinusoidal remodeling in chronic liver disease: new targets for the treatment of portal hypertension? *J Hepatol* 2010; 53: 976-980
- 5 张杰, 陈积圣, 王坤, 张磊. 硫代乙酰胺诱导肝硬化模型方法的改进. 中华实验外科杂志 1999; 16: 567
- 6 张谊, 张启瑜, 廖毅, 杨文军. 硫代乙酰胺剂量个体化诱导大鼠肝硬化门脉高压模型. 肝胆胰外科杂志 2007; 19: 164-167
- 7 杨思贤, 赵金满, 徐珊珊. 肝硬化门静脉高压对D-木糖吸收率的影响及意义. 世界华人消化杂志 2010; 18: 9-13
- 8 Nicoletti JN, Shah SK, McCloskey DP, Goodman JH, Elkady A, Atassi H, Hylton D, Rudge JS, Scharfman HE, Croll SD. Vascular endothelial growth factor is up-regulated after status epilepticus and protects against seizure-induced neuronal loss in hippocampus. *Neuroscience* 2008; 151: 232-241
- 9 涂传涛, 王吉耀, 郭津生. 环氧合酶-2在四氯化碳诱导肝硬化大鼠肝窦毛细血管化形成中的作用. 中华消化杂志 2009; 29: 236-240
- 10 Vollmar B, Menger MD. The hepatic microcirculation: mechanistic contributions and therapeutic targets in liver injury and repair. *Physiol Rev* 2009; 89: 1269-1339
- 11 Stockmann C, Kerdiles Y, Nomaksteinsky M, Weidemann A, Takeda N, Doedens A, Torres-Collado AX, Iruela-Arispe L, Nizet V, Johnson RS. Loss of myeloid cell-derived vascular endothelial growth factor accelerates fibrosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010; 107: 4329-4334
- 12 Patsenker E, Popov Y, Stickel F, Schneider V, Ledermann M, Sägesser H, Niedobitek G, Goodman SL, Schuppan D. Pharmacological inhibition of integrin alphavbeta3 aggravates experimental liver fibrosis

■应用要点
本实验结果表明, 应用外源性血管内皮生长因子可以改善肝硬化大鼠肝脏微循环, 对于临床探讨应用血管生成疗法对肝硬化门脉高压进行治疗具有实际意义。

■ 同行评价

本文科学性较好，对于临床探讨肝硬化门静脉高压的治疗具有实际意义。

- and suppresses hepatic angiogenesis. *Hepatology* 2009; 50: 1501-1511
- 13 Bosch J, Abraldes JG, Fernández M, García-Pagán JC. Hepatic endothelial dysfunction and abnormal angiogenesis: new targets in the treatment of portal hypertension. *J Hepatol* 2010; 53: 558-567
- 14 Chen J, Braet F, Brodsky S, Weinstein T, Romanov V, Noiri E, Goligorsky MS. VEGF-induced mobilization of caveolae and increase in permeability of endothelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 2002; 282: C1053-C1063
- 15 Nagy JA, Feng D, Vasile E, Wong WH, Shih SC, Dvorak AM, Dvorak HF. Permeability properties of tumor surrogate blood vessels induced by VEGF-A. *Lab Invest* 2006; 86: 767-780
- 16 Ballermann BJ. Contribution of the endothelium to the glomerular permselectivity barrier in health and disease. *Nephron Physiol* 2007; 106: p19-p25
- 17 Bokeriya LA, Golukhova EZ, Eremeeva MV, Aslanidi IP, Merzlyakov VY, Georgiev GP, Kiselev SL, Berishvili II, Vakhromeeva MN, Serov RA, Artyukhina TV, Basarab YS, Polyakova ES, Lukashkin MA. Use of human VEGF(165) gene for therapeutic angiogenesis in coronary patients: first results. *Bull Exp Biol Med* 2005; 140: 106-112
- 18 Brodsky SV, Mendelev N, Melamed M, Ramaswamy G. Vascular density and VEGF expression in hepatic lesions. *J Gastrointestin Liver Dis* 2007; 16: 373-377
- 19 Ueno T, Nakamura T, Torimura T, Sata M. Angiogenic cell therapy for hepatic fibrosis. *Med Mol Morphol* 2006; 39: 16-21
- 20 叶春华, 刘淳阳. 静脉应用血管内皮生长因子治疗肝硬化门静脉高压症大鼠的实验研究. 中国医学工程 2005; 13: 232-235, 239
- 21 朱立新, 耿小平, 范上达. 多种血管新生指标在肝细胞肝癌中的表达及敏感性比较. 消化外科 2003; 2: 153-157
- 22 Hollestelle MJ, Geertzen HG, Straatsburg IH, van Gulik TM, van Mourik JA. Factor VIII expression in liver disease. *Thromb Haemost* 2004; 91: 267-275
- 23 郝菁华, 任万华, 石军, 韩国庆, 朱菊人, 谢英渤, 王书运. 肝脏微循环障碍在慢性乙型肝炎中的作用及其发生机制. 微循环学杂志 2001; 11: 16-18
- 24 张景, 张庆富. 肝脏微循环的研究进展. 中国微循环 2007; 11: 278-281
- 25 徐珊珊, 赵金满, 杨思贤. 门脉高压肝脏小叶间动脉与小叶间静脉血管内皮生长因子受体的分布. 世界华人消化杂志 2010; 18: 1756-1760
- 26 Pandya NM, Dhalla NS, Santani DD. Angiogenesis-a new target for future therapy. *Vascul Pharmacol* 2006; 44: 265-274
- 27 Perry BN, Arbiser JL. The duality of angiogenesis: implications for therapy of human disease. *J Invest Dermatol* 2006; 126: 2160-2166
- 28 Grover TR, Parker TA, Markham NE, Abman SH. rhVEGF treatment preserves pulmonary vascular reactivity and structure in an experimental model of pulmonary hypertension in fetal sheep. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2005; 289: L315-L321
- 29 吕立权, 李松华. 肝窦内皮细胞与门静脉高压. 国外医学·消化系疾病分册 2002; 22: 100-102
- 30 Xu H, Shi BM, Lu XF, Liang F, Jin X, Wu TH, Xu J. Vascular endothelial growth factor attenuates hepatic sinusoidal capillarization in thioacetamide-induced cirrhotic rats. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 2349-2357

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》参考文献要求

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

miRNA干扰质粒的构建及其对肝癌HepG2细胞IGF-II表达的抑制作用

姚宁华, 姚登福, 钱静, 董志珍, 邱历伟, 蔚丹丹

姚宁华, 姚登福, 邱历伟, 蔚丹丹, 南通大学附属医院临床医学研究中心 江苏省南通市 226001
钱静, 南通大学附属医院放疗科 江苏省南通市 226001
董志珍, 南通大学诊断学教研室 江苏省南通市 226001
姚宁华, 在读研究生, 主要从事恶性肿瘤早期诊断与发病机制的研究。
江苏省自然科学基金资助项目, No. BK2008187
南通大学自然科学基金资助项目, No. 09ZY013
作者贡献分布: 主要实验、数据分析和文章起草由姚宁华、钱静及蔚丹丹完成; 细胞培养和质粒构建由姚宁华、钱静及邱历伟完成; 课题设计、文章修改和审阅由董志珍与姚登福完成。
通讯作者: 姚登福, 教授, 226001, 江苏省南通市西寺路20号, 南通大学附属医院临床医学研究中心, yaodf@ahnmc.com
电话: 0513-85052413 传真: 0513-85052523
收稿日期: 2011-01-09 修回日期: 2011-03-14
接受日期: 2011-03-23 在线出版日期: 2011-04-08

Construction of expression plasmids carrying miRNA targeting IGF-II and detection of their inhibitory effect on IGF-II expression in human HepG2 cells

Ning-Hua Yao, Deng-Fu Yao, Jing Qian,
Zhi-Zhen Dong, Li-Wei Qiu, Dan-Dan Yu

Ning-Hua Yao, Deng-Fu Yao, Li-Wei Qiu, Dan-Dan Yu, Clinical Research Center, Affiliated Hospital of Nantong University, Nantong 226001, Jiangsu Province, China
Jing Qian, Department of Radiation Therapy, Affiliated Hospital of Nantong University, Nantong 226001, Jiangsu Province, China

Zhi-Zhen Dong, Department of Diagnostic Medicine, Nantong University, Nantong 226001, Jiangsu Province, China
Supported by: the Natural Science Foundation of Jiangsu Province, No. BK2008187; and the Natural Science Foundation of Nantong University, No. 09ZY013

Correspondence to: Professor Deng-Fu Yao, Clinical Research Center, Affiliated Hospital of Nantong University, 20 Xishi Road, Nantong 226001, Jiangsu Province, China. yaodf@ahnmc.com

Received: 2011-01-09 Revised: 2011-03-14

Accepted: 2011-03-23 Published online: 2011-04-08

Abstract

AIM: To investigate inhibitory effect of transfection of eukaryotic expression plasmids carrying specific microRNA (miRNA) on insulin-like growth factor II (IGF-II) gene and protein expression in human HepG2 cells.

METHODS: Four miRNAs targeting the IGF-II gene were synthesized and inserted into the pcDNA™ 6.2-GW/EmGFPmiR vector. The recombinant plasmids were identified and transiently transfected into HepG2 cells. Their inhibitory efficiency on IGF-II expression was determined at gene level by real time-PCR and at protein level by ELISA.

RESULTS: Four eukaryotic expression plasmids carrying miRNA targeting IGF-II were constructed successfully and confirmed by sequencing. HepG2 cells were then transfected with these plasmids (MR-IGF-II-1 to 4). The highest transfection efficiency was up to 50%. The reduced rates of IGF-II gene expression were 33%, 43%, 0% and 3% in cells transfected with MR-IGF-II-1 to 4, respectively. Transfection of the MR-IGF-II-2 plasmid for 72 h reduced IGF-II protein expression by 44% in HepG2 cells.

CONCLUSION: The expression plasmids carrying miRNA targeting IGF-II have been successfully constructed. Transfection of these plasmids can efficiently inhibit IGF-II expression in HepG2 cells.

Key Words: Hepatocellular carcinoma; Insulin-like growth factor 2; microRNA; Plasmid construction; Gene silencing

Yao NH, Yao DF, Qian J, Dong ZZ, Qiu LW, Yu DD. Construction of expression plasmids carrying miRNA targeting IGF-II and detection of their inhibitory effect on IGF-II expression in human HepG2 cells. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2011; 19(10): 1015-1021

摘要

目的: 研究miRNA干扰质粒对胰岛素样生长因子Ⅱ(IGF-II)在肝细胞癌表达的抑制作用, 探讨IGF-II在肝细胞癌治疗中的价值。

方法: 以人IGF-II基因序列设计并合成4条miRNA, 将miRNA插入质粒构建pcDNA™ 6.2-GW/EmGFP miR 1-4干扰载体; 筛选、转染HepG2细胞, 以荧光定量PCR分析靶向肝癌IGF-II基因表达的干扰效果; 以ELISA法比较

■背景资料

肝癌发展是由遗传学和表观遗传学改变引起的原癌基因的活化和抑癌基因的失活, 而表遗传修饰主要包括DNA甲基化、组蛋白乙酰化状态异常以及染色体结构改变等, IGF-II表达异常与肝癌发生密切相关。

■同行评议者
田宇彬, 教授, 青岛大学医学院附属医院消化内科

■研发前沿

重组DNA技术使肝癌基因治疗成为可能,以肝癌发生机制制定的基因治疗已成为肿瘤治疗的热点。

转染前后IGF- II蛋白表达水平。

结果: 测序证实,成功构建了真核IGF- II干扰质粒MR-IGF- II -1-4,将干扰质粒转染至HepG2细胞,镜下显示转染效率50%;经荧光定量PCR扩增,沉默IGF- II基因表达效率MR-IGF- II -1为33%、MR-IGF- II -2为43%、MR-IGF- II -3为0%、MR-IGF- II -4为3%。将其中MR-IGF- II -2转染至HepG2细胞,在转录和蛋白水平上对IGF- II具有较高干扰效率,分别达43.0%和43.5%。

结论: 成功构建了人miRNA干扰质粒,他能有效抑制HepG2细胞IGF- II的表达。

关键词: 肝细胞癌;胰岛素样生长因子II;微小RNA;质粒构建;基因沉默

姚宁华,姚登福,钱静,董志珍,邱历伟,蔚丹丹. miRNA干扰质粒的构建及其对肝癌HepG2细胞IGF- II表达的抑制作用. 世界华人消化杂志 2011; 19(10): 1015-1021
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/1015.asp>

0 引言

肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)的发生、发展是多病因、多步骤及多因子协同的复杂过程,其中多种基因的调控和表达与HCC密切相关^[1-3]。胰岛素样生长因子(insulin-like growth factors, IGFs)家族异常表达与多种肿瘤的发生相关。IGFs中的配体IGF- I (insulin-like growth factor 1)和IGF- II (insulin-like growth factor 2)氨基酸序列有62%同源性,均可与细胞表面的胰岛素样生长因子I受体(the type I insulin-like growth factor, IGF-1R)结合,发挥促有丝分裂作用,促进正常细胞增殖,参与肿瘤细胞增生及分化。IGF- I、IGF- II和IGF-1R在多种肿瘤中分别或共同高表达,HCC组织中则发现IGF- II异常表达,且与肝细胞持续性增殖、异常生长、分化及癌变密切相关^[4,5]。IGF- II基因在胎肝和新生儿肝脏中大量表达,成人肝中不表达,在肝细胞发生癌变时IGF- II呈胚胎性过量表达^[6,7]。本文构建IGF- II表达干扰质粒,经筛选将有效干扰质粒转染肝癌细胞(HepG2),观察对HCC细胞IGF- II的表达干扰和抑制效果。

1 材料和方法

1.1 材料 人HCC HepG2细胞株购自南京凯基生物科技发展有限公司; BLOCK-iT™ Pol II miR RNAi Expression Vector Kit with EmGFP(No.

K4936-00)、质粒载体pcDNA™6.2-GW/EmGFPmiR、TRIZol、感受态细胞DH5α、超纯水及基因扩增引物合成等均来自Invitrogen公司; T4快速连接酶试剂盒(Promega); 胰化蛋白胨、酵母提取物(OXOID); 壮观霉素(Sigma); FuGENE® HD Transfection Reagent(Roche); RIPA裂解液(强)、PMSF、BCA蛋白浓度测定试剂盒、DEPC、Hoechst 33342、琼脂糖及高纯度质粒抽提试剂盒(碧云天); Cell culture RNA提取试剂盒(富士); cDNA合成试剂盒(Fermentas); SYBR® Premix Ex Taq™ II(TaKaRa)购自大连宝生物工程有限公司; 人IGF- II ELISA试剂盒(武汉华美)购自南京生兴生物科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 靶向IGF- II miRNA干扰载体的构建:根据IGF- II基因序列(NM_000612)设计并合成4条miRNA寡聚核苷酸单链DNA及阴性对照核苷酸单链DNA(Invitrogen),序列见表1。

将4对Oligo各自退火成双链,用三蒸水溶解成100 μmol/L,互补单链各5 μL两两混合,总体积20 μL(100 μmol/L top strand Oligo 5 μL, 100 μmol/L bottom strand Oligo 5 μL, 10×Oligo annealing buffer 2 μL, 三蒸水8 μL)在95 °C加热5分钟,然后放置室温自然冷却20 min,形成双链Oligo。然后用载体构建试剂盒BLOCK-iT™ Pol II miR RNAi Expression Vector Kit with EmGFP进行重组克隆,将双链的miRNA Oligo各自插入到miRNA表达载体pcDNA™6.2-GW/EmGFP-miR中,构建miRNA质粒。

1.2.2 干扰载体转化与测序分析:将退火的双链Oligo稀释成10 nmol/L浓度,在室温连接30 min,总体积20 μL,含5×Ligation Buffer 4 μL, pcDNA6.2-GW/EmGFP 2 μL, ds Oligo(10 nmol/L) 4 μL, T4 DNA Ligase(10⁶ U/L)1 μL, 双蒸水9 μL。构建质粒,转化入DH5α。每个转化平板分别挑取4个克隆,用载体通用引物进行菌落PCR筛选。筛选得到的阳性克隆进行测序验证重组克隆中插入序列,扩增质粒。pcDNA™6.2-GW/EmGFPmiR反向测序引物5'-CTCTAGATCAAC-CACTTTGT -3',针对靶基因IGF- II构建的4个干扰质粒pcDNA™ 6.2-GW/EmGFPmi-1-4。

1.2.3 靶向IGF- II miRNA干扰载体的筛选:制备LB培养基含壮观霉素(50 g/L),37 °C增菌15 h后,提取质粒。将处对数生长期HepG2细胞以2.5 g/L胰酶消化,用完培悬浮细胞,计数后按照每孔5×10⁵个细胞种板,过夜。在细胞覆盖率90%时,

表 1 IGF-II miRNA Oligo序列及阴性序列

名称	寡聚核苷酸单链DNA序列
MR122-1	F: 5'-TGCTGCAGCAATGCAGCAGCAGGCGAGTTGGCCACTGACTGACTCGCCTCGCTGCATTGCTG-3' R: 5'-CCTGCAGCAATGCAGCAGGCGAGTCAGTCAGTGGCCAAAACCTGCCTCGTGCATTGCTG-3'
MR122-2	F: 5'-TGCTGTAAGCAGCAATGCAGCACGAGGTTGGCCACTGACTGACCTCGTGTGCTATTGCTGCTTA-3' R: 5'-CCTGTGTAAGCAGCAATAGCACGAGGTCAGTCAGTGGCCAAAACCTCGTGTGCTGCATTGCTGCTAC-3'
MR122-3	F: 5'-TGCTGTGCGACGGCTCACACGGCTTGGTTGGCCACTGACTGACCAAGCCGTGAGCCGTCGCA-3' R: 5'-CCTGTGCGACGGCTCACGGCTTGGTCAGTCAGTGGCCAAAACCAAGCCGTGAGCCGTCGCA-3'
MR122-4	F: 5'-TGCTGTCAACGATGCCACGGCTGCGAGTTGGCCACTGACTGACTCGCAGCCGGCATCGTTGA-3' R: 5'-CCTGTCAACGATGCCGGCTGCGAGTCAGTCAGTGGCCAAAACCTCGCAGCCGTGGCATCGTTGAC-3'
阴性	F: 5'-TGCTGAAATGTACTGCGGTGGAGACGTTGGCCAGTCAGTCAGTGGCCAAAACGTCCTCCACGCGCAGTACATT-3' R: 5'-CCTGAAATGTACTGCGGTGGAGACGTCAGTCAGTGGCCAAAACGTCCTCCACGCGCAGTACATT-3'

常规消化收集细胞, 分别以90 μL DMEM高糖基培稀释10 μL干扰质粒及阴性对照质粒Neg(200 μg/L), 92 μL DMEM高糖基培稀释高效转染试剂8 μL, 总体积100 μL, 混匀, 室温12 min; 用200 μL含转染试剂-质粒复合物DMEM高糖基培重悬细胞, 37 °C, 50 mL/L CO₂中静置20 min; 加 RPMI 1640完培后种板, 37 °C, 50 mL/L CO₂培养; 8 h更换培养液。在所设定时间点, 以荧光显微镜观察转染效率。

1.2.4 IGF-II cDNA合成: 使用Quickgene-81自动提取仪(富士)制备细胞总RNA。预冷管中加入总RNA 1 μg和1 μL随机引物[Oligo-dT(18), 0.5 g/L], 加DEPC处理水至12 μL, 离心5 s, 70 °C 5 min, 离心5 s; 将EP管冰浴, 加4 μL 5×反应缓冲液; 1 μL核酸酶抑制物(2×10⁷ U/L)和2 μL dNTP(10 mmol/L), 离心5 s, 37 °C 5 min; 加1 μL逆转录酶(2×10⁷ U/L), 终体积20 μL, 42 °C 60 min, 70 °C 10 min, 备用。

1.2.5 引物合成与定量PCR扩增: 引物设计: IGF-II-F1: 5'-CGTGGCATCGTTGA GGAGTG-3' (942-961 nt)和IGF-II-R1: 5'-CTGAACGCCTC-GAGCTCCTT-3'(1 182-1 201 nt), 片段260 bp; 内参引物: GAPDH-F: 5'-CACTGGCGTCTTCAC-CACCA T-3'(396-416 nt)和GAPDH-R: 5'-GTG-CAGGAGGCATTGCTGAT-3'(541-560 nt), 片段165 bp。体系25 μL: 双蒸水9.5 μL, 上游引物(10 μmol/L)0.5 μL, SYBR® Premix Ex Taq™ II 12.5 μL; 下游引物(10 μmol/L)0.5 μL; 模板2.0 μL。反应条件: 95 °C 2 min后, 以95 °C 10 s; 60 °C 30 s; 70 °C 45 s, 重复40个循环。

1.2.6 IGF-II 沉默效率: 经定量PCR检测细胞IGF-II 和内参基因表达, 根据PCR反应曲线得到各样品IGF-II 和GAPDH基因Ct值(threshold cy-

cle number), 以ΔΔCt法相对定量。以转染阴性干扰载体为对照, 比较各转染干扰载体组IGF-II 基因表达。靶向IGF-II 基因干扰效果计算: ΔΔCt = (待测IGF-II 基因Ct平均值-待测GAPDH基因Ct平均)-(对照IGF-II 基因Ct平均值-对照GAPDH基因Ct平均值)基因表达量F = 2^{-ΔΔCt}, IGF-II 基因沉默效率为1-2^{-ΔΔCt}。

1.2.7 IGF-II 蛋白测定: 分别在24、48和72 h收集细胞, 以RIPA裂解液(含1/100 PMSF)与冰上裂解细胞, 10 min后收集裂解产物, 12 000 g 4 min离心收集上清, 以BCA法测定总蛋白和ELISA法测IGF-II 蛋白水平。

统计学处理 数据以mean±SD表示。以Sigma Stat 2.0软件行配对t检验或单因素方差分析, 以P<0.05表示差异显著。

2 结果

2.1 真核表达质粒构建与测序 将真核表达质粒约5.7 kb; IGF-II 片段真核表达质粒pcDNA™6.2-GW/EmGFPmiR经测序和比对, 重组克隆中插入片段序列与设计的Oligo序列完全一致, IGF-II miRNA干扰载体构建成功。

2.2 构建质粒筛选和干扰效率比较 以4种构建的干扰载体转染HepG2细胞, 瞬时转染48 h后收集样品, 定量PCR分析IGF-II 基因的表达(图1)及实际对IGF-II 的沉默效果。MR-IGF-II -1和MR-IGF-II -2均可沉默IGF-II , 以MR-IGF-II -2对IGF-II 基因的沉默效果最佳, 干扰效率为43%。而MR-IGF-II -3和MR-IGF-II -4对IGF-II 基因几乎无沉默效果(表2)。

2.3 IGF-II -miRNA转染HepG2效率 pcDNA™6.2-GW/EmGFP miRNA重组质粒转染HepG2细胞48 h后, 使用倒置荧光显微镜观察转染效果, 转染

■相关报道

肝癌动物模型动态观察肝细胞癌变过程中IGF-II 基因P2 CpG岛的甲基化状态改变, 同时观察了不同肝脏组织中IGF-II 基因启动子区域CpG岛甲基化状态改变在肝癌形成中起重要作用。

■创新盘点

本实验构建了人源性真核IGF-II表达干扰质粒,从基因转录和蛋白表达水平上观察对HepG2细胞IGF-II的表达抑制,这为今后的肝癌基因治疗奠定基础。

表2 构建的4种干扰载体对HepG2细胞干扰效率比较

分组	IGF-II Ct值	ΔCt	$\Delta\Delta Ct$	$2^{\Delta\Delta Ct}$	沉默效率($1-2^{\Delta\Delta Ct}$)
MR-IGF-II-1组	28.42 ± 0.19	17.70	0.58	0.67	0.33
MR-IGF-II-2组	28.09 ± 0.26	17.92	0.80	0.57	0.43
MR-IGF-II-3组	27.23 ± 0.22	16.98	-0.14	1.10	0.00
MR-IGF-II-4组	27.60 ± 0.13	17.17	0.05	0.97	0.03
阴性组	26.74 ± 0.13	17.12	0.00	1.00	0.00

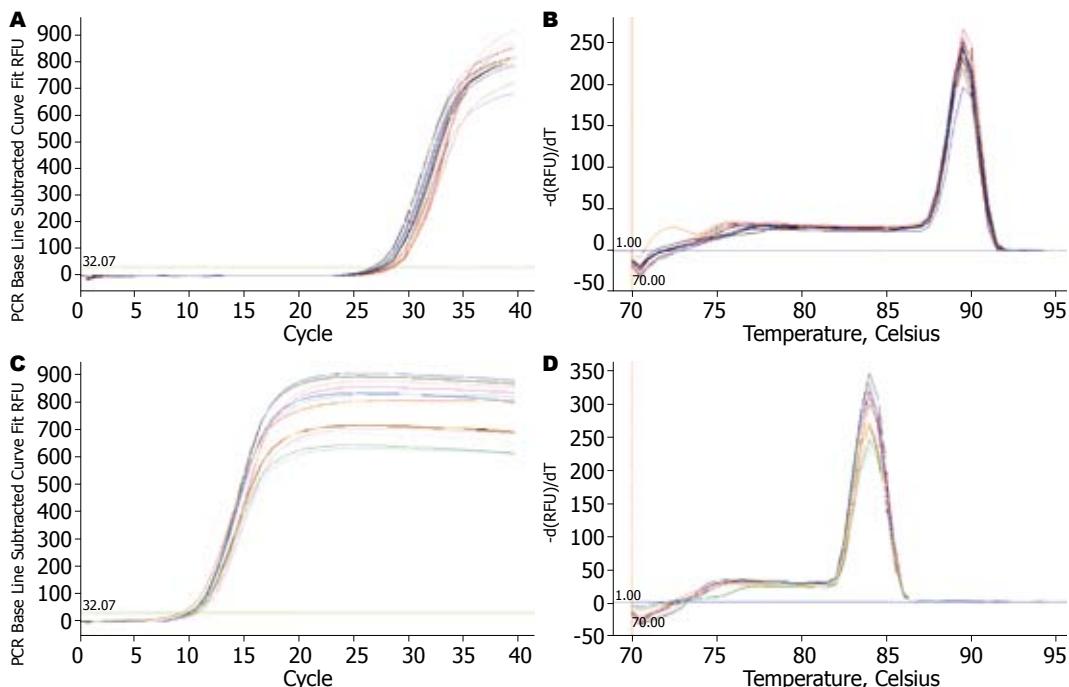


图1 转染48 h后IGF-II基因与内参基因扩增曲线和熔解曲线。A: IGF-II基因扩增曲线; B: IGF-II基因熔解曲线; C: 内参基因扩增曲线; D: 内参基因熔解曲线。

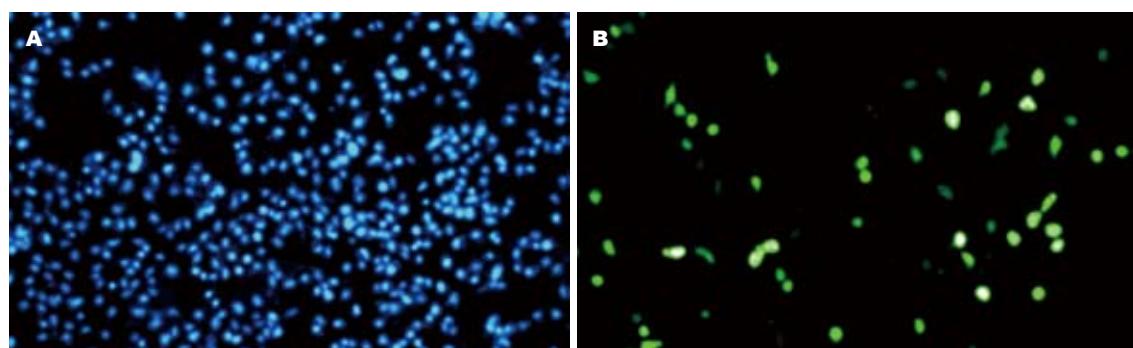


图2 IGF-II-miRNA转染HepG2细胞48 h后的转染效果。A: Hoechst 33342; B: 转染后荧光表达。

效率50%(图2)。

2.4 miRNA干扰质粒对IGF-II基因表达的抑制以MR-IGF-II-2进行种板、转染,分别在第24、48和72 h提取RNA及合成IGF-II cDNA,再以定量PCR分析HepG2细胞IGF-II mRNA表达程度。对IGF-II基因表达的实际沉默效率34%、44%

和42%(表3)。

2.5 miRNA干扰质粒对IGF-II蛋白表达抑制以MR-IGF-II-2进行种板、转染,分别在第24、48和72 h收集、裂解细胞,提取总蛋白,以ELISA法测定HepG2细胞中IGF-II蛋白水平,以蛋白比浓度(每g总蛋白中IGF-II mg数)表示,正常

表 3 MR-IGF-II-2干扰载体转染HepG2细胞IGF-II基因的沉默效率 (mean ± SD)

分组	GAPDH Ct	IGF-II Ct	ΔCt	ΔΔCt	$2^{-\Delta\Delta Ct}$	沉默效率($1-2^{-\Delta\Delta Ct}$)
24 h						
正常组	10.07 ± 0.12	20.97 ± 0.12	10.90			
阴性组	9.97 ± 0.12	20.90 ± 0.17	10.93	0.03	0.979	0.02
干扰组	9.87 ± 0.12	21.37 ± 0.38	11.50	0.60	0.659	0.34
48 h						
正常组	10.93 ± 0.15	25.43 ± 0.72	14.50			
阴性组	10.83 ± 0.12	25.35 ± 0.50	14.52	0.02	0.986	0.01
干扰组	10.50 ± 0.35	25.83 ± 0.21	15.33	0.83	0.562	0.44
72 h						
正常组	9.73 ± 0.15	23.47 ± 0.46	13.74			
阴性组	9.67 ± 0.06	23.43 ± 0.23	13.76	0.02	0.986	0.01
干扰组	9.70 ± 0.10	24.23 ± 0.25	14.53	0.79	0.578	0.42

表 4 miRNA干扰质粒对肝癌细胞IGF-II蛋白表达的影响 (mean ± SD, n = 3)

分组	IGF-II (mg/g总蛋白)	q值
正常组	113.23 ± 4.66	
阴性组	102.60 ± 4.23	4.0949
干扰组		
24 h	73.83 ± 3.83 ^b	15.6483
48 h	64.34 ± 4.42 ^b	19.4108
72 h	63.88 ± 4.54 ^b	19.5837

^bP<0.01 vs 正常组.

组与阴性组的差别未见明显的统计学意义, 但对干扰组不同时间的IGF-II表达抑制分别为35.80%、43.18%和43.58%, 组间差异显著(均P<0.01, 表4).

3 讨论

HCC的发生是多中心、多病因、多阶段的发展过程^[8,9]. HCC癌变和胚胎组织中IGF-II呈过量表达, 并受胚胎型启动子调控. 以前的肝癌模型动态证实IGF-II异常表达与肝细胞癌变关系十分密切, 且为肝细胞癌变的早期事件^[7,10]. miRNA是21-23个碱基的小分子RNA, 存在于真核生物中. miRNA可通过部分互补或者完全互补结合到目的靶mRNA, 以诱发蛋白质翻译抑制(翻译抑制子)或者介导目的mRNA的降解调节基因表达, 包括细胞分化、生物发育、疾病的发生、发展, 与病毒的复制和癌症等有关^[11]. 肝癌治疗以手术为主, 因肝癌细胞对放疗、化疗不敏感, 重组DNA技术使肝癌基因治疗成为可能, 以肝癌发生机制制定的基因治疗已成为肿

瘤治疗的热点^[12,13]. 本文利用分子克隆手段, 成功构建人源性真核IGF-II表达干扰质粒, 从基因转录和蛋白表达水平上, 观察对HepG2细胞IGF-II的表达抑制, 为肝癌基因治疗奠定基础.

肝癌发展是由遗传学和表观遗传学改变引起的原癌基因的活化和抑癌基因的失活, 而表遗传修饰主要包括DNA甲基化、组蛋白乙酰化状态异常以及染色体结构改变等, IGF-II表达异常与肝癌发生密切相关, 不同肝组织中该基因启动子的甲基化状态的研究已有报道^[14,15]. 肝癌动物模型动态观察肝细胞癌变过程中IGF-II基因P2 CpG岛的甲基化状态改变, 同时观察了不同肝脏组织中IGF-II基因P3 CpG岛的甲基化状态的差异. 该基因启动子区域CpG岛甲基化状态改变在肝癌形成中起重要作用^[16,17]. 本研究中IGF-II miRNA重组质粒的成功构建, 并将该质粒及阴性质粒分别转染HepG2细胞株, 经抗生素筛选后成功建立稳定表达miRNA质粒的HepG2细胞株. 非编码RNA(miRNA)是体内的RNA干扰触发器, 可通过在经典的RNA干扰途径降解靶基因mRNA、也可直接抑制靶基因的蛋白翻译、还可经快速脱腺苷化降解mRNA, 被看做体内固有的基因调控子中最大家族.

以真核表达载体构建了IGF-II表达干扰载体, 模拟天然miRNA构建表达miRNA质粒, 以调控相关基因IGF-II表达, 先以调控目标基因的miRNA表达质粒的构建和有效质粒筛选, 确定针对IGF-II基因的miRNA的有效作用位点, 观察构建的候选质粒对肝癌中IGF-II靶基因的调控效应, 针对IGF-II基因分别构建了4个质粒, 筛选出了2个有效质粒, 选用最有效的MR-IGF-II-2用于体外研究; 并确定了2 035-2 055为IGF-II

■应用要点

本研究将有效质粒瞬时转染HepG2细胞后, miRNA使肝癌细胞IGF-II在转录水平和蛋白水平上都明显下调, 肝癌细胞增殖受抑制, 其结果将会为今后研究肝癌的发生机制及生物治疗提供有价值的基础研究信息和实验依据.

■同行评价

本文科学性和可读性较好，为肝癌基因治疗奠定基础。

有效位点；将有效质粒瞬时转染HepG2细胞后，观察到miRNA使肝癌细胞中IGF-II表达在转录水平和蛋白水平上都明显下调；并使肝癌细胞增殖受抑制，最高抑制率可达到51.1%，表现为细胞周期改变，癌细胞增殖受阻于G₀-G₁期，癌细胞凋亡率增加，进一步证实了IGF-II异常表达与肝癌发生的密切关系^[15,18,19]。

IGF-II在胎儿和新生儿肝脏中基因有大量表达，成人大肝中未见表达。肝细胞在恶性转化过程中，IGF-II呈胚胎性过量表达，并具有强烈的致有丝分裂剂作用，促进细胞增殖分化，参与肿瘤细胞增生及分化。IGF-II在HCC组织中异常表达，与肝细胞持续性增殖、异常生长、分化及癌变密切相关^[20-22]。针对IGF-II表达的相关信号通路的基因治疗或改变IGF-II基因启动子P3的甲基化状态，纠正IGF-II基因异常，可成为基因治疗新靶点^[15,23,24]。研究结果将会为今后研究肝癌的发生机制及生物治疗提供有价值的基础研究信息和实验依据^[25,26]。

4 参考文献

- 1 Tovar V, Alsinet C, Villanueva A, Hoshida Y, Chiang DY, Solé M, Thung S, Moyano S, Toffanin S, Minguez B, Cabellos L, Peix J, Schwartz M, Mazzaferro V, Bruix J, Llovet JM. IGF activation in a molecular subclass of hepatocellular carcinoma and pre-clinical efficacy of IGF-1R blockage. *J Hepatol* 2010; 52: 550-559
- 2 Spangenberg HC, Thimme R, Blum HE. Evolving therapies in the treatment of hepatocellular carcinoma. *Biologics* 2008; 2: 453-462
- 3 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
- 4 Weng CJ, Hsieh YH, Tsai CM, Chu YH, Ueng KC, Liu YF, Yeh YH, Su SC, Chen YC, Chen MK, Yang SF. Relationship of insulin-like growth factors system gene polymorphisms with the susceptibility and pathological development of hepatocellular carcinoma. *Ann Surg Oncol* 2010; 17: 1808-1815
- 5 Qian J, Yao D, Dong Z, Wu W, Qiu L, Yao N, Li S, Bian Y, Wang Z, Shi G. Characteristics of hepatic igf-ii expression and monitored levels of circulating igf-ii mRNA in metastasis of hepatocellular carcinoma. *Am J Clin Pathol* 2010; 134: 799-806
- 6 Ubagai T, Kikuchi T, Fukusato T, Ono Y. Aflatoxin B1 modulates the insulin-like growth factor-2 dependent signaling axis. *Toxicol In Vitro* 2010; 24: 783-789
- 7 Qiu LW, Yao DF, Zong L, Lu YY, Huang H, Wu W, Wu XH. Abnormal expression of insulin-like growth factor-II and its dynamic quantitative analysis at different stages of hepatocellular carcinoma development. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2008; 7: 406-411
- 8 Lee JS, Thorgeirsson SS. Genetic profiling of human hepatocellular carcinoma. *Semin Liver Dis* 2005; 25: 125-132
- 9 Thorgeirsson SS, Lee JS, Grisham JW. Molecular prognostication of liver cancer: end of the beginning. *J Hepatol* 2006; 44: 798-805
- 10 Nussbaum T, Samarin J, Ehmann V, Bissinger M, Ryschich E, Khamidjanov A, Yu X, Gretz N, Schirmacher P, Breuhahn K. Autocrine insulin-like growth factor-II stimulation of tumor cell migration is a progression step in human hepatocarcinogenesis. *Hepatology* 2008; 48: 146-156
- 11 Elyakim E, Sitbon E, Faerman A, Tabak S, Montia E, Belanis L, Dov A, Marcussen EG, Bennett CF, Chajut A, Cohen D, Yerushalmi N. hsa-miR-191 is a candidate oncogene target for hepatocellular carcinoma therapy. *Cancer Res* 2010; 70: 8077-8087
- 12 Zhang J, Yang Y, Yang T, Liu Y, Li A, Fu S, Wu M, Pan Z, Zhou W. microRNA-22, downregulated in hepatocellular carcinoma and correlated with prognosis, suppresses cell proliferation and tumorigenicity. *Br J Cancer* 2010; 103: 1215-1220
- 13 Lachenmayer A, Alsinet C, Chang CY, Llovet JM. Molecular approaches to treatment of hepatocellular carcinoma. *Dig Liver Dis* 2010; 42 Suppl 3: S264-S272
- 14 Zhou HK, Yang DH, Tang SH, Huang W, Lu XH. [Construction of a plasmid vector of fused protein genes driven by human insulin-like growth factor II P3 promoter]. *Zhonghua Yixue Zazhi* 2006; 86: 106-110
- 15 Yao X, Hu JF, Daniels M, Shiran H, Zhou X, Yan H, Lu H, Zeng Z, Wang Q, Li T, Hoffman AR. A methylated oligonucleotide inhibits IGF2 expression and enhances survival in a model of hepatocellular carcinoma. *J Clin Invest* 2003; 111: 265-273
- 16 Tang SH, Yang DH, Huang W, Zhou M, Zhou HK, Lu XH, Ye G. Differential promoter usage for insulin-like growth factor-II gene in Chinese hepatocellular carcinoma with hepatitis B virus infection. *Cancer Detect Prev* 2006; 30: 192-203
- 17 Tang SH, Yang DH, Huang W, Zhou HK, Lu XH, Ye G. Hypomethylated P4 promoter induces expression of the insulin-like growth factor-II gene in hepatocellular carcinoma in a Chinese population. *Clin Cancer Res* 2006; 12: 4171-4177
- 18 Wu J, Qin Y, Li B, He WZ, Sun ZL. Hypomethylated and hypermethylated profiles of H19DMR are associated with the aberrant imprinting of IGF2 and H19 in human hepatocellular carcinoma. *Genomics* 2008; 91: 443-450
- 19 Sakatani T, Kaneda A, Iacobuzio-Donahue CA, Carter MG, de Boon Witzel S, Okano H, Ko MS, Ohlsson R, Longo DL, Feinberg AP. Loss of imprinting of Igf2 alters intestinal maturation and tumorigenesis in mice. *Science* 2005; 307: 1976-1978
- 20 Eichenmüller M, von Schweinitz D, Kappler R. Betulinic acid treatment promotes apoptosis in hepatoblastoma cells. *Int J Oncol* 2009; 35: 873-879
- 21 Cheng W, Tseng CJ, Lin TT, Cheng I, Pan HW, Hsu HC, Lee YM. Glypican-3-mediated oncogenesis involves the Insulin-like growth factor-signaling pathway. *Carcinogenesis* 2008; 29: 1319-1326
- 22 Dong ZZ, Yao DF, Yao DB, Wu XH, Wu W, Qiu LW, Jiang DR, Zhu JH, Meng XY. Expression and alteration of insulin-like growth factor II-messenger RNA in hepatoma tissues and peripheral blood of patients with hepatocellular carcinoma. *World J*

- 23 Gastroenterol 2005; 11: 4655-4660
- 23 Nussbaum T, Samarin J, Schirmacher P, Breuhahn K. [Insulin-like growth factor (IGF)-signalling pathway components are potential therapeutic targets in the treatment of human hepatocellular carcinoma]. *Verh Dtsch Ges Pathol* 2007; 91: 278-285
- 24 Chen YW, Boyartchuk V, Lewis BC. Differential roles of insulin-like growth factor receptor- and insulin receptor-mediated signaling in the phenotypes of hepatocellular carcinoma cells. *Neoplasia* 2009; 11: 835-845
- 25 Jeng YM, Chang CC, Hu FC, Chou HY, Kao HL, Wang TH, Hsu HC. RNA-binding protein insulin-like growth factor II mRNA-binding protein 3 expression promotes tumor invasion and predicts early recurrence and poor prognosis in hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2008; 48: 1118-1127
- 26 Morisawa T, Marusawa H, Ueda Y, Iwai A, Okazaki IM, Honjo T, Chiba T. Organ-specific profiles of genetic changes in cancers caused by activation-induced cytidine deaminase expression. *Int J Cancer* 2008; 123: 2735-2740

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 修回稿件件

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

2 稿件修改

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

3 版权

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

一氧化氮在伴高脂血症急性出血坏死性胰腺炎大鼠胰腺及肾损害中的作用

吴婷, 王昭智

■背景资料

急性胰腺炎(AP)是消化科常见的急腹症, 约25%的患者发生全身炎症反应综合征(SIRS), 继之发展为多器官功能不全综合征(MODS), 成为急性出血坏死性胰腺炎(ANP), 并发症涉及全身各脏器。AP时胰腺外器官损伤中肾功能障碍的发生率仅次于肺功能障碍, 大约在14%-43%。ANP伴发急性肾功能衰竭(ARF)的死亡率高达71%-84%。

吴婷, 王昭智, 福建医科大学附属第一医院消化内科 福建省福州市 350004
吴婷, 副教授, 主要从事消化系统疾病的临床及基础研究。
作者贡献分布: 研究过程、论文撰写、文献检索及数据分析由王昭智完成; 选题、课题设计及审校由吴婷完成。
通讯作者: 吴婷, 副教授, 350004, 福建省福州市台江区茶中路20号, 福建医科大学附属第一医院消化内科。drwt@medmail.com.cn
电话: 0591-87982521
收稿日期: 2010-12-23 修回日期: 2011-03-01
接受日期: 2011-03-16 在线出版日期: 2011-04-08

Nitric oxide protects against pancreatic and renal injury in rats with acute necrotizing pancreatitis and hyperlipidemia

Ting Wu, Zhao-Zhi Wang

Ting Wu, Zhao-Zhi Wang, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Fujian Medical University, Fuzhou 350004, Fujian Province, China

Correspondence to: Associate Professor Ting Wu, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Fujian Medical University, 20 Chazhong Road, Taijiang District, Fuzhou 350004, Fujian Province, China. drwt@medmail.com.cn

Received: 2010-12-23 Revised: 2011-03-01

Accepted: 2011-03-16 Published online: 2011-04-08

Abstract

AIM: To determine whether nitric oxide (NO) protects against pancreatic and renal injury in rats with acute necrotizing pancreatitis (ANP) and hyperlipidemia.

METHODS: Forty male Sprague-Dawley rats were fed a high-fat diet for 4 weeks to induce hyperlipidemia. The rats were randomly divided into three groups: group A (hyperlipidemia + ANP + normal saline), group B (hyperlipidemia + ANP + L-arg), and group C (hyperlipidemia + ANP + L-Name). ANP was induced by retrograde injection of 3.5% sodium taurocholate into the biliopancreatic duct. Each group was treated 30 min before and 2 h after ANP induction. At 6 h after ANP induction, serum amylase (Amyl), creatinine (Cr), urea nitrogen (BUN), NO, and pancreatic NO and endothelial nitric oxide syn-

thetase (eNOS) were measured; pancreatic histopathology was detected by light microscopy; ultrastructure of glomerular podocytes was observed by electron microscopy; and expression of nephrin in glomerular podocytes was examined by immunohistochemistry.

RESULTS: Serum Amyl, Cr and BUN in group B were significantly lower than those in groups A and C (Amyl: 4219.8 ± 900.0 , 6643.2 ± 1135.4 vs 2434.4 ± 831.6 ; Cr: 15.8 ± 1.6 , 22.4 ± 3.3 vs 9.9 ± 0.8 ; BUN: 135.9 ± 23.6 , 206.4 ± 23.4 vs 103.2 ± 13.2 ; all $P < 0.01$). Pancreatic injury and changes in glomerular podocytes were milder in group B than in groups A and C. The levels of serum and pancreatic NO (59.46 ± 11.21 , 44.84 ± 10.72 vs 78.88 ± 9.76 ; 5.23 ± 0.48 , 4.39 ± 0.45 vs 6.18 ± 0.57 ; all $P < 0.01$) and pancreatic eNOS, and expression of nephrin in glomerular podocytes were significantly higher in group B than in groups A and C.

CONCLUSION: NO produced by eNOS can protect against pancreatic and renal injury in rats with ANP and hyperlipidemia.

Key Words: Nitric oxide; Acute pancreatitis; Kidney injury; Glomerular podocyte; Hyperlipidemia

Wu T, Wang ZZ. Nitric oxide protects against pancreatic and renal injury in rats with acute necrotizing pancreatitis and hyperlipidemia. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2011; 19(10): 1022-1027

摘要

目的: 探讨一氧化氮(NO)含量变化对伴高脂血症急性出血坏死性胰腺炎(ANP)大鼠胰腺、肾损害的作用和对肾小球足细胞的影响。

方法: ♂ SD大鼠30只, 高脂饲料喂养4 wk建立大鼠高脂血症模型, 将大鼠随机等分为3组; A组即高脂血症+ANP; B组即高脂血症+ANP+L-精氨酸(L-arg); C组即高脂血症+ANP+L-硝基精氨酸甲基酯(L-name), 3组均逆行胰胆管注射3.5%牛磺脱氧胆酸钠制作大

鼠SAP模型. A组给予适量生理盐水, B组给予L-arg, 每次250 mg/kg, C组给予L-name, 每次10 mg/kg, 3组均在造模前30 min和造模后2 h 给药. 术后6 h监测血清淀粉酶(Amyl)、肌酐(Cr)、血尿素氮(BUN)、NO水平, 胰腺组织NO和内皮型一氧化氮合成酶(eNOS)含量变化, 光镜观察胰腺组织病理学变化, 电镜观察肾小球足细胞病理学变化, 免疫组织化学技术分析肾小球足细胞nephrin蛋白的表达情况.

结果: 与B组比较, A、C组Amyl(U/L)、Cr(μmol/L)、BUN(mmoll/L)水平显著升高 (Amyl: 4 219.8±900.0, 6 643.2±1 135.4 vs 2 434.4±831.6; Cr: 15.8±1.6, 22.4±3.3 vs 9.9±0.8; BUN: 135.9±23.6, 206.4±23.4 vs 103.2±13.2, 均P<0.01), 胰腺组织及肾脏足细胞损伤加重, 血清和胰腺组织NO(μmol/L)水平显著降低(59.46±11.21, 44.84±10.72 vs 78.88±9.76; 5.23±0.48, 4.39±0.45 vs 6.18±0.57, 均P<0.01), 胰腺组织eNOS、肾脏足细胞nephrin蛋白表达降低.

结论: 在伴高脂血症ANP合并肾功能障碍时, eNOS催化产生的NO不仅可以保护胰腺组织, 并且对肾小球足细胞和肾脏功能也具有一定的保护作用.

关键词: 一氧化氮; 急性胰腺炎; 肾损害; 肾小球足细胞; 高脂血症

吴婷, 王昭智. 一氧化氮在伴高脂血症急性出血坏死性胰腺炎大鼠胰腺及肾损害中的作用. 世界华人消化杂志 2011; 19(10): 1022-1027
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/1022.asp>

0 引言

急性肾功能障碍是急性坏死性胰腺炎(acute necrotizing pancreatitis, ANP)常见的并发症之一^[1]. ANP合并肾损害的发病机制尚不完全清楚, 一般认为血流动力学异常, 微循环障碍(microcirculatory disorder, MCD)和炎症介质、细胞因子的作用是ANP并发肾损害的主要原因. 内皮型一氧化氮合酶(endothelial nitric oxide synthase, eNOS)产生的NO可能参与调节血压和器官的血流分布, 抑制血小板的黏附和活化, 抑制多核粒细胞的聚集. 在ANP时, 外源性增加或减少体内NO含量, 是否加重或减轻胰肾损害程度, 以及对肾小球足细胞有怎样影响, 目前少有研究报道. 高脂血症作为ANP继发于胆源性, 酒精性之后的常见病因之一^[2], 近年来呈上升趋势. 本研究

拟通过建立伴高脂血症ANP大鼠模型, 应用L-精氨酸(L-arg)和L-硝基精氨酸甲基酯(L-name)对实验大鼠进行干预, 观察NO含量变化对胰肾损害和肾小球足细胞的影响.

■研发前沿
 NO已成为近年来研究的热点, NO对于ANP作用方面的研究也层出不穷.

1 材料和方法

1.1 材料 健康♂SD大鼠30只, 体质量180-220 g(购自上海斯莱克实验动物有限公司). 3.5%牛磺脱氧胆酸钠(购自厦门泰京生物技术有限公司), L-arg, L-name, DAB显色试剂盒(购自中山金桥生物技术有限公司), NO试剂盒(购自南京建成生物工程研究所), 兔抗大鼠eNOS多克隆抗体(购自美国Santa公司), 兔抗大鼠nephrin多克隆抗体(购自美国Biaworld公司).

1.2 方法

1.2.1 造模: ♂ SD大鼠30只, 清洁级, 质量180-220 g. 全部大鼠高脂饲料(主要成分为87.8%基础饲料+10%猪油+2%胆固醇+0.2%胆酸钠)喂养4 wk, 建立高脂血症模型^[3]. 随机等分为3组, 每组10只, 实验前12 h开始禁食, 自由饮水, 10%(3 mL/kg)水合氯醛ip麻醉, 无菌条件下经上腹正中切口进腹, 暴露胰腺, 5号头皮针经肠壁从十二指肠乳头插入胆胰管约1 cm, 用动脉夹固定针头近十二指肠乳头处. 近肝门处也用动脉夹阻断胆总管, 用微量注射泵注入3.5%牛磺脱氧胆酸钠1.0 mL/kg^[4], 注射速度0.2 mL/min, 保持压力7 min. A组制备ANP模型前30 min和后2 h ip注射适量生理盐水(NS)^[5], B组相同时间和途径给予L-arg(每次250 mg/kg), C组相同时间和途径给予L-name(每次10 mg/kg).

1.2.2 标本采集: 各组大鼠于造模6 h后麻醉开腹, 经右心房取血3-5 mL, 3 000 r/min离心10 min, 部分上清液置于-20 ℃冰箱, 部分置于-80 ℃冰箱待测. 切取胰腺组织, 一部分-80 ℃冰箱冻存; 另一部分置于40 g/L中性甲醛溶液固定备用. 切取右肾上极组织, 一部分置于40 g/L中性甲醛溶液固定备用, 另一部分切取1 mm×1 mm×1 mm组织3-5块, 放入1%锇酸溶液中固定.

1.2.3 检测指标及方法: (1)血清淀粉酶(amylase, Amyl)、肌酐(creatinine, Cr)、血尿素氮(blood urea nitrogen, BUN)检测: 吸取-20 ℃冰箱冻存的各组实验大鼠血清上清液1 mL, 用全自动生化分析仪(美国Beckman公司)检测; (2)血清、胰腺组织NO测定: 吸取-80 ℃冰箱冻存的各组实验大鼠血清上清液0.1 mL, 采用硝酸还原酶比色法测定血清NO₂⁻/NO₃⁻含量, 间接反应NO的生成量.

■创新盘点

多数研究结果显示高脂血症不仅能诱发急性胰腺炎(AP),而且能加重AP的损伤程度。本研究采用3.5%牛磺脱氧胆酸钠(而非5%牛磺脱氧胆酸钠)建立伴高脂血症ANP大鼠模型,不仅确保建模成功,还可降低大鼠死亡率,为成功建立伴高脂血症ANP大鼠模型提供实验依据。

表1 大鼠Amyl、Cr、BUN水平测定结果 ($n = 10$, mean \pm SD)

分组	Amyl(U/L)	Cr($\mu\text{mol}/\text{L}$)	BUN(mmol/L)
A组	4 219.8 \pm 900.0	15.8 \pm 1.6	135.9 \pm 23.6
B组	2 434.4 \pm 831.6 ^b	9.9 \pm 0.8 ^b	103.2 \pm 13.2 ^b
C组	6 643.2 \pm 1135.4 ^b	22.4 \pm 3.3 ^b	206.4 \pm 23.4 ^b

^b $P < 0.01$ vs A组。

将冻存于-80℃冰箱的各组实验大鼠胰腺组织匀浆,2 000 r/min离心10 min,取上清液0.5 mL,其余操作同血浆NO测定,按说明书进行操作。试剂盒购自南京建成生物工程研究所;(3)胰腺组织形态学检查及光镜下胰腺组织损伤定量评估:取固定于40 g/L甲醛的各组大鼠胰腺组织,常规石蜡包埋、切片,苏木素-伊红(HE)染色,光学显微镜下观察胰腺组织病理改变,并参照Grewal等^[6]对胰腺组织损伤进行定量评估。评分标准:水肿:0分=无水肿,1分=轻度叶间隙增宽,2分=重度叶间隙增宽,3分=腺泡间隙增宽,4分=细胞间隙增宽;炎症:以每高倍视野计,每5个炎细胞计0.5分,超过40个计4分;出血:0分=无出血,1分=有出血;坏死:0分=无坏死,1分=坏死面积1%-10%,2分=坏死面积11%-20%,3分=坏死面积21%-30%,4分=坏死面积>30%;(4)电镜下肾小球足细胞组织形态学观察:取固定于1%锇酸溶液的肾脏组织,逐级酒精、丙酮脱水,环氧树脂618包埋,半薄切片定位、超薄切片经醋酸铀和枸橼酸铅双重染色,Philips EM208S型透射按常规制备超薄切片,电镜观察肾小球足细胞的组织形态学改变;(5)免疫组织化学技术检测胰腺组织eNOS、肾小球足细胞nephrin表达水平:取固定于40 g/L甲醛的各组大鼠胰腺组织和肾脏组织,常规石蜡包埋、切片,采用兔超敏二步法,DAB显色。以PBS代替一抗作为空白对照。试剂盒购自中山金桥生物有限公司。具体判定标准如下:将染色程度分为4级:基本不着色者为0分,着色淡者为1分,着色适中者2分,着色深者为3分;着色细胞占计数细胞百分率≤5%为0分、6%-25%为1分、26%-50%为2分、≥51%为3分。将每个点阵着色程度与着色细胞百分率得分乘积,为其最后得分。0-1分为阴性(-),2-3分为弱阳性(+),4-6分为阳性(++)、6分以上为强阳性(+++).

统计学处理 本实验采用SPSS17.0统计软件,计量资料用Levene法进行方差齐性检验,组间两

表2 血清、胰腺组织NO浓度测定结果 ($n = 10$, mean \pm SD, $\mu\text{mol}/\text{L}$)

分组	血清	胰腺组织
A组	59.46 \pm 11.21	5.23 \pm 0.48
B组	78.88 \pm 9.76 ^b	6.18 \pm 0.57 ^b
C组	44.84 \pm 10.72 ^b	4.39 \pm 0.45 ^b

^b $P < 0.01$ vs A组。

两比较用LSD-t(方差齐)或Tamhane's T2(方差不齐)法进行显著性分析,等级资料用两个独立样本比较的Wilcoxon秩和检验。 $P < 0.05$ 为有统计学意义。

2 结果

2.1 Amyl、Cr、BUN水平 与A组比较,B组Amyl、Cr、BUN水平显著降低,C组上述各项指标显著升高,均具有统计学意义($P < 0.01$,表1)。

2.2 血清、胰腺组织NO浓度 与A组比较,B组血清、胰腺组织NO浓度显著升高,C组这些指标显著降低,均具有统计学意义($P < 0.01$,表2)。

2.3 胰腺组织病理学表现 A组:叶间隙及腺泡间隔显著扩张,大量炎症细胞浸润,可见较多红细胞,面积不等的腺细胞坏死。B组:叶间隙轻度增宽,炎症细胞浸润,红细胞较A组减少,偶见腺细胞坏死。C组:同样出现水肿、炎症细胞浸润、出血、坏死等改变,尤以坏死更为严重,部分细胞内可见脂质空泡形成。参照Grewal法,与A组比较,B组水肿、炎症、出血、坏死均减轻,C组明显加重,差异有统计学意义($P < 0.05$,表3)。

2.4 肾小球足细胞电镜表现 A组:足细胞结构尚完整,胞质密度下降,体积增大,细胞内空泡形成,部分细胞器消失。B组:足细胞足突宽度明显增加,部分可见融合,并有微绒毛形成。C组:足细胞线粒体等细胞器消失,细胞膜消失,细胞结构及完整性破坏,并可见红细胞自血管祥溢出(图1)。

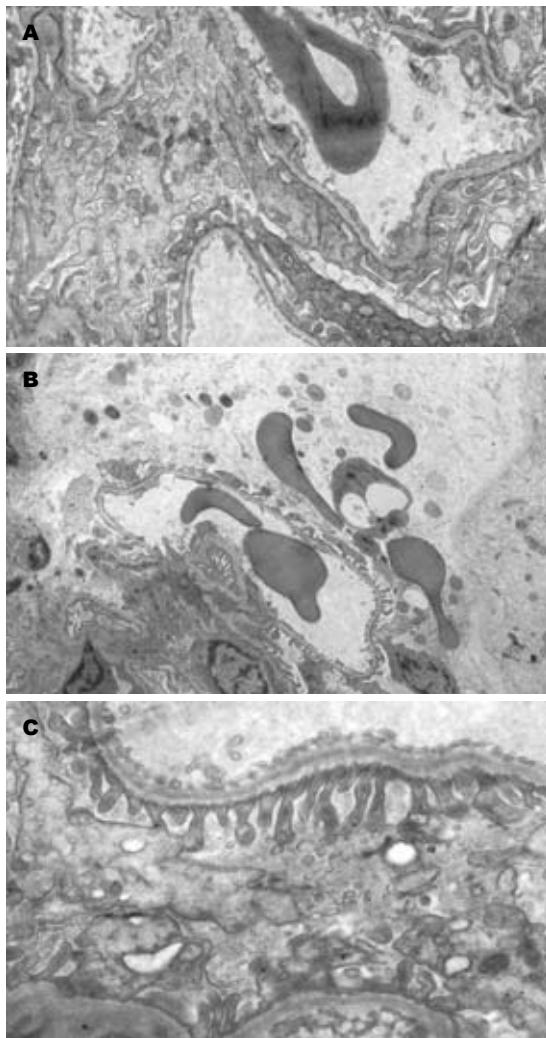
2.5 胰腺组织eNOS、肾小球足细胞nephrin水平 与A组比较,B组胰腺组织eNOS、肾小球足细胞nephrin染色程度较深,全部细胞均染色,C组染色程度浅,染色细胞较A组明显减少,差异有统计学意义($P < 0.05$,表4,图2,3)。

3 讨论

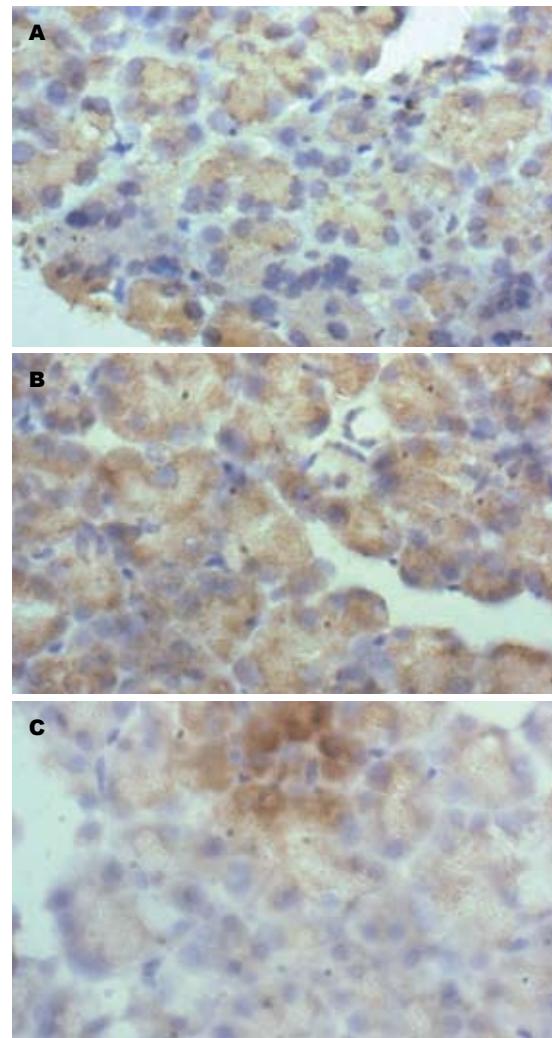
ANP常并发多器官功能不全综合征(multiple organ dysfunction syndrome, MODS),在胰外器官损伤中,肾功能障碍发生率仅次于肺功能障碍^[1],大

表 3 胰腺组织病理学评估结果(%)

分组	水肿(分)					坏死(分)					炎症(分)								出血(分)	
	0	1	2	3	4	0	1	2	3	4	0.5	1	1.5	2	2.5	3	3.5	4	0	1
A组	0	0	7	3	0	0	1	3	6	0	0	0	0	0	2	6	2	0	6	4
B组	0	8	2	0	0	0	7	3	0	0	0	1	0	5	3	2	0	0	3	7
C组	0	0	1	7	2	0	0	0	2	8	0	0	0	0	0	1	1	8	0	10

图 1 各组大鼠电镜肾小球足细胞改变($\times 15\,000$). A: A组; B: B组; C: C组.

约在14%-43%. 其发病机制仍不明确, 目前认为可能与以下因素有关: (1)毛细血管渗漏综合征的发生, 大量炎性渗液和组织液进入第三间隙, 同时释放大量血管活性物质, 造成有效循环血容量不足, 血流量减少, 引起肾脏局部的血液循环动力学改变, MCD; (2)炎症介质、细胞因子直接损伤肾小球内皮细胞和肾小管上皮细胞^[7]; (3)大量腹腔炎性渗液吸收进入血液循环对肾脏的毒性作用. 其中血液循环动力学改变, MCD和炎症介质、细胞因子的作用被认为是ANP时肾功能障碍的

图 2 各组大鼠胰腺eNOS表达变化(HE $\times 400$). A: A组; B: B组; C: C组.

重要因素^[8]. 因此, 改善血液循环动力学、MCD, 抑制炎症介质和细胞因子成为治疗ANP合并肾功能障碍的关键.

NO是一种很强生物活性物质, 具有广泛且重要的生物学功能. 在体内L-arg通过一氧化氮合成酶(nitric oxide synthase, NOS)作用合成NO是NO的唯一合成途径. eNOS是3种NOS中的一种, 由内皮细胞产生. eNOS催化作用下合成的NO能有效改善胰腺微循环, 抑制白细胞内皮细胞相互作用, 抑制血小板黏附和聚集, 抗血栓形

■应用要点

本实验通过建立高脂血症型ANP大鼠模型, 应用L-arg和L-name对模型进行干预, 探讨NO在伴高脂血症ANP大鼠合并肾损害时对胰腺和肾功能的作用, 并通过检测大鼠肾小球足细胞nephrin的表达情况, 探讨对肾小球足细胞的可能作用, 旨在为临床防治伴高脂血症ANP合并肾损害扩宽思路, 并提供新的实验基础.

■同行评价

本文新颖性较好，具有一定的临床参考价值。

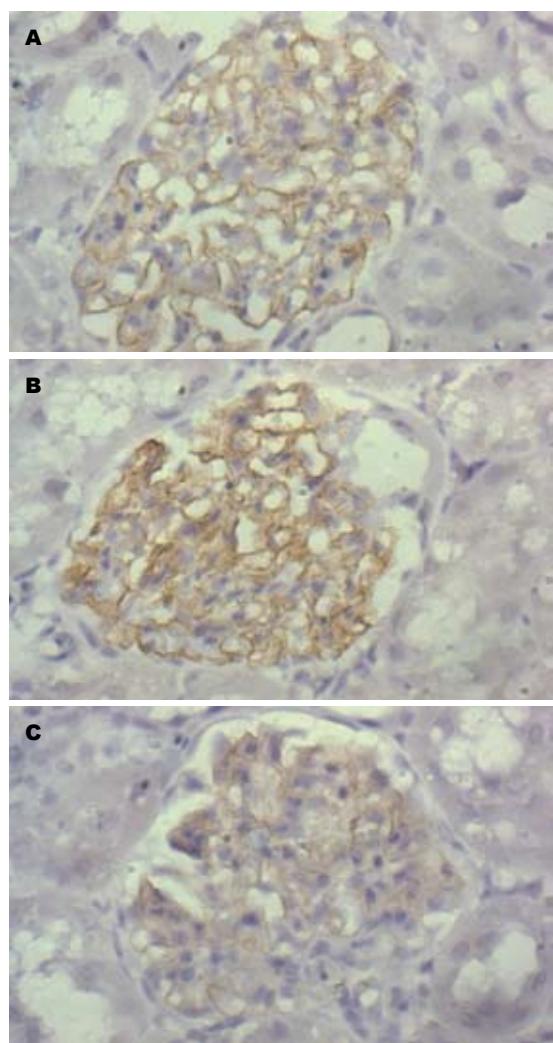


图3 各组大鼠肾脏nephrin表达变化(HE $\times 400$). A: A组; B: B组; C: C组.

成^[9]. 近年来有研究结果显示NO可以减轻ANP的损害作用^[10,11]. L-name属于非选择性底物抑制剂, 但对eNOS的抑制作用最强^[12]. 本研究显示, 实验大鼠在注射L-arg之后, 与A组比较, eNOS表达升高, 血清NO, 胰腺组织NO水平亦随之升高, Amyl明显下降, 胰腺及肾小球足细胞病理损伤减轻, 血清Cr, BUN水平随之降低, nephrin表达升高, 而C组与A组比较, 则得出相反实验结果. 这说明增加体内NO水平, 不仅降低ANP的严重程度, 而且可以有效改善胰肾功能障碍, 对肾小球足细胞也起到一定的保护作用. 同时也从正反两方面证明了体内NO含量与eNOS的表达水平呈正相关.

肾小球足细胞是位于肾小球基底膜外侧的一种终末期分化细胞, 是维持肾小球滤过屏障结构和功能正常的主要细胞之一, 其裂孔隔膜是避免机体蛋白丢失的最后一道屏障. 目前认

表4 胰腺组织、肾小球表达评估结果(n)

分级	eNOS			nephrin		
	A组	B组	C组	A组	B组	C组
-	0	0	8	0	0	7
+	3	0	2	8	2	2
++	7	2	0	2	1	1
+++	0		0	0	7	0

为, 特异性表达于足细胞裂孔膜上的蛋白分子nephrin是肾小球滤过屏障选择性功能的关键, 参与细胞的信号转导、维持足细胞的正常形态和功能^[13]. 有文献报道, 当肾功能障碍时, 足细胞足突融合, 细胞脱落或发生凋亡, 功能受损, 数量减少, nephrin表达明显减少^[14,15], 因此肾小球足细胞nephrin水平可以作为检测肾小球足细胞功能的可靠指标. 本实验研究表明, ANP导致肾功能障碍时, 血清Cr、BUN升高, 足细胞结构及完整性破坏, 裂孔隔膜的屏障滤过作用消失, 红细胞溢出, nephrin表达减少, 并且血清Cr、BUN升高的程度与肾小球足细胞病理损伤程度呈正相关, 而与nephrin表达水平呈负相关.

高脂血症作为ANP的危险因素之一, 可激活血小板, 损伤血管内皮细胞, 促进eNOS向细胞膜上的caveolae内转位, 从而影响其活性, 减少NO生成^[16], 而伴高脂血症的ANP两种损害因素的作用下有可能使NO生成减少更加重, 因而补充外源性NO就成为一种必要的治疗措施^[17,18]. 本实验研究中也证实, eNOS表达产生的NO在伴高脂血症ANP合并肾功能障碍时, 不仅缓解ANP的病情发展, 而且对肾脏也有一定的保护作用, 其机制可能与改善肾脏MCD, 调节肾血流量和抑制白细胞黏附和激活, 抑制血小板聚集有关. 然而, NO对肾小球足细胞的保护机制还不清楚, 仍有待进一步研究.

4 参考文献

- Pupelis G. Renal failure in acute pancreatitis. Timing of dialysis and surgery. *Przegl Lek* 2000; 57 Suppl 5: 29-31
- Chang MC, Su CH, Sun MS, Huang SC, Chiu CT, Chen MC, Lee KT, Lin CC, Lin JT. Etiology of acute pancreatitis—a multi-center study in Taiwan. *Hepatogastroenterology* 2003; 50: 1655-1657
- 林征, 吴小南, 汪家梨. 雄性SD大鼠高脂血症模型饲料配方的实验研究. 海峡预防医学杂志 2007; 13: 56-57
- 吴婷, 杨琳娜, 韩海燕. 伴高脂血症性重症急性胰腺炎大鼠的肠道免疫功能的实验研究. 国际消化病杂志 2009; 29: 201-204
- Ang AD, Adhikari S, Ng SW, Bhatia M. Expression of nitric oxide synthase isoforms and nitric oxide

- production in acute pancreatitis and associated lung injury. *Pancreatology* 2009; 9: 150-159
- 6 Grewal HP, Mohey el Din A, Gaber L, Kotb M, Gaber AO. Amelioration of the physiologic and biochemical changes of acute pancreatitis using an anti-TNF-alpha polyclonal antibody. *Am J Surg* 1994; 167: 214-218; discussion 218-219
- 7 徐毅晖, 陈昱, 崔淑兰, 王晖. 促炎和抗炎因子在急性胰腺炎发病机制中的研究进展. 世界华人消化杂志 2010; 18: 1912-1918
- 8 Yekebas EF, Strate T, Zolmajd S, Eisenberger CF, Erbersdobler A, Saalmüller A, Steffani K, Busch C, Elsner HA, Engelhardt M, Gillesen A, Meins J, The M, Knoefel WT, Izicki JR. Impact of different modalities of continuous venovenous hemofiltration on sepsis-induced alterations in experimental pancreatitis. *Kidney Int* 2002; 62: 1806-1818
- 9 陈祥建, 张启瑜, 陈必成. 早期应用L-精氨酸治疗急性出血坏死性胰腺炎的实验研究. 肝胆胰外科杂志 2002; 14: 220-222
- 10 Sánchez-Bernal C, García-Morales OH, Domínguez C, Martín-Gallán P, Calvo JJ, Ferreira L, Pérez-González N. Nitric oxide protects against pancreatic subcellular damage in acute pancreatitis. *Pancreas* 2004; 28: e9-e15
- 11 Cosen-Binker LI, Binker MG, Cosen R, Negri G, Tiscornia O. Influence of nitric oxide-donating non-steroidal anti-inflammatory drugs on the evolution of acute pancreatitis. *Shock* 2006; 25: 190-203
- 12 周昭前, 周宏灏. 一氧化氮合酶抑制剂的研究进展. 中国药理学通报 1999; 15: 11-14
- 13 申焕蓉, 曹灵. 足细胞表型的改变与肾脏疾病. 中国中西医结合肾病杂志 2009; 10: 279-280
- 14 谭会斌, 傅淑霞, 杨林. 缬沙坦联合苯那普利对糖尿病大鼠足细胞损伤的影响及肾脏保护机制的研究. 中国中西医结合肾病杂志 2008; 9: 338-341
- 15 Siu B, Saha J, Smoyer WE, Sullivan KA, Brosius FC 3rd. Reduction in podocyte density as a pathologic feature in early diabetic nephropathy in rodents: prevention by lipoic acid treatment. *BMC Nephrol* 2006; 7: 6
- 16 Yang B, Rizzo V. TNF-alpha potentiates protein-tyrosine nitration through activation of NADPH oxidase and eNOS localized in membrane rafts and caveolae of bovine aortic endothelial cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2007; 292: H954-H962
- 17 Tsuchihashi S, Kaldas F, Chida N, Sudo Y, Tamura K, Zhai Y, Qiao B, Busuttil RW, Kupiec-Weglinski JW. FK330, a novel inducible nitric oxide synthase inhibitor, prevents ischemia and reperfusion injury in rat liver transplantation. *Am J Transplant* 2006; 6: 2013-2022
- 18 Sukhotnik I, Helou H, Mogilner J, Lurie M, Bernstein A, Coran AG, Shiloni E. Oral arginine improves intestinal recovery following ischemia-reperfusion injury in rat. *Pediatr Surg Int* 2005; 21: 191-196

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)

丹参酮ⅡA对人胰腺癌细胞凋亡的诱导作用及其对SAPK/JNK信号转导通路的影响

王炎, 李琦, 范忠泽, 王忆勤, 邱艳艳, 靳宝辉, 陈星竹, 殷佩浩

■背景资料

丹参酮ⅡA是中药丹参的有效成分之一, 近年研究发现, 丹参酮ⅡA对胰腺癌等多种肿瘤细胞具有显著的杀伤作用, 已成为肿瘤治疗的一个新靶点。王炎, 李琦, 范忠泽, 靳宝辉, 陈星竹, 上海中医药大学附属普陀医院肿瘤科 上海市 200062
王忆勤, 上海中医药大学基础医学院 上海市 201203
邱艳艳, 殷佩浩, 上海中医药大学附属普陀医院普外科 上海市 200062
王炎, 博士, 主要从事中医药治疗肿瘤方面的研究。
国家自然科学基金资助项目, No. 81001594
上海市教育委员会科研基金资助项目, No. 07cz014
上海市科委自然基金资助项目, No. 09ZR1428500
上海市重点学科基金资助项目, No. S30302
作者贡献分布: 此课题由李琦与王炎设计; 研究过程由殷佩浩与王炎操作完成; 研究所用新试剂及分析工具由范忠泽与王忆勤提供; 数据分析由邱艳艳、靳宝辉及陈星竹完成; 本论文写作由殷佩浩与王炎完成。
通讯作者: 殷佩浩, 200062, 上海市普陀区兰溪路164号, 上海中医药大学附属普陀医院普外科, yinpeihao1975@hotmail.com
电话: 021-62572723-4305 传真: 021-62161216
收稿日期: 2010-12-11 修回日期: 2011-03-14
接受日期: 2011-03-23 在线出版日期: 2011-04-08

Tanshinone IIA induces apoptosis of pancreatic cancer cells via the SAPK/JNK signal pathway

Yan Wang, Qi Li, Zhong-Ze Fan, Yi-Qin Wang,
Yan-Yan Qiu, Bao-Hui Jin, Xing-Zhu Chen, Pei-Hao Yin

Yan Wang, Qi Li, Zhong-Ze Fan, Bao-Hui Jin, Xing-Zhu Chen, Department of Oncology, Putuo Hospital Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200062, China

Yi-Qin Wang, School of Basic Medical Sciences, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China

Pei-Hao Yin, Yan-Yan Qiu, Department of General Surgery, Putuo Hospital Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200062, China
Supported by: the National Natural Science Foundation of China, No. 81001594; the Foundation of Shanghai Municipal Education Commission, No. 07cz014; the Foundation of Shanghai Municipal Science and Technology Commission, No. 09ZR1428500; and the Shanghai Leading Academic Discipline Project, No. S30302

Correspondence to: Pei-Hao Yin, Department of General Surgery, Putuo Hospital Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, 164 Lanxi Road, Puto District, Shanghai 200062, China. yinpeihao1975@hotmail.com

Received: 2010-12-11 Revised: 2011-03-14

Accepted: 2011-03-23 Published online: 2011-04-08

■同行评议者

杜群, 副研究员, 广州中医药大学脾胃研究所药理室; 张春虎, 副教授, 中南大学湘雅医院中西医结合研究所

Abstract

AIM: To investigate whether tanshinone IIA (TSIIA) induces apoptosis of human pancreatic

cancer cells via the SAPK/JNK signal pathway.

METHODS: After treatment with TSIIA, MTT assay was used to observe the cytostatic effect of TSIIA on human pancreatic cancer PANC-1 cells; cell apoptosis was assessed by immunofluorescence and flow cytometry (FCM); p-JNK expression was assayed by Western blot; and mRNA expression of survivin was detected by quantitative fluorescence PCR.

RESULTS: TSIIA inhibited PANC-1 cell growth in a concentration- and time-dependent manner. After PANC-1 cells were treated with 8, 16, or 32 mg/L of TSIIA for 48 h, typical morphologic changes of apoptosis were observed by fluorescence microscopy after Hoechst staining. The apoptosis rates of cells treated with 8, 16, and 32 mg/L of TSIIA for 48 h were (8.83 ± 1.51)%, (12.86 ± 2.70)% and (21.24 ± 2.58)%, respectively, showing a significant difference among the three groups ($P < 0.01$). After the SAPK/JNK signal pathway was blocked, cell apoptosis rate decreased significantly ($P < 0.01$). p-JNK expression began to increase at 1 h and reached the peak at 4 h after TSIIA treatment. The mRNA expression of the survivin gene decreased obviously after treatment with 16 mg/L TSIIA for 48 h but increased significantly when the SAPK/JNK signal transduction pathway was blocked.

CONCLUSION: TSIIA can induce human pancreatic cancer cell apoptosis. TSIIA exerts anti-pancreatic cancer effects possibly by down-regulating the expression of survivin mRNA via the SAPK/JNK signal transduction pathway.

Key Words: Tanshinone IIA; Pancreatic cancer; Apoptosis; SAPK/JNK; Signal transduction; Survivin

Wang Y, Li Q, Fan ZZ, Wang YQ, Qiu YY, Jin BH, Chen XZ, Yin PH. Tanshinone IIA induces apoptosis of human pancreatic cancer cells via the SAPK/JNK signal pathway. Shijie Huaren Zazhi 2011; 19(10): 1028-1033

摘要

目的: 研究丹参酮ⅡA诱导人胰腺癌细胞凋亡

和凋亡相关基因表达的JNK信号转导通路, 揭示其抗胰腺癌的部分机制.

方法: MTT法观察丹参酮ⅡA对人胰腺癌PANC-1细胞的生长抑制作用; 8、16、32 mg/L丹参酮ⅡA分别作用人胰腺癌PANC-1细胞48 h后, 免疫荧光染色观察细胞凋亡情况; 流式细胞仪法(FCM)检测细胞凋亡; Western blot检测丹参酮ⅡA作用PANC-1细胞后SAPK/JNK信号通路的激活情况, 荧光定量PCR检测Survivin基因mRNA的表达水平; 并比较阻断JNK信号通路后, 丹参酮ⅡA对胰腺癌细胞凋亡Survivin基因mRNA的表达.

结果: MTT法测得丹参酮ⅡA对人胰腺癌PANC-1细胞的生长抑制率均有显著的抑制作用, 其作用与剂量和作用时间成正相关; 丹参酮ⅡA作用48 h后, 荧光显微镜下观察到经Hoechst染色的典型凋亡细胞. 8、16、32 mg/L浓度丹参酮ⅡA作用人胰腺癌细胞后的细胞凋亡率分别为 $8.83\% \pm 1.51\%$, $12.86\% \pm 2.70\%$ 和 $21.24\% \pm 2.58\%$, 与对照组($0.63\% \pm 0.18\%$)比较, 均有显著性差异(均 $P < 0.01$); 阻断JNK信号通路后, 凋亡率明显降低($P < 0.01$). 丹参酮ⅡA作用人胰腺癌细胞1 h后JNK信号通路被激活, 4 h达峰值. 16 mg/L丹参酮ⅡA作用人胰腺癌细胞48 h后, Survivin mRNA的表达明显下降, 分别为正常细胞的0.61, 0.39, 0.10倍; 阻断JNK信号通路后, 丹参酮ⅡA作用人胰腺癌细胞的Survivin mRNA的表达明显上升.

结论: 丹参酮ⅡA能诱导人胰腺癌PANC-1细胞株凋亡. 通过JNK信号转导通路下调Survivin mRNA的表达可能是其诱导胰腺癌细胞凋亡的重要机制.

关键词: 丹参酮ⅡA; 胰腺癌; 凋亡; SAPK/JNK; 信号转导; 生存素

王炎, 李琦, 范忠泽, 王忆勤, 邱艳艳, 靳宝辉, 陈星竹, 殷佩浩. 丹参酮ⅡA对人胰腺癌细胞凋亡的诱导作用及其对SAPK/JNK信号转导通路的影响. 世界华人消化杂志 2011; 19(10): 1028-1033

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/1028.asp>

0 引言

丹参酮ⅡA(tanshinone ⅡA, TSⅡA)为中药丹参主要有效成分之一, 最早用于治疗心脑血管疾病. 近年研究发现, TSⅡA对肝癌、胃癌等多种肿瘤细胞具有显著的杀伤作用, 引起了人们的广泛关注^[1-3]. 国内外已有的研究^[4-6]证实, TSⅡA能够诱导体外培养的细胞凋亡. 我们最近的实

验研究也表明, TSⅡA能够显著地抑制小鼠胰腺癌瘤体生长, 延长生存期, 其抗胰腺癌的主要机制是诱导细胞凋亡^[7,8]. 但其诱导细胞凋亡机制尚不明确. 本研究从细胞内信号转导角度对TSⅡA诱导人胰腺癌细胞株PANC-1细胞凋亡及凋亡相关基因进行研究, 探讨p38MAPK信号通路在TSⅡA诱导人胰腺癌细胞凋亡中的作用, 为揭示TSⅡA治疗胰腺癌的机制提供实验依据.

1 材料和方法

1.1 材料 人胰腺癌细胞株PANC-1购于中科院上海细胞研究所; TSⅡA购自西安冠宇生物技术有限公司, 纯度 $\geq 98\%$ (批号: 200512001). JNK特异性的抑制剂sp600125购于美国Serologllcais公司; 总RNA抽提试剂RNAiso Reagent、荧光定量PCR试剂日本TaKaRa公司; GAPDH、Survivin上下游引物和探针由上海闪晶分子生物科技有限公司设计并合成, 5'端标记上报告荧光基团FAM(6-carboxy-fluo-rescein-phosphoramidite), 3'端标记上淬灭荧光基团TAMRA(carboxy-tetramethyl-rhodamine). 引物序列如下: 上游引物: 5'-GGTCATCCAGTCGCTTGT-3', 下游引物: 5'-AATTCTGTTGCCACCTTCG-3'; 内参GAPDH作为对照, 上游引物: 5'-CCACTCCTCACCTTGAC-3', 下游引物: 5'-ACCCTGTTGCTGTAGCCA-3'. 氯仿、异丙醇、无水乙醇均为分析纯.

1.2 方法

1.2.1 MTT法测定TSⅡA对人胰腺癌细胞的生长抑制作用: 取对数生长期的人胰腺癌PANC-1细胞, 调整细胞浓度至 $2 \times 10^7 / L$, 以每孔 $100 \mu L$ 接种于96孔培养板中, 在 50 mL/L CO_2 、饱和湿度、 37°C 孵箱中预培养24 h后加入 $100 \mu L$ 不同浓度培养液配制的TSⅡA, 使最终每组含TSⅡA浓度分别为: 2、4、8、16、32、64 mg/L 6个剂量, 每个剂量分别设4个复孔, 并设正常细胞作对照组, 继续培养. 分别于24、48、72 h 3个时相进行MTT比色实验: 每次于实验结束前每孔加入浓度为 $5 \text{ g/L MTT液} 20 \mu L$, 37°C 避光培养继续培养4 h, 使MTT还原为formazan. 每孔加DMSO $150 \mu L$, 震荡10 min, 混匀使formazan充分溶解, 10 min后置于酶标仪570 nm检测吸光度(A)值, 以空白组平均值调零, 按以下公式计算抑制率: 细胞生长抑制率 = $(1 - \text{实验孔平均} A \text{ 值}) / \text{对照孔平均} A \text{ 值} \times 100\%$, 以剂量和生长抑制率作直线相关分析.

■研发前沿
随着分子生物学技术的发展, 信号转导及表达调控机制成为当今肿瘤研究中的热点. 如能从细胞内信号转导角度, 深入研究丹参酮ⅡA诱导胰腺癌细胞凋亡的机制, 将会为胰腺癌的治疗提供新的途径和实验方法.

■相关报道

国内外有关报道提示丹参酮ⅡA对多种肿瘤细胞具有显著的杀伤作用。国内已有的研究证明丹参酮ⅡA能够诱导体外培养的细胞凋亡,但对丹参酮诱导胰腺癌细胞凋亡的具体机制尚缺乏报道。

1.2.2 Hoechst染色观察细胞凋亡形态: PANC-1细胞常规培养,取对数生长期细胞制备细胞悬液,以每孔 1×10^5 个细胞接种于6孔培养板中,在37℃、50 mL/L CO₂的培养箱中培养过夜。加不同浓度TSⅡA(浓度为8、16、32 mg/L)作用48 h后,按说明书固定、染色、封片。荧光显微镜下激发波长350 nm,发射波长460 nm观察。

1.2.3 流式细胞仪检测细胞凋亡: 人胰腺癌PANC-1细胞常规培养至对数生长期,换无血清培养液培养12 h使细胞周期同步化,设8、16、32 mg/L TSⅡA组,20 μmol/L的JNK抑制剂sp600125组,20 μmol/L的JNK抑制剂sp600125 TSⅡA组,培养48 h后,分别收集各组细胞置于10 mL离心管中。各样本的细胞密度为 1×10^9 /L,1 000 r/min离心5 min后弃去培养液。用孵育缓冲液洗涤1次,1 000 r/min离心5 min,用100 μL标记溶液重悬细胞,室温下避光孵育15 min,1 000 r/min离心5 min沉淀细胞,孵育缓冲液洗1次。加入Annexin V-FITC /PI溶液5 μL,4 ℃下孵育20 min。最后补400 μL PBS,用流式细胞仪(FACS Calibur,BD公司)检测细胞凋亡情况。每个样品检测1万个细胞,用Cell Quest软件分析细胞凋亡情况。

1.2.4 Western印迹法检测JNK的磷酸化: 将各组细胞用预冷的PBS液洗2次,吸弃PBS液,加入预冷的含抑制剂的蛋白质抽提试剂,轻轻摇动5 min后,用一预冷的橡胶和塑料细胞刮刮下培养瓶壁上细胞,转移细胞悬液到离心管中,冰浴15 min进行裂解。裂解液于预冷的离心机中14 000 r/min离心15 min,吸弃上清液;BCA法测定蛋白质浓度。50 μg总蛋白在SDS聚丙烯酰胺凝胶电泳分离后,电转移至PVDF膜,膜在5% BSA溶液中室温培养1 h,以封闭膜上的非特异结合。封闭过的膜加入一抗4 ℃过夜。TBST洗膜3次,每次5 min;再加入HRP标记的二抗,室温孵育1 h,TBST洗膜3次,每次5 min;同样方法标记鼠单克隆抗GAPDH作对照。洗膜稍干后,按1:1加入AB显影液(与二抗HRP结合),在Bio-Rad的化学发光成像仪上显影,然后分析灰度值,再计算灰度系数比。

1.2.5 荧光定量PCR检测Survivin mRNA表达: 将TSⅡA稀释至终浓度为16 mg/L,处理人胰腺癌细胞48 h后加胰酶消化离心收集细胞。将各组细胞分别加入2 mL RNAiso,按说明书提取总RNA,1 μL总RNA在20 μL体系中按照标准程序进行反转录,反应条件:37 ℃ 15 min,85 ℃ 5 s。Survivin

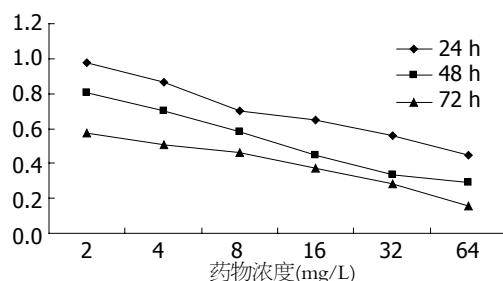


图1 TSⅡA对人胰腺癌PANC-1细胞生长的抑制作用。

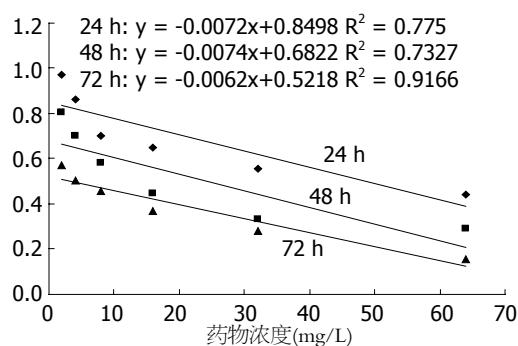


图2 TSⅡA对PANC-1细胞生长抑制率与剂量的关系。

和GAPDH基因荧光定量PCR反应体系均如下: Premix EX Taq™ 10 μL, Rox Reference Dye 0.4 μL, 上下游引物各0.4 μL, 荧光探针0.8 μL, dH₂O 6 μL, cDNA 2 μL, 20 μL体系, 反应条件如下:(1) 预变性: 95 ℃ 10 s; (2) 变性: 95 ℃ 5 s; (3) 退火, 延伸: 60 ℃ 31 s, 40个循环, 数据采用ABI 7300 SDS Software分析。相对mRNA表达 = $2^{-\Delta Ct}$, ΔCt值 = 靶基因Ct值-GAPDH Ct值。以GAPDH作为内参照, 同时以PANC-1细胞作为基准, 各组细胞mRNA的表达量表示成PANC-1细胞的N倍。N = 样品表达量/基准表达量 = $2^{\frac{-\text{样本Ct}}{\text{基准Ct}}}$, 每组均做3个样本, 取均数。

统计学处理 采用PEMS3.1医学统计软件包进行统计分析。采用计量资料以mean±SD表示。多样本比较采用单因素方差分析, Student's *t*, Rank sum test, SNK检验方法进行统计分析, 组间比较用*t*或*t'*检验。*P*<0.05具有统计学差异。

2 结果

2.1 TSⅡA对人胰腺癌细胞的生长抑制作用 不同剂量的TSⅡA在对PANC-1细胞的生长均有一定的抑制作用。在相同的作用时间随着TSⅡA作用剂量的增加对PANC-1细胞的生长抑制率明显增高(*P*<0.01, 图1), 量效关系明显, 以下公式表明TSⅡA剂量与抑制率成正相关。TSⅡA剂量和对胰腺癌细胞的生长抑制率之间的直线回

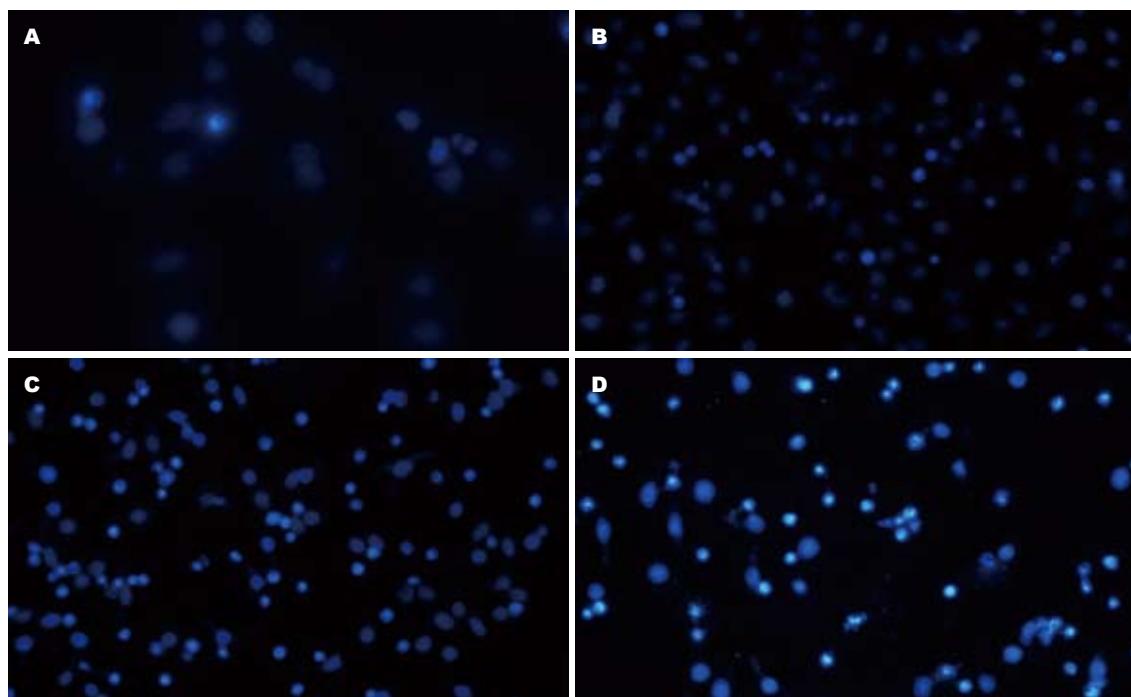


图 3 荧光显微镜细胞的形态学(Hoechst染色 $\times 200$) A: 对照组; B: 8 mg/L TS II A组; C: 16 mg/L TS II A组; D: 32 mg/L TS II A组.

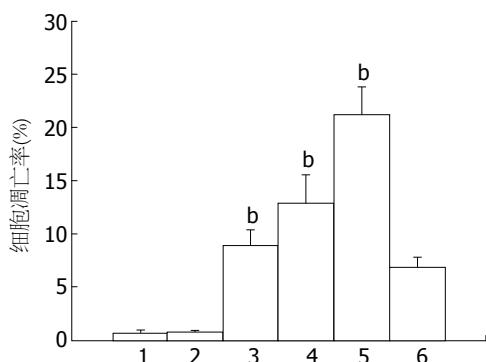


图 4 TS II A对胰腺癌细胞凋亡的影响. 1: 对照组; 2: JNK抑制剂组; 3: 8 mg/L TS II A组; 4: 16 mg/L TS II A组; 5: 32 mg/L TS II A组; 6: 16 mg/L TS II A+JNK抑制剂组. * $P < 0.01$ vs 对照组.

归方程为: 24 h: $y = -0.0072x + 0.8498$, $R^2 = 0.775$; 48 h: $y = -0.0074x + 0.6822$, $R^2 = 0.7327$; 72 h: $y = -0.0062x + 0.5218$, $R^2 = 0.9166$. 72 h半数抑制浓度(IC_{50})为3.52 mg/L(图2).

2.2 荧光显微镜观察细胞的形态学变化 荧光显微镜下对照组PANC-1细胞(未加药物处理)核呈弥漫均匀的蓝色荧光染色, 未见凋亡荧光染色细胞. 8、16、32 mg/L剂量的TS II A作用于人胰腺癌PANC-1细胞后, 均可见凋亡细胞, 表现为胞核或胞质内可见浓染致密的颗粒荧光及块状荧光(DNA荧光碎片, 图3).

2.3 TS II A对胰腺癌细胞凋亡和细胞周期的影响 8、16、32 mg/L浓度的TS II A作用人胰腺癌

细胞后的细胞凋亡率明显高于对照组的凋亡率($8.83\% \pm 1.51$, $12.86\% \pm 2.70\%$, $21.24\% \pm 2.58\% vs 0.63 \pm 0.18\%$), 并出现凋亡典型性特征峰. 加入抑制剂sp600125组的细胞凋亡率, TS II A组作用人胰腺癌细胞后凋亡率显著提高($0.78 \pm 0.09\% vs 0.63 \pm 0.18\%, P < 0.01$); 阻断SAPK/JNK信号转导通路后TS II A作用人胰腺癌细胞后凋亡率明显降低($P < 0.01$). 提示TS II A通过胰腺癌细胞内SAPK/JNK信号转导途径诱导细胞凋亡(图4).

2.5 TS II A对PANC-1细胞JNK的激活作用 对照组PANC-1细胞p-JNK弱表达, TS II A作用PANC-1细胞1 h时JNK被迅速激活, 随着作用时间的延长p-JNK表达逐步增强, 4 h达峰值, 约为对照组的2.5倍(图5).

2.6 SAPK/JNK信号通路对TS II A诱导胰腺癌细胞凋亡Survivin mRNA的影响 TS II A作用人胰腺癌细胞48 h后Survivin mRNA的表达明显下调($P < 0.01$), 分别为正常细胞的0.61, 0.39, 0.10倍; 阻断SAPK/JNK信号通路后, Survivin mRNA的表达明显上调($P < 0.01$, 图6).

3 讨论

胰腺癌属于中医中“癥瘕”、“积聚”等范畴. 近年来, 中医药治疗胰腺癌显示出一定的优势, 引起了人们关注, 现代研究发现^[9-11], 中医药在胰腺癌治疗中具有在减轻症状、控制肿瘤发展、

■创新点
本研究从细胞内信号转导角度揭示丹参酮 II A的抗胰腺癌机制, 并发现丹参酮 II A通过SAPK/JNK信号通路下调Survivin基因诱导胰腺癌细胞凋亡, 是其抗肿瘤的重要机制.

■应用要点

本文研究了丹参酮ⅡA诱导人胰腺癌细胞凋亡的有效浓度和剂量关系,探讨了治疗其作用的分子机制,为丹参酮ⅡA治疗胰腺癌提供了理论依据。

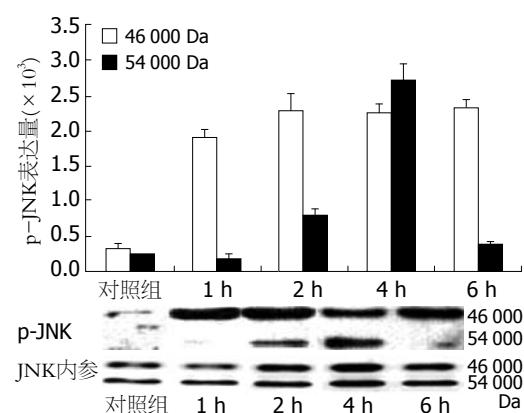


图 5 TS II A对PANC-1细胞JNK的激活作用.

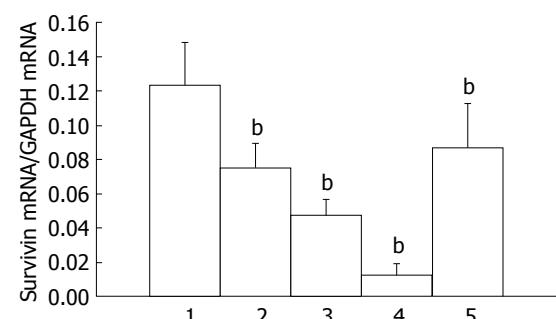


图 6 TS II A诱导人胰腺癌细胞凋亡对Survivin mRNA的影响. 1: 对照组; 2: 8 mg/L TS II A组; 3: 16 mg/L TS II A组; 4: 32 mg/L TS II A组; 5: 16 mg/L TS II A+JNK抑制剂组.
^bP<0.01 vs 对照组.

延长带瘤生存期等方面作用。瘀血是肿瘤的常见中医症候, 活血化瘀是肿瘤的重要的中医治疗方法之一。中药丹参是活血化瘀的要药, 丹参酮是从中药丹参中提取的脂溶性有效成分, 按其不同的化学结构分为Tan I A、Tan II A、Tan III B、丹参酮IV等15种成分, 其中TS II A具有天然抗炎、抗氧化作用, 早年主要用于心脑血管病, 近年来研究发现对肝癌等多种肿瘤细胞具有抑制作用, 其抗肿瘤的作用的通过诱导细胞凋亡途径的来实现^[12,13]。课题组前期实验研究也表明, TS II A能够显著地抑制小鼠胰腺癌瘤体生长, 延长生存期, 其抗胰腺癌的主要机制是诱导细胞凋亡。

细胞凋亡是在基因调控下的细胞程序性死亡, 临幊上除了大剂量化疗、放疗可能引起细胞坏死外, 一般抗癌药物、激素制剂、放疗、中药等的主要作用机制之一, 都是通过诱导各自敏感的细胞发生凋亡来达到治疗目的。凋亡不仅直接影响着机体组织的正常发育、分化与死亡, 他在肿瘤治疗中的作用也已受到极大的重视^[14-16]。

c-Jun氨基末端激酶(c-Jun N-terminal kinase, JNK)也被称为应激活化蛋白激酶(stress-activated protein kinase, SAPK), 是丝裂原活化蛋白酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)家族中的重要成员, 是细胞内重要的信号转导通路之一^[17-19]。JNK位于细胞质, 相对分子质量为54 000 Da的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶。JNK包含双磷酸化的功能区Thr-Pro-Tyr, JNK与其下游c-Jun N端的活化区结合并使其第63, 73位丝氨酸残基磷酸化, JNK的活化是通过其氨基酸残基端的磷酸化, 在静止细胞中, JNK通过磷酸化反应而激活, 一旦被激活, 胞质中的JNK移位到细胞核, 通过对转录因子c-Jun, ATF-2, Elk-1等的磷酸化促进基因的表达及新蛋白质的合成, 而促进或引起细胞凋亡^[20]。目前, 多数研究认为JNK通路是化疗药物, 紫外线照射及Fas蛋白等诱导细胞凋亡所必需的通路, 并必须持续激活JNK才能诱导细胞凋亡^[21-23]。

我们在实验中发现, TS II A对人胰腺癌PANC-1细胞的生长抑制率均有显著的抑制作用, 其作用与剂量和作用时间成正相关; TS II A作用48 h后, 荧光显微镜下观察到经Hoechst染色的典型凋亡细胞。8、16、32 mg/L浓度TS II A作用人胰腺癌细胞后的细胞凋亡率分别为8.83%±1.51%, 12.86%±2.70%和21.24%±2.58%, 与对照组(0.63%±0.18%)比较, 均有显著性差异(P<0.01); 阻断JNK信号通路后, 凋亡率明显降低(P<0.01)。TS II A作用人胰腺癌细胞1 h后, JNK信号通路被激活, 4 h达峰值。16 mg/L TS II A作用人胰腺癌细胞48 h后, Survivin mRNA的表达明显下降; 阻断JNK信号通路后, TS II A作用人胰腺癌细胞的Survivin mRNA的表达明显上升。提示TS II A治疗胰腺癌的机制与诱导胰腺癌细胞凋亡有关, 通过JNK信号转导下调Survivin mRNA是TS II A诱导胰腺癌细胞凋亡的重要机制之一。本实验显示TS II A具有较好的诱导胰腺癌细胞凋亡的作用, 在治疗胰腺癌方面具有较好的应用前景。

4 参考文献

- Zhou L, Chan WK, Xu N, Xiao K, Luo H, Luo KQ, Chang DC. Tanshinone II A, an isolated compound from Salvia miltiorrhiza Bunge, induces apoptosis in HeLa cells through mitotic arrest. *Life Sci* 2008; 83: 394-403
- Li Q, Wang Y, Feng N, Fan Z, Sun J, Nan Y. Novel polymeric nanoparticles containing tanshinone II A for the treatment of hepatoma. *J Drug Target* 2008; 16: 725-732

- 3 王炎, 李琦, 范忠泽, 孙珏, 王忆勤, 王忆勤, 高虹. 丹参酮 II A介导p38MAPK信号转导诱导人肝癌细胞凋亡. 世界华人消化杂志 2009; 17: 124-129
- 4 Kim HJ, Kim SH. Tanshinone IIA enhances BMP-2-stimulated commitment of C2C12 cells into osteoblasts via p38 activation. *Amino Acids* 2010; 39: 1217-1226
- 5 Park IJ, Kim MJ, Park OJ, Park MG, Choe W, Kang I, Kim SS, Ha J. Cryptotanshinone sensitizes DU145 prostate cancer cells to Fas(APO1/CD95)-mediated apoptosis through Bcl-2 and MAPK regulation. *Cancer Lett* 2010; 298: 88-98
- 6 Tian HL, Yu T, Xu NN, Feng C, Zhou LY, Luo HW, Chang DC, Le XF, Luo KQ. A novel compound modified from tanshinone inhibits tumor growth in vivo via activation of the intrinsic apoptotic pathway. *Cancer Lett* 2010; 297: 18-30
- 7 殷佩洁, 李琦, 秦爱军, 王炎, 刘宁宁, 隋华, 李先茜, 吴琼. 蟾毒灵诱导人胰腺癌细胞凋亡及其作用机制研究. 上海中医药杂志 2008; 42: 78-81
- 8 李琦, 王炎, 范忠泽, 冯年平, 高虹, 南艺蕾, 倪雷, 鲍文磊, 隋华. 丹参酮 II A及其纳米粒诱导肝癌细胞凋亡及对p38 MAPK、TGF β 1信号蛋白表达的影响. 肿瘤 2008; 28: 8-12
- 9 刘军楼, 汪悦, 徐力, 杨继兵, 于希忠, 刘佳, 唐宇宏. 冬凌草甲素对SW1990细胞的增殖抑制作用. 中国癌症杂志 2010; 20: 915-920
- 10 龙群. 中医药治疗中晚期胰腺癌临床体会. 中国中医急症 2009; 18: 2055-2056
- 11 杜志芳, 张炳太, 张继文, 张俊茂. 胰腺癌135例诊断分析. 肿瘤研究与临床 2005; 17: 19-20
- 12 董昕, 徐立, 娄子洋. 丹参药材中水溶性及脂溶性成分的电喷雾离子阱质谱研究. 中国药学杂志 2010; 45: 1048-1054
- 13 郭增军, 龙丽辉, 徐颖, 张宇, 唐星. UPLC-ESI-MS分析丹参药材、脂溶性及水溶性提取物的色谱、质谱行为及相关性. 中药材 2010; 33: 925-929
- 14 Ribatti D, Vacca A. The role of microenvironment in tumor angiogenesis. *Genes Nutr* 2008; 3: 29-34
- 15 Lee SK, Kim HN, Kang YR, Lee CW, Kim HM, Han DC, Shin J, Bae K, Kwon BM. Obovatol inhibits colorectal cancer growth by inhibiting tumor cell proliferation and inducing apoptosis. *Bioorg Med Chem* 2008; 16: 8397-8402
- 16 汤睿, 朱正纲. 凋亡途径与肿瘤治疗. 世界华人消化杂志 2008; 13: 2469-2472
- 17 Bogoyevitch MA, Ngoei KR, Zhao TT, Yeap YY, Ng DC. c-Jun N-terminal kinase (JNK) signaling: recent advances and challenges. *Biochim Biophys Acta* 2010; 1804: 463-475
- 18 Séverin S, Ghevaert C, Mazharian A. The mitogen-activated protein kinase signaling pathways: role in megakaryocyte differentiation. *J Thromb Haemost* 2010; 8: 17-26
- 19 Geest CR, Coffer PJ. MAPK signaling pathways in the regulation of hematopoiesis. *J Leukoc Biol* 2009; 86: 237-250
- 20 Yu MK, Lee YH, Yoon MR, Bhattacharai G, Lee NH, Kim TG, Jhee EC, Yi HK. Attenuation of AH26-induced apoptosis by inhibition of SAPK/JNK pathway in MC-3T3 E1 cells. *J Endod* 2010; 36: 1967-1971
- 21 Brnjic S, Olofsson MH, Havelka AM, Linder S. Chemical biology suggests a role for calcium signaling in mediating sustained JNK activation during apoptosis. *Mol Biosyst* 2010; 6: 767-774
- 22 Bermudez O, Pagès G, Gimond C. The dual-specificity MAP kinase phosphatases: critical roles in development and cancer. *Am J Physiol Cell Physiol* 2010; 299: C189-C202
- 23 Igaki T. Correcting developmental errors by apoptosis: lessons from *Drosophila* JNK signaling. *Apoptosis* 2009; 14: 1021-1028

■同行评价

本文学术性较好, 揭示了丹参酮 II A诱导人胰腺癌细胞凋亡的部分机制.

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•

《世界华人消化杂志》入选北京大学图书馆 2008年版《中文核心期刊要目总览》

本刊讯 《中文核心期刊要目总览》(2008年版)采用了被索量、被摘量、被引量、他引量、被摘率、影响因子、获国家奖或被国内外重要检索工具收录、基金论文比、Web下载量等9个评价指标, 选作评价指标统计源的数据库及文摘刊物达80余种, 统计文献量达32 400余万篇次(2003-2005年), 涉及期刊12 400余种. 本版还加大了专家评审力度, 5 500多位学科专家参加了核心期刊评审工作. 经过定量评价和定性评审, 从我国正在出版的中文期刊中评选出1 980余种核心期刊, 分属七大编73个学科类目. 《世界华人消化杂志》入选本版核心期刊库(见R5内科学类核心期刊表, 第66页). (编辑部主任: 李军亮 2010-01-08)

姜辣素辅助昂丹司琼对顺铂所致大鼠异嗜行为的抑制作用

杨玉玲, 岳旺, 田字彬, 王茂龙, 杨志宏, 张琪, 魏良洲, 赵清喜, 石振艳

■背景资料

恶心、呕吐严重影响肿瘤患者化疗效果和生存质量, 目前临床常用止吐药物作用受体单一、价格昂贵, 故亟待开发一种高效、廉价的抗呕吐药物。生姜是传统中药中的“止呕圣药”, 已有一千多年的历史, 《伤寒杂病论》中止呕方剂中一半以上含有生姜, 姜辣素是其主要止呕成分。

杨玉玲, 田字彬, 张琪, 魏良洲, 赵清喜, 青岛大学医学院附属医院消化内科 山东省青岛市 266003

岳旺, 杨志宏, 石振艳, 青岛大学医学院药学系 山东省青岛市 266021

王茂龙, 青岛大学医学院附属医院胸外科 山东省青岛市 266003

国家自然科学基金资助项目, No. 30873108/H3108

山东省自然基金资助项目, No. Y2007C097

作者贡献分布: 杨玉玲、岳旺、田字彬及王茂龙对此文所作贡献均等; 此课题由杨玉玲、田字彬及岳旺设计, 研究过程、数据分析由杨玉玲与王茂龙完成, 论文写作由杨玉玲与田字彬完成。通讯作者: 田字彬, 教授, 主任医师, 266003, 山东省青岛市江苏路16号, 青岛大学医学院附属医院消化内科。
tianzb@qumh.qd.sd.cn

电话: 0532-82911302

收稿日期: 2010-12-16 修回日期: 2011-01-25

接受日期: 2011-02-15 在线出版日期: 2011-04-08

Ondansetron in combination with gingerol suppresses cisplatin-induced pica in rats

Yu-Ling Yang, Wang Yue, Zi-Bin Tian, Mao-Long Wang, Zhi-Hong Yang, Qi Zhang, Liang-Zhou Wei, Qing-Xi Zhao, Zhen-Yan Shi

Yu-Ling Yang, Zi-Bin Tian, Qi Zhang, Liang-Zhou Wei, Qing-Xi Zhao, Department of Gastroenterology, Affiliated Hospital of Qingdao University Medical College, Qingdao 266003, Shandong Province, China

Wang Yue, Zhi-Hong Yang, Zhen-Yan Shi, Department of Pharmacy, Qingdao University Medical College, Qingdao 266021, Shandong Province, China

Mao-Long Wang, Department of Thoracic Surgery, Affiliated Hospital of Qingdao University Medical College, Qingdao 266003, Shandong Province, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30873108/H3108; and the Natural Science Foundation of Shandong Province, No. Y2007C097

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

Received: 2010-12-16 Revised: 2011-01-25

Accepted: 2011-02-15 Published online: 2011-04-08

Abstract

AIM: To investigate whether ondansetron in combination with gingerol has suppressive effect on cisplatin-induced acute and delayed pica behavior in rats.

METHODS: Rats were divided randomly into blank control group, model control group, ondansetron group, gingerol group, and ondan-

setron plus gingerol group. Kaolin and food ingestion were recorded during 0-24 h and 48-72 h after cisplatin administration. At 72 h, the area postrema and jejunum tissue samples were taken to detect the immunoexpression of substance P by immunohistochemistry.

RESULTS: During 0-24 h and 48-72 h after cisplatin administration, food ingestion increased significantly ($t = 13.333, 15.000, 13.8333, 15.167$, all $P < 0.01$) but kaolin ingestion decreased significantly ($t = 9.122, 12.986, 8.525, 8.902$, all $P < 0.01$) in the gingerol group and ondansetron plus gingerol group compared to the model control group. Compared to the ondansetron group, food ingestion was significantly higher in the gingerol group and ondansetron plus gingerol group ($t = 8.000, 9.667, 11.500, 12.833$, all $P < 0.01$), and kaolin ingestion was significantly lower in the ondansetron plus gingerol group ($t = 2.499, 3.999$, all $P < 0.01$). Kaolin ingestion was higher during 0-24 h ($t = 1.365$, $P < 0.05$) but lower during 48-72 h ($t = 3.622$, $P < 0.01$) in the gingerol group than in the ondansetron group. Compared to the gingerol group, kaolin ingestion decreased significantly in the ondansetron plus gingerol group during 0-24 h ($t = 3.865$, $P < 0.01$). No significant difference was noted in kaolin and food ingestion during 48-72 h between the ondansetron plus gingerol group and the gingerol group ($t = 0.377, 1.333$, all $P > 0.05$). The immunoexpression levels of substance P in the AP of gingerol group and ondansetron plus gingerol group were lower than that in the ondansetron group ($t = 2.217, 2.408$, all $P < 0.01$).

CONCLUSION: Gingerol is able to improve food ingestion and inhibit cisplatin-induced pica behavior in rats probably by restraining the immunoexpression of substance P. Ondansetron in combination gingerol is able to effectively inhibit cisplatin-induced acute and delayed pica in rats.

Key Words: Gingerol; Substance P; Pica; Vomiting; Chemotherapy-induced nausea and vomiting

Yang YL, Yue W, Tian ZB, Wang ML, Yang ZH, Zhang Q, Wei LZ, Zhao QX, Shi ZY. Ondansetron in combination with gingerol suppresses cisplatin-induced pica in rats. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2011; 19(10): 1034-1039

摘要

目的: 研究姜辣素辅助昂丹司琼对顺铂所致大鼠急性期和延迟期异嗜行为的抑制作用。

方法: 大鼠随机分成正常对照组、模型组、昂丹司琼组、姜辣素组及姜辣素+昂丹司琼组, 记录顺铂注射后0-24 h和48-72 h各组大鼠摄食量及啃食高岭土量。72 h后取延髓极后区及近端空肠组织, 免疫组织化学方法测定组织中P物质表达。

结果: 顺铂注射后0-24 h和48-72 h内, 姜辣素组、昂丹司琼+姜辣素组摄食量较模型组显著增加($t = 13.333, 15.000, 13.8333, 15.167$, 均 $P < 0.01$), 啃食高岭土量显著减少($t = 9.122, 12.986, 8.525, 8.902$, 均 $P < 0.01$); 姜辣素组和昂丹司琼+姜辣素组摄食量均显著高于昂丹司琼组($t = 8.000, 9.667, 11.500, 12.833$, 均 $P < 0.01$); 昂丹司琼+姜辣素组啃食高岭土量显著低于昂丹司琼组($t = 2.499, 3.999$, 均 $P < 0.01$); 姜辣素组啃食高岭土量在0-24 h内高于昂丹司琼组($t = 1.365$, $P < 0.05$), 48-72 h内低于昂丹司琼组($t = 3.622$, $P < 0.01$)。昂丹司琼+姜辣素组在0-24 h内啃食高岭土量显著低于姜辣素组($t = 3.865$, $P < 0.01$), 在48-72 h内啃食高岭土量及摄食量与姜辣素组均无显著差异($t = 0.377, 1.333$, 均 $P > 0.05$)。姜辣素组及昂丹司琼+姜辣素组的AP区P物质免疫组织化学表达均少于昂丹司琼组($t = 2.217, 2.408$, 均 $P < 0.01$)。

结论: 姜辣素具有可促进大鼠摄食并可抑制顺铂所致的异嗜作用, 与昂丹司琼联用可有效抑制急性期和延迟期异嗜行为, 其机制可能与抑制P物质表达有关。

关键词: 姜辣素; P物质; 异嗜; 化疗性呕吐

杨玉玲, 岳旺, 田字彬, 王茂龙, 杨志宏, 张琪, 魏良洲, 赵清喜, 石振艳. 姜辣素辅助昂丹司琼对顺铂所致大鼠异嗜行为的抑制作用. 世界华人消化杂志 2011; 19(10): 1034-1039
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/1034.asp>

0 引言

恶心呕吐是肿瘤化疗最常见不良反应之一, 按发生时间可分为预期性、急性和迟发性3大类^[1]。目前临床常用止吐药物5-HT₃受体阻滞剂控制急性化疗性呕吐(chemotherapy-induced nausea and vomiting, CINV)效果显著, 但对于延迟性呕吐效果较差。姜辣素(gingerol)是生姜的提取物, 其主要成分有[2]-、[4]-、[6]-姜酚和姜烯酚^[2,3]等, 研究显示姜辣素可作用于多个呕吐相关受体, 具

有良好的止吐效果^[4]。顺铂是强致吐性化疗药, 是呕吐模型的常用催吐剂。大鼠无呕吐反射, 但顺铂注射后可出现啃食高岭土的异嗜行为, 其延髓背外侧后区(the area postrema, AP)内具有与人类呕吐化学感受器触发区(chemoreceptor trigger zone, CTZ)相似的解剖结构, 可以产生条件味觉厌恶(conditioned taste aversion, CTA)反应, 故大鼠异嗜高岭土行为可以间接反映呕吐的程度^[5]。本研究利用顺铂所致大鼠异嗜模型, 探讨姜辣素及其与昂丹司琼联用对顺铂所致大鼠急性期和延迟期异嗜高岭土行为的抑制作用。

■ 相关报道

Ryan等通过对600多例肿瘤化疗患者的随机对照双盲试验, 提出生姜止吐效果良好; Abdil-Aziz等研究证明姜辣素的止吐机制不仅限作用于5-HT₃受体; 钱秋海等证实姜辣素可作用于5-HT₃受体、NK1受体及D2受体。

1 材料和方法

1.1 材料 姜辣素(宝鸡宏远生物制药, 2005071223)溶于1%西黄芪胶; 顺铂(齐鲁制药, 903005CE)溶于50 °C温生理盐水; 盐酸昂丹斯琼注射液(奥赛康制药, 090102); 免抗P物质试剂盒(北京博奥森生物, bs-0064R)。

1.2 方法

1.2.1 动物实验: 健康♂成年wistar大鼠[华中科技大学实验动物中心, SCXK(鄂)2004-0007]30只, 质量200-250 g, 室温(22 °C ± 2 °C)单笼饲养, 12 h明暗周期(18:00-6:00为暗周期)。随机分成5组: 正常对照组($n = 6$), 模型组($n = 6$), 昂丹司琼组($n = 6$), 姜辣素组($n = 6$), 姜辣素+昂丹司琼组($n = 6$)。除正常对照组外, 其余组大鼠用顺铂(3 mg/kg)腹腔注射(ip)造模, 并于顺铂注射前1 h及注射后24、48 h各组分别给予以下处理: 生理盐水(10 mg/kg, ip), 西黄芪胶(10 mg/kg, ip), 昂丹司琼(4 mg/kg, ip), 姜辣素(400 mg/kg, ip)^[4], 姜辣素(400 mg/kg, ip)+昂丹司琼(4 mg/kg, ip); 观察顺铂注射后0-24 h、48-72 h各组大鼠摄食量和啃食高岭土量。72 h后处死大鼠, 取AP区及近端空肠(距幽门约20 cm)组织于4%甲醛4 °C固定。

1.2.2 免疫组织化学和图像分析: 组织先后在20%蔗糖和30%蔗糖中, 4 °C冰箱内脱水, 液氮中速冻1 min后切片(4 μm厚)。严格按照抗P物质(bs-0064R)免疫组织化学试剂盒说明操作。将切片用pH7.4的PBS液室温下漂洗, 10%正常山羊血清液封闭, 加1:200稀释的兔多克隆P物质抗体, PBS液漂洗后滴加生物素化二抗, DAB显色剂显色, 苏木素复染, 无水酒精脱水, 二甲苯透明, 中性树胶封片。200倍光镜下随机选取5个视野并照相, 观察外周空肠及AP区组织阳性产物的分布、染色情况。黄光源下为浅黄色背景, 标记阳性颗粒在细胞质表达, 呈棕黄色或棕褐色。对每例切片, 按Ferrier所采取半定量积分法^[6]判

■ 创新盘点

将昂丹司琼和姜辣素联用，在增强抑制急性期CINV效果的同时，可弥补昂丹司琼对延迟期CINV无效的缺点，并可促进摄食，保证机体营养摄入。

表1 顺铂注射后0~72 h内各组大鼠啃食高岭土量和摄食量比较 $n = 6$, mean \pm SD

分组	0~24 h		48~72 h	
	高岭土量(g)	摄食量(g)	高岭土(g)	摄食量(g)
正常对照组	0.352 \pm 0.267 ^{bd}	30.000 \pm 3.899 ^{bd}	0.319 \pm 0.178 ^{bd}	30.833 \pm 4.916 ^{bd}
模型组	14.270 \pm 1.677 ^d	14.167 \pm 3.971 ^c	9.706 \pm 1.775 ^d	16.333 \pm 3.386
昂丹司琼组	3.783 \pm 0.817 ^b	19.500 \pm 3.182 ^a	4.803 \pm 1.223 ^b	18.667 \pm 2.944
姜辣素组	5.148 \pm 1.184 ^{bc}	27.500 \pm 4.506 ^{bd}	1.182 \pm 0.368 ^{bd}	30.167 \pm 2.927 ^{bd}
昂丹司琼+姜辣素组	1.283 \pm 0.804 ^{bdf}	29.167 \pm 5.636 ^{bd}	0.804 \pm 0.442 ^{bd}	31.500 \pm 3.082 ^{bd}

高岭土量 $F = 164.504, 94.174; P = 0.000, 0.000$; 摄食量 $F = 15.551, 26.089; P = 0.000, 0.000$. ^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs 模型组; ^c $P < 0.05$, ^d $P < 0.01$ vs 昂丹司琼组; ^f $P < 0.01$ vs 姜辣素组.

断结果: A(按切片中阳性细胞占切片中总细胞数的比例评分): 未见阳性细胞为0分, 阳性细胞占整个视野细胞数的1%-25%为1分, 26%-50%为2分, 51%-75%为3分, 76%-100%为4分; B(按切片中阳性细胞显色有无及深浅评分): 无显色为0分, 淡黄色为1分, 棕黄色为2分, 棕褐色为3分. 每例积分 = A \times B, 两者积分相乘结果作为阳性表达强度.

统计学处理 计量资料用mean \pm SD表示, 采用SPSS13.0统计分析软件, 应用单因素方差分析和LSD-t检验分析, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义.

2 结果

2.1 对急性期异嗜行为的抑制作用 模型组较正常对照组啃食高岭土量显著增多, 摄食量显著减少(均 $P < 0.01$). 昂丹司琼组、姜辣素组和昂丹司琼+姜辣素组啃食高岭土量较模型组均显著减少(均 $P < 0.01$). 姜辣素组啃食高岭土量多于昂丹司琼组($P < 0.05$); 昂丹司琼+姜辣素组啃食高岭土量明显低于昂丹司琼组、姜辣素组(均 $P < 0.01$). 昂丹司琼组摄食量多于模型组($P < 0.05$); 姜辣素组、昂丹司琼+姜辣素组摄食量明显多于模型组、昂丹司琼组(均 $P < 0.01$). 姜辣素组摄食量与昂丹司琼+姜辣素组摄食量比较无显著性差异($P > 0.05$, 表1).

2.2 对延迟期异嗜行为的抑制作用 模型组啃食高岭土量显著多于正常对照组($P < 0.01$)、摄食量显著低于正常对照组($P < 0.01$). 昂丹司琼组、姜辣素组、昂丹司琼+姜辣素组啃食高岭土量较模型组均显著减少(均 $P < 0.01$). 姜辣素组、昂丹司琼+姜辣素组啃食高岭土量显著低于昂丹司琼组(均 $P < 0.01$). 昂丹司琼组摄食量与模型组比较无显著性差异($P > 0.05$). 姜辣素组、昂丹司琼+姜辣素组

摄食量明显多于模型组、昂丹司琼组(均 $P < 0.01$). 昂丹司琼+姜辣素组啃食高岭土量、摄食量与姜辣素组比较均无显著性差异($P > 0.05$, 表1).

2.3 空肠和AP区P物质免疫组织化学表达 P物质阳性颗粒在近端空肠组织表达于肌间神经节(图1), 在AP区表达于神经元(图2). 模型组空肠组织和AP区P物质免疫组织化学阳性积分均显著大于正常对照组(均 $P < 0.01$). 昂丹司琼组、姜辣素组和昂丹司琼+姜辣素组空肠组织和AP区的P物质免疫组织化学阳性积分均显著小于模型组(均 $P < 0.01$). 在空肠组织中, 昂丹司琼+姜辣素组的积分值小于昂丹司琼组($P < 0.01$)和姜辣素组($P < 0.05$), 而姜辣素组与昂丹司琼组相比无显著性差异($P > 0.05$). 在AP区组织中, 姜辣素组和昂丹司琼+姜辣素组的P物质免疫组织化学阳性积分均显著小于昂丹司琼组(均 $P < 0.01$), 姜辣素组和昂丹司琼+姜辣素组之间无显著性差异($P > 0.05$, 表2).

3 讨论

化疗药物(顺铂等)通过作用于多个位点诱发恶心呕吐反射, 化疗药物注射后, 产生多种自由基, 促使肠嗜铬细胞释放5-HT, 5-HT作用于位于肠壁迷走神经传入纤维末梢的5-HT₃受体, 迷走神经传入纤维将产生的神经冲动上传至脑干背侧的孤束核和AP, 即迷走神经复合体背侧. 迷走神经复合体背侧多种神经递质受体均参与呕吐反射的发生, 如神经激肽-1(neurokinin-1, NK1)受体、5-HT₃受体和多巴胺-2(dopamine-2, D2)受体^[7]等; 迷走神经传出纤维自迷走神经复合体背侧出发将冲动传至呕吐中枢, 呕吐中枢支配效应器从而引发呕吐反射^[8]. AP是脑室周围器官, 位于第4脑室两侧上方, 缺乏有效的血脑屏障, 可以感受血液和脑脊液的呕吐刺激信号, 因此称为呕吐化学感受器触发区(chemoreceptor

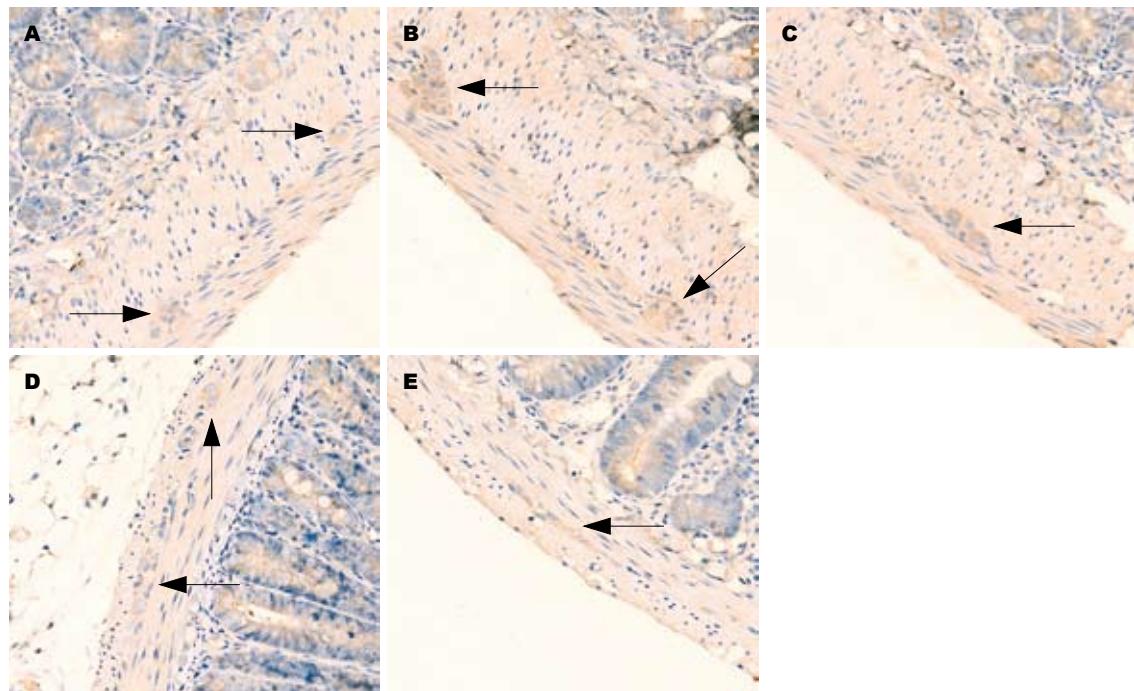


图 1 各组大鼠远端空肠组织中P物质的表达(HE $\times 200$)。A: 正常对照组轻微表达或不表达; B: 模型组表达明显增强; C: 昂丹司琼组呈中度表达; D: 姜辣素组呈轻度表达, 低于昂丹司琼组; E: 昂丹司琼+姜辣素组呈轻度表达, 低于昂丹司琼组, 与姜辣素组相比无明显差异。

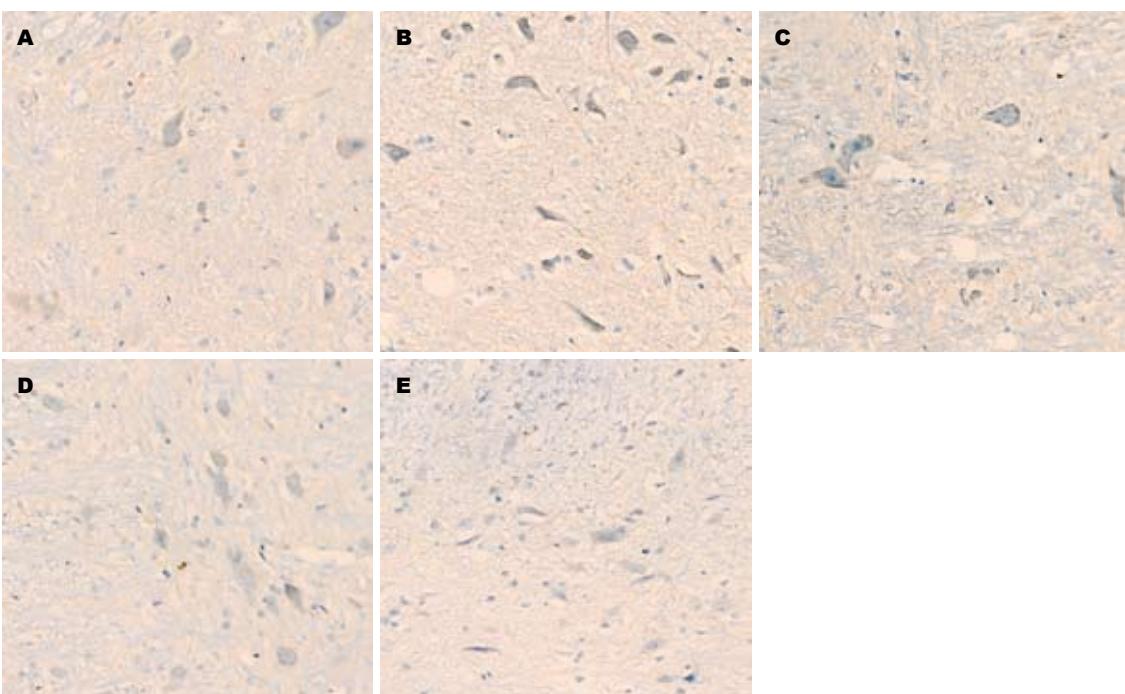


图 2 各组大鼠AP组织中P物质的表达(HE $\times 200$)。阳性细胞呈棕黄色染色。A: 正常对照组轻微表达或不表达; B: 模型组表达明显增强; C: 昂丹司琼组呈中度表达; D: 姜辣素组呈轻度表达, 低于昂丹司琼组; E: 昂丹司琼+姜辣素组呈轻度表达, 低于昂丹司琼组, 与姜辣素组相比无明显差异。

trigger zone, CTZ)^[9]。CINV按发生时间不同可分为预期性、急性和迟发性三大类^[1]。急性恶心呕吐主要发生于化疗开始后24 h内, 24 h后的恶心呕吐称为延迟性恶心呕吐^[10](顺铂所致的恶心呕

吐主要发生在48-72 h, 且对常用的5-HT₃受体阻滞剂反应不敏感^[11])。急性CINV的发生主要与肠道嗜铬细胞释放的5-HT有关^[12], 昂丹司琼即竞争性结合5-HT₃受体抑制5-HT的作用而发挥抗

■应用要点
姜辣素可作为辅助用药与昂丹司琼联用, 增强急性期止吐效果, 并对抗延缓期呕吐, 同时增加摄食, 以保证营养供应。生姜价格低廉, 姜辣素提取工艺简单, 无不良反应, 可作为常用药物开发利用。

■同行评价

本文思路清晰, 方法准确, 对指导临床化疗相关呕吐的治疗有一定的意义。

表 2 顺铂注射72h后各组大鼠空肠和AP区内P物质的表达
(n = 6, mean ± SD)

分组	空肠	AP区
正常对照组	0.83 ± 0.17 ^{bd}	1.02 ± 0.2 ^{bd}
模型组	5.20 ± 1.05 ^d	6.32 ± 1.15 ^d
昂丹司琼组	2.17 ± 0.78 ^b	3.70 ± 1.02 ^b
姜辣素组	1.93 ± 0.42 ^b	1.48 ± 0.35 ^{bd}
昂丹司琼+姜辣素组	1.07 ± 0.27 ^{bde}	1.29 ± 0.42 ^{bd}

空肠F = 46.018, P = 0.000; AP区F = 56.349, P = 0.000. ^aP<0.01 vs 模型组; ^bP<0.01 vs 昂丹司琼组; ^cP<0.05 vs 姜辣素组.

呕吐作用。20世纪90年代发现神经激肽P物质及其受体NK1在延迟性CINV中具有重要作用^[11,13], NK1受体阻滞剂治疗延迟性CINV效果良好^[14,15]。

生姜作为传统中药已有一千多年的历史,有“止呕圣药”之美誉,动物实验^[16,17]和临床研究^[18,19]显示,生姜可有效改善顺铂引起的恶心呕吐。生姜的有效止呕成分为姜辣素^[3],其抗呕吐机制最初认为为阻断5-HT₃受体^[20,21],后证实其并非与5-HT₃受体竞争性结合,而是作用于一个调节性位点,此位点除可抑制5-HT₃受体活性外,还可调节P物质受体和胆碱能受体活性^[22];另有研究证实姜辣素可作用于辣椒素受体发挥抗呕吐作用^[23]。因此,姜辣素可能通过作用于多种受体发挥抗呕吐作用。因大鼠异嗜高岭土行为可以间接反映呕吐的程度,本研究利用顺铂所致大鼠异嗜模型,探讨姜辣素及其与昂丹司琼联用对顺铂所致大鼠急性期和延迟期异嗜高岭土行为的抑制作用,结果显示,姜辣素在0-24 h内对大鼠异嗜行为虽有抑制作用,但其作用弱于昂丹司琼,而48-72 h内的作用强于昂丹司琼;昂丹司琼与姜辣素联用后在0-24 h内抑制异嗜行为效果强于两者单一用药,在48-72 h内强于单用昂丹司琼,而与单用姜辣素无明显差异,说明姜辣素可能对大鼠急性(相当于本实验的0-24 h)和延迟性(相当于本实验的48-72 h)异嗜行为均有抑制作用,抑制延迟性异嗜行为效果优于昂丹司琼。推测姜辣素及与昂丹司琼联用可能有效缓解顺铂所致急性和延迟性呕吐。免疫组织化学染色显示,姜辣素组和昂丹司琼+姜辣素组空肠和AP组织中P物质表达较昂丹司琼组减少,说明姜辣素可能通过抑制P物质表达发挥抗异嗜行为的作用。本研究还显示,姜辣素组大鼠的摄食量均多于模型组和昂丹司琼组,而昂丹司琼+姜辣素组和姜辣素组比较摄食量无明显差

异,说明姜辣素除具有抗异嗜行为外,还具有促进大鼠摄食的作用,而昂丹司琼则无促进大鼠摄食作用。推测姜辣素的抗呕吐及促摄食作用可能与其改善胃排空障碍、增加胃动力及促进食欲有关^[24-27]。

4 参考文献

- Licitra L, Spinazzé S, Roila F. Antiemetic therapy. *Crit Rev Oncol Hematol* 2002; 43: 93-101
- Kawai T, Kinoshita K, Koyama K, Takahashi K. Anti-emetic principles of Magnolia obovata bark and Zingiber officinale rhizome. *Planta Med* 1994; 60: 17-20
- Yang Y, Kinoshita K, Koyama K, Takahashi K, Kondo S, Watanabe K. Structure-antiemetic-activity of some diarylheptanoids and their analogues. *Phytomedicine* 2002; 9: 146-152
- Qian QH, Yue W, Wang YX, Yang ZH, Liu ZT, Chen WH. Gingerol inhibits cisplatin-induced vomiting by down regulating 5-hydroxytryptamine, dopamine and substance P expression in minks. *Arch Pharm Res* 2009; 32: 565-573
- Takeda N, Hasegawa S, Morita M, Matsunaga T. Pica in rats is analogous to emesis: an animal model in emesis research. *Pharmacol Biochem Behav* 1993; 45: 817-821
- Ferrier CM, de Witte HH, Straatman H, van Tienvoven DH, van Geloof WL, Rietveld FJ, Sweep CG, Ruiter DJ, van Muijen GN. Comparison of immunohistochemistry with immunoassay (ELISA) for the detection of components of the plasminogen activation system in human tumour tissue. *Br J Cancer* 1999; 79: 1534-1541
- Lohr L. Chemotherapy-induced nausea and vomiting. *Cancer J* 2008; 14: 85-93
- Hesketh PJ. Chemotherapy-induced nausea and vomiting. *N Engl J Med* 2008; 358: 2482-2494
- McCarthy LE, Borison HL. Cisplatin-induced vomiting eliminated by ablation of the area postrema in cats. *Cancer Treat Rep* 1984; 68: 401-404
- Antonarakis ES, Hain RD. Nausea and vomiting associated with cancer chemotherapy: drug management in theory and in practice. *Arch Dis Child* 2004; 89: 877-880
- Kris MG, Roila F, De Mulder PH, Marty M. Delayed emesis following anticancer chemotherapy. *Support Care Cancer* 1998; 6: 228-232
- Endo T, Minami M, Hirafuji M, Ogawa T, Akita K, Nemoto M, Saito H, Yoshioka M, Parvez SH. Neurochemistry and neuropharmacology of emesis - the role of serotonin. *Toxicology* 2000; 153: 189-201
- Girish C, Manikandan S. Aprepitant: a substance P antagonist for chemotherapy induced nausea and vomiting. *Indian J Cancer* 2007; 44: 25-30
- Poli-Bigelli S, Rodrigues-Pereira J, Carides AD, Julie Ma G, Eldridge K, Hippie A, Evans JK, Horgan KJ, Lawson F. Addition of the neurokinin 1 receptor antagonist aprepitant to standard antiemetic therapy improves control of chemotherapy-induced nausea and vomiting. Results from a randomized, double-blind, placebo-controlled trial in Latin America. *Cancer* 2003; 97: 3090-3098
- Fang ZW, Zhai SD. [A meta-analysis of aprepitant for prevention of chemotherapy-induced nausea and vomiting]. *Beijing Daxue Xuebao* 2010; 42: 756-763

- 16 Yamahara J, Rong HQ, Naitoh Y, Kitani T, Fujimura H. Inhibition of cytotoxic drug-induced vomiting in suncus by a ginger constituent. *J Ethnopharmacol* 1989; 27: 353-355
- 17 Haksar A, Sharma A, Chawla R, Kumar R, Arora R, Singh S, Prasad J, Gupta M, Tripathi RP, Arora MP, Islam F, Sharma RK. Zingiber officinale exhibits behavioral radioprotection against radiation-induced CTA in a gender-specific manner. *Pharmacol Biochem Behav* 2006; 84: 179-188
- 18 Hickok JT, Roscoe JA, Morrow GR, Ryan JL. A Phase II/III Randomized, Placebo-Controlled, Double-Blind Clinical Trial of Ginger (Zingiber officinale) for Nausea Caused by Chemotherapy for Cancer: A Currently Accruing URCC CCOP Cancer Control Study. *Support Cancer Ther* 2007; 4: 247-250
- 19 Zick SM, Ruffin MT, Lee J, Normolle DP, Siden R, Alrawi S, Brenner DE. Phase II trial of encapsulated ginger as a treatment for chemotherapy-induced nausea and vomiting. *Support Care Cancer* 2009; 17: 563-572
- 20 Sharma SS, Kochupillai V, Gupta SK, Seth SD, Gupta YK. Antiemetic efficacy of ginger (Zingiber officinale) against cisplatin-induced emesis in dogs. *J Ethnopharmacol* 1997; 57: 93-96
- 21 Abdel-Aziz H, Nahrstedt A, Petereit F, Windeck T, Ploch M, Verspohl EJ. 5-HT3 receptor blocking activity of arylalkanes isolated from the rhizome of Zingiber officinale. *Planta Med* 2005; 71: 609-616
- 22 Abdel-Aziz H, Windeck T, Ploch M, Verspohl EJ. Mode of action of gingerols and shogaols on 5-HT3 receptors: binding studies, cation uptake by the receptor channel and contraction of isolated guinea-pig ileum. *Eur J Pharmacol* 2006; 530: 136-143
- 23 Borrelli F, Capasso R, Pinto A, Izzo AA. Inhibitory effect of ginger (Zingiber officinale) on rat ileal motility in vitro. *Life Sci* 2004; 74: 2889-2896
- 24 Sharma SS, Gupta YK. Reversal of cisplatin-induced delay in gastric emptying in rats by ginger (Zingiber officinale). *J Ethnopharmacol* 1998; 62: 49-55
- 25 Wu KL, Rayner CK, Chuah SK, Changchien CS, Lu SN, Chiu YC, Chiu KW, Lee CM. Effects of ginger on gastric emptying and motility in healthy humans. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2008; 20: 436-440
- 26 Wadikar DD, Nanjappa C, Premavalli KS, Bawa AS. Development of ginger based ready-to-eat appetizers by response surface methodology. *Appetite* 2010; 55: 76-83
- 27 Stewart JJ, Wood MJ, Wood CD, Mims ME. Effects of ginger on motion sickness susceptibility and gastric function. *Pharmacology* 1991; 42: 111-120

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》栏目设置

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

优化外科超声吸引器参数设置对解剖性肝切除的作用

唐继红, 付必莽, 唐波, 李晗宇, 朱洪, 李铁汉, 刘锋, 张捷

■背景资料

肝部分切除是治疗肝脏占位性疾病的主要手段, 随着肝移植时代的到来现, 肝脏外科也进入到精准解剖学性肝切除时代。Excel™型外科超声吸引器(CUSA)的应用是最具代表性的新兴技术, 该设备精细而准确的解剖学高选择性切肝技术推动了肝切部分除技术的进步。

唐继红, 付必莽, 唐波, 朱洪, 李铁汉, 刘锋, 张捷, 昆明医学院第二附属医院肝胆胰一病区 云南省肝胆胰外科研究所 云南省昆明市 650101

李晗宇, 昆明医学院第四附属医院(云南省第二人民医院)肝胆外科 云南省昆明市 650021

唐继红, 副主任医师, 主要从事肝脏肿瘤临床外科治疗研究。

云南省科研院所内设基金资助项目, No. 2010ND003

通讯作者: 付必莽, 650101, 云南省昆明市, 昆明医学院第二附属医院肝胆胰一病区, 云南省肝胆胰外科研究所。

bmangfu@msn.com

电话: 0871-5351281-2681

收稿日期: 2010-12-09 修回日期: 2011-03-08

接受日期: 2011-03-16 在线出版日期: 2011-04-08

Clinical effects of anatomic hepatectomy with Cavitron ultrasonic surgical aspirator using optimized parameter settings

Ji-Hong Tang, Bi-Mang Fu, Bo Tang, Han-Yu Li, Hong Zhu, Tie-Han Li, Feng Liu, Jie Zhang

Ji-Hong Tang, Bi-Mang Fu, Bo Tang, Hong Zhu, Tie-Han Li, Feng Liu, Jie Zhang, Department of Hepatobiliary Surgery, the Second Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming 650101, Yunnan Province, China
Han-Yu Li, Department of Hepatobiliary Surgery, the Fourth Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming 650021, Yunnan Province, China

Supported by: the Fund of Yunnan Scientific Research Institutions, No. 2010ND003

Correspondence to: Bi-Mang Fu, Department of Hepatobiliary Surgery, the Second Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming 650101, Yunnan Province, China. bmangfu@msn.com

Received: 2010-12-09 Revised: 2011-03-08

Accepted: 2011-03-16 Published online: 2011-04-08

Abstract

AIM: To evaluate the clinical effects of anatomic hepatectomy with Cavitron ultrasonic surgical aspirator (CUSA) using optimized parameter settings.

METHODS: Thirty-one patients with space-occupying lesions of the liver who underwent hepatectomy with CUSA were divided into two groups: patients using recommended parameters for CUSA (control group, $n = 10$) and those using optimized parameters (optimization group, $n = 21$). Total blood loss, blood transfusion, operative time, and recovery of liver func-

tion after operation were compared between the two groups.

RESULTS: All the patients recovered in 4 weeks after operation. Radical treatment was achieved in 90% of patients using recommended parameters and in 87.5% of those using optimized ones, with no significant difference between the two groups. Total blood loss, blood transfusion, operative time, and recovery of liver function after operation were better in the optimization group than in the control group ($3.8 \text{ h} \pm 0.8 \text{ h}$ vs $6.2 \text{ h} \pm 1.9 \text{ h}$; $1\ 150 \text{ mL} \pm 460 \text{ mL}$ vs $2\ 900 \text{ mL} \pm 510 \text{ mL}$; $530 \text{ mL} \pm 300 \text{ mL}$ vs $1\ 760 \text{ mL} \pm 1\ 700 \text{ mL}$, all $P < 0.05$). The mean amount of abdominal drainage in 24 h after operation was not remarkably different between the two groups.

CONCLUSION: Using optimized parameters for CUSA can improve the clinical effects and efficiency of anatomic hepatectomy for patients with space-occupying lesions of the liver.

Key Words: Cavitron ultrasonic surgical aspirator; Optimized parameter settings; Anatomical hepatectomy; Efficiency of hepatectomy

Tang JH, Fu BM, Tang B, Li HY, Zhu H, Li TH, Liu F, Zhang J. Clinical effects of anatomic hepatectomy with Cavitron ultrasonic surgical aspirator using optimized parameter settings. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2011; 19(10): 1040-1044

摘要

目的: 研究外科超声吸引器(CUSA)系统在解剖性肝切除术中的断肝技术参数设置, 寻找最佳的断肝参数设置, 以提高CUSA在肝切除中临床效率。

方法: 优化CUSA技术参数设置, 将31例采用CUSA实施Glisson蒂横断式解剖性肝切除的肝实质占位患者分为两组: 优化参数设置组($n = 21$)和厂家推荐参数设置组($n = 10$)。对比分析两组手术时间、术中出血量、术中输血量, 术后腹腔引流量和肝功能康复情况。

结果: 两组患者均于术后4 wk内康复出院。优

化参数组和推荐参数组恶性肿瘤根治率分别为85.7%和90%, 组间无显著差异。优化参数设置组手术时间短、出血量、输血量均优于推荐参数设置组($3.8 \text{ h} \pm 0.8 \text{ h}$ vs $6.2 \text{ h} \pm 1.9 \text{ h}$; $1150 \text{ mL} \pm 460 \text{ mL}$ vs $2900 \text{ mL} \pm 510 \text{ mL}$; $530 \text{ mL} \pm 300 \text{ mL}$ vs $1760 \text{ mL} \pm 1700 \text{ mL}$, 均 $P < 0.05$), 优化设置组术后肝酶学康复优于推荐参数组, 而两组术后24 h引流量无显著差异。

结论: 优化CUSA参数设置可增加对肝组织的保护、减少术中出血和缩短手术时间, 从而显著提高断肝效果。

关键词: 外科超声吸引器; 优化参数设置; 解剖性肝切除; 切肝效果

唐继红, 付必莽, 唐波, 李晗宇, 朱洪, 李铁汉, 刘锋, 张捷. 优化外科超声吸引器参数设置对解剖性肝切除的作用. 世界华人消化杂志 2011; 19(10): 1040-1044

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/1040.asp>

0 引言

肝部分切除是治疗肝脏占位性疾病的主要手段, 随着肝移植时代的到来, 肝脏外科也进入到精准解剖学性肝切除时代。ExcelTM型外科超声吸引器(cavitron ultrasonic surgical aspirator, CUSA)的应用是最具代表性的新兴技术, 该设备精细而准确的解剖学高选择性切肝技术推动了肝切部分除技术的进步^[1,2]。因此, 熟练掌握该设备的使用技巧可以明显提高肝切除的效果。我们在切肝过程中发现, 调整和优化CUSA系统参数设置可提高组织选择性、减少术中失血等, 从而获得较厂家推荐的参数设置更为理想的切肝效果。本文以临床实践为基础, 总结出CUSA的优化参数设置, 并于2008-12/2010-10以厂家推荐的参数设置为对照进行临床对照研究, 证实了优化CUSA ExcelTM系统参数设置可有效地减少肝切除断肝过程中的出血和肝损伤, 提高解剖性肝切除的临床效果。现报道如下。

1 材料和方法

1.1 材料 总病例31例, 均为2008-12/2010-10住院患者, 其中男17例, 女14例, 年龄28-61(48.2±8.7)岁。原发性肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)21例, 胆管细胞癌1例, 肝脏局灶结节性增生2例, 肝血管瘤7例。术前肝功能Child A级28例, B级3例。手术方式: 行右半肝1例, 左半肝1例, SIII 1例, SIV 2例, SV 3例, SVI 2例, SVII 3例, SVIII 3例, SII III 2例, SVVII 3例, SVVI 2例, SVVII 4

例, SVVIII VI+射频1例, SIII VVII 1例, SIV VI+射频1例, SV VI 1例。

1.2 方法

1.2.1 手术操作: 2组患者均由同一术者完成, 使用美国Valleylab公司生产的CUSA ExcelTM-8 System超声外科吸引器, 手柄频率23 kHz、带Valleylab Force FX双极电刀手控附件。取上腹“J”形或上腹“人”字形切口充分暴露肝脏。术中B超探查明确确认肝占位部位、大小、数目及与血管关系, 并标记切除线。常规顺逆结合切除胆囊, 显露第一肝门。以Takasaki等^[3]的肝三段解剖理论基础, 术前用参照文献[4]行肝内血管三维重建, 采用Glisson鞘横断解剖性肝切除, 阻断Glisson鞘并确认拟切除肝段或叶的缺血线, 结扎并切断支配需切除肝叶的Glisson鞘; 如果需切除肝段, 则先以CUSA解剖第一肝门部肝实质, 暴露需要切除的肝段Glisson鞘, 结扎之并确认缺血线。然后交替阻断需保留侧肝脏Glisson鞘, 控制CVP在3-5 cmH₂O, 用CUSA沿切标记线离断肝实质, >2 mm管道予以结扎, 余下管道用连发钛夹处理, 切除病变肝段。

1.2.2 分组和观察指标: 根据就诊顺序分为I组($n = 10$)和II组($n = 21$): I组采用CUSA厂家推荐的参数设置参数断肝, II组采用课题组优化设置参数断肝。2组间资料具有可比性。2组间相关参数具有可比性。对比分析2组手术时间、术中出血量、术中输血量、术后腹腔引流量和肝功能康复情况。肝脏质地分为软(正常肝脏或轻度肝硬化伴中度脂肪肝, 肝脏形态大小正常)、中(中度肝硬化, 表明明显结节感, 质地变硬, 肝脏形态大小正常或轻度缩小)、硬(肝脏因硬化显著缩小, 表明结节明显且大小不一, 质地坚硬)3种。

2 结果

2.1 肝脏术前重建及评估 术前Philips 256层iCT重建后肝脏门脉及动脉结构清晰, 结合文献报道的肝三段理论和Glisson鞘横断解剖性肝切除为指导, 顺利行解剖性肝切除(图1-5)。

2.2 CUSA参数优化调整结果 通过调整振幅和变动组织选择性, 可以提高血管损伤和减少出血, 增加断肝速度(表1)。

2.3 手术时长和失血指标比较 I组手术时间、出血量、输血量和术后24 h引流量分别为(6.2 ± 1.9) h、(2900 ± 510) mL和(1760 ± 1700) mL, II组为(3.8 ± 0.8) h、(1150 ± 460) mL和(530 ± 300) mL, 组间比较均具有显著性($P < 0.05$); 但术

■创新点

目前尚未见到对CUSA用于切肝参数优化的文献报道, 能够参考的资料仅是来源于厂家推荐的参考设置参数, 但本课题组在使用过程中发现对于不同的质地的肝组织, 厂家推荐的参数设置并非最佳设置。手柄的振幅和组织选择性是影响肝组织游离的主要因素, 因此本课题组主要针对调整手柄振幅和组织选择性来提高切肝的速度和对血管的保护作用。

■应用要点

优化CUSA参数设置可增加对肝组织的保护、减少术中出血和缩短手术时间,从而显著提高断肝效果。

表1 CUSA自带说明书断肝建议技术参数与优化设置参数对比

破碎要求	肝脏硬度	手柄频率(KHz)		组织选择性		吸引(%)		冲洗(mL/min)		振幅(%)	
		I组	II组	I组	II组	I组	II组	I组	II组	I组	II组
精细	软	23	23	++++	+++	50	50	3~5	3~5	60~80	20~40
普通	中	23	23	+++; ++	+++; ++	70	60	5~6	5~6	80~100	30~50
快速	硬	23	23	++; Std	++; Std	100	60	8~10	5~6	100	30~50

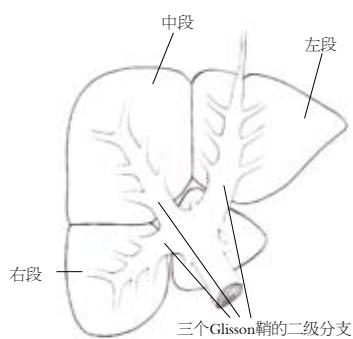


图1 Takasaki K将肝脏分为左中右三段和尾状叶,每段有独立的Glisson系统,以此为单位行Glisson鞘横断肝切除。

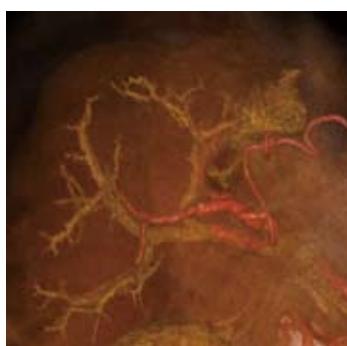


图2 iCT3D重建示肝内Glisson蒂分布与符合Takasaki的肝三段解剖。Glisson鞘内见肝动脉和门静脉。

后引流量I组为(370±290)mL, II组为(170±110)mL, 组间比较无显著差异($P>0.05$)。II组术后肝酶学康复优于I组(图6)。

2.4 术后相关并发症和预后 两组均未出现严重并发症,术后4 wk内康复出院。两组间复发率等指标无显著差异($P<0.05$): I组恶性肿瘤根治率为90%(1/10),未达根治1例为门脉左主干癌栓形成,目前随访4 mo生存良好,根治者随访3~18 mo,复发率20%(2/10),其余患者生存良好。II组恶性肿瘤根治率85.7%(3/18),未达根治者1例为肿瘤浸润门脉右主干1例(残留肿瘤组织直径约1.5 cm)、S V VIII VI+射频1例和S III VI+射频1例。根治性切除18例中,随访18 mo,生存率100%、复发率4.5%(1/22),死亡率9.5%(2/21),2例死亡均为非根治病例。

3 讨论

CUSA利用超声波对人体组织的热效应、机械

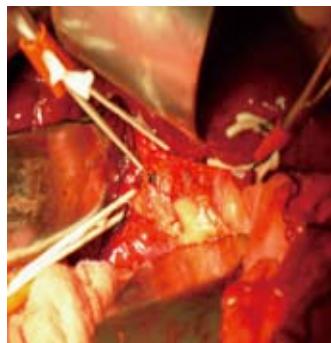


图3 以3D重建为基础,游离左中右肝段Glisson鞘并悬吊之。



图4 病灶位于Couinard S VI。根据Glisson鞘横断理论进一步解剖右肝段肝实质并选择性阻断Couinard S VI Glisson鞘, S VI缺血缺血线清晰可见。

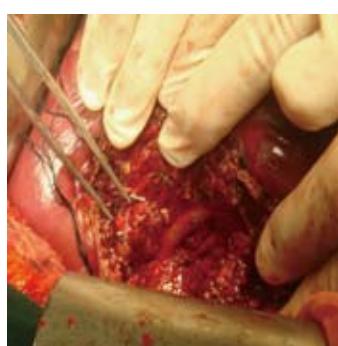


图5 解剖性切除Couinard S VI。切缘整齐,支配S VII肝内管道保留完好。

效应和空化作用等原理,将要切除的组织粉碎,再经冲洗液与切除组织碎屑混合乳化,经超声探头上的吸引装置吸除^[5,6]。CUSA具有超声振荡切割、冲洗乳化与吸引3种功能,能选择性地保留肝实质内的血管等结构,减少或避免血管、胆管的损伤。具有出血少、术野洁净、对血管和周围组织损伤保护性好、手术操作安全可靠、术后反应轻等特点,使切割更精确,对周围组织损伤较小^[1,7,8]。CUSA与传统切肝技术相比,在控制失血、肝组织保护、复杂部位肝解剖等

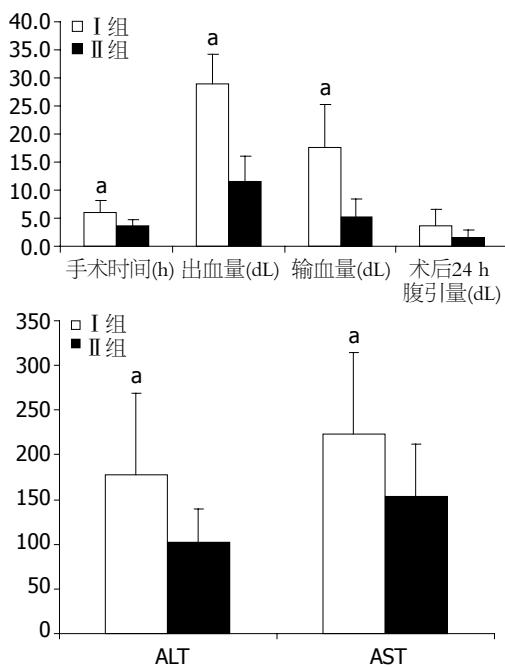


图 6 两组患者术中及术后相关指标比较。^a $P < 0.05$ vs. II组.

方面有明显的优势^[9,10]. 特别是恰当的设备参数设置配合操作者的技巧, 可以最大限度地显露肝实质内管道结构并予以保护、避免损伤肝内血管, 从而显著提高手术效果和肿瘤切除率, 保护肝功能损害和减少术后并发症^[2,7,11].

CUSA最佳功能的发挥与其术中使用技术参数密切相关, 恰当的参数设置保证最大限度的保护对健康肝脏和血管的损害^[12]. 但是目前尚未见到对CUSA用于切肝参数优化的文献报道, 能够参考的资料仅是来源于厂家推荐的参考设置参数, 但我们在使用过程中发现对于不同的质地的肝组织, 厂家推荐的参数设置并非最佳设置. 手柄的振幅和组织选择性是影响肝组织游离的主要因素^[5,13]. 因此我们主要针对调整手柄振幅和组织选择性来提高切肝的速度和对血管的保护作用. 本研究显示, 与厂家推荐参数比较, 我们的优化方案调整了振幅、组织选择性和吸引等环节, 使得各参数间配合更佳默契. 调低振幅在减慢超声震荡效率的情况下可增加对组织的保护, 配合适当的冲洗水流量和吸引, 可更好地暴露管道组织, 有利于减少目标管道组织表明的水分和积血, 得以提高电凝止血效率. 调低振幅看似降低了断肝效率, 但由于出血的减少和电凝止血效果的改善, 总体断肝时间得以减少. 研究结果证实, II组手术时间、出血量、输血量和术后24 h引流量等指标均显著优于I组. 究其原因在于CUSA的优化参数设置可以提高组织选择性和对细小血管的保护, 同时

最大限度地减少对健康肝组织的损伤, 从而有效地减少了出血、提高了断肝效率、节省了手术时间. 而厂家推荐的参数设置虽然可以快速断肝, 但是由于组织选择性未达到最佳水平, 以至于术中用于止血的时间过长, 从而造成出血量增加和延长手术时间. 但是如果术中止血彻底, 两组参数设置都是安全的, 因此术后引流量并无显著差异. 优化参数设置组术后ALT和AST的康复指标明显好于推荐参数设置组也佐证了上述推测.

结合本研究结果, 我们初步总结出以下经验: (1)术前通过MRI、iCT等影像检查, 充分了解每个患者肝脏病变、相关管道解剖特征, 术前作出可行的手术方案, 并在术中通过术中超声定位进一步明确解剖结构, 是手术成败的重要环节; (2)针对不同病理状态的肝实质, 调整设备操控指标, 实时优化CUSA参数设置, 在结合良好的目标肝段入肝血流阻断, 并严格按照肝段或叶的解剖标志并结合阻断后缺血线在无Glisson系统分布的平面断肝; (3)CUSA沿管道走向纵向适当频度移动CUSA刀头, 对肝实质作用较长时间充分粉碎肝实质组织, 断面显露管道结构时, 应首先距目标管道0.5-1.0 cm由浅入深解剖管道周围组织, 完全暴露管道组织后再行钛夹或者结扎离断. <1.0 mm结构可以电凝离断, 2.0-3.0 mm结构连发钛夹钳闭即可, 3.0 mm以上宜细线结扎. 电凝止血时务必和吸引功能最佳配合、保证充分的吸引, 因为电凝只有在充分暴露血管并且无积血时才能给血管最大的能量传递以便凝固止血. 我们做法为术者持CUSA显露断面管道, 第一助手电凝、钛夹钳夹或结扎管道, 第二助手以精细剪刀离断目标管道, 第三助手负责暴露并辅助保持创面干洁, 有序的配合有助于准确操作、减少失误、缩短手术时间.

总之, CUSA系统使断肝技术进入精肝切除时代, 但需要与准确的肝脏断面解剖径路、有效的离断肝段阻断和协调的操作配合相结合, 才能使其价值得到充分体现.

4 参考文献

- 陈心葵, 杨军. 超声外科手术吸引器及临床应用概况. 国外医学·生物医学工程分册 1997; 20: 17-20
- 孔连宝, 王学浩, 张峰, 李相成, 蒋维维. 超声刀技术在肝肿瘤切除术及活体肝移植术中的应用. 南京医科大学学报(自然科学版) 2008; 28: 1155-1157
- Takasaki K. Glissonean pedicle transection method for hepatic resection: a new concept of liver segmentation. J Hepatobiliary Pancreat Surg 1998; 5: 286-291

■同行评价
本文可读性较好, 为临床医师提供一定的经验和总结.

- 4 付必莽, 张捷, 孙勇, 唐继红, 顾亚律, 唐波, 胡明道, 杨达宽, 何晓顺, 黄洁夫. 256层智能CT精准肝切除模型的建立及临床应用. 肝胆外科杂志 2010; 18: 202-205
- 5 吴敏, 汤黎明, 吴巍. 多功能超声外科手术装置的原理及设计. 医疗设备信息 2004; 19: 13-15
- 6 Mark A. Neurohr, Newport, KY, inventor. Ultrasonic surgical instruments. United States patent US20080234710A1. 2008 Sep 25
- 7 Takatsuki M, Eguchi S, Yamanouchi K, Tokai H, Hidaka M, Soyama A, Miyazaki K, Hamasaki K, Tajima Y, Kanematsu T. Two-surgeon technique using saline-linked electric cautery and ultrasonic surgical aspirator in living donor hepatectomy: its safety and efficacy. *Am J Surg* 2009; 197: e25-e27
- 8 Gurusamy KS, Pamecha V, Sharma D, Davidson BR. Techniques for liver parenchymal transection in liver resection. *Cochrane Database Syst Rev* 2009; CD006880
- 9 Fasulo F, Giori A, Fissi S, Bozzetti F, Doci R, Gennari L. Cavitron Ultrasonic Surgical Aspirator (CUSA) in liver resection. *Int Surg* 1992; 77: 64-66
- 10 Nagano Y, Matsuo K, Kunisaki C, Ike H, Imada T, Tanaka K, Togo S, Shimada H. Practical usefulness of ultrasonic surgical aspirator with argon beam coagulation for hepatic parenchymal transection. *World J Surg* 2005; 29: 899-902
- 11 Xu JS, Guo H. Study on a micro-knife and its vibration signal acquisition system. *Piezoelectricity, Acoustic Waves, and Device Applications (SPAWDA)* and 2009 China Symposium on Frequency Control Technology, Joint Conference of the 2009 Symposium on, 2009: 131
- 12 Cimino WW. Ultrasonic surgery: power quantification and efficiency optimization. *Aesthet Surg J* 2001; 21: 233-241
- 13 汤黎明, 吴敏, 刘铁兵, 赵海洋, 姜险峰. 超声刀频率检测方法及装置研究. 医疗卫生装备 2007; 28: 22-23

编辑 曹丽鸥 电编 何基才

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)

危重症患者胃食管反流相关问题的研究进展

张敏洁, 陈维顺

张敏洁, 陈维顺, 中南大学湘雅医学院株洲临床学院 株洲市一医院消化内科 湖南省株洲市 412000

作者贡献分布: 张敏洁与陈维顺对本文所作贡献均等; 此综述由陈维顺与张敏洁构思; 综述资料搜集及写作由张敏洁完成; 陈维顺审校。

通讯作者: 陈维顺, 硕士生导师, 主任医师, 412000, 湖南省株洲市, 中南大学湘雅医学院株洲临床学院, 株洲市一医院消化内科. chen8242123@sina.com

电话: 0731-28203211

收稿日期: 2010-12-23 修回日期: 2011-02-28

接受日期: 2011-03-08 在线出版日期: 2011-04-08

Gastroesophageal reflux and reflux-related complications in critically ill patients

Min-Jie Zhang, Wei-Shun Chen

Min-Jie Zhang, Wei-Shun Chen, Zhuzhou Clinical College of Xiangya School of Medicine, Central South University; Department of Gastroenterology, the First Hospital of Zhuzhou, Zhuzhou 412000, Hunan Province, China

Correspondence to: Professor Wei-Shun Chen, Zhuzhou Clinical College of Xiangya School of Medicine, Central South University; Department of Gastroenterology, the First Hospital of Zhuzhou, Zhuzhou 412000, Hunan Province, China. chen8242123@sina.com

Received: 2010-12-23 Revised: 2011-02-28

Accepted: 2011-03-08 Published online: 2011-04-08

Abstract

There are numerous risk factors for gastroesophageal reflux (GER) in critically ill patients, such as tracheal intubation/mechanical ventilation, tube feeding, decreased level of consciousness, sustained supine position, and high intra-abdominal pressure. Therefore, GER is very common in critically ill patients. Patients who suffered from GER are liable not only to gastroesophageal reflux disease (GERD) but also to other severe complications such as aspiration pneumonia, acute lung injury, GERD-derived respiratory distress, noncardiac chest pain (NCCP), and sudden infant death (SID). As GER and its complications can greatly affect patients' prognosis, improving the diagnosis of GER and taking precaution measures are of great importance to critically ill patients.

Key Words: Critically ill patients; Gastroesophageal reflux; Adverse consequences; Mechanism; Diagnosis

Zhang MJ, Chen WS. Gastroesophageal reflux and reflux-related complications in critically ill patients. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2011; 19(10): 1045-1050

摘要

危重症患者由于存在气管插管/机械通气、鼻饲/肠内营养等诊疗操作加之存在程度不等的意识障碍, 长期卧床, 腹内压升高等高危因素, 使胃食管反流十分常见, 其危害性不但引起胃食管反流病, 更重要的引起吸入性肺炎、急性肺损伤、源性呼吸窘迫等呼吸系危象, 还可导致非心源性胸痛, 新生儿猝死。其诸多不良反应并同原发病一起影响患者预后, 提高对胃食管反流病的诊断水平, 并采取相应的防治措施十分必要。

关键词: 危重症患者; 胃食管反流; 后果; 机制; 诊断

张敏洁, 陈维顺. 危重症患者胃食管反流相关问题的研究进展. 世界华人消化杂志 2011; 19(10): 1045-1050

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/1045.asp>

0 引言

胃食管反流病(gastroesophageal reflux disease, GERD)是临床常见病, 近年来发病率有增高趋势^[1], 除常见烧心、反酸、胸骨后疼痛等胃及食管症状外, GERD食管外表现有时也非常突出^[2], 包括肺系症状与疾病: 哮喘、气管支气管炎、吸入性肺炎. 耳鼻咽喉症状: 哮鸣性喉痉挛、喉部痰液过多等. 口腔症状, 睡眠呼吸暂停综合征等. GERD相关其他症状: 在GERD患者中消化道溃疡、肠易激综合征(腹痛、腹泻、便秘)、中风等疾病的发病率高于无GERD人群。危重症患者由于气管插管/机械通气, 鼻饲/肠内营养等操作的实施加之存在程度不等的意识障碍, 长期卧床, 腹内压升高等致使胃食管反流(gastroesophageal reflux, GER)现象发生率居高不下, 并同原发病一起对患者病情及预后造成巨大影响, 这已逐渐得到众多临床工作者的重视, 本文就GER对危重症患者的影响、反流的诱发因素、反流的临床诊断、内外科治疗等方面

■背景资料

GERD是临床常见病。危重症患者由于各种临床操作的实施加之存在程度不等的意识障碍, 长期卧床, 腹内压升高等致使GER现象发生率居高不下, 并同原发病一起对患者病情及预后造成巨大影响。

■同行评议者
施诚仁, 教授, 上海交通大学医学院附属新华医院
小儿外科

■研究前沿

吸入性肺炎、急性肺损伤、GERD源性呼吸窘迫等GER相关并发症已越来越受到临床重视,但其发生机制、影响因素、临床诊断及防治措施尚有诸多问题未得到解决,有待深入研究。

面简述如下。

1 危重症患者GER发生率

危重症患者GER发生率目前尚未见详细的文献统计,但在不同病理状态下的反流率已有较多文献报道,Abdel-Gawad等^[3]在研究中指出,使用机械通气的患者发生GER的比例高达91.6%。Metheny等^[4]在实验中获得的数据表明,320例进行机械通气及鼻饲的患者发生GER的占88.9%。

2 GER对危重症患者的影响

2.1 吸入性肺炎 吸入性肺炎是由来自鼻咽部分泌物、酸性胃内容物反流、误吸所致的肺炎,危重症患者发生率为10%-43%。GER不但引起化学性炎症,其所含细菌吸入肺部则引起肺部的感染,其中GER与呼吸机相关性肺炎(ventilator-associated pneumonia, VAP)的发病密切相关。VAP是指患者接受机械通气48 h后所并发的肺实质感染,是机械通气患者严重的并发症。加拿大危重症学会最近制定的VAP最新指南^[5]指出:在ICU危重患者中VAP感染率达40%-60%,呼吸道感染占30%-60%,在ICU的滞留时间平均延长4.3 d,死亡绝对危险增加5.8%。经研究部分VAP患者肺内致病菌为G⁻菌^[6,7],与患者胃内定植菌具有同源性,提示胃内细菌通过反流与误吸造成肺部感染,是VAP的重要感染途径之一。目前认为胃-肺感染途径包括4个必需的步骤:胃内细菌定植、胃内容物的反流、反流基础上肺的吸入,以及机体防御功能降低。可见预防GER对防止吸入性肺炎,减少VAP的发生有十分重要的意义。

2.2 急性肺损伤 GERD的反流液包括胃液和十二指肠液,前者主要成分是胃酸和胃蛋白酶,为酸性攻击因子;后者主要成分是胆汁和胰液,为碱性攻击因子。胃酸和胆汁酸为双重攻击因子对呼吸道和呼吸膜有直接损伤作用,其所诱导产生的炎性细胞浸润,肿瘤坏死因子和白介素-8等炎症介质的产生有间接损伤作用^[8]。反流液可引起支气管黏膜充血水肿、渗出,支气管痉挛。反流液也可使肺微血管痉挛,引起肺内血液分流,形成死腔样通气,通气血流比例失调,进而导致急性肺损伤、急性呼吸窘迫综合征和呼吸衰竭等^[9]。

2.3 GERD源性呼吸窘迫 Debley等^[10]在对126例哮喘患者的研究发现,其中有94例(74.6%)诊断为GERD,且GERD的反流症状的严重程度与哮喘的严重程度及其控制药物的使用量呈正相关。

汪忠镐等^[11]诊治的许多患者曾处于危重状态,包括2人已经历过呼吸停止、瞳孔散大而被通知“死亡”的过程;4人曾行1-2次气管切开术;1人气管切开持续插管长达9 mo余,经正确诊断及抗反流治疗后,气道插管得以去除,故提出GERD源性呼吸窘迫不是哮喘,而常是GER中的一种继发性病变。其发病机制在于反流引起的喉气管激惹、痉挛以至窒息。提出与GERD有关的呼吸窘迫是严重威胁生命的疾病之一。

2.4 GER与胸痛 非心源性胸痛(noncardiac chest pain, NCCP)是指排除心脏因素所引起的复发性胸骨后疼痛或不适,目前国内研究普遍认为NCCP最常见的病因是食管病变^[12],其中尤以GERD最多见占60%。

2.5 新生儿猝死 新生儿尤其是早产儿由于生理解剖的特殊性,GER发生率高,轻度反流发病率可达80%-85%。可刺激喉部化学感受器引起呼吸暂停和心动过缓,并可诱发喉痉挛形成上气道阻塞加重缺氧,或因反流量大误吸而窒息致死^[13]。陈政^[14]所在的新生儿科收治的新生儿因GER致猝死的6例患者,经复苏抢救治疗,2例经抢救0.5-1 h无效死亡,4例恢复了呼吸、心跳,但终因呼吸暂停时间太长,缺氧严重,出现各种严重并发症,而于复苏后5 h内死亡。

3 造成反流及误吸的危险因素

3.1 气管插管/机械通气 GER在机械通气患者中非常常见,在拔管的48 h内仍然存在误吸的风险。Abdel-Gawad等^[3]在研究中指出使用机械通气的患者发生GER的比例高达91.6%。且VAP患者均存在GER,未患VAP的患者中也有75%存在GER。患有VAP的患者平均总反流时间(50 min)显著长于未患有VAP的患者(30 min)。总反流时间可比较准确地预测VAP的发生。还有研究报道,进行机械通气的危重症患者发生酸反流的高达80%,发生胆汁反流(十二指肠胃反流)的占60%^[15,16]。气管插管/机械通气引起GER的机制尚不清楚,可能由下述机制导致:机械通气导致食管下括约肌压力降低明显或消失^[15]及腹内压升高,胃内压力高出食管腔内压力^[17]。气管插管致使无效咳嗽,咽喉的敏感性下降,咽喉肌废用性萎缩,气囊压迫食管从而导致上气道防御能力的减弱。

目前主张采取以下措施减少反流及降低VAP的风险^[18]: (1)严格无菌操作; (2)积极口腔护理; (3)声门下分泌物引流(SSD); (4)使用热湿交换器

(HME); (5)缩短机械通气时间; (6)胃动力药物的应用; (7)减少强力镇静剂和肌松剂的应用; (8)预防性抗生素, 包括选择性消化道和口腔去污染; (9)增强免疫力。

3.2 鼻胃管的使用/肠内营养 留置鼻胃管是危重症患者重要的诊疗项目之一, 其具有胃肠减压、鼻饲营养、观察引流液了解病情等多项作用, 但对GER的影响不容忽视, 一项对102 842例居住在护理机构人群的大样本回顾性研究发现, 鼻胃管是可预测反流与误吸的18个危险因素中预测强度第3的危险因素^[19]。在一个对540例ICU住院患者进行的有关吸入性肺炎危险因素的前瞻性队列研究中, 发现鼻饲的相对危险度为1.11^[20]。Douzinas等^[21]的研究中表明, GER的发生率与留置鼻胃管明显相关($r = 0.56, P < 0.01$)。鼻胃管引起吸入的可能机制包括^[22]: (1)食管括约肌完整性缺失; (2)下食管括约肌的松弛频率增加; (3)咽部内收反射敏感性下降; (4)胃内残余量造成胃内压升高; (5)呕吐。

为防范反流可采取的措施: 在鼻饲前应检查胃内残余物, 在鼻饲时和鼻饲后30 min嘱患者保持坐位, 每次鼻饲量应<300 mL, 30 min内灌入量不能超过250 mL^[23], 对于反流严重者, 需插空肠管行肠内营养更佳。Heyland等^[24]研究显示, 胃管前端位置的不同可使GER有显著的差异, 胃管前端置入幽门以下的小肠时发生GER较少, 且发生肺吸入的情况也有减少趋势, 认为小肠内营养可减少GER的发生。

3.3 意识水平 不容否认意识障碍与反流和误吸之间有密切的关联, 并是其重要的危险因素, Carrilho等^[20]进行的有关吸入性肺炎危险因素的前瞻性队列研究中意识障碍的相对危险度为2.67。Metheny等^[4]的研究显示, 低格拉斯哥昏迷评分(glasgow coma scale, GCS)的危重症患者更易发生GER。意识障碍造成反流及误吸的机制是多方面的: 意识障碍常导致胃肠功能低下, 食管下括约肌松弛使食管体部收缩能力下降, 胃排空延迟。且意识障碍患者的胃贲门处于半开放状态, 胃内容物易反流。呼吸中枢处于抑制状态, 支气管敏感部位的神经反应性及敏感性降低, 咳嗽反射及咽反射减弱, 不能有效排除过多的分泌物而流入肺内造成肺部感染。

3.4 腹内压 当腹内压(intra-abdominal pressure, IAP) $\geq 12 \text{ mmHg}$ 时称之为腹内高压。Vidal等^[17]的研究发现, 入住ICU>24 h并实施经膀胱腹内压测定的94例患者中, 83例(89%)获得了测量结

果。若以IAP_{max} $\geq 12 \text{ mmHg}$ 为诊断标准, 有53例(64%)发生腹内高压, 该研究还发现有部分患者是在ICU住院的过程中逐渐发展为腹内高压, 导致腹内压升高的危险因素包括机械通气、急性呼吸窘迫综合征、液体复苏、胃轻瘫/肠梗阻、酸中毒、低血压、低体温、腹部手术、腹腔感染、肺炎、败血症等。腹内压升高是引起GER的重要发病因素, 腹内压增高可引起食管下端括约肌压相对降低而导致GER。

3.5 体位 危重患者往往存在胃肠功能障碍, 尤其是胃张力和蠕动功能低下, 在采取仰卧位时, 胃底部经常有胃液潴留。患者睡眠或咳嗽时(包括吸痰引起的剧烈咳嗽), 胃内容物反流入口腔, 误吸入肺。有证据表明, 持续的平卧位可增加GER以及误吸的风险^[4]。目前有关预防吸入性肺炎的临床指南建议患者背部与床面最少成30度夹角^[25]。但Torres等^[26]的研究(以15例插了鼻胃管并实施了机械通气的危重患者为对象)发现, GER的发生与体位并无明显关系。Ibáñez等^[27]的研究也表明, 在50例插胃管的患者中不管患者采取的是平卧位还是半卧位GER的发生率没有明显统计学差异[平卧81%(21/26) vs 半卧67%(16/24); $P = 0.26$]。由此可推测对患者所实施的侵入性操作是造成患者GER的主要原因, 而体位因素则退居其次。

4 适合危重症患者GER的诊断技术

尚无适合危重症患者的特殊GER诊断技术, 一般认为诊断GER的常规方法^[28]同样适应于危重症患者。

4.1 食管pH监测 24 h食管pH监测通过记录食管内的pH值变化, 证实反流是否存在。由于它具有可重复性、较高的敏感性和特异性, 可用来评价症状与反流的相关性, 已广泛应用于临床并成为诊断GER的金标准。本课题组^[29]曾给30例危重症患者进行24 h胃内pH及胆汁反流监测, 插管顺利, 效果满意。Abdel-Gawad等^[3]同样运用24 h动态胃内pH和胆汁反流监测进行实验数据的收集。

4.2 食管胆汁反流测定 部分GERD患者有非酸性反流物质因素的参与, 特别是与胆汁反流相关。Bilitec 2000胆汁反流监测仪通过检测胆红素来反映胆汁反流存在与否及其程度。其缺点是固体食物颗粒易堵塞探头小孔影响检查结果, 患者在监测过程中需避免进食与胆汁吸收光谱相似的食物, 且多数十二指肠内容物的反流与胃内容物的反流同时存在, 并在抑酸后症状有所

■ 相关报道

Gawad等运用24 h动态胃内pH和胆汁反流监测进行实验数据的收集, 研究得出使用机械通气的危重症患者发生GER的比例高达91.6%。

■创新盘点

本文从危重症患者角度总结了近年来文献关于GER的相关并发症及发生的危险因素，并对其各种诊断及治疗方法进行了比较，对临床有借鉴作用。

缓解。该检查往往和24 h食管pH监测一起判断患者反流情况^[3,29]。

4.3 食管多通道腔内阻抗监测联合pH监测 食管多腔道阻抗(multichannel intraluminal impedance, MII)检测是用食管内的探针检测食团通过紧密排列电极之间的阻抗变化。空气导电性低，测得的阻抗值高，而吞咽或反流物导电性高，测得的阻抗值低。食管内阻抗值变化可以区分判断食团前进(如吞咽)或后退(如反流)，反流物为液体或气体。24 h食管pH监测不能识别pH>4的反流以及气体反流。由于无法评估食管内液体或食团的运动方向，若有酸性物质摄入，可能造成假阳性的结果。目前多腔道阻抗导管带有pH监测通道。食管多通道腔内阻抗联合pH监测可以检测大多数的反流事件，并能区分酸性、弱酸性、弱碱性反流，还能判断反流的程度和范围^[30]。在最近的研究中，Corvaglia等^[31]用该方法对新生儿重症监护病房的早产儿进行GER情况的检测。尚未见文献报道该方法用于普通重症监护病房的危重症患者。但该方法在GERD的诊断中备受推崇。

4.4 唾液中胃蛋白酶检测 唾液中胃蛋白酶浓度检测：患者深咳吐出咽后部唾液，不少0.5 mL。用酶联免疫方法检测唾液中胃蛋白酶浓度。根据24 h食管pH检查，pH<4为存在GER，但胃蛋白酶在pH>6才失活，在pH为4-6，24 h食管pH诊断为阴性事件但实际有胃内容物的反流，国外有文献比较胃蛋白酶与24 h食管pH检测对于诊断咽喉反流的价值，结果唾液中胃蛋白酶监测的灵敏度和特异度分别是100%和89%^[32]。李湘平等^[33]的研究提示，应用唾液中胃蛋白酶检测的诊断灵敏度为93.8%，特异度为46.2%。唾液中胃蛋白酶质量浓度的检测可作为一项灵敏度高、无创、快速的客观的诊断方法应用于咽喉反流的筛查。Metheny等^[4]对360例危重患者进行该检测，从获得的支气管分泌物阳性标本计算出平均每个患者每3 d发生1.6次反流。存在吸入性肺炎的患者阳性率为48%。

4.5 消化内镜检查 上消化道内镜检查对于确定有无食管炎症及其严重程度、有无Barrett's食管等具有重要价值。我国《胃食管反流共识意见》^[34]提出将该检查作为GERD的常规首选检查。

由于危重症患者恐不能耐受普通胃镜，食管胶囊内镜(esophageal capsule endoscopy, ECE)是一种新的无创内镜监测技术，有研究显示，该检测技术对食管炎和内镜下可疑的食

管组织学变化敏感度为60%-79%，特异度为94%-100%，阳性预测值为83%-100%，阴性预测值为92%-95%，对于诊断食管炎和食管组织学变化有良好的特异性和阴性预测值，但是对于诊断食管组织学变化的敏感性并不理想^[35]。目前该检查多用来诊断GER主要为反流性食管炎，Barrett's食管，门脉高压食管静脉曲张，尚未有文献报道用于对危重症患者GER情况的诊断。

5 GERD的内外科及内镜治疗

GERD的治疗原则是缓解症状，预防和治疗重要并发症及预防GERD复发。

5.1 内科治疗 包括改变生活方式和药物治疗：(1)抑制胃酸分泌；(2)促动力药物治疗^[36]。但对于危重患者抑酸药物需谨慎应用。Vakil^[37]认为酸抑制药物可以改变胃内菌群。流行病学研究结果显示，此类药物的使用和肺炎发生相关。

5.2 外科治疗 曾经在临床应用过的抗反流手术方法不下数十种。其中不少术式或因设计欠合理，或因临幊上使用不多而逐渐被废弃。最后剩下360度Nissen胃底折叠术、Belsey Mark IV手术(240度胃底折叠术)、Hill手术(经腹胃后固定术)、Guarner手术(贲门后胃底固定术)、Dor手术(贲门前胃底固定术)等数种术式仍被采用^[38]。曹占国等^[39]对腹腔镜下前180度折叠术与360度Nissen胃底折叠术的两年临幊效果及术后并发症发生率进行了比较，结果显示两种折叠术式对改善大多数GERD患者生活质量，控制反流的效果相当，但前180度折叠较Nissen折叠对胃肠功能影响更小。

5.3 内镜治疗 内镜抗反流治疗技术是近几年问世的新方法包括内镜下缝合治疗、射频治疗、内镜下注射和(或)植入治疗等。内镜缝合术和射频能量传递术是唯一经美国FDA批准用于治疗GERD的内镜治疗术，这两种内镜治疗术在短期试验中取得了令人兴奋的结果，但还需与药物治疗和腹腔镜胃底折叠术进行大规模、随机、双盲试验来评价这两种内镜治疗术治疗GERD的效果^[40]。

6 结论

众多研究表明，危重症患者GER发生率高，其危害性不但引起GERD，更重要的引起吸入性肺炎、急性肺损伤、GERD源性呼吸窘迫、非心源性胸痛、新生儿猝死等情况加重患者病情，增加患者死亡风险，延长患者住院时间。因此，

临床应充分重视危重症患者GER, 一方面在临床操作中尽可能避免GER的发生; 另一方面应采取有效措施治疗GER, 减少GER所导致的各种并发症发生。

7 参考文献

- 1 Wong BC, Kinoshita Y. Systematic review on epidemiology of gastroesophageal reflux disease in Asia. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2006; 4: 398-407
- 2 赵莉, 魏子白, 吴云林. 胃食管反流病的食管外表现. 国际消化病杂志 2009; 29: 14-16
- 3 Abdel-Gawad TA, El-Hodhod MA, Ibrahim HM, Michael YW. Gastroesophageal reflux in mechanically ventilated pediatric patients and its relation to ventilator-associated pneumonia. *Crit Care* 2009; 13: R164
- 4 Metheny NA, Clouse RE, Chang YH, Stewart BJ, Oliver DA, Kollef MH. Tracheobronchial aspiration of gastric contents in critically ill tube-fed patients: frequency, outcomes, and risk factors. *Crit Care Med* 2006; 34: 1007-1015
- 5 Dodek P, Keenan S, Cook D, Heyland D, Jacka M, Hand L, Muscedere J, Foster D, Mehta N, Hall R, Brun-Buisson C. Evidence-based clinical practice guideline for the prevention of ventilator-associated pneumonia. *Ann Intern Med* 2004; 141: 305-313
- 6 张聚静, 阎锡新, 杨秀芬, 王海滨, 吴雅莉. 胃腔定植菌迁移与呼吸机相关肺炎相关性研究. 临床荟萃 2005; 20: 1156-1158
- 7 代芊, 周涌, 宁涛, 李剑峰, 李冰, 黄汉朝. 院内肺炎逆行感染途径的Southern印迹杂交分析. 中华医院感染学杂志 2003; 13: 301-304
- 8 曲成业. 吸入性肺炎急性期病理生理与治疗进展. 国外医学麻醉学与复苏分册 2000; 21: 87-89
- 9 卫丽, 汪琪. 十二指肠胃食管反流液对气管微循环的影响. 中国微循环 2002; 6: 205-207
- 10 Debley JS, Carter ER, Redding GJ. Prevalence and impact of gastroesophageal reflux in adolescents with asthma: a population-based study. *Pediatr Pulmonol* 2006; 41: 475-481
- 11 汪忠镐, 吴继敏, 刘建军, 王利营, 来运刚, 季峰, 田书瑞. 胃食管反流导致的呼吸窘迫的原因. 医学研究杂志 2008; 37: 1-3
- 12 Battaglia E, Bassotti G, Buonafede G, Serra AM, Dughera L, Orzan F, Casoni R, Chistolini F, Morelli A, Emanuelli G. Noncardiac chest pain of esophageal origin in patients with and without coronary artery disease. *Hepatogastroenterology* 2005; 52: 792-795
- 13 金汉珍, 黄德珉, 官希吉. 实用新生儿学. 第3版. 北京: 人民卫生出版社, 2003: 493, 992
- 14 陈政. 新生儿胃食管反流致猝死6例临床分析. 疑难病杂志 2008; 7: 620
- 15 Nind G, Chen WH, Protheroe R, Iwakiri K, Fraser R, Young R, Chapman M, Nguyen N, Sifrim D, Rigda R, Holloway RH. Mechanisms of gastroesophageal reflux in critically ill mechanically ventilated patients. *Gastroenterology* 2005; 128: 600-606
- 16 Xin Y, Dai N, Zhao L, Wang JG, Si JM. The effect of famotidine on gastroesophageal and duodenogastric-esophageal reflexes in critically ill patients. *World J Gastroenterol* 2003; 9: 356-358
- 17 Vidal MG, Ruiz Weisser J, Gonzalez F, Toro MA, Loudet C, Balasini C, Canales H, Reina R, Estensoro E. Incidence and clinical effects of intra-abdominal hypertension in critically ill patients. *Crit Care Med* 2008; 36: 1823-1831
- 18 余巍巍. 重症监护室呼吸机相关肺炎预防研究进展. 中国呼吸与危重监护杂志 2010; 9: 101-103
- 19 Langmore SE, Skarupski KA, Park PS, Fries BE. Predictors of aspiration pneumonia in nursing home residents. *Dysphagia* 2002; 17: 298-307
- 20 Carrilho CM, Grion CM, Bonametti AM, Medeiros EA, Matsuo T. Multivariate analysis of the factors associated with the risk of pneumonia in intensive care units. *Braz J Infect Dis* 2007; 11: 339-344
- 21 Douzinas EE, Tsapalos A, Dimitrakopoulos A, Diamanti-Kandarakis E, Rapidis AD, Roussos C. Effect of percutaneous endoscopic gastrostomy on gastro-esophageal reflux in mechanically-ventilated patients. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 114-118
- 22 Gomes GF, Pisani JC, Macedo ED, Campos AC. The nasogastric feeding tube as a risk factor for aspiration and aspiration pneumonia. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2003; 6: 327-333
- 23 Marik PE, Kaplan D. Aspiration pneumonia and dysphagia in the elderly. *Chest* 2003; 124: 328-336
- 24 Heyland DK, Drover JW, Dhaliwal R, Greenwood J. Optimizing the benefits and minimizing the risks of enteral nutrition in the critically ill: role of small bowel feeding. *JPNEN J Parenter Enteral Nutr* 2002; 26: S51-S55; discussion S56-S57
- 25 Tablan OC, Anderson LJ, Besser R, Bridges C, Hajjeh R. Guidelines for preventing health-care-associated pneumonia, 2003: recommendations of CDC and the Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee. *MMWR Recomm Rep* 2004; 53: 1-36
- 26 Torres A, Serra-Batlles J, Ros E, Piera C, Puig de la Bellacasa J, Cobos A, Lomeña F, Rodríguez-Roisin R. Pulmonary aspiration of gastric contents in patients receiving mechanical ventilation: the effect of body position. *Ann Intern Med* 1992; 116: 540-543
- 27 Ibáñez J, Peñafiel A, Raurich JM, Marse P, Jordá R, Mata F. Gastroesophageal reflux in intubated patients receiving enteral nutrition: effect of supine and semirecumbent positions. *JPNEN J Parenter Enteral Nutr* 1992; 16: 419-422
- 28 曾艳凌, 林志辉. 胃食管反流诊断技术进展. 医学综述 2009; 15: 1836-1839
- 29 朱宜人, 陈维顺, 李舜午, 罗虹雨, 钟燎原, 周红兵, 张选均. 危重病人24 h动态胃内pH和胆汁反流监测的研究. 中国医学工程 2006; 14: 487-488
- 30 Sifrim D, Castell D, Dent J, Kahrlas PJ. Gastroesophageal reflux monitoring: review and consensus report on detection and definitions of acid, non-acid, and gas reflux. *Gut* 2004; 53: 1024-1031
- 31 Corvaglia L, Mariani E, Aceti A, Capretti MG, Ancora G, Faldella G. Combined oesophageal impedance-pH monitoring in preterm newborn: comparison of two options for layout analysis. *Neurogastroenterol Motil* 2009; 21: 1027-e1081
- 32 Knight J, Lively MO, Johnston N, Dettmar PW, Koufman JA. Sensitive pepsin immunoassay for detection of laryngopharyngeal reflux. *Laryngoscope* 2005; 115: 1473-1478
- 33 李湘平, 陈顺金, 王路, 刘雄, 刘友利, 曾芳芳. 唾液中胃蛋白酶检测对咽喉反流的诊断价值. 中华耳鼻喉头颈外科杂志 2009; 44: 99-104
- 34 中国胃食管反流病共识意见专家组. 中国胃食管反流病共识意见2006年10月三亚. 胃肠病学 2007; 12: 233-239
- 35 Galmiche JP, Sacher-Huvelin S, Coron E, Cholet F, Soussan EB, Sébille V, Filoche B, d'Abrigeon

■应用要点

本文对危重患者GER情况进行了多方面的叙述, 期盼引起临床工作者的高度重视, 以提高危重患者GER的诊断及防治水平。

■同行评价

本文可读性较好，能使读者全面地了解重症患者胃食管反流方面的相关知识，为提高临床医生对它的诊断率和治疗效果奠定理论基础。

- G, Antonietti M, Robaszkiewicz M, Le Rhun M, Ducrotté P. Screening for esophagitis and Barrett's esophagus with wireless esophageal capsule endoscopy: a multicenter prospective trial in patients with reflux symptoms. *Am J Gastroenterol* 2008; 103: 538-545
- 36 林三仁. 中国胃食管反流病共识意见指南解读. 中华医学信息导报 2007; 22:13-14
- 37 Vakil N. Acid inhibition and infections outside the gastrointestinal tract. *Am J Gastroenterol* 2009; 104 Suppl 2: S17-S20
- 38 张逊. 胃食管反流病外科治疗的进展. 中华医学杂志 2005; 85: 1582-1584
- 39 曹占国, 秦鸣放, 王庆, 赵宏志. Nissen胃底折叠术与前180度胃底折叠术的疗效比较. 世界华人消化杂志 2010; 18: 2594-2598
- 40 李兆申, 陈志荣. 胃食管反流病内镜治疗进展. 临床荟萃 2003; 18: 1166-1167

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》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位胃肠病学和肝病学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学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、传递、生长因素和受体、营养肥胖、成像及高技术。

《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学领域的专家评论及临床实践和基础研究相结合具有实践意义的文章, 为内科学、外科学、感染病学、中医药学、肿瘤学、中西医结合学、影像学、内镜学、介入治疗学、病理学、基础研究等医生和研究人员提供转换平台, 更新知识, 为患者康复服务。

PD-1/PD-L通路对乙型肝炎病毒感染结局的影响

原琳, 李智伟

原琳, 李智伟, 中国医科大学附属盛京医院感染科 辽宁省沈阳市 110004
辽宁省教育厅科学基金资助项目, No. 20060979
作者贡献分布: 本综述写作由原琳完成; 李智伟审核。
通讯作者: 李智伟, 教授, 110004, 辽宁省沈阳市三好街36号, 中
国医科大学附属盛京医院感染科. lizw@sj-hospital.org
电话: 024-96615-62311
收稿日期: 2010-12-30 修回日期: 2011-03-15
接受日期: 2011-03-23 在线出版日期: 2011-04-08

Involvement of the PD-1/ PD-L pathway in outcome of hepatitis B virus infection

Lin Yuan, Zhi-Wei Li

Lin Yuan, Zhi-Wei Li, Department of Infectious Diseases,
Shengjing Hospital of China Medical University, Shenyang
110004, Liaoning Province, China

Supported by: the Science Foundation of the Education
Department of Liaoning Province, No. 20060979

Correspondence to: Professor Zhi-Wei Li, Department of
Infectious Diseases, Shengjing Hospital of China Medical
University, 36 Sanhao Avenue, Shenyang 110004, Liaoning
Province, China. lizw@sj-hospital.org

Received: 2010-12-30 Revised: 2011-03-15

Accepted: 2011-03-23 Published online: 2011-04-08

Abstract

Programmed death 1 (PD-1) is a costimulatory molecule which can be expressed on T cells. PD-1 and its ligands (PD-Ls) have been demonstrated to be able to inhibit the effector functions of T cells and even result in T cell function. Recently, many studies have demonstrated that the activation of the PD-1/PD-L pathway may affect the outcome of HBV infection. Blockade of the PD-1/PD-L pathway may enhance body's immune responses, which provides a new avenue for therapy of chronic hepatitis B.

Key Words: Programmed death 1; Programmed death 1 ligand; Hepatitis B virus; T lymphocyte

Yuan L, Li ZW. Involvement of the PD-1/PD-L pathway in outcome of hepatitis B virus infection. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2011; 19(10): 1051-1056

摘要

程序性死亡因子-1(programmed death 1, PD-1)

是可以表达在T淋巴细胞膜表面的负向协同刺激分子受体, 他与PD-1配体(programmed death 1 ligand, PD-L)形成通路后, 可以减弱T淋巴细胞免疫反应, 甚至导致T淋巴细胞功能衰竭。近来研究表明PD-1/PD-L通路的形成可以影响HBV感染后疾病的进展及预后。在适当的时候阻断PD-1/PD-L通路可以增强机体免疫应答, 为慢性乙型肝炎的治疗提供新的途径。

关键词: 程序性死亡因子-1; 程序性死亡因子-1配体; 乙型肝炎病毒; T淋巴细胞

■背景资料
HBV感染因机体的免疫状态不同会产生不同的结局, 因此通过免疫调节手段干预HBV感染后的结局一直是研究热点, 已有研究表明, PD-1/PD-L通路是可以影响机体免疫状态的一条重要通路, 有着重要的和广泛的临床应用价值。

原琳, 李智伟. PD-1/PD-L通路对乙型肝炎病毒感染结局的影响. 世界华人消化杂志 2011; 19(10): 1051-1056

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/1051.asp>

0 引言

乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)感染呈世界性分布, 但不同地区HBV感染的发病率差异很大, 在我国, 现有的慢性HBV感染者约9 300万人, 慢性乙型肝炎(chronic hepatitis B, CHB)患者约2 000万例, 其中约有15%-35%的患者最终会发展成肝硬化或肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)^[1-3]。

HBV感染的临床转归与机体免疫密切相关, 其中细胞免疫特别是HBV特异性T淋巴细胞免疫在病毒清除过程中起着重要作用。Kevin Lafferty提出的关于T淋巴细胞激活的双信号假说已经被人们广泛地接受。假说认为, T淋巴细胞活化成为效应T淋巴细胞发挥清除病毒作用, 除了需要T淋巴细胞受体(T cell receptor, TCR)识别抗原提呈细胞(antigen presenting cell, APC)表面的主要组织相容性复合物(major histocompatibility complex MHC)-肽复合物信号刺激外(第一信号), 还需要来自协同刺激分子的辅助调节信号, 即第二信号。第二信号是调节免疫功能的一个重要信号, 从功能上可分为激活T淋巴细胞的协同刺激分子和诱导T淋巴细胞耐受的协同刺激分子两类。协同刺激分子是一类细胞膜表面分子, 可为T、B淋巴细胞的活化提供辅助信号, 从而调节细胞的增殖、活化及分化。CD28/细

■同行评议者
靳雪源, 副主任医师, 中国人民解放军第302医院消化内科

■研发前沿

随着对PD-1研究的深入，他在CHB发生机制、HBV感染预后方面的研究逐渐成为焦点。

胞毒性T淋巴细胞抗原4(cytotoxic T lymphocyte antigen 4, CTLA-4)-B7和CD40-CD40L等信号通路已经被证明在调节T淋巴细胞活化和免疫耐受中扮演着重要角色。其中，程序性死亡因子-1(programmed death 1, PD-1)及其配体PD-L(programmed death 1 ligand)是近年来发现的B7/CD28家族中的负性协同刺激信号重要成员，PD-1/PD-L刺激信号通路形成后，向T淋巴细胞传递的负向刺激信号，减弱T淋巴细胞的应答，甚至导致T淋巴细胞功能衰竭，从而导致病毒持续感染^[4]。越来越多的研究表明，PD-1与其配体形成通路会影响HBV感染后疾病的进展及预后，本文对此作用进行综述。

1 PD-1及其配体的结构特点

1.1 PD-1是Ishida等^[5]于1992年发现的在发生程序性死亡的T淋巴细胞膜上的单体型I型跨膜蛋白，相对分子质量55 000 Da。现在大部分研究认为他属于CD28免疫球蛋白超家族，但也有研究认为PD-1只是在外部结构上类似CD28家族，而内部功能尤其是信号传导方面与CD28家族相去甚远^[6]。PD-1可以表达在活化的T淋巴细胞、B淋巴细胞、髓样细胞、单核细胞和自然杀伤T淋巴细胞等细胞表面^[5,7-11]。PD-1的分子结构由具有IgV样结构的胞外区，跨膜区，和具有连接信号肽功能的胞质尾区构成。他还具有另一种形式-可溶性的PD-1(soluble programmed death-1, sPD-1)，sPD-1具有膜性PD-1的IgV样结构的胞外区。Nielsen等^[12]在对PD-1 mRNA的研究中发现，除了能表达完整PD-1的mRNA外，还存在4种PD-1基因的剪接变体，即PD-1Δex2、PD-1Δex3、PD-1Δex2、3和PD-1Δex2、3、4，其中PD-1Δex3编码的转录本原有在136位置上的谷氨酸被甘氨酸所代替，产生缺乏膜性PD-1分子完整跨膜区的可溶性PD-1分子形式。

1.2 PD-1/L2 PD-1的配体为PD-L1(又称B7-H1)和PD-L2(又称B7-DC)，他们均属于B7家族，是负性协同刺激分子。他们可以表达于T淋巴细胞、Kupffer细胞、星状细胞、树突状细胞、髓样细胞，以及肝窦内皮细胞等细胞上^[13-19]。PD-L1还可以表达在血管内皮细胞、胰岛细胞、角蛋白细胞等细胞上。他们除了表达的范围不同，与PD-1的结合能力也不同。有研究表明，PD-1/PD-L2的结合力要强于PD-1/PD-L1，并且有着不同的结合和解离动力学^[20]。炎性细胞因子，包括IFN-α、β、γ，IL-2等可以上调APC、上皮细胞

及粒细胞上PD-L1(B7-H1)和PD-L2(B7-DC)的表达^[8,21-25]。

2 PD-1/PD-L通路与HBV感染

随着对PD-1研究的深入，越来越多的研究表明，PD-1与病毒感染后病毒特异性T淋巴细胞功能衰竭及免疫耐受有关。Barber等^[13]对感染慢性淋巴脉络丛脑膜炎病毒的小鼠模型T淋巴细胞上PD-1表达的研究发现，在功能衰竭的淋巴脉络丛脑膜炎病毒的T淋巴细胞上PD-1的表达显著高于正常功能的淋巴细胞，且利用抗体阻断PD-1与其配体形成的通路后，T淋巴细胞增殖、分泌细胞因子、杀伤受感染细胞等功能都得到了恢复。Maier等^[26]应用PD-L1的特异性抗体来治疗HBV转基因小鼠后发现单个CTL细胞分泌IFN-γ的功能得到恢复，并且伴随着肝内能分泌IFN-γ的CTL细胞绝对数量的增加，从而证明了PD-1/PD-L1通路随着肝内抗原的识别会导致T淋巴细胞分泌IFN-γ功能的抑制。阻断这个抑制通路可以在恢复CTL细胞应答途径上逆转病毒持续及慢性感染^[27]。这种功能衰竭的T淋巴细胞高表达PD-1/PD-L1通路的现象在HBV感染中同样被观察到^[11]。肝炎病毒侵入人体后会和其他病毒一样引起机体免疫应答，但应答的类型不同，就会导致不同的感染结局，即病毒被彻底清除，或者持续慢性感染，导致免疫应答类型不同的机制极其复杂，但已有研究显示，PD-1的表达会影响T淋巴细胞的反应性，从而影响急性乙型肝炎或丙肝肝炎病毒感染后的结局^[28-31]。

2.1 PD-1/PD-L与急性乙型肝炎 Zhang等^[30]对23名急性HBV感染患者外周血及肝内PD-1表达的研究中发现，PD-1在急性HBV感染的不同阶段表达不同。在感染早期HBV病毒特异性淋巴细胞表面上PD-1的表达是显著增加的，而病毒清除之后，PD-1的表达又出现减少。与其他类型的病毒特异性T淋巴细胞(巨细胞病毒特异性T淋巴细胞、流感病毒特异性T淋巴细胞)、CHB患者、急性肝衰竭患者及正常人体内T淋巴细胞上PD-1的表达对比后，发现在急性HBV感染早期，HBV特异性T淋巴细胞的应答是多样性的，且比其他病毒特异性T淋巴细胞、其他HBV感染阶段(CHB和急性肝功能衰竭)及正常健康人群表达更高水平的PD-1。且感染初HBV特异性T淋巴细胞上PD-1的表达和ALT水平之间有着显著的正相关性。虽然这个相关仅在感染最初出现，在接下来的阶段就会消失，但足以提示我们，

PD-1表达显著上调可能是肝脏炎症反应中的一个保护因素。在急性乙型肝炎感染的早期, HBV特异性CD8+ T淋巴细胞能直接杀伤受感染的肝细胞, 导致肝脏损害^[32,33], ALT水平会提高, ALT越高, 在很大程度上提示肝脏的损害越严重。该研究在急性乙型肝炎病毒感染后肝脏严重损伤阶段观察到明显上调的PD-1表达, 这可能是因为严重的肝脏炎症导致肝脏微环境因子诱导T淋巴细胞表达高水平的PD-1来直接诱导自身凋亡, 以减轻炎症反应。这一结果在对急性肝脏衰竭患者T淋巴细胞上PD-1表达的观察中也得到证实, Zhang等^[30]观察到, 急性肝衰的患者患病最初PD-1的表达水平是低下的, 且有比急性乙型肝炎患者有延迟的PD-1上调表达, 这提示缺乏PD-1的表达会导致严重的肝细胞衰竭。而随着急性乙型肝炎患者体内HBV病毒的清除, T淋巴细胞上PD-1的表达会减少。Boettler等^[29]在6例急性HBV病毒感染后自愈的患者中研究发现, HBV特异性CD8+ T淋巴细胞很少表达PD-1而高表达趋化因子受体7(CC chemokine receptor 7, CCR7), 并且表现为T淋巴细胞功能增强、血清氨基转移酶下降和病毒的清除。这些研究提示, PD-1在HBV感染中起着重要的作用并且可能和疾病的进程相关。

2.2 PD-1/PD-L与CHB

2.2.1 PD-1及其配体在HBV感染不同阶段的表达不同: 慢性HBV感染的一个特征就是对于受感染的肝脏细胞波动变化的免疫应答状态会导致肝脏炎症及持续的病毒感染。有研究显示, PD-1和其配体PD-L1形成通路可以影响CD4+ T淋巴细胞(Th)功能, 抑制Th1细胞增殖, 减少有利于免疫激活的IFN-γ、IL-2等Th1型细胞因子分泌, 使Th1/Th2平衡倾向Th2^[21,34,35], 病毒感染慢性化。此外, PD-1和其配体形成通路后可以向CD8+ T淋巴细胞传递负性刺激信号, 抑制病毒特异性T淋巴细胞增殖、活化及降低杀伤靶细胞的功能, 导致T淋巴细胞功能衰竭^[36,37], 甚至会诱导活化的T淋巴细胞凋亡^[30,38]。这些可能是PD-1及其配体形成的通路导致HBV感染慢性化的机制。但是, PD-1/PD-L1通路在CHB自然病程的不同阶段对T淋巴细胞应答起到的作用是不同的。Liang等^[39]对64名CHB不同自然阶段的患者体内T淋巴细胞上PD-1表达的研究中发现, 在CHB的免疫耐受阶段和静止期病毒携带阶段, PD-1表达上调是没有统计学意义的, 免疫清除阶段PD-1的表达比正常对照组及另外两个阶段的患者有

显著的升高, 而到静止阶段后, PD-1的表达可以从高恢复至正常。Peng等^[40]通过检测HBV特异性T淋巴细胞上PD-1的表达水平, 探究HBV感染不同阶段的患者PD-1/PD-L1通路在T淋巴细胞应答过程中的作用, 以急性乙型肝炎恢复期的患者作为对照, 结果发现活动性的CHB患者总CD8+ T淋巴细胞上PD-1的表达显著上调, 尤其是在HBV特异性CD8+ T淋巴细胞上。而且CHB患者外周血单核细胞上表达PD-L1也有显著的上调。大多数研究都显示活动性的CHB患者体内T淋巴细胞上PD-1表达会显著上调^[24,41,42]。

2.2.2 PD-1在平衡机体清除HBV应答与免疫介导的肝脏损害中起到重要作用: 大量研究表明, HBV的持续感染与T淋巴细胞表面表达上调的PD-1有关。Kassel等^[24]对74例肝脏活组织标本(其中CHB 11例, 慢性丙型肝炎17例, 自身免疫性肝炎14例, 非酒精性脂肪性肝病13例, 和正常肝组织19例)上表达的PD-1及其配体进行研究。结果发现, 因HBV和HCV感染导致的慢性肝炎患者肝内T淋巴细胞表面表达的PD-1要显著高于正常肝组织T淋巴细胞表面表达的PD-1。他们应用肝炎活动指数(histology activity index, HAI)方法来衡量肝脏损害, 与整个肝脏中(包括肝门静脉周围和小叶区)PD-1, MHC class I, B7-H1和B7-DC表达的频率/强度作比较。淋巴细胞的频率和HAI是确定的分别可以用来衡量肝脏炎症和肝脏损害的指标。而ALT是缺乏敏感性和特异性的评价肝损害的标志。结果发现HAI分数与PD-1、B7-H1和B7-DC的表达有显著正相关性。研究还发现与B7-H1及B7-DC相关的另一个B7家族的分子B7-H3, 却没有显示出与HAI有相关性, 这提示我们, PD-1、B7-H1和B7-DC与HAI的相关性是特异的, 而不是B7家族所有成员都与之相关。也就是说肝脏损害与PD-1、B7-H1和B7-DC表达之间存在密切相关性。慢性肝炎的患者肝脏内PD-1及其配体的表达都是上调的。但是在Kassel等^[24]的研究中未发现ALT与PD-1及其配体之间存在相关性。Xie等^[41]研究了32例CHB患者肝脏活组织细胞上PD-1和PD-L1的表达, 并与4名正常健康志愿者肝脏活组织细胞上PD-1和PD-L1的表达对比, 结果发现CHB患者PD-1/PD-L1表达的上调与肝脏炎症和ALT的水平呈显著相关。肝脏炎症越重, ALT水平越高, PD-1/PD-L1的表达越多, 这也支持PD-1表达显著上调是机体在肝脏炎症反应加重时的一个自我保护因素。而PD-1/PD-L通路表达上调过程的

■ 相关报道

Ye等在研究中发现PD-1/PD-L通路形成后会抑制病毒特异性T淋巴细胞增殖、活化及降低杀伤靶细胞的能力, 导致T淋巴细胞功能衰竭, 最终HBV感染慢性化。

■创新盘点

本文就PD-1/PD-L通路在HBV感染不同阶段T淋巴细胞上表达特点,对机体免疫状态的影响及阻断PD-1/PD-L通路有利于机体免疫功能恢复等热点问题进行综述。

机制可能与炎症反应过程中产生的大量炎性细胞因子可以诱发PD-L1和PD-L2有关^[23-25]。所以,在急性肝衰竭或慢性重型肝炎基础上急性肝衰的情况下,上调PD-1及其配体的表达,可能成为一个有效的治疗肝脏衰竭的手段。此外,Xie等^[41]还发现在CHB活跃期,肝脏内抗原存在的细胞(包括Kupffer细胞和肝窦内皮细胞)上PD-L1适量而不是过度的表达,还有在非活跃期低水平的PD-L1表达可能与HBV被抑制有关。他们的数据提示慢性HBV感染中,PD-1和PD-L1在肝内的相互作用可能在平衡机体对HBV免疫应答与免疫介导的肝脏损害中起到重要作用。

2.2.3 抗病毒治疗可以影响T淋巴细胞上PD-1的表达: Evans等^[42]纵向研究18例应用抗病毒药物(替比夫定和拉米夫定)治疗的e抗原阳性的CHB患者治疗过程中病毒载量水平、HBeAg血清转换与PD-1水平及T淋巴细胞反应性之间的关系,结果发现,PD-1的表达与病毒载量的水平有紧密的联系。抗病毒治疗中,PD-1在总的CD8+ T淋巴细胞、HBV特异性CD8+ T淋巴细胞上的表达都有显著减少,PD-1的mRNA也有一致的减少,且与病毒载量减少之间呈显著的相关性。而这种PD-1表达的减少又与分泌IFN-γ的T淋巴细胞增加以及分泌IL-10的T淋巴细胞减少有关。抗病毒治疗后T淋巴细胞的活性、分泌Th1型细胞因子的能力及杀伤靶细胞的能力都已有所恢复。研究还发现血清e抗原减少与减少的PD-1有关,这个结论不依赖于血清病毒载量的多少。因此我们可知在CHB病毒感染中,病毒量及e抗原定量都促进PD-1的表达,并导致T淋巴细胞功能减退。抗病毒治疗或抑制病毒的复制,会减少PD-1的表达。

2.2.4 阻断PD-1及其配体形成的通路有利于机体清除HBV: 从PD-1/PD-L通路可以衰减T淋巴细胞免疫功能,导致免疫耐受这一点出发,研究PD-1/PD-L通路在HBV感染中的作用可能为CHB抗病毒治疗提供一条新的途径。已经有研究在HBV转基因小鼠模型中观察到阻断PD-1及其配体的通路可以恢复HBV特异性淋巴细胞功能^[26,32,43]。在对CHB患者的体外研究中也发现应用抗PD-L1抗体阻断PD-1/PD-L1通路后可以恢复功能衰竭的T淋巴细胞的增殖及活化,并提高外周血HBV特异性T淋巴细胞分泌IFN-γ和IL-2等有利于免疫清除的细胞因子的能力,从而有利于HBV的清除^[11,20,30,40,44]。Fisicaro等^[44]对活动的CHB患者外周和肝内HBV特异性T淋巴细胞

上表达的PD-1研究中还发现,阻断PD-1/PD-L1通路不仅能恢复外周血CD8+ T淋巴细胞的功能,还能恢复肝内CD8+ T淋巴细胞的功能。他们发现肝内HBV特异性CD8+ T淋巴细胞要比外周表达更高水平的PD-1。阻断PD-1/PD-L1通路后肝内CD8+ T淋巴细胞增殖及分泌IFN-γ和IL-2的能力恢复方面还要强于外周T淋巴细胞。但是有学者发现在CHB免疫耐受期及非活动病毒携带阶段,阻断PD-1/PD-L1通路对T淋巴细胞的应答是没有影响的,而在慢性HBV感染的免疫清除期阻断PD-1/PD-L1通路能显著恢复T淋巴细胞应答^[39]。

3 sPD-1

PD-1还存在另一种形式-sPD-1,他具有表达在细胞表面的PD-1的IgV样结构的胞外区,这个胞外区具有可溶性,由编码PD-1基因中的PD-1 Δex3 编码^[6]。有研究显示,sPD-1有阻断PD-1/PD-L通路的作用。He等^[45]在小鼠肝癌模型中发现应用sPD-1可以阻断PD-1/PD-L1(B7-H1)通路来改善肿瘤逃逸的情况。Wu等^[46]在对再生障碍性贫血患者T淋巴细胞异常活化的研究中发现,sPD-1能起到类似自身免疫抗体的作用来阻断T淋巴细胞上膜性PD-1的功能,导致T淋巴细胞异常增殖、活化。Xu等^[47]发现利用原核细胞转录合成的sPD-1具有很强的和PD-L1结合的能力,与PD-1竞争配体,可以恢复T淋巴细胞的杀伤、分泌功能。但是,目前sPD-1在HBV感染中的生物学作用尚不明了。不过根据sPD-1可以阻断PD-1/PD-L通路这一生物学特点,他可能成为具有治疗CHB潜力的新的免疫干预手段。

4 结论

随着对PD-1研究的深入,他在CHB发生机制、HBV感染预后方面的研究逐渐成为焦点。PD-1及其配体可以形成抑制性通路,向活化的T淋巴细胞传递负向刺激信号,从而抑制T淋巴细胞活化,导致T淋巴细胞功能衰竭。在临床病例研究中可以看到,T淋巴细胞膜表面PD-1的表达在HBV感染的不同阶段是不同的。PD-1的表达水平与肝脏炎症程度有关,当免疫介导的肝脏损害反应严重时,PD-1表达会上调,抑制T淋巴细胞功能,调节体内Th1/Th2平衡向Th2漂移,对防止过度的免疫反应造成肝功能衰竭有一定作用。而与此同时也导致了T淋巴细胞功能的衰竭,不利于机体清除病毒,与HBV持续感染有关。所以

T淋巴细胞膜上PD-1的表达水平对HBV感染是一把双刃剑, 从这个特点出发, 深入研究PD-1在HBV感染中表达规律可能为急性肝功能衰竭及慢性乙型病毒型肝炎的治疗提供新的手段。而对于没有进展为急性肝功能衰竭的活动性肝炎患者, PD-1水平随着炎症程度的加重而上升, PD-1表达的水平可以估计肝脏炎症的进展情况。目前研究已经发现应用抗PD-L抗体及sPD-1可以阻断PD-1/PD-L通路, 恢复已衰竭的T淋巴细胞的功能, 增加IFN- γ 和IL-2等Th1型细胞因子分泌, 减少IL-10等Th2型细胞因子分泌, 可能成为新的治疗CHB的免疫干预手段。尽管如此, 我们也应认识到存在的潜在风险, 如过度抑制PD-1及其配体通路会导致自身免疫性疾病出现^[4]。有选择性把病毒特异性T淋巴细胞上表达的PD-1作为目标, 是取得危险和利益在合理比例的必要条件。

5 参考文献

- 1 Liang X, Bi S, Yang W, Wang L, Cui G, Cui F, Zhang Y, Liu J, Gong X, Chen Y, Wang F, Zheng H, Wang F, Guo J, Jia Z, Ma J, Wang H, Luo H, Li L, Jin S, Hadler SC, Wang Y. Epidemiological serosurvey of hepatitis B in China--declining HBV prevalence due to hepatitis B vaccination. *Vaccine* 2009; 27: 6550-6557
- 2 Lu FM, Zhuang H. Management of hepatitis B in China. *Chin Med J (Engl)* 2009; 122: 3-4
- 3 Lai CL, Ratziu V, Yuen MF, Poynard T. Viral hepatitis B. *Lancet* 2003; 362: 2089-2094
- 4 Martinic MM, von Herrath MG. Novel strategies to eliminate persistent viral infections. *Trends Immunol* 2008; 29: 116-124
- 5 Ishida Y, Agata Y, Shibahara K, Honjo T. Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death. *EMBO J* 1992; 11: 3887-3895
- 6 Riley JL. PD-1 signaling in primary T cells. *Immunol Rev* 2009; 229: 114-125
- 7 Bennett F, Luxenberg D, Ling V, Wang IM, Marquette K, Lowe D, Khan N, Veldman G, Jacobs KA, Valge-Archer VE, Collins M, Carreno BM. Program death-1 engagement upon TCR activation has distinct effects on costimulation and cytokine-driven proliferation: attenuation of ICOS, IL-4, and IL-21, but not CD28, IL-7, and IL-15 responses. *J Immunol* 2003; 170: 711-718
- 8 Brown JA, Dorfman DM, Ma FR, Sullivan EL, Munoz O, Wood CR, Greenfield EA, Freeman GJ. Blockade of programmed death-1 ligands on dendritic cells enhances T cell activation and cytokine production. *J Immunol* 2003; 170: 1257-1266
- 9 Okazaki T, Honjo T. The PD-1-PD-L pathway in immunological tolerance. *Trends Immunol* 2006; 27: 195-201
- 10 Wherry EJ, Ha SJ, Kaech SM, Haining WN, Sarkar S, Kalia V, Subramaniam S, Blattman JN, Barber DL, Ahmed R. Molecular signature of CD8+ T cell exhaustion during chronic viral infection. *Immunity* 2007; 27: 670-684
- 11 Boni C, Fisicaro P, Valdatta C, Amadei B, Di Vincenzo P, Giuberti T, Laccabue D, Zerbini A, Cavalli A, Missale G, Bertoletti A, Ferrari C. Characterization of hepatitis B virus (HBV)-specific T-cell dysfunction in chronic HBV infection. *J Virol* 2007; 81: 4215-4225
- 12 Nielsen C, Ohm-Laursen L, Barington T, Husby S, Lillevang ST. Alternative splice variants of the human PD-1 gene. *Cell Immunol* 2005; 235: 109-116
- 13 Barber DL, Wherry EJ, Masopust D, Zhu B, Allison JP, Sharpe AH, Freeman GJ, Ahmed R. Restoring function in exhausted CD8 T cells during chronic viral infection. *Nature* 2006; 439: 682-687
- 14 Mühlbauer M, Fleck M, Schütz C, Weiss T, Froh M, Blank C, Schölmerich J, Hellerbrand C. PD-L1 is induced in hepatocytes by viral infection and by interferon-alpha and -gamma and mediates T cell apoptosis. *J Hepatol* 2006; 45: 520-528
- 15 Mühlbauer M, Ringel S, Hartmann A, Lallinger G, Weiss TS, Gäbele E, Wünsch PH, Schölmerich J, Hellerbrand C. Lack of association between the functional CX3CR1 polymorphism V249I and hepatocellular carcinoma. *Oncol Rep* 2005; 13: 957-963
- 16 Oikawa T, Takahashi H, Ishikawa T, Hokari A, Otsuki N, Azuma M, Zeniya M, Tajiri H. Intrahepatic expression of the co-stimulatory molecules programmed death-1, and its ligands in autoimmune liver disease. *Pathol Int* 2007; 57: 485-492
- 17 Gehring AJ, Sun D, Kennedy PT, Nolte-t Hoen E, Lim SG, Wasser S, Selden C, Maini MK, Davis DM, Nassal M, Bertoletti A. The level of viral antigen presented by hepatocytes influences CD8 T-cell function. *J Virol* 2007; 81: 2940-2949
- 18 Mataki N, Kikuchi K, Kawai T, Higashiyama M, Okada Y, Kurihara C, Hokari R, Kawaguchi A, Nagao S, Kondo T, Itoh K, Miyakawa H, Miura S. Expression of PD-1, PD-L1, and PD-L2 in the liver in autoimmune liver diseases. *Am J Gastroenterol* 2007; 102: 302-312
- 19 Yu MC, Chen CH, Liang X, Wang L, Gandhi CR, Fung JJ, Lu L, Qian S. Inhibition of T-cell responses by hepatic stellate cells via B7-H1-mediated T-cell apoptosis in mice. *Hepatology* 2004; 40: 1312-1321
- 20 Younghak P, Kozono Y, Kozono H, Iwai H, Otsuki N, Jin H, Omura K, Yagita H, Pardoll DM, Chen L, Azuma M. Differential binding properties of B7-H1 and B7-DC to programmed death-1. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 307: 672-677
- 21 Loke P, Allison JP. PD-L1 and PD-L2 are differentially regulated by Th1 and Th2 cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100: 5336-5341
- 22 Sharpe AH, Freeman GJ. The B7-CD28 superfamily. *Nat Rev Immunol* 2002; 2: 116-126
- 23 Wang S, Chen L. Co-signaling molecules of the B7-CD28 family in positive and negative regulation of T lymphocyte responses. *Microbes Infect* 2004; 6: 759-766
- 24 Kassel R, Cruise MW, Iezzoni JC, Taylor NA, Pruett TL, Hahn YS. Chronically inflamed livers up-regulate expression of inhibitory B7 family members. *Hepatology* 2009; 50: 1625-1637
- 25 Nakazawa A, Dotan I, Brimnes J, Allez M, Shao L, Tushima F, Azuma M, Mayer L. The expression and function of costimulatory molecules B7H and B7-H1 on colonic epithelial cells. *Gastroenterology* 2004; 126: 1347-1357
- 26 Maier H, Isogawa M, Freeman GJ, Chisari FV. PD-1:

■应用要点

本文通过探究PD-1/PD-L通路在HBV感染不同阶段T淋巴细胞上表达、变化特点, 为慢性乙型肝炎发病机制, HBV感染预后及治疗的研究提供新的方向。

■同行评价

本文科学性、创新性较好，为慢性乙型肝炎的治疗提供新的途径，对HBV的临床治疗具有较重要的参考意义。

- PD-L1 interactions contribute to the functional suppression of virus-specific CD8+ T lymphocytes in the liver. *J Immunol* 2007; 178: 2714-2720
- 27 Brooks DG, Ha SJ, Elsaesser H, Sharpe AH, Freeman GJ, Oldstone MB. IL-10 and PD-L1 operate through distinct pathways to suppress T-cell activity during persistent viral infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 105: 20428-20433
- 28 Urbani S, Amadei B, Tola D, Massari M, Schivazappa S, Missale G, Ferrari C. PD-1 expression in acute hepatitis C virus (HCV) infection is associated with HCV-specific CD8 exhaustion. *J Virol* 2006; 80: 11398-11403
- 29 Boettler T, Panther E, Bengsch B, Nazarova N, Spangenberg HC, Blum HE, Thimme R. Expression of the interleukin-7 receptor alpha chain (CD127) on virus-specific CD8+ T cells identifies functionally and phenotypically defined memory T cells during acute resolving hepatitis B virus infection. *J Virol* 2006; 80: 3532-3540
- 30 Zhang Z, Zhang JY, Wherry EJ, Jin B, Xu B, Zou ZS, Zhang SY, Li BS, Wang HF, Wu H, Lau GK, Fu YX, Wang FS. Dynamic programmed death 1 expression by virus-specific CD8 T cells correlates with the outcome of acute hepatitis B. *Gastroenterology* 2008; 134: 1938-1949, 1949.e1-e3
- 31 Gu LL, Xu B, Zhang JY, Zhang Z, Wang FS. [Dynamic expression of PD-1 in HBV-specific cytotoxic T lymphocytes correlates with memory T-cell development in acute hepatitis B patients]. *Zhonghua Ganzangbing Zazhi* 2008; 16: 649-653
- 32 Isogawa M, Furuchi Y, Chisari FV. Oscillating CD8(+) T cell effector functions after antigen recognition in the liver. *Immunity* 2005; 23: 53-63
- 33 Bertozetti A, Maini M, Williams R. Role of hepatitis B virus specific cytotoxic T cells in liver damage and viral control. *Antiviral Res* 2003; 60: 61-66
- 34 Jeong HY, Lee YJ, Seo SK, Lee SW, Park SJ, Lee JN, Sohn HS, Yao S, Chen L, Choi I. Blocking of monocyte-associated B7-H1 (CD274) enhances HCV-specific T cell immunity in chronic hepatitis C infection. *J Leukoc Biol* 2008; 83: 755-764
- 35 Wong M, La Cava A, Singh RP, Hahn BH. Blockade of programmed death-1 in young (New Zealand black x New Zealand white)F1 mice promotes the activity of suppressive CD8+ T cells that protect from lupus-like disease. *J Immunol* 2010; 185: 6563-6571
- 36 Ye P, Weng ZH, Zhang SL, Zhang JA, Zhao L, Dong JH, Jie SH, Pang R, Wei RH. Programmed death-1 expression is associated with the disease status in hepatitis B virus infection. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 4551-4557
- 37 Zhang Z, Jin B, Zhang JY, Xu B, Wang H, Shi M, Wherry EJ, Lau GK, Wang FS. Dynamic decrease in PD-1 expression correlates with HBV-specific memory CD8 T-cell development in acute self-limited hepatitis B patients. *J Hepatol* 2009; 50: 1163-1173
- 38 Xu B, Zhang Z, Shi Y, Chen XY, Wang FS. [PD-1 up-regulation influenced apoptosis of HBV-specific CD8 T cells in patients with acute resolved hepatitis B]. *Zhonghua Yixue Zazhi* 2009; 89: 1158-1161
- 39 Liang XS, Zhou Y, Li CZ, Wan MB. Natural course of chronic hepatitis B is characterized by changing patterns of programmed death type-1 of CD8-positive T cells. *World J Gastroenterol* 2010; 16: 618-624
- 40 Peng G, Li S, Wu W, Tan X, Chen Y, Chen Z. PD-1 upregulation is associated with HBV-specific T cell dysfunction in chronic hepatitis B patients. *Mol Immunol* 2008; 45: 963-970
- 41 Xie Z, Chen Y, Zhao S, Yang Z, Yao X, Guo S, Yang C, Fei L, Zeng X, Ni B, Wu Y. Intrahepatic PD-1/PD-L1 up-regulation closely correlates with inflammation and virus replication in patients with chronic HBV infection. *Immunol Invest* 2009; 38: 624-638
- 42 Evans A, Riva A, Cooksley H, Phillips S, Puranik S, Nathwani A, Brett S, Chokshi S, Naoumov NV. Programmed death 1 expression during antiviral treatment of chronic hepatitis B: Impact of hepatitis B e-antigen seroconversion. *Hepatology* 2008; 48: 759-769
- 43 Weng ZH, Ye P, Zhang SL. [Enhancement of anti-viral immunity in HBV mouse model by blocking PD-1/PD-L1 signaling pathway]. *Zhonghua Ganzangbing Zazhi* 2010; 18: 263-266
- 44 Fisicaro P, Valdatta C, Massari M, Loggi E, Biasini E, Sacchelli L, Cavallo MC, Silini EM, Andreone P, Missale G, Ferrari C. Antiviral intrahepatic T-cell responses can be restored by blocking programmed death-1 pathway in chronic hepatitis B. *Gastroenterology* 2010; 138: 682-693, 693.e1-e4
- 45 He L, Zhang G, He Y, Zhu H, Zhang H, Feng Z. Blockade of B7-H1 with sPD-1 improves immunity against murine hepatocarcinoma. *Anticancer Res* 2005; 25: 3309-3313
- 46 Wu H, Miao M, Zhang G, Hu Y, Ming Z, Zhang X. Soluble PD-1 is associated with aberrant regulation of T cells activation in aplastic anemia. *Immunol Invest* 2009; 38: 408-421
- 47 Xu L, Liu Y, He X. Expression and purification of soluble human programmed death-1 in Escherichia coli. *Cell Mol Immunol* 2006; 3: 139-143

编辑 李薇 电编 何基才

EGFR靶向药物在结直肠癌中的研究进展

王丽, 余英豪

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

王丽, 福建省人民医院病理科 福建省福州市 350004

中国人民解放军南京军区科研基金资助项目, No. 10MA107
作者贡献分布: 本文综述由王丽完成; 余英豪审校。

通讯作者: 余英豪, 教授, 主任医师, 350025, 福建省福州市, 中
国人民解放军南京军区福州总医院病理科。

yuyinghao0808@126.com

电话: 0591-83717703

收稿日期: 2010-12-27 修回日期: 2011-03-09

接受日期: 2011-03-16 在线出版日期: 2011-04-08

EGFR-targeted drugs for colorectal cancer: current status and future challenges

Li Wang, Ying-Hao Yu

Li Wang, Ying-Hao Yu, Department of Pathology, Fuzhou General Hospital of Nanjing Military Command of Chinese PLA, Fuzhou 350025, Fujian Province, China

Li Wang, Department of Pathology, the People's Hospital of Fujian Province, Fuzhou 350004, Fujian Province, China

Supported by: the Science Foundation of Nanjing Military Command of Chinese PLA, No. 10MA107

Correspondence to: Professor Ying-Hao Yu, Department of Pathology, Fuzhou General Hospital of Nanjing Military Command of Chinese PLA, Fuzhou 350025, Fujian Province, China. yuyinghao0808@126.com

Received: 2010-12-27 Revised: 2011-03-09

Accepted: 2011-03-16 Published online: 2011-04-08

Abstract

Colorectal cancer is a common gastrointestinal malignancy. The effects of traditional chemotherapy and radiation therapy against colorectal cancer are not satisfactory. The epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling pathway plays an important role in tumor proliferation, angiogenesis, invasion, and metastasis in colorectal cancer. EGFR-targeted drugs have been developed and applied to the treatment of colorectal cancer. This paper provides a literature review on the current status and future challenges of EGFR-targeted therapy of colorectal cancer.

Key Words: Colorectal cancer; Epidermal growth factor receptor; Targeted therapy; Epidermal growth factor receptor-targeted drugs

Wang L, Yu YH. EGFR-targeted drugs for colorectal can-

cer: current status and future challenges. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2011; 19(10): 1057-1062

摘要

结直肠癌是常见的消化系恶性肿瘤, 传统的化疗和放疗效果均不甚理想。表皮生长因子受体(EGFR)信号转导通路在结直肠癌细胞的增殖、血管生成、侵袭、转移等方面有重要作用。因此, 针对EGFR的靶向药物已陆续开发, 并应用于结直肠癌治疗的临床实践。本文就EGFR靶向药物在结直肠癌中的研究现状及其相关问题进行综述。

关键词: 结直肠癌; 表皮生长因子受体; 靶向治疗; 表皮生长因子受体靶向药物

王丽, 余英豪. EGFR靶向药物在结直肠癌中的研究进展. 世界华人消化杂志 2011; 19(10): 1057-1062

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/1057.asp>

0 引言

结直肠癌是全球范围内第3位常见的恶性肿瘤, 其相关死亡占第4位^[1]。近年来, 在世界范围内发病率及死亡率呈明显上升趋势, 我国结直肠癌的发病率亦呈逐年上升趋势, 尤其在大中城市, 每年以4%的增长速度上升^[2]。手术仍是治疗结直肠癌的主要手段^[3], 但效果并不理想, 近40年来手术患者5年生存率为50%-60%^[4], 治疗失败的主要原因是肿瘤复发和转移。辅助放化疗只能延长部分晚期患者的生存期^[5]。近年来, 靶向药物治疗结直肠癌取得了重要进展, 在目前抗肿瘤分子靶向治疗中, 表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)是最受关注的治疗靶点之一^[6]。针对EGFR的靶向药物已陆续开发, 并应用于结直肠癌治疗的临床实践, 本文就EGFR靶向药物在结直肠癌中的研究现状及其相关问题进行综述。

1 EGFR的结构和功能

人EGFR基因定位于7p13-q22区, 全长200 bp, 由28个外显子组成, 编码的蛋白质相对分子质量

■背景资料

结直肠癌是全球范围内第3位常见的恶性肿瘤, 其相关死亡占第4位; 手术仍是治疗结直肠癌的主要手段, 但效果并不理想; 近年来, 靶向药物治疗结直肠癌取得了重要进展, 而EGFR是最受关注的治疗靶点之一。

■同行评议者
田晓峰, 教授, 大连医科大学附属第二医院普通外科

■研发前沿

目前临幊上常見的EGFR TK抑制剂有吉非替尼(gefitinib, ZD1839)、埃罗替尼(erlotinib, OSI-774)、EKB-569。此类药物也是目前靶向治疗研究的热点,但多用于胰腺癌、肺癌、胃癌等。

为170 000 Da,具有酪氨酸激酶(tyrosine kinase, TK)活性,是一种细胞膜表面的糖蛋白受体,是传递细胞外信号到细胞核内的重要途径蛋白。

迄今发现,EGFR共有6种配体,表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)、转化生长因子- α (transforming growth factor α , TGF- α)、双调蛋白(amphiregulin, AR)、 β -细胞素(beta-cellulin, BTC)、肝素结合的EGF/heparinbinding EGF, HBEGF)及表皮素(epiregulin, EPR),其中最重要的是EGF和TGF- α ^[7]。EGFR与其配体的结合具有高亲和性、可饱和性和特异性的特性。

EGFR与其配体结合后形成同源二聚体,也可与其他TK受体形成异源二聚体,导致胞内TK区的激活,启动一系列级联反应,将信号传到细胞核内,最终引起一系列相关基因活化,导致肿瘤细胞增殖、凋亡抑制,促使肿瘤细胞转移并导致放、化疗耐受,在肿瘤发生发展过程中扮演着重要角色^[8]。多个文献报道显示,EGFR在胃癌、胰腺癌、卵巢癌、结直肠癌、非小细胞肺癌、头颈部鳞癌以及胶质瘤等恶性肿瘤中存在过表达,并在其发生、发展中起重要作用^[9-13]。

2 结直肠癌EGFR蛋白过表达与EGFR基因突变

2.1 EGFR蛋白过表达 免疫组织化学法常用于检测结直肠癌中EGFR蛋白表达,阳性定位于细胞膜。在许多关于结直肠癌EGFR蛋白表达的报道中,阳性表达率为8%-83%,存在较大的差异^[14,15],其表达意义也一直有争议。阳性表达率差异较大的原因可能由于阳性判定标准不同引起,此外采用不同的抗体、不同的检测方法学以及标本储存时间(影响染色强度)等,也可能是造成研究结果迥异的原因。Sawhney等^[16]认为EGFR过表达与肿瘤侵袭行为和预后不佳有关。相反,Doger等^[17]认为EGFR过表达与预后无关,且表达与原发肿瘤及淋巴结转移之间亦无相关性。尽管Cunningham等^[15]的数据显示了与其他研究不同的EGFR高表达率(83%),但却也未发现其表达与临床病理参数和生存期之间有任何关联。国内的多项研究表明^[18-21],EGFR表达水平与患者年龄、性别、肿瘤生长部位、浸润深度、大体形态、组织学类型、分化程度无明显相关性,而与结直肠癌TNM分期和淋巴结转移相关,其高表达与肿瘤的高侵袭转移性有关,可作为判断结直肠癌进展和预后的指标。

2.2 EGFR基因突变 EGFR基因检测多采用荧光定量PCR或荧光原位杂交的方法。目前发现肿

瘤细胞EGFR基因的突变形式主要包括^[22]: (1)点突变:主要集中在EGFR-TK区,导致翻译后的氨基酸变异或翻译提前终止; (2)基因扩增:指基因整体拷贝数量的增加; (3)基因片段插入或缺失,主要见于3种情况,一是20外显子的小片段插入;二是19外显子内部出现短序列的缺失-框内缺失;三是EGFR突变变异体III的出现,这是由于基因重排或选择性mRNA剪切导致细胞膜外配体结合区2-7外显子缺失。基于上述突变形式产生变异的不完整蛋白可以自身激活TK,并引发下游信号通路的激活。

Nagahara等^[23]采用荧光定量PCR检测了33例结肠癌患者EGFR突变情况,发现4例(12%)存在3个位点突变:2例19外显子E749K;1例20外显子E762G;1例20外显子A767T。Ooi等^[14]用荧光原位杂交方法检测244例结直肠癌标本,发现11例(4.5%)存在基因扩增。Shia等^[24]用显色原位杂交技术检测147例结直肠腺癌标本,发现17例(11.6%)有基因扩增。Cappuzzo等^[25]报道,根据结直肠肿瘤EGFR扩增检测结果,有EGFR扩增患者较无基因扩增的患者抗EGFR单抗治疗反应率提高,至疾病进展时间(time to progression, TTP)延长(6.6 mo vs 3.7 mo)。Moroni等^[26]分析了9例转移性结直肠癌化疗失败后采用抗EGFR单抗治疗有效的患者,发现其中8例有EGFR基因拷贝数增加,认为EGFR基因拷贝数可作为选择该类生物靶向药物敏感人群的遗传学标记。

3 EGFR靶向药物与结直肠癌治疗

以5-FU为主的化疗一直是晚期结直肠癌的主要治疗手段,过去十多年间,一些新型化疗药物如伊立替康、奥沙利铂、卡培他滨等相继引入结直肠癌治疗,尽管在一定程度上提高了疗效,但其中位生存期仍不超过2年^[27]。近年来,随着对肿瘤生长的分子生物学机制研究的不断深入,肿瘤治疗进入了分子靶向治疗的时代,一些新型分子靶向药物用于结直肠癌治疗取得令人鼓舞的疗效,并成为结直肠癌的标准内科治疗。

EGFR是结直肠癌靶向治疗的主要靶点之一。目前针对EGFR的靶向治疗策略主要有两大类:一类是针对EGFR受体胞外区的单克隆抗体;另一类是抑制EGFR胞内区TK的小分子化合物。虽然两类药物的作用部位不同,但通过竞争性阻滞配体与EGFR的结合及阻断下游信号通路转导,最终产生相似的效果,即阻滞肿瘤细胞在G₁期、促进凋亡、抑制新生血管形成、抑制侵

袭和转移, 从而起到治疗肿瘤的作用^[28].

3.1 EGFR单抗 目前, 有两种EGFR单抗被批准用于结直肠癌的临床治疗^[29].

3.1.1 西妥昔单抗: 2004-02-12, 美国FDA批准西妥昔单抗(cetuximab, C225, Erbitux)用于经盐酸伊立替康(irinotecan hydrochloride, CPT-11)为基础化疗仍无法控制病情的转移性结直肠癌患者, 或者单一用药治疗对CPT-11为基础化疗耐受的转移性结直肠癌患者. 这是第一个在美国正式批准用于结直肠癌的分子靶向药物. C225是一种人鼠嵌合性IgG1型抗EGFR单抗, 较天然配体亲和力高100倍以上^[30], 通过与受体胞外区结合, 导致受体内化、降解、抑制EGFR信号转导, 并通过抗体依赖的细胞毒(antibody dependent cytotoxicity, ADCC)效应杀伤肿瘤细胞^[31]. Saltz等^[32]报道采用C225单药治疗57例EGFR过表达的难治性结直肠癌患者, 结果5例(9%)达部分缓解(partial response, PR), 轻微缓解(mild remission, MR)及稳定(stable disease, SD)达21例(35%), 中位存活期(median overall survival, MOS)6.4 mo, 表明单药治疗有一定的疗效. 对于化疗失败患者, Folprecht等^[33]对一组CPT-11/5-FU治疗失败的121例晚期结直肠癌患者, 加用C225后, 仍有27例取得PR, 有效率高达22%, 中位缓解时间为183 d, 为结直肠癌的药物治疗提供了一个新思路. Cunningham等^[34]报道对329例EGFR表达阳性, CPT-11为基础方案化疗失败的转移性结直肠癌患者单用C225或与CPT-11联用, 结果两组的PR分别为10.8%和22.9%, SD分别为21.6%和32.6%, TTP分别为1.5 mo和4.1 mo($P<0.01$), MOS分别为6.8 mo和8.6 mo($P=0.48$). 提示对于CPT-11失败的病例, C225+CPT-11联合方案可以作为优先选择.

3.1.2 帕尼单抗: 2006-09美国FDA批准帕尼单抗(panitumumab, ABX-EGF)用于标准化疗方案治疗失败的晚期结直肠癌患者, 作为单药三线治疗^[35]. 帕尼单抗是一种完全人源化单抗, 对EGFR有着很高的亲和力和特异性, 且较西妥昔单抗免疫原性低, 治疗前不需要预处理. Hecht等^[36]报道的一项单用帕尼单抗治疗148例EGFR阳性, 既往化疗失败的转移性结直肠癌患者的II期临床研究结果为PR 9%, SD 29%, 中位PFS 14 wk, 中位OS 9 mo. Van Cutsem等^[37]报道的一项463例结直肠癌患者的III期研究中, 分别给予帕尼单抗+支持治疗、单纯支持治疗, 结果显示帕尼单抗组PR率为8%, 单纯支持治疗组为

0%, 帕尼单抗组SD率为28%, 单纯支持治疗组为10%, 帕尼单抗组疾病进展率下降了46%, 中位PPS延长(13.8 mo vs 8.5 mo).

3.2 EGFR TK抑制剂 目前临幊上常见的EGFR TK抑制剂有吉非替尼(gefitinib, ZD1839)、埃罗替尼(erlotinib, OSI-774)、EKB-569. 此类药物也是目前靶向治疗研究的热点, 但多用于胰腺癌、肺癌、胃癌等. 用于结直肠癌的治疗也取得一定疗效, 但是临床意义似乎不大, 因此近年来此类药物应用于结肠直肠癌方面的研究基本停滞^[38].

3.3 不同机制或途径联合阻滞EGFR 为进一步观察阻滞EGFR对结直肠癌患者的疗效, 可将不同机制或途径的阻滞剂联合应用. Matar等^[39]联合C225和吉非替尼治疗9例结直肠癌患者, 5例(56%)获得了PR, 治疗前和治疗后14 d进行肿瘤组织及皮肤活检, 提示两药抑制EGFR磷酸化更明显, 减少了肿瘤的增殖, 促进凋亡.

4 EGFR靶向药物疗效预测

由于EGFR靶向药物费用昂贵, 很多患者没有机会获得这些最新的治疗, 另外, 即使有条件获得这种治疗, 多数患者也不一定能获得理想的疗效. 所以, 准确预测EGFR靶向治疗的意义非常重大. 但到目前为止仍未找到可靠的、能够准确预测疗效的分子或临床标记^[29]. 目前, 主要有以下方法用于EGFR抑制剂使用或疗效判断依据.

4.1 EGFR蛋白表达状态 EGFR单抗最初仅被用于EGFR表达阳性的患者, 但随后的研究表明, EGFR的表达与否或表达水平与肿瘤缓解率、中位无进展时间和总生存期无显著相关性^[40]. 并且有试验发现C225对EGFR表达阴性的患者亦有效. Chung等^[41]对16例伊立替康耐药并经免疫组织化学检测EGFR表达阴性的转移性结直肠癌患者给予C225联合伊立替康治疗, 4例缓解, 提示由免疫组织化学分析EGFR表达结果筛选适合C225治疗的患者有一定局限性. 目前, NCCN指南已明确否定将EGFR蛋白表达状态作为患者接受EGFR单抗治疗的依据.

4.2 k-ras基因状态 K-ras是EGFR信号转导通路中最重要的下游分子, 对肿瘤的发生、发展、增生、转移及血管形成发挥关键作用^[42]. 值得注意的是, 多个研究表明, K-ras突变与EGFR单抗的耐药有关. Lièvre等^[43]对30例接受含C225方案治疗的结直肠癌患者进行分析, 结果11例有效患者肿瘤组织标本均未检出K-ras突变, 而19例无效患

■相关报道

2008年ASCO会议推荐k-ras基因突变患者不适合接受西妥昔单抗治疗. 2008版NCCN指南亦推荐对复发或转移的患者, 肿瘤组织进行基因突变检测, 对于存在K-ras突变的患者, 不推荐使用西妥昔单抗进行治疗, 不论单用还是与化疗联合应用.

■应用要点

近年来, 国内外围绕EGFR单抗治疗结直肠癌进行了广泛深入的研究, 亦取得了重要进展, 相信随着研究的不断深入, EGFR靶向治疗应能在结直肠癌治疗中发挥更大的作用, 使更多患者受益。

者中13例存在K-ras突变。Khambata-Ford等^[44]对80例接受C225单药治疗的结直肠癌患者基因检测结果进行了分析, 结果显示K-ras突变组的疾病控制率为10%, 而无突变组疾病控制率为48%。Van Cutsem等^[37]将帕尼单抗单药与BSC治疗作对照, 结果发现在帕尼单抗治疗组中, *k-ras*基因突变患者无论是有效率还是PFS时间均明显逊于野生型患者。2008年ASCO会议^[45]推荐*k-ras*基因突变患者不适合接受西妥昔单抗治疗。2008版NCCN指南^[46]亦推荐对复发或转移患者肿瘤组织进行基因突变检测, 对于存在K-ras突变患者, 不推荐使用西妥昔单抗治疗, 不论单用还是与化疗药物联合应用。因此K-ras突变有可能成为筛选EGFR单抗耐药的一个重要标记。

4.3 EGFR配体 在早期的细胞研究中发现, EGFR配体如EGF、TGF- α 等的存在对于EGFR单抗的抗肿瘤作用有明显影响^[47]。Khambata-Ford等^[44]和Jacobs等^[48]对C225单药或联合伊立替康治疗的转移性结直肠癌患者分析发现, AREG和EREG高表达与临床获益密切相关。同样, C225联合化疗治疗晚期胃癌的结果亦表明血清EGF与TGF- α 高水平与临床获益相关^[49]。但目前有关配体水平与EGFR单抗临床疗效的研究还存在较大分歧, 需要进一步深入的研究^[50]。

4.4 基因遗传多态性 细胞研究表明, EGFR基因第1内含子CA重复数目与EGFR表达相关^[51], EGF A61G多态性对EGF表达也有明显影响^[52,53]。

4.5 “痤疮样”皮疹 皮疹被认为是预测EGFR单抗疗效的另一重要临床标记。BOND-1研究^[34]比较了含伊立替康方案一线化疗失败的转移性结直肠肿瘤患者, 二线使用伊立替康或伊立替康联合C225的疗效, 结果发现, 皮疹严重程度与临床疗效明显相关。多个应用C225或帕尼单抗治疗的研究也都发现了这一现象^[36,37,54,55]。为进一步验证皮疹程度与疗效的关系, 国外设计了EVEREST试验^[56], 该研究共入组166例伊立替康耐药患者, 应用标准剂量C225+伊立替康治疗3 wk, 对于皮疹发生较轻(0、1级)的89例患者, 再随机分为继续C225标准剂量治疗组和C225剂量爬坡组(增加C225剂量, 直至患者耐受良好且皮疹至2级, 最大剂量500 mg/m²), 结果显示, C225爬坡组3、4级皮肤毒性发生率明显升高, 同时有效率也明显提高(30% vs 13%), TTP及OS尚在随访观察中。据此认为特征性的“痤疮样”皮疹是一种较理想的临床疗效预测指标, 但因该预测只有在用药后才能显示, 所以与其说是疗效的预

测标志, 不如说是有效的临床征兆更为恰当^[29]。

5 结论

EGFR是一种在肿瘤细胞信号转导过程中扮演重要角色的蛋白质, 近年来, 国内外围绕EGFR单抗治疗结直肠癌进行了广泛深入的研究, 亦取得了重要进展, 但仍有许多问题尚待解决^[57]: 哪些患者适合EGFR靶向药物治疗; 治疗反应与受体表达之间存在何种关系; 靶向药物与化疗、放疗及其他分子靶向药物之间如何联用等等, 都需要进一步深入研究。相信随着研究的不断深入, EGFR靶向治疗应能在结直肠癌治疗中发挥更大的作用, 使更多患者受益。

6 参考文献

- 1 Weitz J, Koch M, Debus J, Höhler T, Galle PR, Büchler MW. Colorectal cancer. *Lancet* 2005; 365: 153-165
- 2 刘云鹏. 2008年转移性结直肠癌个体化治疗进展回顾. 中国癌症杂志 2009; 19: 406-408
- 3 Goodwin RA, Asmis TR. Overview of systemic therapy for colorectal cancer. *Clin Colon Rectal Surg* 2009; 22: 251-256
- 4 龚志军, 任镜清, 孔刚, 卿笃桔, 梁永全, 刘虹, 周伟. VEGF、EGFR、CD44V6、Cath-D及nm23-H1在结直肠癌组织中的表达及意义. 结直肠肛门外科 2008; 14: 17-20
- 5 Cohen SJ, Cohen RB, Meropol NJ. Targeting signal transduction pathways in colorectal cancer--more than skin deep. *J Clin Oncol* 2005; 23: 5374-5385
- 6 王玉, 方明治, 金黑鹰. 表皮生长因子受体靶向治疗结直肠癌的临床进展. 世界华人消化杂志 2010; 18: 1804-1809
- 7 Yarden Y. The EGFR family and its ligands in human cancer. signalling mechanisms and therapeutic opportunities. *Eur J Cancer* 2001; 37 Suppl 4: S3-S8
- 8 Ng M, Cunningham D. Cetuximab (Erbitux)--an emerging targeted therapy for epidermal growth factor receptor-expressing tumours. *Int J Clin Pract* 2004; 58: 970-976
- 9 Mimori K, Nagahara H, Sudo T, Ishii H, Yamashita K, Barnard GF, Mori M. The epidermal growth factor receptor gene sequence is highly conserved in primary gastric cancers. *J Surg Oncol* 2006; 93: 44-46
- 10 Chan JK, Pham H, You XJ, Cloven NG, Burger RA, Rose GS, Van Nostrand K, Korc M, Disaia PJ, Fan H. Suppression of ovarian cancer cell tumorigenicity and evasion of Cisplatin resistance using a truncated epidermal growth factor receptor in a rat model. *Cancer Res* 2005; 65: 3243-3248
- 11 Wu X, Deng Y, Wang G, Tao K. Combining siRNAs at two different sites in the EGFR to suppress its expression, induce apoptosis, and enhance 5-fluorouracil sensitivity of colon cancer cells. *J Surg Res* 2007; 138: 56-63
- 12 Thienelt CD, Bunn PA Jr, Hanna N, Rosenberg A, Needle MN, Long ME, Gustafson DL, Kelly K. Multicenter phase I/II study of cetuximab with paclitaxel and carboplatin in untreated patients with stage IV non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2005; 23: 8786-8793
- 13 Shepherd FA, Rodrigues Pereira J, Ciuleanu T,

- Tan EH, Hirsh V, Thongprasert S, Campos D, Maoleeekoonpiroj S, Smylie M, Martins R, van Kooten M, Dedi M, Findlay B, Tu D, Johnston D, Bezjak A, Clark G, Santabarbara P, Seymour L. Erlotinib in previously treated non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 2005; 353: 123-132
- Ooi A, Takehana T, Li X, Suzuki S, Kunitomo K, Iino H, Fujii H, Takeda Y, Dobashi Y. Protein over-expression and gene amplification of HER-2 and EGFR in colorectal cancers: an immunohistochemical and fluorescent *in situ* hybridization study. *Mod Pathol* 2004; 17: 895-904
- Cunningham MP, Essapen S, Thomas H, Green M, Lovell DP, Topham C, Marks C, Modjtahedi H. Co-expression of the IGF-IR, EGFR and HER-2 is common in colorectal cancer patients. *Int J Oncol* 2006; 28: 329-335
- Sawhney RS, Zhou GH, Humphrey LE, Ghosh P, Kreisberg JI, Brattain MG. Differences in sensitivity of biological functions mediated by epidermal growth factor receptor activation with respect to endogenous and exogenous ligands. *J Biol Chem* 2002; 277: 75-86
- Doger FK, Meteoglu I, Tuncyurek P, Okyay P, Cevikel H. Does the EGFR and VEGF expression predict the prognosis in colon cancer? *Eur Surg Res* 2006; 38: 540-544
- 杨树钢, 叶建新. DCR3和EGFR在结直肠癌中的表达及临床意义. *中国医药导报* 2009; 6: 30-32
- 梁君林, 万德森, 潘志忠, 周志伟. Dukes' A、B期结直肠癌c-erbB-2, EGFR和TGF- α 表达与复发转移的关系. *癌症* 2007; 26: 647-651
- 侍立志, 王兆春. EGF, EGFR和PCNA表达与大肠癌临床病理学特征及关系. *中国普通外科杂志* 2004; 13: 253-256
- 冯俊, 吴云飞, 徐惠绵. EGFR、VEGF表达与大肠癌淋巴结及肝转移的相关性. *现代肿瘤医学* 2008; 16: 388-390
- 武晓楠. 表皮生长因子受体基因在多种肿瘤中的突变情况及临床意义. *中国全科医学* 2008; 11: 1197-1201
- Nagahara H, Mimori K, Ohta M, Utsunomiya T, Inoue H, Barnard GF, Ohira M, Hirakawa K, Mori M. Somatic mutations of epidermal growth factor receptor in colorectal carcinoma. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 1368-1371
- Shia J, Klimstra DS, Li AR, Qin J, Saltz L, Teruya-Feldstein J, Akram M, Chung KY, Yao D, Paty PB, Gerald W, Chen B. Epidermal growth factor receptor expression and gene amplification in colorectal carcinoma: an immunohistochemical and chromogenic *in situ* hybridization study. *Mod Pathol* 2005; 18: 1350-1356
- Cappuzzo F, Finocchiaro G, Rossi E, Jänne PA, Carnaghi C, Calandri C, Bencardino K, Ligorio C, Ciardiello F, Pressiani T, Destro A, Roncalli M, Crino L, Franklin WA, Santoro A, Varella-Garcia M. EGFR FISH assay predicts for response to cetuximab in chemotherapy refractory colorectal cancer patients. *Ann Oncol* 2008; 19: 717-723
- Moroni M, Veronese S, Benvenuti S, Marrapese G, Sartore-Bianchi A, Di Nicolantonio F, Gambacorta M, Siena S, Bardelli A. Gene copy number for epidermal growth factor receptor (EGFR) and clinical response to antiEGFR treatment in colorectal cancer: a cohort study. *Lancet Oncol* 2005; 6: 279-286
- Meyerhardt JA, Mayer RJ. Systemic therapy for colorectal cancer. *N Engl J Med* 2005; 352: 476-487
- 李峰, 严家芹, 陈壬寅, 赵国强, 李晟磊, 曹娟娟. EGFR基因单核苷酸多态性与结直肠癌的相关性. *山东医药* 2009; 49: 4-6
- 刘慧龙, 徐建明. EGFR单抗治疗结直肠癌研究进展. *临床肿瘤学杂志* 2008; 13: 948-953
- Campiglio M, Locatelli A, Olgati C, Normanno N, Somenzi G, Vigano L, Fumagalli M, Ménard S, Gianni L. Inhibition of proliferation and induction of apoptosis in breast cancer cells by the epidermal growth factor receptor (EGFR) tyrosine kinase inhibitor ZD1839 ('Iressa') is independent of EGFR expression level. *J Cell Physiol* 2004; 198: 259-268
- 施敏, 张俊, 朱正纲. EGFR单抗治疗晚期结直肠癌的疗效预测标志物的研究进展. *世界华人消化杂志* 2010; 18: 3831-3837
- Saltz LB, Meropol NJ, Loehrer PJ Sr, Needle MN, Kopit J, Mayer RJ. Phase II trial of cetuximab in patients with refractory colorectal cancer that expresses the epidermal growth factor receptor. *J Clin Oncol* 2004; 22: 1201-1208
- Folprecht G, Lutz MP, Schöffski P, Seufferlein T, Nolting A, Pollert P, Köhne CH. Cetuximab and irinotecan/5-fluorouracil/folinic acid is a safe combination for the first-line treatment of patients with epidermal growth factor receptor expressing metastatic colorectal carcinoma. *Ann Oncol* 2006; 17: 450-456
- Cunningham D, Humblet Y, Siena S, Khayat D, Bleiberg H, Santoro A, Bets D, Mueser M, Harstrick A, Verslype C, Chau I, Van Cutsem E. Cetuximab monotherapy and cetuximab plus irinotecan in irinotecan-refractory metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* 2004; 351: 337-345
- 郁宝铭. 结直肠癌分子靶向治疗药物研究现状. *世界华人消化杂志* 2008; 16: 3705-3712
- Hecht JR, Patnaik A, Berlin J, Venook A, Malik I, Tchekmedyan S, Navale L, Amado RG, Meropol NJ. Panitumumab monotherapy in patients with previously treated metastatic colorectal cancer. *Cancer* 2007; 110: 980-988
- Van Cutsem E, Peeters M, Siena S, Humblet Y, Hendrlisz A, Neijns B, Canon JL, Van Laethem JL, Maurel J, Richardson G, Wolf M, Amado RG. Open-label phase III trial of panitumumab plus best supportive care compared with best supportive care alone in patients with chemotherapy-refractory metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2007; 25: 1658-1664
- 田源, 蔡欣, 刘基巍. 结肠直肠癌的分子靶向治疗进展. *癌症进展* 2010; 8: 151-155, 179
- Matar P, Rojo F, Cassia R, Moreno-Bueno G, Di Cosimo S, Tabernero J, Guzmán M, Rodriguez S, Arribas J, Palacios J, Baselga J. Combined epidermal growth factor receptor targeting with the tyrosine kinase inhibitor gefitinib (ZD1839) and the monoclonal antibody cetuximab (IMC-C225): superiority over single-agent receptor targeting. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 6487-6501
- 刘欣, 李进. 西妥昔单抗治疗胃肠肿瘤的研究进展. *肿瘤* 2009; 29: 1094-1097
- Chung KY, Shia J, Kemeny NE, Shah M, Schwartz GK, Tse A, Hamilton A, Pan D, Schrag D, Schwartz L, Klimstra DS, Fridman D, Kelsen DP, Saltz LB. Cetuximab shows activity in colorectal cancer patients with tumors that do not express the epidermal growth factor receptor by immunohistochemistry. *J Clin Oncol* 2005; 23: 1803-1810
- 王丽, 余英豪. 结直肠癌k-ras基因检测及其靶向治疗的研究现状. *世界华人消化杂志* 2010; 19: 62-67
- Lièvre A, Bachet JB, Boige V, Cayre A, Le Corre D,

■同行评价

本文层次清晰, 逻辑性强, 为EGFR抑制剂治疗结直肠癌奠定理论基础.

- Buc E, Ychou M, Bouché O, Landi B, Louvet C, André T, Bibeau F, Diebold MD, Rougier P, Ducreux M, Tomasic G, Emile JF, Penault-Llorca F, Laurent-Puig P. KRAS mutations as an independent prognostic factor in patients with advanced colorectal cancer treated with cetuximab. *J Clin Oncol* 2008; 26: 374-379
- 44 Khambata-Ford S, Garrett CR, Meropol NJ, Basik M, Harbison CT, Wu S, Wong TW, Huang X, Takimoto CH, Godwin AK, Tan BR, Krishnamurthi SS, Burris HA 3rd, Poplin EA, Hidalgo M, Baselga J, Clark EA, Mauro DJ. Expression of epiregulin and amphiregulin and K-ras mutation status predict disease control in metastatic colorectal cancer patients treated with cetuximab. *J Clin Oncol* 2007; 25: 3230-3237
- 45 Bokemeyer C, Bondarenko I, Makhson A, Hartmann JT, Aparicio J, de Braud F, Donea S, Ludwig H, Schuch G, Stroh C, Loos AH, Zubel A, Koralewski P. Fluorouracil, leucovorin, and oxaliplatin with and without cetuximab in the first-line treatment of metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2009; 27: 663-671
- 46 步召德, 季加孚. 2008年版NCCN结肠癌临床实践指南解读. 世界华人消化杂志 2009; 17: 343-346
- 47 Liu B, Fang M, Lu Y, Mendelsohn J, Fan Z. Fibroblast growth factor and insulin-like growth factor differentially modulate the apoptosis and G1 arrest induced by anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody. *Oncogene* 2001; 20: 1913-1922
- 48 Jacobs B, De Roock W, Piessevaux H, Van Oirbeek R, Biesmans B, De Schutter J, Fieuws S, Vandesompele J, Peeters M, Van Laethem JL, Humblet Y, Pénault-Llorca F, De Hertogh G, Laurent-Puig P, Van Cutsem E, Tejpar S. Amphiregulin and epiregulin mRNA expression in primary tumors predicts outcome in metastatic colorectal cancer treated with cetuximab. *J Clin Oncol* 2009; 27: 5068-5074
- 49 刘慧龙, 张小田. 西妥昔单抗联合卡培他滨和顺铂一线治疗晚期胃癌相关预测因子的研究. 临床肿瘤学杂志 2009; 13: 385-389
- 50 刘慧龙, 刘端琪. 表皮生长因子受体单抗相关生物标志研究进展. 肿瘤研究与临床 2009; 21: 501-503
- 51 Amador ML, Oppenheimer D, Perea S, Maitra A, Cusatis G, Iacobuzio-Donahue C, Baker SD, Ashfaq R, Takimoto C, Forastiere A, Hidalgo M. An epidermal growth factor receptor intron 1 polymorphism mediates response to epidermal growth factor receptor inhibitors. *Cancer Res* 2004; 64: 9139-9143
- 52 Shahbazi M, Pravica V, Nasreen N, Fakhouri H, Fryer AA, Strange RC, Hutchinson PE, Osborne JE, Lear JT, Smith AG, Hutchinson IV. Association between functional polymorphism in EGF gene and malignant melanoma. *Lancet* 2002; 359: 397-401
- 53 Bhowmick DA, Zhuang Z, Wait SD, Weil RJ. A functional polymorphism in the EGF gene is found with increased frequency in glioblastoma multiforme patients and is associated with more aggressive disease. *Cancer Res* 2004; 64: 1220-1223
- 54 Lenz HJ, Van Cutsem E, Khambata-Ford S, Mayer RJ, Gold P, Stella P, Mirtsching B, Cohn AL, Pippas AW, Azarnia N, Tsuchihashi Z, Mauro DJ, Rowinsky EK. Multicenter phase II and translational study of cetuximab in metastatic colorectal carcinoma refractory to irinotecan, oxaliplatin, and fluoropyrimidines. *J Clin Oncol* 2006; 24: 4914-4921
- 55 Jonker DJ, O'Callaghan CJ, Karapetis CS, Zalcberg JR, Tu D, Au JJ, Berry SR, Krahn M, Price T, Simes RJ, Tebbutt NC, van Hazel G, Wierzbicki R, Langer C, Moore MJ. Cetuximab for the treatment of colorectal cancer. *N Engl J Med* 2007; 357: 2040-2048
- 56 De Roock W, Jonker DJ, Di Nicolantonio F, Sartore-Bianchi A, Tu D, Siena S, Lamba S, Arena S, Frattini M, Piessevaux H, Van Cutsem E, O'Callaghan CJ, Khambata-Ford S, Zalcberg JR, Simes J, Karapetis CS, Bardelli A, Tejpar S. Association of KRAS p.G13D mutation with outcome in patients with chemotherapy-refractory metastatic colorectal cancer treated with cetuximab. *JAMA* 2010; 304: 1812-1820
- 57 吴晴, 李兆申. 消化系统肿瘤的分子靶向治疗. 世界华人消化杂志 2008; 16: 3666-3672

编辑 曹丽鸥 电编 何基才

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)

幽门螺杆菌与消化性溃疡并出血的研究现状

周虹, 吕农华

周虹, 吕农华, 南昌大学第一附属医院消化内科 江西省南昌市 330006

“十一五”国家科技支撑计划基金资助项目, No. 2008BAI68B00

作者贡献分布: 本文由周虹综述; 吕农华审校。

通讯作者: 吕农华, 教授, 主任医师, 330006, 江西省南昌市, 南昌大学第一附属医院消化内科, lunonghua@163.com

收稿日期: 2010-12-30 修回日期: 2011-03-02

接受日期: 2011-03-08 在线出版日期: 2011-04-08

Advances in understanding relationship between *Helicobacter pylori* infection and peptic ulcer bleeding

Hong Zhou, Nong-Hua Lv

Hong Zhou, Nong-Hua Lv, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang 330006, Jiangxi Province, China

Supported by: the National Key Technology R&D Program during the 11th Five-Year Plan Period, No. 2008BAI68B00

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

Received: 2010-12-30 Revised: 2011-03-02

Accepted: 2011-03-08 Published online: 2011-04-08

Abstract

Helicobacter pylori (*H.pylori*) is a definite causative factor for peptic ulcer; however, its role in peptic ulcer bleeding is not very clear. Detection of *H.pylori* infection in patients with peptic ulcer bleeding is often affected by methods and drugs used. *H.pylori* infection increases, to some extent, the risk of peptic ulcer bleeding. Eradication of *H.pylori* may reduce the risk of peptic ulcer bleeding and promote ulcer healing.

Key Words: *Helicobacter pylori*; Peptic ulcer; Peptic ulcer bleeding

Zhou H, Lv NH. Advances in understanding relationship between *Helicobacter pylori* infection and peptic ulcer bleeding. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2011; 19(10): 1063-1066

摘要

幽门螺杆菌是消化性溃疡的确定性致病因素,

其在溃疡并出血的作用尚不十分明确。目前, 幽门螺杆菌在消化性溃疡并出血的感染率受检测方法、药物等影响不尽相同。幽门螺杆菌感染在一定程度上增加了消化性溃疡并出血的危险性, 从长远上根除幽门螺杆菌可以降低溃疡出血风险, 促进溃疡愈合。

关键词: 幽门螺杆菌; 消化性溃疡; 消化性溃疡并出血

周虹, 吕农华. 幽门螺杆菌与消化性溃疡并出血的研究现状. 世界华人消化杂志 2011; 19(10): 1063-1066

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/1063.asp>

■背景资料

消化性溃疡(PU)并出血是上消化道出血的最常见病因, 约占所有病因的50%, 约有80%的溃疡病出血可自行停止, 但其病情发展迅速, 病死率高。*H.pylori*是PU的确定性致病因素, 也是PUB的危险因素。

0 引言

消化性溃疡(peptic ulcer, PU)是常见病和多发病, 呈世界性分布, 约有10%的人患过此病。出血是PU最常见的并发症, 也是上消化道大出血的常见原因, 约占所有病因的50%^[1], 其死亡率高达10%^[2]。自1983年Marshall等从人胃黏膜组织中培养出了幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *H.pylori*)后, 各国学者纷纷进行研究, 一致认为*H.pylori*是PU的确定性致病因素。然而目前关于*H.pylori*感染与PU并出血(peptic ulcer bleeding, PUB)的关系却不十分明确, 本文旨在对*H.pylori*感染及其根除后对PUB的影响作一综述。

1 *H.pylori*导致PUB的机制

目前认为, *H.pylori*引起PU的发病机制主要有两种学说: 一是Goodwin的“漏屋顶假说(hypothesis of leaking roof)”: 这是目前较为经典的学说, 即在胃和十二指肠黏膜受损的情况下, *H.pylori*感染导致H⁺反弥散, 进一步导致黏膜损伤造成溃疡。这一假说强调了*H.pylori*感染导致防御因素的减弱, *H.pylori*主要通过释放脂多糖、尿素酶和空泡细胞毒素损害黏膜屏障及其防御机制^[3]; 另一种是Levi的胃泌素联系学说:*H.pylori*定植过程中尿素酶分解尿素产生氨, 导致胃窦部的pH值升高, 反馈性地促进胃泌素释放, 使循环中的胃泌素水平升高, 引起高胃酸, 从而导致胃黏膜损害^[4]。溃疡并发出血多由于溃疡基底或其周围

■同行评议者

何松, 教授, 重庆医科大学附属第二医院消化内科

■研究前沿

PUB患者中*H.pylori*感染率受众多因素影响,缺少一个统一的诊断标准,因此尽快明确出血状态下*H.pylori*检测的敏感性降低的机制,找到有效而准确的检测方法已成为目前研究的重点。但随着耐药菌株的迅速增加,各种药物联合方案的根除率逐渐降低,如何高效、经济地根除*H.pylori*成为研究的热点。

血管破裂所致。因此,认为*H.pylori*感染在PUB患者中起着重要的病原学作用。

2 *H.pylori*在PUB中的感染率

在PUB患者中,*H.pylori*感染率仍存在争议。Chen等^[5]研究发现*H.pylori*的感染率高达90.5%,而其他文献报道*H.pylori*的感染率则没有那么高,处于20%-70%^[6],除地区因素外,主要是由于判断感染的标准和检测方法的不同造成感染率的差异。若以快速尿素酶试验(rapid urease test, RUT)或尿素呼气试验(urea breath test, UBT)任何一项阳性,即判定其为*H.pylori*感染,则感染率明显增高^[5],反之两者均阳性才判定为*H.pylori*感染,其阳性率则有所下降。目前,大部分研究采用了RUT检测*H.pylori*的感染,其阳性率为20%-60%^[6],组织学检测*H.pylori*的阳性率为61%-89%,高于RUT^[7]。绝大部分研究^[8,9]认为*H.pylori*在PUB患者的感染率明显低于未出血患者。

值得注意的是,近期应用抗生素、质子泵抑制剂(proton pump inhibitors, PPIs)、铋剂等药物,因有引起胃内酸碱度的改变和暂时抑制*H.pylori*的作用,会使*H.pylori*检查(除外血清学检查)呈假阴性,其假阴性率可达13%^[8]。另外,在溃疡出血和未出血患者不同的检测方法其敏感性不同,血液的存在也可能影响胃的*H.pylori*检测。关于引起PU患者在出血状态下*H.pylori*检测的敏感性减低的原因目前尚无统一的解释。Houghton等^[10]认为是人类血浆中含有某种能直接杀死*H.pylori*的因子,Leung等^[11]认为血清白蛋白对*H.pylori*指示剂的缓冲作用所致,而Archimandritis等^[12]、Tang等^[13]则认为胃内血液的存在不会影响检测结果,Lee等^[14]和Parry等^[15]也认为胃黏膜标本暴露在血液中不能解释为什么出血患者RUT敏感性降低。其原因尚待进一步研究,推测与*H.pylori*菌量减少或尿素酶活性降低有关。

目前,尚不清楚短期常规剂量或高剂量的奥美拉唑是否对*H.pylori*在溃疡出血患者胃内的定植有影响。Udd等^[16]研究了不同剂量奥美拉唑的治疗效果,发现奥美拉唑治疗3 d后*H.pylori*的检测转阴是剂量依赖性的。研究发现^[17],大多数*H.pylori*阳性的溃疡出血患者,除部分行高剂量PPIs治疗外,其*H.pylori*检测结果亦阳性。因此,可以认为,*H.pylori*感染的诊断依赖于活检的时机,并且与PPIs治疗开始的时间有关,为避免由于PPIs治疗造成的假阴性结果,应尽早行UBT检

测。但UBT受诸如药物、上消化道出血、胃内其他产生尿素酶细菌等因素影响,可能出现假阴性或假阳性,尤其在有胃部分切除手术史的患者中准确性有限。若第1次检测阴性,需在出血停止后4-8 wk或行*H.pylori*根除治疗后再次行*H.pylori*检测以排除*H.pylori*感染^[18]。

3 *H.pylori*感染对PUB的影响

*H.pylori*感染是PUB的一个重要因素^[19]。目前大部分研究认为*H.pylori*感染增加了PU患者出血的危险性。Kuyvenhoven等^[20]的研究显示:*H.pylori*感染导致PUB的相对危险度增加了1.5倍,并且*H.pylori*感染可能在一定程度上加剧了非甾体类抗炎药(non-steroidal anti-inflammatory drugs, NSAIDs)使用患者溃疡出血的风险,但其影响作用似乎比较轻微。Huang等^[21]的荟萃分析显示*H.pylori*感染使PUB的风险增加了1.79倍。在一定程度上,*H.pylori*的再感染可能是溃疡再出血的原因之一^[22]。Arkkila等^[23]的研究发现*H.pylori*阴性的PUB患者,溃疡愈合率为95%,而*H.pylori*阳性患者其溃疡愈合率为8%,远远低于*H.pylori*阴性患者;而*H.pylori*阴性的PUB患者溃疡恶化率为2%,*H.pylori*阳性患者其溃疡恶化率为38%。因此可以认为*H.pylori*感染降低溃疡愈合率,易导致溃疡恶变。

其次,*H.pylori*感染对PUB的影响与*H.pylori*的基因型相关。细胞毒素相关基因A(cytotoxin associated gene product A, CagA)阳性的*H.pylori*感染患者,溃疡并出血的风险增加^[24],其风险是NSAIDs使用患者的3倍^[25]。Perng等^[26]对168例患者进行前瞻性研究,通过DNA提取和聚合酶链反应检测CagA,并对vacA和iceA进行分型,发现PUB患者vacA s1a和m1T明显少于未出血组,认为*H.pylori* vacA s1a和m1T的存在在一定程度上可以预防或减少溃疡出血。

也有资料显示,*H.pylori*可能不是溃疡并出血的独立因素。Sotoudehmanesh等^[27]的Logistic回归分析显示,在总体感染率较低的情况下,考虑溃疡部位的影响时,胃溃疡并出血*H.pylori*感染率较十二指肠溃疡并出血高,提示*H.pylori*感染可能不是PUB的独立因素;而不考虑溃疡部位,*H.pylori*感染在控制PUB的混杂因素中是个保护性因素。另有研究^[28]发现,在十二指肠溃疡出血患者,与*H.pylori*阳性相比,*H.pylori*阴性患者症状更加严重,其再出血率、手术率和死亡率都较高,甚至可以认为*H.pylori*感染是保护性

因素, 这可能与 *H.pylori* 阴性患者症状不明显, 往往以上消化道出血为首发症状来就诊。总体上, 我们可以认为 *H.pylori* 感染是PUB患者的一个主要致病因素, 其存在增加了PU患者出血的可能。

4 对 *H.pylori* 阳性的PUB患者是否需要行 *H.pylori* 根除治疗

尽管 *H.pylori* 在PUB患者的感染率较低, 绝大多数的研究^[29,30]表明, 从长远角度讲, 根除 *H.pylori* 可以显著降低溃疡患者再出血的风险, 促进溃疡愈合。一项荟萃分析^[22]显示: 成功根除 *H.pylori* 后, 溃疡患者的再出血率可以降低到1%。根除 *H.pylori* 在统计学上有显著意义, 除能减少溃疡复发外, 还能防止溃疡进一步恶化、出血^[31]。而目前关于 *H.pylori* 对出血急性期的溃疡患者短期再出血率的影响的资料较少见。Schilling等的研究发现, 一旦内镜止血成功后, *H.pylori* 感染的存在并不影响PUB患者的短期(<21 d)再出血率^[32,33]。

目前, 对于有长期应用NSAIDs的溃疡出血患者, 是否有根除 *H.pylori* 的必要存在一定的争论。目前普遍认为 *H.pylori* 感染和NSAIDs, 不仅是 PUB的独立的危险因素, 而且有协同作用^[34], 因此倾向于行 *H.pylori* 根除治疗, 认为根除 *H.pylori* 可减少PUB的危险, 在一定程度上可以预防溃疡及再出血的发生^[35,36]。但Aabakken等^[37]认为NSAIDs相关性溃疡出血的患者不需要根除 *H.pylori*。

大量资料^[38-41]表明, 所有的溃疡出血患者, 都必须行 *H.pylori* 检测, 一旦检测结果为阳性, 不论是否使用NSAIDs, 都必须给予 *H.pylori* 根除治疗。如果 *H.pylori* 根除成功, 不需要长期抑酸维持治疗^[42]。

5 结论

PUB患者中 *H.pylori* 感染率受众多因素影响, 缺少一个统一的诊断标准, 因此尽快明确出血状态下 *H.pylori* 检测的敏感性降低的机制, 找到有效而准确的检测方法已成为目前研究的重点。目前治疗 *H.pylori* 感染采用抗生素加PPIs或秘剂的联合疗法, 其疗效约为90%。但随着耐药菌株的迅速增加, 各种药物联合方案的根除率逐渐降低, 如何高效、经济地根除 *H.pylori* 成为研究的热点。随着疫苗研究的发展, 在不远的将来, 疫苗接种可能成为预防 *H.pylori* 感染、降低 *H.pylori* 相关性疾病发病率的最佳选择。

6 参考文献

1 周虹, 吕农华. 消化性溃疡并出血高危因素的研究进

- 展. 世界华人消化杂志 2010; 18: 3544-3547
- 2 Sung JJ. Marshall and Warren Lecture 2009: Peptic Ulcer Bleeding: An expedition of 20 years from 1989-2009. *J Gastroenterol Hepatol* 2010; 25: 229-233
- 3 Isomoto H, Moss J, Hirayama T. Pleiotropic actions of Helicobacter pylori vacuolating cytotoxin, VacA. *Tohoku J Exp Med* 2010; 220: 3-14
- 4 Chu YT, Wang YH, Wu JJ, Lei HY. Invasion and multiplication of Helicobacter pylori in gastric epithelial cells and implications for antibiotic resistance. *Infect Immun* 2010; 78: 4157-4165
- 5 Chen TS, Luo JC, Chang FY. Prevalence of Helicobacter pylori infection in duodenal ulcer and gastroduodenal ulcer diseases in Taiwan. *J Gastroenterol Hepatol* 2010; 25: 919-922
- 6 Schilling D, Demel A, Adamek HE, Nusse T, Weidmann E, Riemann JF. A negative rapid urease test is unreliable for exclusion of Helicobacter pylori infection during acute phase of ulcer bleeding. A prospective case control study. *Dig Liver Dis* 2003; 35: 217-221
- 7 Lee JM, Breslin NP, Fallon C, O'Morain CA. Rapid urease tests lack sensitivity in Helicobacter pylori diagnosis when peptic ulcer disease presents with bleeding. *Am J Gastroenterol* 2000; 95: 1166-1170
- 8 Wildner-Christensen M, Touborg Lassen A, Lindebjerg J, Schaffalitzky de Muckadell OB. Diagnosis of Helicobacter pylori in bleeding peptic ulcer patients, evaluation of urea-based tests. *Digestion* 2002; 66: 9-13
- 9 Vestergård A, Bredahl K, de Muckadell OB, Pedersen OB, Hansen JM. [Bleeding peptic ulcer. Prevalence of Helicobacter pylori and use of nonsteroidal anti-inflammatory drugs/acetylsalicylic acid]. *Ugeskr Laeger* 2009; 171: 235-239
- 10 Houghton J, Ramamoorthy R, Pandya H, Dhirmalani R, Kim KH. Human plasma is directly bactericidal against Helicobacter pylori in vitro, potentially explaining the decreased detection of Helicobacter pylori during acute upper GI bleeding. *Gastrointest Endosc* 2002; 55: 11-16
- 11 Leung WK, Sung JJ, Siu KL, Chan FK, Ling TK, Cheng AF. False-negative biopsy urease test in bleeding ulcers caused by the buffering effects of blood. *Am J Gastroenterol* 1998; 93: 1914-1918
- 12 Archimandritis A, Tzivras M, Sougioultsis S, Papaparaskevas I, Apostolopoulos P, Avlami A, Davaris PS. Rapid urease test is less sensitive than histology in diagnosing Helicobacter pylori infection in patients with non-variceal upper gastrointestinal bleeding. *J Gastroenterol Hepatol* 2000; 15: 369-373
- 13 Tang JH, Liu NJ, Cheng HT, Lee CS, Chu YY, Sung KF, Lin CH, Tsou YK, Lien JM, Cheng CL. Endoscopic diagnosis of Helicobacter pylori infection by rapid urease test in bleeding peptic ulcers: a prospective case-control study. *J Clin Gastroenterol* 2009; 43: 133-139
- 14 Lee JM, Breslin NP, Gopaul M, Koh CW, Kong TY, Soong MM, O'Morain CA. The effects of blood on rapid urease testing for Helicobacter pylori in mucosal biopsies from the gastric antrum. *Ir J Med Sci* 2000; 169: 60-62
- 15 Perry M, Vakil N, Cutler AF. Admixture with whole blood does not explain false-negative urease tests. *J Clin Gastroenterol* 2000; 30: 64-65
- 16 Udd M, Miettinen P, Palmu A, Julkunen R. Effect of short-term treatment with regular or high doses of omeprazole on the detection of Helicobacter pylori

■应用要点

本文系统地阐明 *H.pylori* 感染及其根除后对PUB的影响, 虽存在一定争议, 但能推动临床领域对其进一步的研究; 在一定程度上能提高临床对于 *H.pylori* 的PUB的认识, 有利于对溃疡并出血的防治。

■同行评价

本文具有一定的临床参考价值,但创新性一般。

- in bleeding peptic ulcer patients. *Scand J Gastroenterol* 2003; 38: 588-593
- 17 Gisbert JP, Esteban C, Jimenez I, Moreno-Otero R. 13C-urea breath test during hospitalization for the diagnosis of Helicobacter pylori infection in peptic ulcer bleeding. *Helicobacter* 2007; 12: 231-237
- 18 Güell M, Artigau E, Esteve V, Sánchez-Delgado J, Junquera F, Calvet X. Usefulness of a delayed test for the diagnosis of Helicobacter pylori infection in bleeding peptic ulcer. *Aliment Pharmacol Ther* 2006; 23: 53-59
- 19 Bardou M, Barkun AN. Preventing the gastrointestinal adverse effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs: from risk factor identification to risk factor intervention. *Joint Bone Spine* 2010; 77: 6-12
- 20 Kuyvenhoven JP, Veenendaal RA, Vandembroucke JP. Peptic ulcer bleeding: interaction between non-steroidal anti-inflammatory drugs, Helicobacter pylori infection, and the ABO blood group system. *Scand J Gastroenterol* 1999; 34: 1082-1086
- 21 Huang JQ, Sridhar S, Hunt RH. Role of Helicobacter pylori infection and non-steroidal anti-inflammatory drugs in peptic-ulcer disease: a meta-analysis. *Lancet* 2002; 359: 14-22
- 22 Gisbert JP, Khorrami S, Carballo F, Calvet X, Gené E, Dominguez-Muñoz JE. H. pylori eradication therapy vs. antisecretory non-eradication therapy (with or without long-term maintenance antisecretory therapy) for the prevention of recurrent bleeding from peptic ulcer. *Cochrane Database Syst Rev* 2003; CD004062
- 23 Arkkila PE, Seppälä K, Kosunen TU, Haapiainen R, Kivilaakso E, Sipponen P, Mäkinen J, Nuutinen H, Rautelin H, Färkkilä MA. Eradication of Helicobacter pylori improves the healing rate and reduces the relapse rate of nonbleeding ulcers in patients with bleeding peptic ulcer. *Am J Gastroenterol* 2003; 98: 2149-2156
- 24 Stack WA, Atherton JC, Hawkey GM, Logan RF, Hawkey CJ. Interactions between Helicobacter pylori and other risk factors for peptic ulcer bleeding. *Aliment Pharmacol Ther* 2002; 16: 497-506
- 25 Tzourmakliotis D, Economou M, Manolakopoulos S, Bethanis S, Bergele C, Lakoumentas J, Sclavos P, Milionis H, Margeli A, Vogiatzakis E, Avgerinos A. Clinical significance of cytotoxin-associated gene A status of Helicobacter pylori among non-steroidal anti-inflammatory drug users with peptic ulcer bleeding: a multicenter case-control study. *Scand J Gastroenterol* 2004; 39: 1180-1185
- 26 Perng CL, Lin HJ, Lo WC, Tseng GY, Sun IC, Ou YH. Genotypes of Helicobacter pylori in patients with peptic ulcer bleeding. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 602-605
- 27 Sotoudehmanesh R, Asgari AA, Fakheri HT, Nouraei M, Khatibian M, Shirazian N. Peptic ulcer bleeding: is Helicobacter pylori a risk factor in an endemic area? *Indian J Gastroenterol* 2005; 24: 59-61
- 28 Adamopoulos AB, Efstatithiou SP, Tsoulous DI, Tzamouranis DG, Tsakou AG, Tiniakos D, Mountrakakis TD. Bleeding duodenal ulcer: comparison between Helicobacter pylori positive and Helicobacter pylori negative bleeders. *Dig Liver Dis* 2004; 36: 13-20
- 29 Amendola M, Farias R, Katz J, Luna P, Ianella M, Musi A, Boerr L, Valero J, Kogan Z, Corti R. [Absence of bleeding recurrence of peptic ulcer after long term follow-up of successful eradication of Helicobacter pylori]. *Acta Gastroenterol Latinoam* 1999; 29: 47-50
- 30 Cheon JH, Kim JH, Lee SK, Kim TI, Kim WH, Lee YC. Helicobacter pylori eradication therapy may facilitate gastric ulcer healing after endoscopic mucosal resection: a prospective randomized study. *Helicobacter* 2008; 13: 564-571
- 31 Labenz J, Börsch G. Role of Helicobacter pylori eradication in the prevention of peptic ulcer bleeding relapse. *Digestion* 1994; 55: 19-23
- 32 Lin HJ, Tseng GY, Hsieh YH, Perng CL, Lee FY, Chang FY, Lee SD. Will Helicobacter pylori affect short-term rebleeding rate in peptic ulcer bleeding patients after successful endoscopic therapy? *Am J Gastroenterol* 1999; 94: 3184-3188
- 33 Schilling D, Demel A, Nüsse T, Weidmann E, Riemann JF. Helicobacter pylori infection does not affect the early rebleeding rate in patients with peptic ulcer bleeding after successful endoscopic hemostasis: a prospective single-center trial. *Endoscopy* 2003; 35: 393-396
- 34 Kawai T, Fukuzawa M, Moriyasu F, Yamashina A. [Influence of H. pylori infection on upper gastrointestinal damage]. *Nippon Rinsho* 2010; 68: 2020-2024
- 35 Kim JJ, Kim N, Lee BH, Kang JM, Seo P, Lim MK, Kwon JH, Song BJ, Lee JW, Lee SH, Park YS, Hwang JH, Kim JW, Jeong SH, Lee DH, Jung HC, Song IS. [Risk factors for development and recurrence of peptic ulcer disease]. *Korean J Gastroenterol* 2010; 56: 220-228
- 36 Chan FK. Should we eradicate Helicobacter pylori infection in patients receiving nonsteroidal anti-inflammatory drugs or low-dose aspirin? *Chin J Dig Dis* 2005; 6: 1-5
- 37 Aabakken L. Nonvariceal upper gastrointestinal bleeding. *Endoscopy* 2001; 33: 16-23
- 38 Sharma VK, Sahai AV, Corder FA, Howden CW. Helicobacter pylori eradication is superior to ulcer healing with or without maintenance therapy to prevent further ulcer haemorrhage. *Aliment Pharmacol Ther* 2001; 15: 1939-1947
- 39 Thiéfén G. [Should Helicobacter pylori infection be tested and eradicated in patients treated or about to be treated with aspirin or nonsteroidal anti-inflammatory drugs?]. *Gastroenterol Clin Biol* 2003; 27: 415-426
- 40 Lai KC, Lam SK. The need for Helicobacter pylori eradication therapy in patients with peptic ulcer bleeding. *Hong Kong Med J* 1999; 5: 163-168
- 41 Gisbert JP, Khorrami S, Carballo F, Calvet X, Gene E, Dominguez-Muñoz E. Meta-analysis: Helicobacter pylori eradication therapy vs. antisecretory non-eradication therapy for the prevention of recurrent bleeding from peptic ulcer. *Aliment Pharmacol Ther* 2004; 19: 617-629
- 42 Gisbert JP, Calvet X, Feu F, Bory F, Cosme A, Almeida P, Santolaria S, Aznárez R, Castro M, Fernández N, García-Grávalos R, Cañete N, Benages A, Montoro M, Borda F, Pérez-Aisa A, Piqué JM. Eradication of Helicobacter pylori for the prevention of peptic ulcer rebleeding. *Helicobacter* 2007; 12: 279-286

编辑 曹丽鸥 电编 何基才

鱼油对重症急性胰腺炎大鼠肠黏膜屏障的影响

张波, 刘燕燕, 刘丛丛, 武华

张波, 刘燕燕, 山西医科大学 山西省太原市 030001
刘丛丛, 山西医科大学第一医院病理科 山西省太原市 030001
武华, 山西医科大学第一医院普外科 山西省太原市 030001
作者贡献分布: 此课题由张波与武华设计; 动物模型制作和指标检测分析由张波与刘燕燕操作完成; 病理分析由刘丛丛完成; 论文写作由张波与武华完成。
通讯作者: 武华, 教授, 主任医师, 030001, 山西省太原市, 山西医科大学第一医院普外科. taiyuanwuhua@yahoo.cn
收稿日期: 2011-01-17 **修回日期:** 2011-03-14
接受日期: 2011-03-23 **在线出版日期:** 2011-04-08

Fish oil protects the intestinal mucosal barrier in rats with severe acute pancreatitis

Bo Zhang, Yan-Yan Liu, Cong-Cong Liu, Hua Wu

Bo Zhang, Yan-Yan Liu, Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, Shanxi Province, China
Cong-Cong Liu, Department of Pathology, the First Hospital of Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, Shanxi Province, China
Hua Wu, Department of General Surgery, the First Hospital of Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, Shanxi Province, China

Correspondence to: Professor Hua Wu, Department of General Surgery, the First Hospital of Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, Shanxi Province, China. taiyuanwuhua@yahoo.cn

Received: 2011-01-17 Revised: 2011-03-14

Accepted: 2011-03-23 Published online: 2011-04-08

Abstract

AIM: To evaluate the protective effect of omega-3 fish oil on the intestinal mucosal barrier in serious acute pancreatitis (SAP) rats.

METHODS: Thirty male Wistar rats were randomly divided into three groups: sham-operated group ($n = 10$), fish oil group ($n = 10$), and normal saline group ($n = 10$). SAP was induced in rats of the fish oil group and normal saline group by retrograde injection of 5% sodium cholate (1 mL/kg) into the pancreatic duct. These two groups were then intravenously given fish oil supplement (2 mL/kg) and normal saline (2mL/kg), respectively. The sham-operated group was subjected to sham operation. After treatment, plasma D-lactate and serum intestinal fatty acid binding protein (I-FABP) were measured, and the severity of pancreatitis and

intestinal changes was evaluated by histopathological scoring.

RESULTS: Plasma D-lactate (mmol/L), serum I-FABP ($\mu\text{g}/\text{L}$), and histopathological scores of intestinal changes and pancreatitis in the normal saline group were markedly lower than those in the sham-operated group and fish oil group (0.43 ± 0.12 vs 0.07 ± 0.02 , 0.26 ± 0.05 ; 1510.00 ± 72.72 vs 80.50 ± 5.60 , 904.00 ± 61.50 ; 2.60 ± 0.32 vs 0.20 ± 0.10 , 1.85 ± 0.34 ; 8.60 ± 0.31 vs 0.30 ± 0.12 , 7.30 ± 0.23 ; all $P < 0.05$ or 0.01).

CONCLUSION: Omega-3 fish oil supplementation reduces plasma D-lactate and serum I-FABP concentrations, protects the intestinal mucosal barrier, and thereby decreases intestinal mucosal permeability and systemic inflammation in SAP rats.

Key Words: Fish oil; Severe acute pancreatitis; Intestinal mucosal barrier; D-lactate; Intestinal fatty acid-binding protein

Zhang B, Liu YY, Liu CC, Wu H. Fish oil protects the intestinal mucosal barrier in rats with severe acute pancreatitis. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2011; 19(10): 1067-1070

■背景资料

重症急性胰腺炎(SAP)具有病情凶险、病程进展快、并发症多和病死率高等特点。在病情进展中, 肠黏膜屏障功能破坏的现象已逐渐得到公认, 已有实验证明肠黏膜屏障功能的破坏是SAP发生级联反应的关键点和转折点, 因此肠黏膜屏障功能是当今SAP研究的关注点。

摘要

目的: 探讨ω-3鱼油脂肪乳剂对重症急性胰腺炎(SAP)大鼠早期肠黏膜功能屏障的影响。

方法: ♂ Wistar大鼠30只随机分为: 假手术组(So组, $n = 10$), 鱼油治疗组(F组, $n = 10$)和生理盐水治疗组(N组, $n = 10$)。通过胰管逆行注射法建成SAP模型, 并分别尾静脉注射ω-3鱼油脂肪乳剂和生理盐水治疗。检测大鼠血浆D-乳酸和肠脂肪酸结合蛋白(I-FABP)的水平, 观察小肠黏膜组织和胰腺组织并进行病理学评分。

结果: N组中D-乳酸浓度(mmol/L), I-FABP浓度($\mu\text{g}/\text{L}$), 小肠组织评分(分)和胰腺组织评分(分)明显高于So组和N组(0.43 ± 0.12 vs 0.07 ± 0.02 , 0.26 ± 0.05 ; 1510.00 ± 72.72 vs 80.50 ± 5.60 , 904.00 ± 61.50 ; 2.60 ± 0.32 vs 0.20 ± 0.10 , 1.85 ± 0.34 ; 8.60 ± 0.31 vs 0.30 ± 0.12 , 7.30 ± 0.23 ; all $P < 0.05$ or 0.01).

■同行评议者

李国威, 教授, 西安交通大学医学院第二附属医院普通外科

■研发前沿

近年来肠黏膜屏障的功能障碍与SAP的关系成为研究SAP的热点。

0.23, 均 $P<0.05$ 或 0.01).

结论: ω -3鱼油脂肪乳剂能降低D-乳酸和I-FABP的浓度, 从而降低肠黏膜的通透性, 减轻全身炎症反应, 保护大鼠的肠黏膜屏障。

关键词: 鱼油; 重症急性胰腺炎; 肠黏膜屏障; D-乳酸; 肠脂肪酸结合蛋白

张波, 刘燕燕, 刘丛丛, 武华. 鱼油对重症急性胰腺炎大鼠肠黏膜屏障的影响. 世界华人消化杂志 2011; 19(10): 1067-1070
<http://www.wjnet.com/1009-3079/19/1067.asp>

0 引言

急性胰腺炎(acute pancreatitis, AP)是一种临床常见的急腹症, 发病急骤, 变化迅速, 病情危重而且复杂。尤其是重症急性胰腺炎(serious acute pancreatitis, SAP)来势更加凶猛, 病死率高达12%-15%, 有并发症者甚至达50%, 而其中约80%的死亡原因与肠道屏障功能受损、继发感染有关^[1]。大量研究显示SAP容易发生肠屏障功能障碍(intestinal barrier functional disturbance, IBFD), IBFD是SAP并发症, 诱发和加重全身炎症反应综合征, 多器官功能障碍综合征, 且死亡率居高不下的症结所在^[2]。本实验旨在通过对SAP大鼠进行鱼油干预, 检测大鼠血浆D-乳酸和肠脂肪酸结合蛋白(intestinal fatty acid binding protein, I-FABP)的含量, 以探讨 ω -3鱼油对SAP大鼠的肠黏膜屏障功能的影响。

1 材料和方法

1.1 材料 Wistar大鼠30只, ♂, 由山西医科大学实验室提供(体质量202-240 g). 10%鱼油脂肪乳剂购于费森尤斯卡比公司。

1.2 方法

1.2.1 分组: 30只大鼠随机分为3组: 假手术组(So, $n = 10$)、鱼油治疗组(F, $n = 10$)和生理盐水治疗组(N, $n = 10$)。

1.2.2 造模: 术前12 h禁食, 自由饮水。乌拉坦腹腔内注射麻醉, 固定大鼠。经上腹正中切口进腹, 提起十二指肠以无损伤血管夹夹闭肝门部胰胆管和十二指肠处。经十二指肠穿刺胰胆管, 加压注射5%牛黄胆酸钠(1 mL/kg, 购自Sigma公司), 持续1 min, 助手捏紧十二指肠两端, 保持3 min, 观察到胰腺迅速充血、间质水肿并有散在出血点, 术毕关腹^[3]。通过尾静脉向F组和N组的大鼠分别注射鱼油(2 mL/kg)及生理盐水(2 mL/kg), 10 min注射完毕^[3]。分别于干预后12 h处死大鼠,

留取血样及胰腺和小肠组织标本。

1.2.3 指标检测: (1)D-乳酸: 采用改良的酶学分光度法测定D-乳酸的含量, 按照说明书操作; (2)I-FABP: 采用ELISA试剂盒检测I-FABP的含量, 按照说明书操作; (3)病理HE染色: 将经甲醛固定的大鼠小肠组织和胰腺组织系列脱水, 石蜡包埋, 连续切片, 常规HE染色。小肠组织常规HE染色后光镜下观察并进行炎症损伤病理学评分^[4]。0分: 无异常改变; 0.5分: 肠黏膜水肿、充血, 无坏死性病变; 1分: 病变局限于肠黏膜, 有散在性出血点; 2分: 坏死累及浅表黏膜, 黏膜中有多区域出血; 3分: 全层坏死伴有肠腔出血。胰腺组织参照Sharif等^[5]的方法对胰腺组织不同程度的炎症、水肿、出血及坏死(0-4分)在光镜下进行评分。

统计学处理 数据采用SPSS16.0统计软件包进行处理。定量资料采用mean±SD表示; 所有数据Levene法进行方差齐性检验, 多组间比较采用方差分析(ANOVA), 组间两两比较采用LSD-t法。取检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 死亡情况 N组有2只大鼠死亡, F组和So组无大鼠死亡。

2.2 血浆D-乳酸变化 So组血浆D-乳酸为0.07 mmol/L±0.02 mmol/L, F组和N组血浆D-乳酸则升高明显, F组和N组与So组比较有显著性差异($P<0.01$); F组与N组比较明显降低($P<0.05$, 表1)。

2.3 血清I-FABP的变化 F组和N组中血清的I-FABP的浓度明显高于So组, 且F组较N组明显降低($P<0.05$), 说明肠黏膜屏障功能障碍时, 有持续的、明显的肠道低灌注, 鱼油能改善肠道的微循环状态(表1)。

2.4 病理组织改变 胰腺组织改变: So组胰腺组织在肉眼及光镜下观察基本正常, 无出血及坏死。N组病理改变表现为胰腺间质水肿, 血管充血, 炎性细胞浸润, 组织间隙见红细胞分布, 胰腺腺泡结构消失(图1A)。F组病理改变表现为中央区可见大片无结构坏死区, 周缘可见部分腺叶轮廓, 残存的腺泡组织腔内有分泌物, 炎细胞浸润明显少于N组(图1B)。小肠组织改变: 鱼油组小肠组织病理改变较N组轻, 其病理评分为1.85±0.34, 与N组比较有显著的改善($P<0.05$, 表1)。

3 讨论

SAP是一种严重的急腹症, 近年来大量研究表明, 在SAP的疾病发展过程中, 肠黏膜屏障功能

■相关报道

王鹏飞等研究发现 ω -3鱼油脂肪乳在提供能量的同时, 对急性胰腺炎的炎症反应具有一定的抑制作用, 可以明显改善胰腺炎症的病理积分和胰腺坏死。

表 1 各组D-乳酸、I-FABP浓度及小肠和胰腺组织评分

分组	D-乳酸浓度(mmol/L)	I-FABP浓度(μg/L)	小肠组织评分	胰腺组织评分
So组	0.07 ± 0.02	80.5 ± 5.6	0.2 ± 0.1	0.3 ± 0.12
N组	0.43 ± 0.12 ^d	1 510 ± 72.72 ^d	2.6 ± 0.32 ^d	8.6 ± 0.31 ^d
F组	0.26 ± 0.05 ^{ad}	904 ± 61.5 ^{ad}	1.85 ± 0.34 ^{ad}	7.3 ± 0.23 ^{ad}

^aP<0.05 vs N组; ^dP<0.01 vs So组.

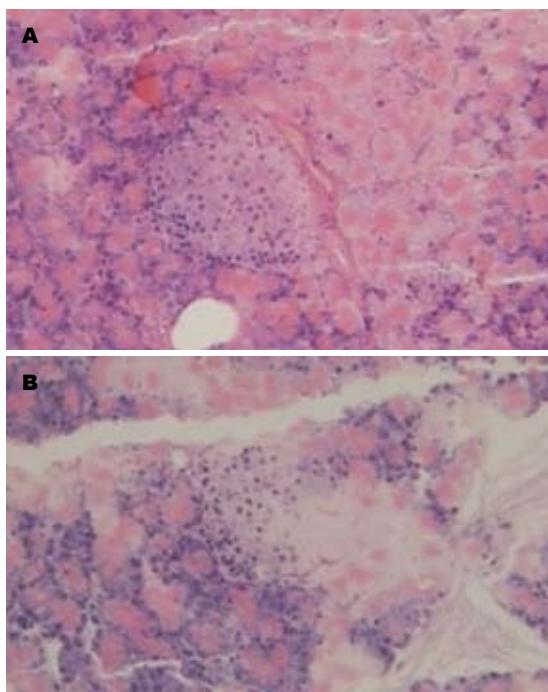


图 1 胰腺组织(HE × 100). A: N组; B: F组.

损害起着极为重要的作用。肠黏膜屏障功能是指肠黏膜上皮具有将肠腔内容物分隔，防止致病物质进入血循环和淋巴循环^[6]。肠黏膜屏障主要由机械屏障、免疫屏障、生物屏障和化学屏障4部分构成。而肠黏膜通透性是评价肠黏膜屏障功能的重要指标之一。Ammori等^[7]研究发现，SAP患者早期的肠道通透性明显增加。本实验结果表明：与So组比较，F组和N组中D-乳酸和肠脂肪酸结合蛋白都明显升高，进一步证实了SAP大鼠早期即有肠黏膜通透性的增加，提示在SAP早期存在肠黏膜屏障功能损伤。

ω-3鱼油脂肪乳的主要成分为ω-3多不饱和脂肪酸(polyunsaturated fatty acids, PUFAs)，来源于深海鱼油，包括二十碳五烯酸(eicosapentaenoic acid, EPA)和二十二碳六烯酸(docosahexaenoic acid, DHA)。大量研究表明EPA和DHA具有良好的炎症反应调节作用^[8]，认为ω-3鱼油脂肪乳在提供能量的同时对AP的炎症反应具有一定的抑

制作用^[9]。本实验研究发现，F组大鼠的小肠组织病理评分低于N组，高于So组，说明在胰腺炎时肠黏膜组织已经受到损伤，应用鱼油可以改善SAP肠道屏障功能障碍。

D-乳酸是细菌发酵的代谢产物，肠通透性增加时肠道中细菌所产生的大量D-乳酸通过受损黏膜进入血液循环，因此血浆D-乳酸水平可以反映肠屏障功能变化^[10]。在本实验中F组中D-乳酸的浓度明显低于N组，说明鱼油可以降低肠黏膜的通透性。

I-FABP是从肠道分离出的特异性表达于肠道的脂肪酸结合蛋白，占肠道蛋白的2%-3%。有研究表明，I-FABP的浓度与肠黏膜屏障功能损害明显相关^[11]。在正常情况下，血清中I-FABP水平在可检测限度以下^[12]。一旦肠道发生缺血，即使只有微绒毛受损而隐窝细胞仍保持完整的情况下，血I-FABP水平也会上升^[13]。亦有研究者将其作为小肠缺血的敏感指标^[14,15]。而在本实验中，我们通过检测SAP大鼠血清I-FABP的浓度，发现在SAP早期，血清I-FABP即有升高，说明了在SAP早期即发生了肠道缺血。而注射了鱼油的大鼠血清中的I-FABP水平与N组比较明显降低，说明鱼油可以改善肠道的微循环状态保护肠黏膜屏障。

目前，肠黏膜通透性改变的路径及其机制尚未完全阐明，但是由于肠黏膜通透性的变化可以反映肠黏膜屏障功能的状态，对预示疾病过程转归具有重要意义。因此，D-乳酸和I-FABP的检测有望成为SAP患者肠黏膜屏障的监测指标。而鱼油可以降低肠黏膜的通透性，改善肠道的微循环状态，可以为临幊上治疗胰腺炎疾病提供依据，其完整的机制有待于进一步的研究证实。

4 参考文献

- 蒋晓芸, 钱立平, 孙大裕. 重症急性胰腺炎肠道屏障功能损伤机制研究进展. 国际消化病杂志 2006; 26: 221-223
- 刘晓臣, 彭燕. 肠屏障功能障碍与重症急性胰腺炎. 世界华人消化杂志 2006; 14: 3131-3135
- 刘纳新, 陈周浔, 余震, 周蒙淘, 陈通克, 章晓东, 章忠渭, 王鹏飞. 鱼油对急性坏死性胰腺炎大鼠胃肠功能

■应用要点
临幊上重症胰腺炎患者多在发病数小时后就诊，此时肠道屏障功能已经损伤，而D-乳酸和I-FABP对肠黏膜损伤有良好的灵敏度和特异性。因此D-乳酸和I-FABP的检测有望成为SAP患者肠黏膜屏障的监测指标。

■同行评价

本文设计合理, 对SAP早期的黏膜通透性改变及处理对策研究具有一定的参考意义。

- 的影响. 中华肝胆外科杂志 2009; 15: 534-536
- 4 Schlag G, Redl H, van Vuuren CJ, Davies J. Hyperdynamic sepsis in baboons: II. Relation of organ damage to severity of sepsis evaluated by a newly developed morphological scoring system. *Circ Shock* 1992; 38: 253-263
 - 5 Sharif S, Broman M, Babcock T, Ong E, Jho D, Rudnicki M, Helton WS, Espat NJ. A priori dietary omega-3 lipid supplementation results in local pancreatic macrophage and pulmonary inflammatory response attenuation in a model of experimental acute edematous pancreatitis (AEP). *JPNEN J Parenter Enteral Nutr* 2006; 30: 271-276
 - 6 Baumgart DC, Dignass AU. Intestinal barrier function. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2002; 5: 685-694
 - 7 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
 - 8 Mori TA, Beilin LJ. Omega-3 fatty acids and inflammation. *Curr Atheroscler Rep* 2004; 6: 461-467
 - 9 Foitzik T, Eibl G, Schneider P, Wenger FA, Jacobi CA, Buhr HJ. Omega-3 fatty acid supplementation increases anti-inflammatory cytokines and attenuates systemic disease sequelae in experimental pancreatitis. *JPNEN J Parenter Enteral Nutr* 2002; 26: 351-356
 - 10 蔡元坤, 秦新裕. D-乳酸与肠道屏障功能. 国外医学·外科分册 2004; 31: 331-335
 - 11 黄晓曦, 王兴鹏, 吴恺, 马晶晶, 徐铭益. 肠屏障功能障碍临床评估指标建立的初步研究. 中华消化杂志 2006; 28: 519-522
 - 12 Pelsers MM, Hermens WT, Glatz JF. Fatty acid-binding proteins as plasma markers of tissue injury. *Clin Chim Acta* 2005; 352: 15-35
 - 13 潘莉雅, 王新颖, 李维勤, 李宁, 黎介寿. 脂肪酸结合蛋白在重症急性胰腺炎诊断中的应用. 肠外与肠内营养 2010; 17: 134-137
 - 14 Wiercinska-Drapalo A, Jaroszewicz J, Siwak E, Pogorzelska J, Prokopowicz D. Intestinal fatty acid binding protein (I-FABP) as a possible biomarker of ileitis in patients with ulcerative colitis. *Regul Pept* 2008; 147: 25-28
 - 15 Derikx JP, Poeze M, van Bijnen AA, Buurman WA, Heineman E. Evidence for intestinal and liver epithelial cell injury in the early phase of sepsis. *Shock* 2007; 28: 544-548

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, 并有足够的具有自明性的信息, 使读者不查阅正文即可理解该表的内容。表内每一栏均应有表头, 表内非公知通用缩写应在表注中说明, 表格一律使用三线表(不用竖线), 在正文中该出现的地方应注出。图应有图序、图题和图注, 以使其容易被读者理解, 所有的图应在正文中该出现的地方注出。同一个主题内容的彩色图、黑白图、线条图, 统一用一个注解分别叙述。如: 图1 萎缩性胃炎治疗前后病理变化。A: …; B: …; C: …; D: …; E: …; F: …; G: …。曲线图可按●、○、■、□、▲、△顺序使用标准的符号。统计学显著性用: ^aP<0.05, ^bP<0.01(^cP>0.05不注)。如同一表中另有一套P值, 则^dP<0.05, ^eP<0.01; 第3套为^fP<0.05, ^gP<0.01。P值后注明何种检验及其具体数字, 如P<0.01, t=4.56 vs 对照组等, 注在表的左下方。表内采用阿拉伯数字, 共同的计量单位符号应注在表的右上方, 表内个位数、小数点、±、-应上下对齐。“空白”表示无此项或未测, “-”代表阴性未发现, 不能用同左、同上等。表图勿与正文内容重复。表图的标目尽量用t/min, c/(mol/L), p/kPa, V/mL, t/°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 cm×4.5 cm, 必须使用双面胶条粘贴在正文内, 不能使用浆糊粘贴。(5)志谢 后加冒号, 排在讨论后及参考文献前, 左齐。

肝上皮样血管平滑肌脂肪瘤2例

马华玲, 杨赤兵, 陈卫斌, 张文娟, 李玲

马华玲, 杨赤兵, 陈卫斌, 张文娟, 李玲, 武钢总医院病理科
湖北省武汉市 430080

作者贡献分布: 此课题由马华玲、杨赤兵及陈卫斌设计; 图片由李玲采集; 临床资料采集由张文娟完成; 本论文写作由马华玲完成。

通讯作者: 马华玲, 主治医师, 430080, 湖北省武汉市, 武钢总医院病理科, mahling@126.com

电话: 027-86487376

收稿日期: 2010-12-23 修回日期: 2011-02-27

接受日期: 2011-03-08 在线出版日期: 2011-04-08

Hepatic epithelioid angiomyolipoma: an analysis of two cases

Hua-Ling Ma, Chi-Bing Yang, Wei-Bin Chen,
Wen-Juan Zhang, Ling Li

Hua-Ling Ma, Chi-Bing Yang, Wei-Bin Chen, Wen-Juan Zhang, Ling Li, Department of Pathology, General Hospital of Wuhan Iron and Steel Corporation, Wuhan 430080, Hubei Province, China

Correspondence to: Hua-Ling Ma, Department of Pathology, General Hospital of Wuhan Iron and Steel Corporation, Wuhan 430080, Hubei Province, China. mahling@126.com

Received: 2010-12-23 Revised: 2011-02-27

Accepted: 2011-03-08 Published online: 2011-04-08

Abstract

AIM: To investigate the clinicopathologic characteristics of hepatic epithelioid angiomyolipoma (EAML).

METHODS: Two cases of hepatic EAML treated at General Hospital of Wuhan Iron and Steel Corporation from 2007 to 2009 were analyzed in this study. The clinicopathologic and immunohistochemical characteristics of the disease were described and the related literature was reviewed.

RESULTS: Both patients are female. Both cases of hepatic EAML had clear boundaries. The tumors were characterized by diffused epithelioid neoplastic cells. The epithelioid cells were round with eosinophilic or clear cytoplasm, and few neoplastic cells showed cellular atypia. Immunohistochemically, the neoplastic cells were diffusely positive for HMB45, Melan-A and SMA.

CONCLUSION: Hepatic EAML is a rare mesen-

chymal neoplasm. The diagnosis and differential diagnosis of EAML rely mainly on histopathology and immunohistochemistry.

Key Words: Hepatic neoplasms; Epithelioid angiomyolipoma; Perivascular epithelioid cell tumor

Ma HL, Yang CB, Chen WB, Zhang WJ, Li L. Hepatic epithelioid angiomyolipoma: an analysis of two cases. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2011; 19(10): 1071-1074

■背景资料

肝上皮样血管平滑肌脂肪瘤(EAML)是一种罕见间叶性肿瘤, 近年本病报道呈上升趋势; 因此肝EAML的准确诊断对于提高该类肿瘤的认识显得尤为重要。

摘要

目的: 探讨肝上皮样血管平滑肌脂肪瘤的病理诊断及鉴别诊断。

方法: 收集武钢总医院病理科2007-2009年手术切除肝上皮样血管平滑肌脂肪瘤标本2例, 对2例肝上皮样血管平滑肌脂肪瘤相关临床资料、病理学特征及免疫组织化学进行观察分析并复习相关文献。

结果: 2病例均为女性, 巨检境界较清楚, 镜下见肿瘤主要由弥漫的上皮样细胞构成, 排列呈不规则梁索状结构, 瘤细胞圆形或多角形, 核呈圆形或卵圆形, 无明显异型性。免疫组织化学示HMB45、Melan-A和SMA均有阳性表达。

结论: 肝上皮样血管平滑肌脂肪瘤是极为罕见的间叶性肿瘤, 其诊断及鉴别诊断主要依靠组织病理学及免疫组织化学。

关键词: 肝肿瘤; 上皮样平滑肌脂肪瘤; 血管周上皮样细胞肿瘤

马华玲, 杨赤兵, 陈卫斌, 张文娟, 李玲. 肝上皮样血管平滑肌脂肪瘤2例. 世界华人消化杂志 2011; 19(10): 1071-1074

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/1071.asp>

0 引言

典型的血管平滑肌脂肪瘤是血管周上皮样细胞肿瘤, 由血管、平滑肌、脂肪3种成分组成^[1]。上皮样血管平滑肌脂肪瘤(epithelioid angiomyolipoma, EAML)亦称单形性上皮样血管平滑肌脂肪瘤, 肿瘤仅由上皮样平滑肌细胞组成, EAML

■同行评议者
王鲁平, 主任医师, 中国人民解放军北京军区总医院病理科

■创新盘点

本文就2例罕见的EAML的临床病例病理特点进行总结, 可提高病理及临床医师对该病的认识。

多见于肾脏^[2], 近年来发生在肝脏的EAML引起了医师的兴趣。发生在肝脏的EAML国内、外报道少见。本文报道2例肝EAML, 结合其临床表现、组织形态和免疫表型, 探讨肝EAML的临床病理特征和鉴别诊断依据, 以提高病理及临床医师对该病的认识。

1 材料和方法

1.1 材料 2例肝上皮样血管平滑肌脂肪瘤是武钢总医院病理科2007-2009年手术切除标本。患者1: 女, 38岁, 体检发现肝脏占位; B超显示肝脏右叶有一占位性病变5.0 cm×4.0 cm×3.5 cm, 境界清楚, 混合密度, 未见肝脏以外的脏器有病变; 实验室检查: 包括AFP在内的所有项目均在正常范围内。患者2: 女, 53岁, 无诱因上腹不适感3 mo, 腹胀, 轻微疼痛; CT显示肝右叶见8.0 cm×8.0 cm×7.0 cm巨大实质性占位, 边界清晰, 似有假包膜, 肿块内见较丰富的血流信号, 考虑肝细胞癌可能性大; 实验室检查: 肝功正常, 血清AFP、CA-199阴性。2例患者均行部分肝切除术, 未行其他辅助治疗, 分别随访17及12 mo, 均病情稳定, 未见复发或转移。

1.2 方法 2例标本经40 g/L甲醛溶液固定, 常规石蜡包埋, 连续组织切片, 4-5 μm厚, 进行苏木精-伊红(HE)染色。在光镜下观察其组织病理学特点, 并选取典型病变区域, 采用SP法分别进行HMB45、Melan-A、SMA、PCK、EMA、 AFP、CEA及S-100的免疫组织化学染色。抗体均购自福州迈新生物技术开发公司。用PBS代替一抗做阴性空白对照; 阳性对照采用已知阳性组织切片; DAB显色, 苏木素复染, 常规脱水透明封片。

2 结果

2.1 病理检查

2.1.1 巨检: 患者1: 部分肝组织6.0 cm×5.0 cm×4.0 cm, 切面见灰红色肝组织中有一灰白色肿块5.0 cm×4.2 cm×3.5 cm, 境界清楚, 硬度中等, 质地细腻, 无出血坏死。患者2: 部分肝组织10.0 cm×10.0 cm×8.0 cm大小, 切面见8.0 cm×8.0 cm×7.0 cm包块, 肿瘤与周边挤压的肝组织界限清楚, 无包膜, 呈淡黄色颗粒状, 局部区域见小出血灶, 质脆。

2.1.2 镜检: 2例肿瘤形态相似, 失去正常肝小叶结构, 细胞多弥漫呈巢状和片状排列(图1A)。主要由大、多边形上皮样细胞构成, 排列呈不规则梁索状结构, 被丰富窦隙状薄壁血管网分隔;

瘤细胞圆形或多角形, 胞质丰富, 呈弱嗜酸性或透明状; 核呈圆形或卵圆形, 染色质细, 无明显异型性, 核仁清楚, 核分裂象罕见(图1B); 可见单核或多核的上皮样细胞、平滑肌及脂肪组织不规则分布在瘤组织内, 血管成分的形态不一, 可有厚壁血管和薄壁血管, 瘤组织中可见梭形细胞的聚集和灶状经典的血管平滑肌脂肪瘤区域。肿瘤周边肝组织未见特殊改变。

2.2 免疫组织化学 肿瘤HMB45、Melan-A和SMA均有阳性表达, 阳性信号均为黄色、棕黄色颗粒, 定位于胞质, 呈弥漫性或灶性分布。其中SMA表达较为弥漫, 且呈强阳性(图2A); Melan-A和HMB45呈弥漫或灶性表达(图2B)。2病例肿瘤细胞均不表达PCK、EMA、AFP、CEA及S-100。

2.3 病理诊断 病理诊断患者为肝EAML。

3 讨论

Mai等^[3]1996年报道了第1例肾脏EAML, 近年来人们逐渐认识和接受了EAML, 并认为此类肿瘤是一种具有恶性潜能的间叶肿瘤。关于EAML的来源问题, 更多的人接受EAML属于血管周围上皮样细胞瘤(perivascular epithelioid cell tumor, PECom)家族成员的理论^[4]。PECom家族包括肾AML、肺透明细胞“糖”瘤、镰状韧带透明细胞黑色素细胞肿瘤、肺淋巴管肌瘤病、肾被膜瘤、肾微小错构瘤、镰状韧带/圆韧带的透明细胞上皮样肿瘤等。这些肿瘤共同特点是肿瘤细胞表达黑色素细胞标记, 同时不同程度表达平滑肌源性标记。本文中2例EAML中黑色素细胞标记(HMB45、Melan-A)和平滑肌源性标记(SMA)均呈阳性表达, 具备一般PEComa的免疫组织化学特点。

文献报道, 肝EAML患者发病年龄范围较广[26-60(平均年龄47)岁], 男女之比为1:4, 女性明显多见, 肿瘤较小时多无临床症状, 偶尔体检时被发现; 肿瘤较大时可有腹胀、腹部包块等症状^[5,6]。本组2例均为女性与文献基本相符。由于EAML缺乏脂肪成分, 在超声和CT检查时很难与其他间叶肿瘤及癌区别^[6,7]。实验室检查一般项目均在正常范围内。肝EAML的发现靠术前CT、B超发现肝脏包块, 最后确诊有赖于病理学检查。EAML属于具有“恶性潜能”的肿瘤, 出现细胞的多形性甚至异型性、核分裂以及血管内瘤栓都不足以作为恶性的诊断依据, 诊断恶性EAML的确凿证据是发现远处转移^[8]。一旦明

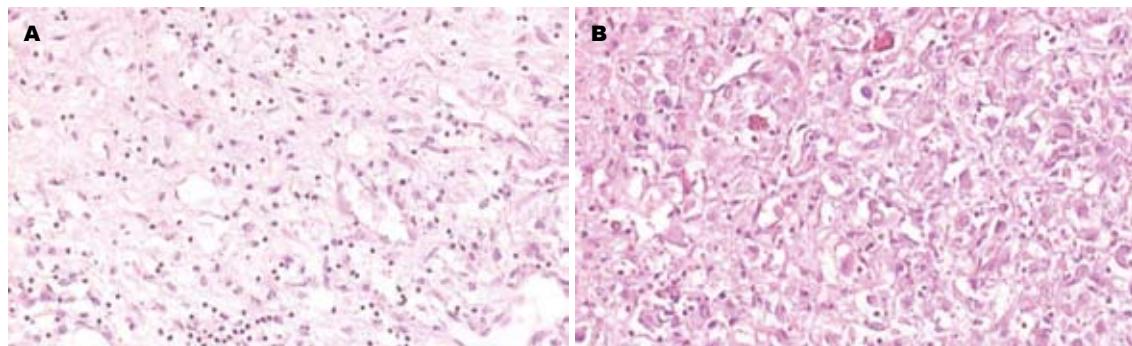


图 1 肝EAML组织病理改变(HE). A: 瘤细胞弥漫呈片状排列($\times 100$); B: 瘤细胞圆形或多角形, 胞质丰富, 呈弱嗜酸性和透明状; 核呈圆形或卵圆形($\times 200$).

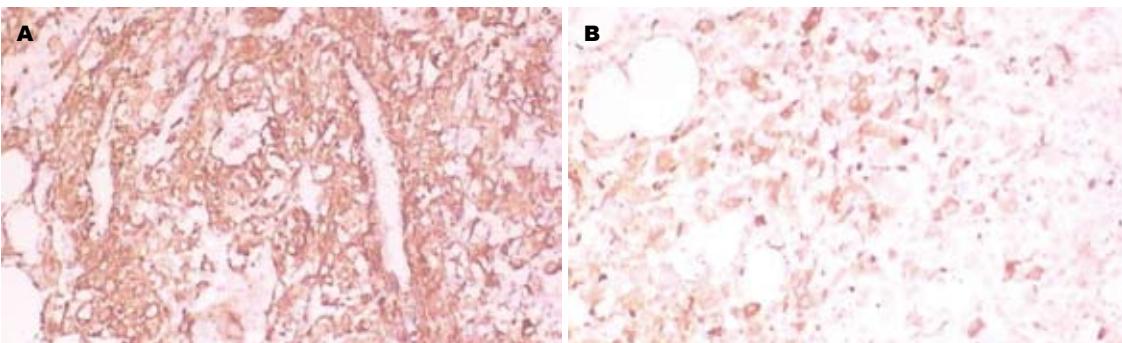


图 2 瘤细胞 SMA、HMB45 的表达(SP $\times 100$). A: SMA 胞质弥漫表达, 呈强阳性; B: HMB45 胞质弥散表达, 呈阳性.

确诊应首选手术切除, 预后较好. 考虑EMAL的潜在恶性倾向, 术后定期随访、复查是必要的. 该2例患者术后未进行后续治疗, 分别随访17及12 mo, 均病情稳定, 未复发或转移.

大体所见肝脏EAML一般为界限清楚或有假包膜的实质性肿块. 边缘与邻近肝实质通常为推挤而不是浸润的关系; 肿块切面灰白、灰黄, 可伴有出血及坏死. 瘤组织主要由大的多边形、圆形上皮样细胞构成, 排列成不规则梁索状结构, 并由大小不等的丰富窦隙状薄壁血管网分隔. 瘤细胞有两种形态: 一种胞质透亮, 周边有空泡形成, 中央嗜伊红细颗粒聚集成块; 另一种胞质内充满嗜伊红细颗粒, 细胞周边深染, 中央淡染, 类似于印戒细胞. 瘤细胞核为圆形、卵圆形, 染色质细, 核仁较明显, 核分裂象罕见. 瘤组织中可见梭形细胞的聚集和灶状经典的AML区域. 周围肝组织未见硬化等特殊改变. 部分区域肿瘤细胞可能退变、坏死, 肿瘤间质中可见不等量散在的淋巴细胞、浆细胞、嗜酸性粒细胞等炎细胞浸润. Li等^[9]在51例肝EAML研究示HMB45的阳性率为98.04%, SMA的阳性率为95.92%. 肿瘤细胞特征性的免疫表型是黑色素细胞(HMB45、Melan-A)和平滑肌细胞(SMA)标

记阳性, 而上皮细胞标记(CK、EMA)阴性. 该免疫组织化学结果与文献在肾的EAML研究中一致^[10]. 文献[9]报道EAML的超微结构: 有具有平滑肌细胞特性的梭形细胞; 有些梭形细胞内含有脂滴, 提示为平滑肌细胞和脂肪细胞间的转换型细胞. 细胞内可见类似黑色素小体的结构及致密颗粒.

肝EAML的诊断一般借助HE、免疫组织化学均能明确诊断. 肝EAML诊断时要与其他肿瘤鉴别^[11], 这些肿瘤包括: (1)肝细胞癌, 尤其透明细胞型肝细胞癌由上皮样细胞构成, 胞质透亮, 核仁嗜酸性, 易与肝EAML混淆. 肝细胞肝癌中癌细胞皆有不同程度的异型性及较多的核分裂象, 有假腺样结构及胆汁淤积, 周围肝组织常有肝硬化; 免疫组织化学: 肝细胞癌CK及AFP均阳性, 而HMB45及SMA标记阴性; (2)原发/转移的黑色素瘤, 肝原发性黑色素瘤极为罕见, 转移性黑色素瘤有黑色素瘤的病史, 镜下黑色素瘤细胞有明显的异型性和较多的核分裂, 免疫组织化学S-100、HMB45和Melan-A阳性, 但SMA呈阴性. 肝EAML弥漫表达HMB-45、SMA, 而且肝EAML有经典的AML成分残留; (3)转移性肾透明细胞癌, 需结合病史、临床表现

■应用要点
与一般的肝脏肿瘤相比, 肝EAML的形态学特征有一定差异, 当不易与其他肿瘤鉴别时, 可应用免疫组织化学及电镜观察.

■同行评价

本文选题恰当, 但可读性一般。

和免疫组织化学进行鉴别, 癌细胞CK、EMA阳性, HMB-45、SMA阴性; 与肝EAML相反。肝脏EAML还应与肝血管肉瘤、肉瘤样癌、透明细胞肉瘤、肝母细胞瘤、副节瘤、嗜酸细胞腺瘤等进行鉴别。

总之, 肝EAML发病率很低, 是一种极为罕见的具有恶性潜能间叶性肿瘤, 他起源于血管周上皮样细胞, 有特定的组织学特点和免疫组织化学表达, 手术切除后预后较好; 诊断肝EAML时应与肝脏的原发和转移性肿瘤进行鉴别。

4 参考文献

- 1 Folpe AL, Mentzel T, Lehr HA, Fisher C, Balzer BL, Weiss SW. Perivascular epithelioid cell neoplasms of soft tissue and gynecologic origin: a clinicopathologic study of 26 cases and review of the literature. *Am J Surg Pathol* 2005; 29: 1558-1575
- 2 Morioka M, Kinugawa K, Funabiki S, Matsuda T, Furukawa Y, Wani Y. Monotypic epithelioid angiomyolipoma of the kidney: a case report. *Int J Urol* 2006; 13: 1240-1242
- 3 Mai KT, Perkins DG, Collins JP. Epithelioid cell variant of renal angiomyolipoma. *Histopathology* 1996; 28: 277-280
- 4 Armah HB, Parwani AV. Perivascular epithelioid cell tumor. *Arch Pathol Lab Med* 2009; 133: 648-654
- 5 Park HK, Zhang S, Wong MK, Kim HL. Clinical presentation of epithelioid angiomyolipoma. *Int J Urol* 2007; 14: 21-25
- 6 Zeng JP, Dong JH, Zhang WZ, Wang J, Pang XP. Hepatic angiomyolipoma: a clinical experience in diagnosis and treatment. *Dig Dis Sci* 2010; 55: 3235-3240
- 7 毕卫群, 陈静静, 华辉, 冉雯雯, 李颖端, 纪清连. 肾脏上皮样血管平滑肌脂肪瘤的螺旋CT表现及病理对照研究. 医学影像学杂志 2009; 19: 1591-1594
- 8 Kato I, Inayama Y, Yamanaka S, Ohshiro H, Gomi K, Shirai S, Aoki I, Uemura H, Miyoshi Y, Kubota Y, Yao M, Nagashima Y. Epithelioid angiomyolipoma of the kidney. *Pathol Int* 2009; 59: 38-43
- 9 Li T, Fan J, Qin LX, Zhou J, Sun HC, Wang L, Ye QH, Qiu SJ, Tang ZY. [A clinicopathologic study of hepatic angiomyolipoma]. *Zhonghua Waike Zazhi* 2009; 47: 1536-1539
- 10 王兆亮, 朱建善, 陈以明, 王莉. 肾脏上皮样血管平滑肌脂肪瘤的免疫组织化学检测. 上海交通大学学报(医学版) 2010; 30: 722-725
- 11 Ding GH, Liu Y, Wu MC, Yang GS, Yang JM, Cong WM. Diagnosis and treatment of hepatic angiomyolipoma. *J Surg Oncol* 2011 Jan 31 [Epub ahead of print]

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•

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(核心板)》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)

肿瘤残余在肝癌微波消融治疗后出现的原因及防治

唐裕福, 张怡冰, 罗斌, 王学范, 林琳, 姜晓峰, 梁健

唐裕福, 罗斌, 王学范, 林琳, 姜晓峰, 梁健, 中国医科大学附属第四医院肝胆外科 辽宁省沈阳市 110032

张怡冰, 沈阳军区总医院干部科 辽宁省沈阳市 110015
辽宁省教育厅高校基金资助项目, No. 2009A729

作者贡献分布: 本课题由梁健设计; 所有患者手术由梁健、姜晓峰、唐裕福、王学范及林琳完成; 手术后患者随访由唐裕福、张怡冰及罗斌完成; 数据统计分析由唐裕福与张怡冰完成; 论文由唐裕福与梁健完成。

通讯作者: 梁健, 教授, 110032, 辽宁省沈阳市, 中国医科大学附属第四医院肝胆外科. liangj63110@vip.sina.com

收稿日期: 2010-11-15 修回日期: 2011-01-09

接受日期: 2011-01-21 在线出版日期: 2011-04-08

Partial response of hepatocellular carcinoma to percutaneous microwave ablation: risk factors and preventive measures

Yu-Fu Tang, Yi-Bin Zhang, Bin Luo, Xue-Fan Wang, Lin Lin, Xiao-Feng Jiang, Jian Liang

Yu-Fu Tang, Bin Luo, Xue-Fan Wang, Lin Lin, Xiao-Feng Jiang, Jian Liang, Department of Hepatobiliary Surgery, the Fourth Hospital of China Medical University, Shenyang 110032, Liaoning Province, China

Yi-Bin Zhang, Department of Personnel Administration, General Hospital of Shenyang Military Area Command, Shenyang 110015, Liaoning Province, China

Supported by: the Foundation of the Educational Commission of Liaoning Province, No. 2009A729

Correspondence to: Professor Jian Liang, Department of Hepatobiliary Surgery, the Fourth Hospital of China Medical University, Shenyang 110032, Liaoning Province, China. liangj63110@vip.sina.com

Received: 2010-11-15 Revised: 2011-01-09

Accepted: 2011-01-21 Published online: 2011-04-08

Abstract

AIM: To investigate the risk factors and preventive measures for partial response of hepatocellular carcinoma to percutaneous microwave ablation.

METHODS: The clinical data for 465 patients with hepatocellular carcinoma (796 tumor nodules) who underwent percutaneous microwave ablation from October 2004 to June 2010 were retrospectively analyzed. The risk factors and preventive measures for partial response to percutaneous microwave ablation were summarized.

RESULTS: Partial response occurred in 48 patients (69 tumor nodules), and the overall partial response rate was 9.15% (69/754). Of these 48 patients, 45 (64 tumor nodules) underwent percutaneous microwave ablation again and achieved complete ablation in 93.94% (62/64) of tumor nodules; 1 (2 tumor nodules) received percutaneous ethanol injection and achieved successful ablation; and 2 received palliative surgery. The incidence of partial response was positively correlated with large tumor diameter, tumor location (at the hepatic hilum or near the diaphragm or hepatic capsule), multiple tumors, and ill-defined margins on ultrasound(all $P < 0.01$), and complete ablation was negatively correlated with previous treatment by TACE (3.60% vs 12.39%, $P < 0.01$). Multivariate analysis showed that tumor size, number of nodules, tumor location, and previous treatment by TACE were independent risk factors for partial response of hepatocellular carcinoma to percutaneous microwave ablation.

CONCLUSION: Large tumor size, multiple tumors, subcapsular lesion, and previous treatment by TACE are often associated with partial response of hepatocellular carcinoma to percutaneous microwave ablation. Percutaneous microwave ablation is an effective and safe method for treatment of partial response of hepatocellular carcinoma.

Key Words: Microwave ablation; Hepatocellular carcinoma; Partial response

Tang YF, Zhang YB, Luo B, Wang XF, Lin L, Jiang XF, Liang J. Partial response of hepatocellular carcinoma to percutaneous microwave ablation: risk factors and preventive measures. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2011; 19(10): 1075-1080

摘要

目的: 探讨微波消融术后肿瘤残余的原因及防治措施。

方法: 回顾性总结了中国医科大学附属第四医院2004-10/2010-06 465例(796个肿瘤结节)

■背景资料

通过微波消融治疗肝癌在临幊上已经广泛应用于, 具有操作简单、安全、疗效确切等优点, 但也存在缺陷, 受肿瘤位置影响, 存在消融不全致肿瘤残余, 影响肝癌患者的生存时间。

■同行评议员
英卫东, 教授, 安徽省立医院肝胆外科

■ 相关报道

翟博等研究发现,随着肿瘤直径越大,消融后肿瘤活性组织的残余率越高.

肝癌患者行微波消融治疗的临床资料,分析了48例患者微波消融术后肿瘤残余的原因.

结果: 436例患者(754个肿瘤结节)获得有效复查资料,其中48例(48/436, 11.01%)患者69个(69/754, 9.15%)肿瘤结节存在消融后肿瘤残余. 45例残余肿瘤患者的66个肿瘤结节再次接受微波消融治疗,62个肿瘤获得完全消融,完全消融率为93.94%. 1例患者的2个肿瘤结节再次接受无水乙醇消融治疗,均获得完全消融. 2例患者接受肝癌切除治疗,其中1例在术后1 mo仍有残余肿瘤. 统计学检验结果显示,肿瘤直径较大、肿瘤位置特殊(肝门部、临近空腔脏器及近膈顶)、多发肿瘤、超声显像模糊者更容易发生肿瘤残余(均 $P<0.01$),结合肝动脉栓塞化疗(TACE)治疗可提高微波完全消融率(3.60% vs 12.39%, $P<0.01$). 进一步的多因素Logistic回归分析提示:肿瘤大小、肿瘤部位、肿瘤数目,结合TACE治疗是微波消融术后肿瘤残余的独立影响因素,分别为肿瘤直径较大者($OR = 5.748, P = 0.016$)、肿瘤位置特殊者($OR = 8.343, P<0.01$)、多发性肿瘤($OR = 6.567, P = 0.001$)、结合TACE治疗者($OR = 8.232, P<0.01$).

结论: 肝癌微波消融术后局部肿瘤灶残留的相关因素包括肿瘤直径较大、肿瘤位置特殊、多发病灶、结合TACE治疗. 残留的局部肿瘤灶再次接受消融治疗仍是有效的治疗方法.

关键词: 微波消融; 肝癌; 肿瘤残余

唐裕福, 张怡冰, 罗斌, 王学范, 林琳, 姜晓峰, 梁健. 肿瘤残余在肝癌微波消融治疗后出现的原因及防治. 世界华人消化杂志 2011; 19(10): 1075–1080

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/1075.asp>

0 引言

微波消融属于局部热消融治疗的一种,目前被广泛应用于临床,具有操作简单、安全、疗效确切等优点,但也存在缺陷,如治疗范围有限、消融不全致肿瘤残余及复发等^[1],尤其是肿瘤残余严重影响肝癌患者的后续治疗^[2]. 本研究统计了中国医科大学附属第四医院2004-10/2010-06行微波消融治疗的465例原发性肝癌患者的临床资料,分析了微波消融术后局部肿瘤残余的影响因素,并对其防治进行了初步探讨.

1 材料和方法

1.1 材料 回顾性分析了中国医科大学附属第四医院2004-10/2010-06 6 mo间,住院的465例

肝癌患者(796个肿瘤结节)接受微波消融术治疗,其中男376例(80.9%),女89例(19.1%). 年龄24-79(平均53.8±11.8)岁. 单个肿瘤直径8-72(平均33.8±13.1) mm. 单个肿瘤结节352例(75.7%),多发结节113例(24.3%). 所有患者均通过超声引导下病灶穿刺活检病理证实为肝癌,其中肝细胞癌448例,胆管细胞癌17例.

1.2 方法

1.2.1 入选标准: (1)不接受手术及放化疗,仅同意微波消融治疗者; (2)外科手术很难切除的特殊病灶位置者; (3)年老体弱、难以耐受手术切除者; (4)手术切除或局部病灶消融治疗后复发者; (5)无肝外转移者,另外患者无明显凝血功能障碍、无肝性脑病、无顽固性腹水、近期无上消化道大出血等病史.

1.2.2 微波消融术: 应用GX-1型微波肿瘤治疗仪(中国南京亿高医疗机械厂),频率2 450 MHZ, 功率0-150 W(连续可调). ATL-3000型彩色超声仪(德国西门子公司)配合微波消融治疗. 麻醉采用静脉全身麻醉,首先在超声引导下穿刺肿瘤病灶行病理活检,然后行微波消融治疗. 微波输出功率60-80 W,每个穿刺点消融时间6-18 min, 直径>4 cm的病灶行多点消融,两穿刺针间距<3 cm,力求微波消融后的超声显示汽化强回声范围覆盖并超过肿瘤病灶.

1.2.3 微波消融肿瘤残余的评估标准: 参照文献[3]从两方面评估微波消融后是否存在肿瘤残余: (1)术后1-2 mo复查增强CT或MRI,显示病理性增强灶位于消融灶内或与消融灶相连; (2)肿瘤血清学指标(AFP、CEA、CA19-9),术后1-2 mo复查比术前增高.

1.2.4 微波消融术后肿瘤残余的相关影响因素: 统计分析肝癌做病灶微波消融术患者的临床资料及术后电话随访结果. 根据临床资料、结合文献[4,5]筛选下列指标作为可能影响肝癌病灶微波消融不全的相关因素: 年龄、性别、肿瘤大小、肿瘤部位(肝实质、邻近空腔脏器及膈顶、肝门部)、肿瘤结节数目、术前AFP值、术前肝功能分级、门脉癌栓、术前肝动脉栓塞化疗(transhepatic arterial embolization, TACE)及术中超声定位清晰度等.

统计学处理 应用SPSS15.0统计软件,单因素分析 χ^2 检验,对有统计学差异的指标做多因素Logistic回归分析, $P<0.05$ 为差异显著.

2 结果

2.1 微波消融术后肿瘤残余情况 465例肝癌患

者796个肿瘤病灶首次行微波消融术, 术后2 mo进行随访, 29例患者因各种原因失访, 失访率为6.23%; 获得有效复查资料的436例患者754个肿瘤中, 48例患者(11.01%, 48/436), 69个肿瘤(9.15%, 69/754)确认为微波消融术后肿瘤残余。

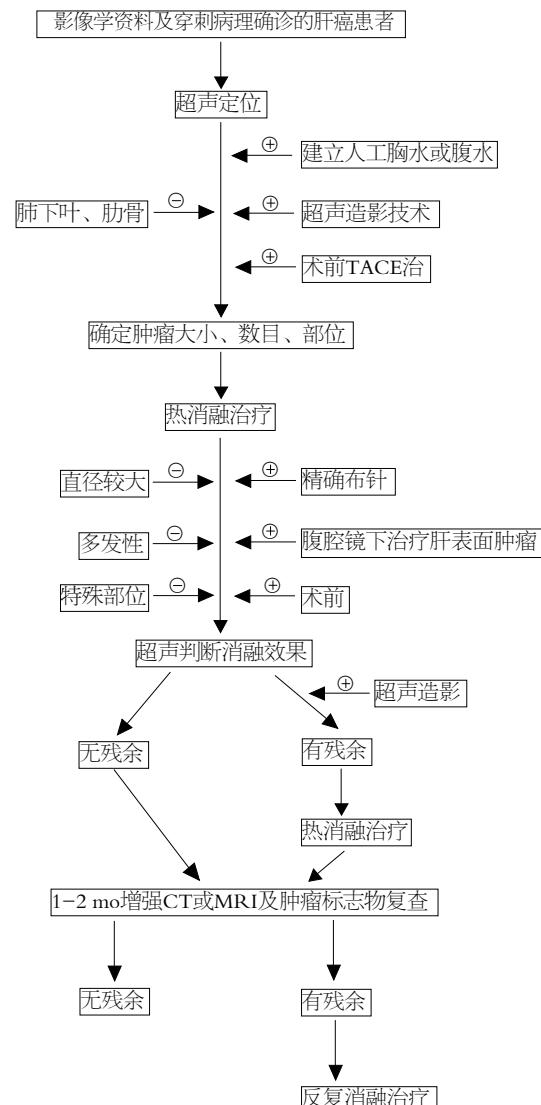
2.2 残余肿瘤的处理 其中45例确认肿瘤残余的患者再次接受微波消融治疗, 术后1-2 mo重新随访复查结果, 45例患者的66个肿瘤灶中62个病灶被完全消融, 完全消融率为93.94%。1例患者接受无水乙醇消融治疗, 术后1 mo复查肿瘤病灶被完全消融。2例患者接受肝癌切除手术, 术后复查1例患者存在肿瘤复发, 另1例未见肿瘤复发。通过对本次研究相关临床资料的总结及45例微波消融后肿瘤残余患者的处理, 初步总结了肝癌热消融后肿瘤残余的防治途径(图1)。

2.3 影响因素 应用SPSS15.0软件, χ^2 检验结果提示, 肿瘤直径较大、肿瘤特殊位置(肝门部、邻近空腔脏器及膈顶)、多发肿瘤、不易超声定位的病灶容易发生肿瘤残余(均 $P<0.01$), 术前行TACE治疗可提高微波完全消融($P<0.01$)。多因素Logistic回归分析提示, 肿瘤大小、肿瘤部位、肿瘤数目, 结合TACE治疗是微波消融术后肿瘤残余的独立影响因素, 结果分别为肿瘤直径较大者($OR = 5.748$, $P = 0.016$)、肿瘤特殊位置($OR = 8.343$, $P = 0.000$)、多发性肿瘤病灶($OR = 6.567$, $P = 0.001$)、结合TACE治疗者($OR = 8.232$, $P = 0.000$, 表1, 2)。

3 讨论

随着微波消融治疗技术在临床肝癌的广泛应用, 有关其并发症的临床报道越来越受到人们的关注。对肝癌病灶的微波消融微创治疗的主要并发症包括出血、肿瘤残余(消融不全)、胆汁漏、肝脓肿、血气胸、周围脏器损伤、经针道的肿瘤转移, 术中血红蛋白尿等^[1,6,7]。其中肿瘤残余是对肝癌局部热消融治疗后、近期肿瘤复发的主要原因, 对肝癌的后续治疗至关重要^[2], 因此深入研究微波消融术后肝癌肿瘤残余的原因, 对提高肝癌患者的生存时间具有重要的临床意义。

参考文献[8-10], 本研究主要涉及以下因素进行探讨: (1)患者情况, 例如年龄、性别、肝功能分级等; (2)与治疗相关的因素, 例如热消融的功率和时间、热消融针道的选择、术前是否行TACE治疗等; (3)局部肿瘤病灶的相关因素, 例如肿瘤大小、生长位置及与邻近器官的关系、病灶的数目等。统计分析结果提示: 肿瘤大



■创新盘点

本研究通过总结45例微波消融治疗后肿瘤残余的肝癌患者的临床资料, 系统地探讨了微波消融治疗后肿瘤残余的相关影响因素及其防治措施。

图1 肝癌热消融后肿瘤残余的防治.

小、肿瘤病灶的特殊位置、肿瘤数目以及术前TACE是微波消融后局部肿瘤残余的重要相关因素。

肿瘤大小是影响肝癌热消融治疗效果的主要因素之一^[3-5,8-11], Komorizono等^[8]研究证实肿瘤直径 >2 cm是局部残余肿瘤复发的危险因素。翟博等^[3]研究发现, 随着肿瘤直径越大, 消融后肿瘤活性组织的残余率越高。本研究亦证实了同样结论。直径大的肿瘤消融治疗后容易残留的原因: (1)肿瘤直径过大, 消融时容易出现三维上的漏空, 导致病灶消融不完全^[12]; (2)临床常选择多点消融, 但存在消融重叠和盲区; (3)直径越大其边界常不规则, 消融时其安全边缘常不易确定, 很难做到一次性消融完全^[3]; (4)肿瘤直径越大, 其分化越差、侵袭性越强, 更易发生肿瘤微转移, 更容易在肿瘤较远的地方形成卫星灶^[13]; (5)采用超声波下判断消融的范围, 由于大肿瘤

■应用要点

本研究总结了肝癌微波消融治疗后肿瘤残余的相关影响因素, 分别为肿瘤大小、肿瘤部位、肿瘤数目及术前TACE; 术前TACE可以提高肿瘤完全消融率; 微波消融治疗后患者应早期复查CT或MRI及肿瘤血清学指标, 及时发现残余肿瘤; 对于残余肿瘤, 再次消融治疗仍是安全有效的治疗方法。

表1 微波消融治疗后肿瘤残余患者的临床资料

临床资料	消融的肿瘤数目(n)	消融不全 ¹ 的肿瘤数目(n)	肿瘤残余率(%)	χ^2 值	P值
性别					
男	637	56	8.79	0.640	0.424
女	117	13	11.11		
年龄(岁)					
>60	211	22	10.43	0.573	0.449
<60	543	47	8.66		
肿瘤大小(cm)					
3	493	39	7.91	42.006	0.000
3~5	217	14	6.45		
>5	44	16	36.36		
肿瘤部位					
肝实质内	391	23	5.88	39.903	0.000
包膜下	159	13	8.18		
近肝膈顶	72	21	29.17		
肝门部	132	12	9.09		
肿瘤结节数目					
单发	328	18	5.49	9.371	0.002
多发	426	51	11.97		
肿瘤分化程度					
低分化	207	20	9.66	0.102	0.950
中分化	286	26	9.09		
高分化	261	23	8.81		
术前AFP值(μg/L)					
<200	274	21	7.66	1.145	0.285
200	480	48	10.00		
Child-Pugh肝功能分级					
Child A	495	42	8.48	0.770	0.380
Child B	259	27	10.42		
门脉癌栓					
有	178	16	8.99	0.001	0.982
无	586	53	9.04		
结合TACE					
有	278	10	3.60	16.339	0.000
无	476	59	12.39		
超声定位清晰度					
清晰	582	41	7.04	13.618	0.000
模糊	172	28	16.28		

¹: 肿瘤残余。

多点消融产生的局部汽化增强改变, 影响了再次穿刺的精确把握。

肝内病灶数目也是影响局部消融治疗效果的因素之一^[4]。本次研究证实多发性肿瘤微波消融治疗后更容易发生肿瘤残余, 这可能与以下因素有关: (1)肝内多发性肿瘤提示已发生肝内转移, 即使肉眼可见的肿瘤全部被消融仍然存在肿瘤的微转移; (2)多发性肿瘤, 常因为相邻肿瘤间距较近, 肿瘤消融后的汽化改变掩盖了相

邻病灶, 导致相邻肿瘤穿刺定位不准。

文献报道^[3~4,8~11]及本研究均证实肿瘤部位是热消融后肿瘤残余的危险因素。本次研究结果还显示, 肝门部、邻近空腔脏器及膈顶的肿瘤容易发生消融后肿瘤残余。(1)邻近空腔脏器及膈顶的肿瘤易发生消融后出血、感染、周围脏器损伤等并发症^[1,14]; (2)由于病灶消融的安全边缘不易确定, 也容易发生针道转移^[8]; (3)近膈顶部肿瘤可因肺叶、肋骨的覆盖使超声显影困难;

表 2 微波消融后肿瘤残余的多因素Logistic回归分析

项目	OR值	P值	95%CI
肿瘤大小	5.748	0.016	1.388–23.795
肿瘤部位	8.343	0.000	2.940–23.678
肿瘤数目	6.567	0.001	2.231–19.332
结合TACE	8.232	0.000	2.549–26.580

(4)肝门部的肿瘤消融常有残余, 一方面临近大血管, 血液循环带走部分热量^[15-17], 致使肿瘤消融温度不够。另一方面肝门部管道结构密集, 微波针穿刺方向不易掌握, 出于安全考虑, 存在消融盲区导致消融后肿瘤残余^[3]。

有关热消融治疗联合TACE治疗的研究证实了治疗前TACE有利于增大局部热消融的范围^[3,17]。本研究结果证实先行TACE治疗的肿瘤残余率明显低于未结合TACE的患者。可能性包括: (1)阻断肝动脉血流, 减少了“热流失效应”, 提高热消融的效率; TACE治疗后碘油可引起周围性栓塞使肿瘤内血供减少, 进而提高热消融的效率^[17]。此外TACE治疗后肿瘤组织缺血和炎性水肿, 可以增大微波消融的范围^[18]; (2)碘油沉积使肿瘤位置及边界显影更加清晰^[19]; (3)TACE可使肿瘤体积减小, 使微波消融的效果更明显^[19]。

总之, 肿瘤相关因素是肝癌热消融治疗后肿瘤残余的最重要影响因素, 先行TACE治疗可以提高肿瘤的完全消融率。我们认为通过如下途径对防治热消融后肿瘤残余有临床意义: (1)对于直径较大、多发性肿瘤及肝门部的肿瘤, 最好先做TACE治疗; (2)直径>3 cm的肿瘤, 建议采用多点消融方式治疗。Chen等^[20]研究发现, 应用数学公式决定肿瘤消融点数及精确、合理的空间排布可以扩大消融范围, 降低肿瘤残余率; (3)对于位于肝脏表面的肿瘤, 有学者利用腹腔下局部消融取得较满意的效果^[21,22], 其定位直观清楚、引导穿刺准确, 可以在腹腔下即时观察肿瘤消融的情况, 并可以避免损伤周围脏器; (4)消融后即刻应用超声造影技术, 能区分无灌注的凝固区域和有灌注的残癌区域^[23], 有利于残癌的及时发现。对残余肿瘤若能及时再次消融治疗, 可以提高完全消融率; (5)对于微波消融治疗的患者, 治疗后1-2 mo应常规复查CT或MRI及肿瘤血清学指标(AFP、CEA、CA19-9)。本研究组的肿瘤残余患者, 绝大多数再次接受微波消融治疗, 取得良好的临床效果。

此外, 临床操作时尚有许多环节影响局部

热消融的治疗效果, 例如操作熟练程度及超声技术熟练程度^[24]、消融及超声等仪器设备的改良^[25,26]等。有关微波消融治疗后肿瘤残余的其他影响因素, 有待进一步研究。

■同行评价

本文设计合理, 讨论较全面, 内容较新颖, 对临床有一定的指导意义。

4 参考文献

- Shimada S, Hirota M, Beppu T, Matsuda T, Hayashi N, Tashima S, Takai E, Yamaguchi K, Inoue K, Ogawa M. Complications and management of microwave coagulation therapy for primary and metastatic liver tumors. *Surg Today* 1998; 28: 1130-1137
- Choi H, Loyer EM, DuBrow RA, Kaur H, David CL, Huang S, Curley S, Charnsangavej C. Radiofrequency ablation of liver tumors: assessment of therapeutic response and complications. *Radiographics* 2001; 21 Spec No: S41-S54
- 翟博, 陈夷, 刘晟, 李晓燕, 盛月红, 吴孟超. 原发性肝癌射频消融后肿瘤残留分析. 中华肝胆外科杂志 2009; 15: 254-258
- Liang P, Dong B, Yu X, Yang Y, Yu D, Su L, Xiao Q, Sheng L. Prognostic factors for percutaneous microwave coagulation therapy of hepatic metastases. *AJR Am J Roentgenol* 2003; 181: 1319-1325
- Kuvshinoff BW, Ota DM. Radiofrequency ablation of liver tumors: influence of technique and tumor size. *Surgery* 2002; 132: 605-611; discussion 611-612
- 郭大伟, 魏云涛, 侯学忠, 李宏伟, 梁健. 肝癌微波治疗术中出现血红蛋白尿的影响因素. 现代肿瘤医学 2009; 17: 503-507
- Huo TI, Huang YH, Wu JC. Percutaneous ablation therapy for hepatocellular carcinoma: current practice and future perspectives. *J Chin Med Assoc* 2005; 68: 155-159
- Komorizono Y, Oketani M, Sako K, Yamasaki N, Shibatou T, Maeda M, Kohara K, Shigenobu S, Ishibashi K, Arima T. Risk factors for local recurrence of small hepatocellular carcinoma tumors after a single session, single application of percutaneous radiofrequency ablation. *Cancer* 2003; 97: 1253-1262
- Hori T, Nagata K, Hasuike S, Onaga M, Motoda M, Moriuchi A, Iwakiri H, Uto H, Kato J, Ido A, Hayashi K, Tsubouchi H. Risk factors for the local recurrence of hepatocellular carcinoma after a single session of percutaneous radiofrequency ablation. *J Gastroenterol* 2003; 38: 977-981
- 夏景林, 叶生龙, 邹静怀, 任正刚, 干育红, 王艳红, 陈漪, 葛宁灵, 汤钊猷, 杨秉辉. 单次经皮射频消融治疗小肝癌的预后及复发危险因素分析. 癌症 2004; 23: 977-980
- Yu HC, Cheng JS, Lai KH, Lin CP, Lo GH, Lin CK, Hsu PI, Chan HH, Lo CC, Tsai WL, Chen WC. Factors for early tumor recurrence of single small hepatocellular carcinoma after percutaneous radiofrequency ablation therapy. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 1439-1444
- 谭开彬, 高云华. 超声引导下微波凝固在肝癌治疗中的应用及进展. 中国超声医学杂志 2000; 16: 390-392
- Llovet JM, Bruix J. Novel advancements in the management of hepatocellular carcinoma in 2008. *J Hepatol* 2008; 48 Suppl 1: S20-S37
- 翟博, 徐爱民, 盛月红, 刘晟, 李晓燕, 陈夷. 肝癌射频消融后针道出血防治21例. 世界华人消化杂志 2008; 16: 2423-2427
- Yu NC, Raman SS, Kim YJ, Lassman C, Chang X, Lu DS. Microwave liver ablation: influence of hepatic vein size on heat-sink effect in a porcine model. *J*

- 16 *Vasc Interv Radiol* 2008; 19: 1087-1092
- 16 Patterson EJ, Scudamore CH, Owen DA, Nagy AG, Buczkowski AK. Radiofrequency ablation of porcine liver in vivo: effects of blood flow and treatment time on lesion size. *Ann Surg* 1998; 227: 559-565
- 17 Ishida T, Murakami T, Shibata T, Inoue Y, Takamura M, Niinobu T, Sato T, Nakamura H. Percutaneous microwave tumor coagulation for hepatocellular carcinomas with interruption of segmental hepatic blood flow. *J Vasc Interv Radiol* 2002; 13: 185-191
- 18 肖震宇, 陈孝平, 黄志勇. 阻断肿瘤血供后微波凝固治疗肝癌的临床研究(附120例临床分析). 中华肝胆外科杂志 2005; 11: 806-808
- 19 Yang WZ, Jiang N, Huang N, Huang JY, Zheng QB, Shen Q. Combined therapy with transcatheter arterial chemoembolization and percutaneous microwave coagulation for small hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2009; 15: 748-752
- 20 Chen MH, Yang W, Yan K, Zou MW, Solbiati L, Liu JB, Dai Y. Large liver tumors: protocol for radiofrequency ablation and its clinical application in 110 patients--mathematic model, overlapping mode, and electrode placement process. *Radiology* 2004; 232: 260-271
- 21 Sakaguchi H, Seki S, Tsuji K, Teramoto K, Suzuki M, Kioka K, Isoda N, Ido K. Endoscopic thermal ablation therapies for hepatocellular carcinoma: a multi-center study. *Hepatol Res* 2009; 39: 47-52
- 22 Kawamoto C, Ido K, Isoda N, Hozumi M, Nagamine N, Ono K, Sato Y, Kobayashi Y, Nagae G, Sugano K. Long-term outcomes for patients with solitary hepatocellular carcinoma treated by laparoscopic microwave coagulation. *Cancer* 2005; 103: 985-993
- 23 Youk JH, Kim CS, Lee JM. Contrast-enhanced agent detection imaging: value in the characterization of focal hepatic lesions. *J Ultrasound Med* 2003; 22: 897-910
- 24 Poon RT, Ng KK, Lam CM, Ai V, Yuen J, Fan ST, Wong J. Learning curve for radiofrequency ablation of liver tumors: prospective analysis of initial 100 patients in a tertiary institution. *Ann Surg* 2004; 239: 441-449
- 25 Yu Z, Liu W, Fan L, Shao J, Huang Y, Si X. The efficacy and safety of percutaneous microwave coagulation by a new microwave delivery system in large hepatocellular carcinomas: four case studies. *Int J Hyperthermia* 2009; 25: 392-398
- 26 Hotta N, Fukuzawa Y, Ayada M, Sato K, Maeno T, Tagaya T, Okumura A, Ishikawa T, Ito Y, Kakumu S. A case of hepatocellular carcinoma (HCC) treated with radiofrequency ablation (RFA) using 4D real-time ultrasound system. *Hepatogastroenterology* 2005; 52: 1224-1227

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 •

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)

伴呼吸衰竭重症急性胰腺炎侵袭性真菌感染15例

骆雪萍, 叶宁, 夏炳杰

骆雪萍, 叶宁, 夏炳杰, 桂林医学院附属医院重症医学科 广西壮族自治区桂林市 541001

作者贡献分布: 骆雪萍负责设计及撰写论文; 叶宁与夏炳杰负责资料收集、数据整理。

通讯作者: 骆雪萍, 副主任医师, 541001, 广西壮族自治区桂林市乐群路15号, 桂林医学院附属医院重症医学科。

xueping-l@sohu.com

电话: 0773-2868080

收稿日期: 2011-01-28 修回日期: 2011-03-17

接受日期: 2011-03-23 在线出版日期: 2011-04-08

Invasive fungal infection in patients with severe acute pancreatitis and respiratory failure: an analysis of 15 cases

Xue-Ping Luo, Ning Ye, Bing-Jie Xia

Xue-Ping Luo, Ning Ye, Bing-Jie Xia, Intensive Care Unit, Affiliated Hospital of Guilin Medical College, Guilin 541001, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China
Correspondence to: Xue-Ping Luo, Intensive Care Unit, Affiliated Hospital of Guilin Medical College, 15 Lequn Road, Guilin 541001, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China. xueping-l@sohu.com

Received: 2011-01-28 Revised: 2011-03-17

Accepted: 2011-03-23 Published online: 2011-04-08

Abstract

AIM: To investigate the clinical characteristics of invasive fungal infection (IFI) in patients with severe acute pancreatitis (SAP) and respiratory failure.

METHODS: The clinical data for patients with SAP and respiratory failure who were treated in ICU between June 2003 and September 2009 were retrospectively analyzed. Patients were divided into three groups according to body fluid culture results and clinical features: invasive fungal infection (IFI), bacterial infection (BI), and non-infection (NI). APACHE II score, length of mechanical ventilation (MV), intra-abdominal pressure, percentage of patients developing multiple organ dysfunction syndrome (MODS) three times or more, surgical intervention, continuous renal replacement therapy (CRRT), mortality, and time required to isolate pathogen were compared among the three groups. Affected regions and pathogen species distribution of IFI were

also investigated.

RESULTS: IFI occurred in 27.27% (15/55) of patients with SAP and respiratory failure. Approximately 73.33% (11/15) of patients with IFI developed intra-abdominal fungal infection, with half of them (6/11) having ventilator-associated fungal pneumonia (VAFP). Compared to patients with BI and NI, patients with IFI had longer MV ($19.53 \text{ d} \pm 4.88 \text{ d}$ vs $14.14 \text{ d} \pm 4.26 \text{ d}$, $6.23 \text{ d} \pm 2.34 \text{ d}$, both $P < 0.05$), and higher rate of surgical intervention (86.67% vs 42.86%, 0.00%, both $P < 0.05$). Compared to patients with BI, the time required to isolate pathogen was longer in patients with IFI ($10.13 \text{ d} \pm 2.59 \text{ d}$ vs $5.14 \text{ d} \pm 2.21 \text{ d}$, $P < 0.05$) though they had similar mortality rate. Bacteria might be isolated before fungi were isolated in patients with intra-abdominal fungal infection and VAFP. Intra-abdominal fungal infection might be concomitant with enterococcal infection.

CONCLUSION: The abdomen is the main region affected by IFI in patients with SAP and respiratory failure. IFI patients often develop VAFP and concomitant bacteria infections. Appropriate management of intra-abdominal infection could improve poor prognosis in patients with SAP and respiratory failure.

Key Words: Severe acute pancreatitis; Respiratory failure; Invasive fungal infection; Species distribution of pathogens

Luo XP, Ye N, Xia BJ. Invasive fungal infection in patients with severe acute pancreatitis and respiratory failure: an analysis of 15 cases. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2011; 19(10): 1081-1084

摘要

目的: 研究伴呼吸衰竭的重症急性胰腺炎(SAP)患者侵袭性真菌感染(IFI)的临床特征,为SAP治疗提供参考。

方法: 回顾性分析监护病房2003-06/2009-09 55例伴呼吸衰竭SAP患者的临床资料,根据体液病原菌培养结果及临床表现,将其分为IFI组、细菌感染(BI)组及非感染(NI)组,比较3组

■背景资料

由于入住ICU的重症急性胰腺炎(SAP)患者普遍存在着侵袭性真菌感染(IFI)的危险因素如机械通气、各种侵入性操作、长期使用抗生素、全胃肠外营养等,近年来SAP IFI的发生率显著增加,严重影响患者的预后,增加病死率。

■同行评议者
谷俊朝, 主任医师, 首都医科大学附属北京友谊医院普外科

■研发前沿

早期IFI发生隐匿，缺乏特异临床表现，易被原发病掩盖，造成早期诊断困难，抗真菌治疗延误。IFI的早期诊断成为研究的热点。

APACHE II 评分、机械通气(MV)时间、腹内压、病原菌检出时间、MODS数 ≥ 3 发生率、外科干预率、CRRT率及病死率。调查IFI组感染部位、病原菌分布等。

结果：IFI率为27.27%(15/55)，以腹腔真菌感染为主，占73.33%(11/15)，其半数(6/11)合并呼吸机相关真菌肺炎(VAfp)。IFI组与BI、NI组比较，MV时间延长($19.53 \text{ d} \pm 4.88 \text{ d}$ vs $14.14 \text{ d} \pm 4.26 \text{ d}$, $6.23 \text{ d} \pm 2.34 \text{ d}$, 均 $P < 0.05$)，外科干预率升高($86.67\% \text{ vs } 42.86\%, 0.00\%$, 均 $P < 0.05$)。与BI组比较，病原菌检出时间延后($10.13 \text{ d} \pm 2.59 \text{ d}$ vs $5.14 \text{ d} \pm 2.21 \text{ d}$, $P < 0.05$)，病死率无差异。腹腔和肺部真菌检出前存在BI。部分腹腔真菌感染混合肠球菌感染。

结论：伴呼吸衰竭SAP IFI主要部位在腹腔，易合并VAfp，伴BI。应积极处理腹腔感染改善预后。

关键词：重症急性胰腺炎；呼吸衰竭；侵袭性真菌感染；病原菌分布

骆雪萍，叶宁，夏炳杰. 伴呼吸衰竭重症急性胰腺炎侵袭性真菌感染15例. 世界华人消化杂志 2011; 19(10): 1081-1084
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/1081.asp>

0 引言

重症急性胰腺炎(severe acute pancreatitis, SAP)是重症监护病房(intensive care unit, ICU)常见的危重症之一。随着呼吸机的普及和尽早应用，SAP因早期呼吸衰竭所致病死率降低，而多数患者死于之后的脓毒症以及由此发展而来的多器官功能不全综合征(multiple organ dysfunction syndrome, MODS)。因ICU患者普遍存在着侵袭性真菌感染(invasive fungal infection, IFI)的危险因素如机械通气(mechanical ventilation, MV)、各种侵入性操作、长时间使用抗菌素等，近年ICU IFI呈明显增多趋势，IFI是导致脓毒症的重要原因之一。但早期IFI发生隐匿，缺乏特异临床表现，易被原发病掩盖，常使抗真菌治疗延误。本文就近年伴呼吸衰竭SAP患者IFI进行回顾性分析，拟为SAP感染防治提供参考。

1 材料和方法

1.1 材料 SAP及IFI的诊断分别按《重症急性胰腺炎诊治指南》^[1]及《重症患者侵袭性真菌感染诊断与治疗指南》^[2]标准。分析桂林医学院附属医院ICU 2003 -06/2009-09伴呼吸衰竭进行有创MV等综合治疗48 h以上55例SAP患者的临床

资料。男41例，女14例，年龄33-83(平均49.48±2.75)岁。原发病：酒精性32例，胆源性20例，其他3例。确诊SAP后行常规治疗，补充容量，液体复苏，应用胰酶抑制剂，抑酸、禁食、留置胃管或胃空肠液囊管，胃肠减压，胃管内注入硫酸镁、大黄等，行气管插管MV纠正低氧血症，行中心静脉置管、营养支持治疗、留置尿管、预防性使用抗菌素，每天监测腹内压(intra-abdominal pressure, IAP)2-3次。外科干预(手术或腹腔穿刺置管灌洗引流)情况：对腹腔渗液多，腹内压增高、脏器功能障碍但无手术条件者，行B超引导下经皮腹腔穿刺置管灌洗引流术；对经强化的ICU治疗，脏器功能障碍呈进行性加重、有手术条件者中转手术治疗。

1.2 方法

1.2.1 病原菌分离：SAP患者入ICU后连续3 d留取以下体液：(1)下呼吸道分泌物：经气管插管吸取下呼吸道分泌物；(2)外周血及中心静脉导管血；(3)腹腔引流液(腹腔引流管存在时)：腹腔灌洗术后经引流管留取或手术中及手术后留取；(4)中段清洁尿；(5)大便。将以上标本送细菌室做病原菌培养及药敏试验，每2-3 d重复以上操作。凡连续2次及2次以上培养出同种细菌或/和真菌方确定为病原菌。同一次培养分离出两种病原菌即认为是混合感染。不重复计入同一患者分离到的相同菌株。

1.2.2 分组及相关危险因素比较：根据患者各种体液病原菌培养结果，并结合临床表现，将其分为侵袭性真菌感染组(IFN，只要分离到真菌就归于此)、细菌感染组(bacterial infection, BI，分离到细菌)、非感染组(non-infection, NI，未分离到病原菌)。根据IFI危险因素^[2]将本资料中共有的危险因素如MV、中心静脉置管、胃肠道外营养等剔除，比较3组的急性生理与慢性健康评分(acute physiology and chronic health evaluation II, APACHE II)、MV时间(d)、IAP(cmH₂O)、病原菌检出时间(d)、MODS数 ≥ 3 发生率、外科干预(手术或腹腔灌洗引流)率、连续肾脏替代治疗(continuous renal replacement therapy, CRRT)率及病死率。调查IFI组感染部位及病原菌分布等。

统计学处理 所有数据使用SPSS13.0统计软件处理。计数资料分析用 χ^2 检验。计量资料用mean±SD表示，用非参数统计(秩和检验)。 $P < 0.05$ 有统计学意义。

2 结果

2.1 患者感染情况 55例患者29例发生感染，感染

表 1 3组相关危险因素比较

分组	n	APACHE II	MV时间 (d)	IAP (cmH ₂ O)	病原菌检 出时间(d)	MODS数 ≥3(%)	外科干预 (%)	CRRT (%)	病死率 (%)
IFI组	15	20.07 ± 3.81	19.53 ± 4.88	24.20 ± 3.82	10.13 ± 2.59	53.55	86.67	46.67	26.67
BI组	14	18.29 ± 3.29	14.14 ± 4.26 ^a	22.14 ± 2.68	5.14 ± 2.21 ^a	42.86	42.86 ^a	28.57	21.43
NI组	26	12.42 ± 2.02 ^a	6.23 ± 2.34 ^a	17.30 ± 1.89 ^a		7.6 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a

^aP<0.05 vs IFI组.

表 2 真菌感染部位及分布

	腹腔(n)	肺部(n)	血源(n)	构成比(%)
白色念珠菌	7	3	2	57.14
热带念珠菌	4	2	0	28.57
近平滑念珠菌	0	0	2	9.52
光滑念珠菌	0	1	0	4.76

肺部: 呼吸机相关真菌肺炎.

率52.73%. IFI组15例, BI组14例, NI组26例. 真菌感染率27.27%(15/55).

2.2 3组相关危险因素比较 IFI组较BI组MV时间延长、外科干预率高、病原菌检出时间延后(均P<0.05), 而APACHE II、腹内压、MODS数≥3率、CRRT及病死率无显著性差异(均P>0.05). IFI组与NI组比较APACHE II、MV时间、IAP、MODS数≥3率、外科干预率、CRRT及病死率均有显著性差异(均P<0.05, 表1).

2.3 IFI组感染部位及真菌分布 共检出4种21株念珠菌. 腹腔真菌感染11例, 占73.33%(11/15), 其中6例同时发生肺部真菌感染. 单纯血源真菌感染4例, 占26.67%(4/15)(表2).

2.4 合并细菌感染情况 81.82%(9/11)腹腔真菌检出前存在腹腔细菌感染, 分别为大肠埃希菌7例, 肠杆菌1例, 粪肠球菌1例. 腹腔混合感染粪肠球菌3例, 尿肠球菌1例. 100%(6/6)肺部真菌检出前存在肺部细菌感染, 3例铜绿假单胞菌, 2例嗜麦芽窄食单胞菌, 1例鲍曼不动杆菌.

2.5 抗生素使用情况及预后 所有患者入ICU后均首选抗革兰阴性杆菌抗生素, 其中使用第3代头孢+甲/奥硝唑40例, 使用喹诺酮类15例. 真菌及革兰阳性球菌检出前均未行预防性抗真菌和抗球菌治疗. 因腹腔感染不能控制致MODS死亡7例.

3 讨论

近年SAP IFI的发生率显著增加^[3]. 有资料^[4]显示50例SAP患者真菌感染率36%, 以腹腔真菌

■相关报道

有动物实验证实SAP使用抗菌素6-9 d后出现肠道真菌易位. 临床研究显示SAP在使用抗菌素7-12 d时预防性使用氟康唑治疗可明显降低SAP患者的真菌感染发生率、病死率, 缩短住院时间.

感染为主占61.11%, 腹腔真菌感染率22%. Vege等^[5]回顾性分析了207例SAP, 发生腹腔真菌感染为15%, 真菌感染组住ICU时间长于细菌感染组, 真菌感染组较非感染组MV率高. 本组伴呼吸衰竭SAP IFI率为27.27%(15/55), 仍以腹腔真菌感染为主占73.33%(11/15), 腹腔真菌感染率20%(11/55), MV时间IFI组比BI组明显延长, 提示真菌感染使病情复杂化, 需要呼吸机支持治疗时间延长, 反之长时间MV应警惕IFI的发生.

本组SAP患者除了存在IFI的危险因素外如病情危重、MV、完全胃肠道外营养等, 还普遍存在腹内压增高(IAP>15.96 cmH₂O). Keskinen等^[6]报道84%的SAP患者发生腹内高压(intra-abdominal hypertension, IAH), IAH导致肠道功能障碍, 加之入ICU后在经验性使用抗革兰阴性杆菌抗菌素的压力下, 肠道屏障功能严重受损, 革兰阳性菌及真菌逐渐被筛选出来并从肠道易位, 成为腹腔感染的主要病原菌. 有动物实验证实^[7], SAP使用抗菌素6-9 d后出现肠道真菌易位. 本研究BI组病原细菌检出时间早于IFI组真菌检出时间(5.14 d±2.21 d vs 10.13 d±2.59 d, P<0.05), 大部分(81.82%, 9/11)腹腔真菌检出前存在腹腔细菌感染, 混合粪肠球菌. 提示应警惕细菌感染后是否存在真菌感染. 有研究^[8]显示SAP在使用抗菌素7-12 d时, 预防性使用氟康唑治疗可降低真菌感染. 也有报道^[9]SAP真菌感染确诊时间较长平均24 d.

IAH与早期器官衰竭相关^[6]. IAH使膈肌上抬, 胸腔内压升高, 肺实质被压缩, 肺容积减少, 肺泡膨胀不全, IAH是导致呼吸衰竭的主要原因之一. IAH使肾灌注减少, 出现少尿、无尿和氮质血症, 甚至肾功能不全. IAH使循环阻力增大, 致心输出量减少, 发生心功能不全. 本研究IFI组和BI组IAP较NI组明显高, CRRT率、MODS数≥3发生率及病死率IFI组和BI组均高于NI组. 相关研究^[5,10]显示与BI组及NI组比较, IFI组的MODS率高于BI组及NI组.

■同行评价

本文设计合理, 对伴呼吸衰竭重症急性胰腺炎侵袭性真菌感染的诊断与治疗有一定实用价值。

对于腹腔渗液多、IAH、脏器功能障碍但无手术条件者, B超引导下经皮腹腔穿刺置管灌洗引流术是较为安全、创伤性小的治疗方法。其在对腹腔坏死组织及渗液进行持续冲洗的同时, 可以减轻炎症反应, 缓解严重感染症状, 适当降低IAP, 为进一步治疗赢得时机。但外科干预是有创的侵入性操作, 因持续反复地冲洗引流管或引流管管理不善, 增加了包括真菌在内的院内感染的机会。本研究示外科干预率IFI组明显高于BI组, 与相关^[5]研究结果一致, 提示外科干预易导致真菌感染的发生, 是SAP IFI的危险因素^[11]。

本组SAP IFI还发生于肺及血源。腹腔真菌感染患者有半数合并呼吸机相关真菌肺炎, 真菌检出前已存在ICU内常见条件致病菌如铜绿假单胞菌、嗜麦芽窄食单胞菌和鲍曼不动杆菌呼吸机相关肺炎。本组血源真菌感染率26.67%(4/15)。Nakamura等^[12]统计在血源真菌感染病例中, 93.6%的患者有中心静脉导管置入, 即绝大部分血源IFI与中心静脉导管的置入相关。建议拔出中心静脉导管并进行最优化的初始抗真菌治疗^[13]。Kochhar等^[4]报道腹腔真菌感染患者半数合并血源真菌感染, 单纯血源真菌感染率为38.89%。

病原真菌的分布因不同地域甚至不同医疗单位有所不同^[4,11]。本IFI组病原菌分布以白色念珠菌为主占57.14%, 其次为热带念珠菌占28.57%。及时掌握本医疗单位真菌的分布规律, 可为针对性的预防及治疗提供依据。

4 参考文献

1 中华医学会外科学分会胰腺外科学组. 重症急性胰腺

- 炎诊治指南. 中华外科杂志 2007; 45: 727-729
- 2 中华医学会重症医学分会. 重症患者侵袭性真菌感染诊断与治疗指南(2007). 中华内科杂志 2007; 46: 960-966
- 3 汤耀卿, 秦帅, 张圣道. 重症急性胰腺炎合并深部真菌感染的危害及诊治对策. 中华肝胆外科杂志 2001; 7: 515-517
- 4 Kochhar R, Ahammed SK, Chakrabarti A, Ray P, Sinha SK, Dutta U, Wig JD, Singh K. Prevalence and outcome of fungal infection in patients with severe acute pancreatitis. *J Gastroenterol Hepatol* 2009; 24: 743-747
- 5 Vege SS, Gardner TB, Chari ST, Baron TH, Clain JE, Pearson RK, Petersen BT, Farnell MB, Sarr MG. Outcomes of intra-abdominal fungal vs. bacterial infections in severe acute pancreatitis. *Am J Gastroenterol* 2009; 104: 2065-2070
- 6 Keskinen P, Leppaniemi A, Pettila V, Piilonen A, Kemppainen E, Hynninen M. Intra-abdominal pressure in severe acute pancreatitis. *World J Emerg Surg* 2007; 2: 2
- 7 石承先, 陈喜. 抗生素治疗大鼠急性胰腺炎后肠道真菌的变化与易位的关系. 世界华人消化杂志 2009; 17: 2714-2717
- 8 汤可立, 石承先. 氟康唑预防重症急性胰腺炎真菌感染32例. 世界华人消化杂志 2010; 18: 1608-1611
- 9 陈尔真, 黄小林, 袁祖荣, 张圣道. 48例重症急性胰腺炎合并真菌感染的临床分析. 中华医院感染学杂志 2004; 14: 759-761
- 10 De Waele JJ, Vogelaers D, Blot S, Colardyn F. Fungal infections in patients with severe acute pancreatitis and the use of prophylactic therapy. *Clin Infect Dis* 2003; 37: 208-213
- 11 Chakrabarti A, Rao P, Tarai B, Shivaprakash MR, Wig J. Candida in acute pancreatitis. *Surg Today* 2007; 37: 207-211
- 12 Nakamura T, Takahashi H. Epidemiological study of Candida infections in blood: susceptibilities of Candida spp. to antifungal agents, and clinical features associated with the candidemia. *J Infect Chemother* 2006; 12: 132-138
- 13 Labelle AJ, Micek ST, Roubinian N, Kollef MH. Treatment-related risk factors for hospital mortality in Candida bloodstream infections. *Crit Care Med* 2008; 36: 2967-2972

编辑 曹丽鸥 电编 何基才

肠黏膜细胞因子在肠易激综合征患者回肠及升结肠组织中的表达

刘修波, 张巍巍, 解祥军, 王青

刘修波, 张巍巍, 解祥军, 王青, 青岛大学医学院附属青岛市立医院东区消化内科 山东省青岛市 266071

作者贡献分布: 刘修波与王青对此文所作贡献均等; 此课题由刘修波、解祥军及王青设计; 研究过程由刘修波与王青操作完成; 研究所用试剂及分析工具由王青提供; 数据分析由刘修波完成; 本论文的写作由刘修波、张巍巍及王青完成。

通讯作者: 王青, 主任医师, 266071, 山东省青岛市东海中路5号, 青岛大学医学院附属青岛市市立医院东区消化内科。
wangq2008001@163.com

电话: 0532-88905630

收稿日期: 2010-12-22 修回日期: 2011-03-15

接受日期: 2011-03-23 在线出版日期: 2011-04-08

Expression of IL-6, IL-23 and TGF-β1 in the mucosa of the ileum and ascending colon of patients with irritable bowel syndrome: an analysis of 110 cases

Xiu-Bo Liu, Wei-Wei Zhang, Xiang-Jun Xie, Qing Wang

Xiu-Bo Liu, Wei-Wei Zhang, Xiang-Jun Xie, Qing Wang, Department of Gastroenterology, Qingdao Municipal Hospital Affiliated to Qingdao University Medical College, Qingdao 266071, Shandong Province, China

Correspondence to: Qing Wang, Department of Gastroenterology, Qingdao Municipal Hospital Affiliated to Qingdao University Medical College, 5 Donghai Middle Road, Qingdao 266071, Shandong Province,

China. wangq2008001@163.com

Received: 2010-12-22 Revised: 2011-03-15

Accepted: 2011-03-23 Published online: 2011-04-08

Abstract

AIM: To investigate the expression of interleukin (IL)-6, IL-23 and transforming growth factor beta1 (TGF-β1) in the mucosa of the ileum and ascending colon of patients with irritable bowel syndrome (IBS).

METHODS: One hundred and ten patients with IBS and 40 healthy volunteers were included in the study. Mucosal samples were taken from the ileum and ascending colon of these subjects to detect the expression of IL-6, IL-23 and TGF-β1 by immunohistochemistry.

RESULTS: The expression levels of IL-6 and

IL-23 in the mucosa of the ileum and ascending colon were higher in IBS patients than in controls (IL-6: 106.45 ± 12.54 vs 82.45 ± 11.52 , $t = 10.58$; 107.48 ± 18.75 vs 91.32 ± 10.45 , $t = 5.16$; IL-23: 10.68 ± 3.35 vs 4.78 ± 2.54 , $t = 10.12$; 11.42 ± 2.87 vs 5.20 ± 1.85 , $t = 12.76$, all $P < 0.05$). No significant difference was found in the expression level of TGF-β1 in the mucosa of the ileum and ascending colon between the two groups ($t = 1.57$, 1.69 , both $P > 0.05$).

■背景资料

肠易激综合征 (IBS) 是一种病因和发病机制不明确的常见功能性胃肠疾病。临床症状主要为腹痛、腹部不适和排便习惯的改变。近年研究发现, 部分IBS患者存在炎症或免疫功能的异常改变。

CONCLUSION: High expression of proinflammatory cytokines in the mucosa of the ileum and ascending colon may have a correlation with visceral perception and altered bowel habits in patients with IBS.

Key Words: Irritable bowel syndrome; Cytokine; Interleukin; Transforming growth factor β1

Liu XB, Zhang WW, Xie XJ, Wang Q. Expression of IL-6, IL-23 and TGF-β1 in the mucosa of the ileum and ascending colon of patients with irritable bowel syndrome: an analysis of 110 cases. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2011; 19(10): 1085-1088

摘要

目的: 研究肠易激综合征(IBS)患者回肠末端及升结肠黏膜组织中炎性因子白介素(IL)-6、IL-23及TGF-β1的表达, 探讨IBS的发病机制。

方法: 选取110例IBS患者, 另选40例健康体检者为对照, 内镜下取回肠及升结肠肠黏膜组织各1块, 用免疫组织化学法测定回肠末端及升结肠肠黏膜中IL-6、IL-23及TGF-β1水平。

结果: IL-6及IL-23在IBS患者回肠末端及升结肠肠黏膜的表达高于对照组(IL-6: 106.45 ± 12.54 vs 82.45 ± 11.52 , $t = 10.58$; 107.48 ± 18.75 vs 91.32 ± 10.45 , $t = 5.16$; IL-23: 10.68 ± 3.35 vs 4.78 ± 2.54 , $t = 10.12$; 11.42 ± 2.87 vs 5.20 ± 1.85 , $t = 12.76$, 均 $P < 0.05$); TGF-β1在IBS患者回肠末端及升结肠肠黏膜的表达与对照组比较差异无统计学意义($t = 1.57$, 1.69 ,

■同行评议者

潘秀珍, 教授, 福建省立医院消化内科

■相关报道

李延青等研究结果显示, IBS患者肠黏膜中存在Th1/Th2比例失调。

$P>0.05$).

结论: IBS患者回肠黏膜及升结肠炎性细胞因子表达水平升高, 促炎细胞因子与抑炎细胞因子失衡, 与IBS内脏感知及排便习惯的改变等症状的发生有一定相关性。

关键词: 肠易激综合征; 细胞因子; 白介素; 转化生长因子 $\beta 1$

刘修波, 张巍巍, 解祥军, 王青. 肠黏膜细胞因子在肠易激综合征患者回肠及升结肠组织中的表达. 世界华人消化杂志 2011; 19(10): 1085-1088

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/1085.asp>

0 引言

肠易激综合征(irritable bowel syndrome, IBS)是一种病因和发病机制不明确的常见功能性胃肠道疾病, 临床症状主要为腹痛、腹部不适和排便习惯的改变。近年研究发现, 部分IBS患者存在炎症或免疫功能的异常改变^[1], 有报道认为IBS症状的出现与IBS患者中促炎作用的细胞因子和抑炎作用的细胞因子失衡有关^[2]。李延青等^[3]研究结果显示在IBS患者肠黏膜存在Th1/Th2比例失调。本文的主要目的是研究IBS患者升结肠及回肠黏膜促炎细胞因子IL-6、IL-23及抑炎细胞因子TGF- $\beta 1$ 的表达, 分析IBS患者的发病机制。

1 材料和方法

1.1 材料 选取2009-08/2010-12青岛市市立医院消化科门诊及病房的IBS患者110例, 入组标准为符合罗马III诊断标准^[4,5], 且均为初诊病例, 无近期服药史, 其中男50例, 女60例, 年龄均18-80(平均48.75±13.44)岁, 所有患者大便常规和潜血检查结果均为阴性。另取同期健康体检者40例为对照组, 其中男18例, 女22例, 年龄20-70(平均51.24±9.65)岁, 所入组者均无消化系统症状, 无免疫病及传染病史。IL-6、IL-23兔抗人多克隆抗体购自北京博奥森生物技术开发公司, TGF- $\beta 1$ 兔抗人多克隆抗体购自福建迈新生物制剂有限公司。病理图像分析采用专业图像分析软件Image-ProPlus(IPP)6.0。

1.2 方法

1.2.1 结肠镜检查及黏膜活检: IBS患者组和对照组均接受Olympus260X型电子结肠镜检查排除器质性病变, 结肠镜检查者为有经验的内镜医师, 术中轻柔操作, 避免反复牵拉刺激, 进镜达回肠末端, 于距回盲瓣10 cm处用经高压蒸汽消

毒灭菌的活检钳钳取回肠黏膜组织1块, 退镜至距回盲瓣5 cm处钳取结肠黏膜组织1块, 组织大小在0.1-0.2 cm, 深达黏膜下层, 所取标本分别迅速置于1%中性甲醛中固定后石蜡包埋、切片, 用于免疫组织化学检查。

1.2.2 免疫组织化学染色: 采用免疫组织化学法检测回肠末端及升结肠黏膜组织中IL-6、IL-23及TGF- $\beta 1$ 的表达, IL-6、IL-23及TGF- $\beta 1$ 的阳性染色均主要位于胞质内, 为棕黄色颗粒沉积。免疫组织化学结果定量判断标准: 染色后先在光镜下做定性观察, 然后于高倍镜下($\times 400$)观察肠黏膜IL-6、IL-23及TGF- $\beta 1$ 的阳性表达情况, 并随机选取互不重叠的5个视野。用专业图像分析软件测定每个视野阳性染色的累积吸光度(累积吸光度=平均吸光度×面积), 取其平均值作为该切片肠黏膜IL-6、IL-23及TGF- $\beta 1$ 表达的半定量指标。操作严格按说明书进行。

统计学处理 应用SPSS13.0软件, 计量资料数据均以mean±SD表示, 两组间比较采用t检验, 以 $P<0.05$ 作为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 IL-6在IBS患者组及对照组的表达 IL-6在IBS组回肠末端及升结肠肠黏膜的表达均显著高于对照组, 差异有统计学意义($t = 10.58, 5.16, P<0.05$, 表1)。

2.2 IL-23在IBS患者组及对照组的表达 IL-23在IBS组回肠末端及升结肠的表达均显著高于对照组, 差异有统计学意义($t = 10.12, 12.76, P<0.05$, 表1)。

2.3 TGF- $\beta 1$ 在IBS患者组及对照组的表达 TGF- $\beta 1$ 在IBS组回肠末端及升结肠的表达与对照组比较无明显差异, 差异无统计学意义($t = 1.57, 1.69, P>0.05$, 表1)。

3 讨论

目前普遍认为IBS是在特殊基质的基础上, 以神经系统、免疫系统和内分泌系统为中介, 社会心理因素刺激共同作用的身心性疾病^[6]。免疫细胞在解剖结构上与肠神经系统的轴突纤维紧密相连, 说明肠道神经肌肉功能的改变可能与免疫细胞的活性有关。细胞因子是由免疫细胞和非免疫细胞经刺激合成、分泌的一类具有广泛生物学活性的小分子蛋白质, 主要功能为调节免疫应答、参与炎症细胞分化发育、介导炎症反应等。肠道炎症和IBS的关系已有很好的认识^[7], 致

■应用要点
IBS患者回肠黏膜及升结肠炎性细胞因子表达水平升高, 促炎细胞因子与抑炎细胞因子失衡, 与IBS内脏感知及排便习惯的改变等症状的发生有一定相关性.

表 1 各组不同部位肠黏膜IL-6、IL-23和TGF-β1的表达

分组	n	IL-6		IL-23		TGF-β1	
		回肠末端	升结肠	回肠末端	升结肠	回肠末端	升结肠
IBS患者组	110	106.45 ± 12.54 ^a	107.48 ± 18.75 ^a	10.68 ± 3.35 ^a	11.42 ± 2.87 ^a	9.35 ± 4.59	10.35 ± 2.78
对照组	40	82.45 ± 11.52	91.32 ± 10.45	4.78 ± 2.54	5.20 ± 1.85	10.62 ± 3.78	11.25 ± 3.17

^aP<0.05 vs 对照组.

炎细胞因子及抗炎细胞因子的失衡是导致免疫异常的重要因素. 鞠辉等^[8]发现, 感染后IBS与溃疡性结肠炎缓解期患者肠黏膜细胞因子的表达差异无统计学意义, 但均高于正常对照组. 常见的促炎细胞因子有IL-1、IL-1β、IL-8、TNF等, IL-6及IL-23均属于促炎细胞因子, IL-6属细胞因子家族, 可促进T淋巴细胞增殖, 刺激细胞毒性T淋巴细胞反应, 还可促进B淋巴细胞分化和诱导B淋巴细胞最终分化为浆细胞, 浆细胞可以分泌多种免疫球蛋白. IL-6基因的多态性能改变患者对IBS的个体的敏感性, 对了解IBS的病理过程有一定的意义^[9].

IL-23是近年来关注较多的细胞因子, 有研究表明, IL-23是自身免疫介导的炎症反应所必需的, IL-23由巨噬细胞及树突状细胞分泌, 是一个由亚单位p19和p40通过二硫键形成的异源二聚体分子, 结构为p19/p40, 任何一个单独的亚单位都不具有生物学活性, 只有两个亚单位结合在一起时, 才能发挥他的生物功能^[10], 可以对多种细胞发挥作用, 促进细胞因子的分泌, 其在体内调节作用主要是通过影响Th17细胞分泌IL-17及与其他细胞因子相互作用完成. IL-23在Th17的生长存活中起重要作用, IL-23能增加Th17细胞表达IL-17, 诱导IL-22, 抑制IL-10, 对稳定Th17的表型是必不可少的^[11], 但在体外, 因原始T淋巴细胞不表达IL-23受体, 因此高度纯化的原始T淋巴细胞在IL-23存在的情况下不能分化为Th17^[12], 只有在TGF及IL-6共同存在的情况下才能诱导原始T淋巴细胞向Th17细胞的分化^[12-14]. Th17细胞主要分泌IL-17, IL-17能诱导其他炎性细胞因子如IL-6、TNF及趋化因子MCP-1、MIP-2等表达, 介导炎症细胞到局部的浸润及组织损伤^[15].

TGF-β是一个多功能的细胞因子超家族, 有多种异构体, 其中最常见的是TGF-β1几乎为所有的白细胞分泌, 主要作用为调节细胞增殖和分化、抑制免疫反应等, 能促进白细胞的分化、抑制其增殖, 能为白细胞的移动提供趋化刺激, 并调节其黏附^[16], 有研究表明TGF-β缺失

的老鼠死于心脏病、肺炎及胃肠道感染, 表明TGF-β在抑制炎症细胞的活化、增殖中起重要作用^[17], 本研究发现IBS患者回肠末端及升结肠肠黏膜IL-6及IL-23的表达增加, TGF-β1阳性表达较对照组差别无统计学意义, 从而造成肠道黏膜促炎和抗炎细胞因子的表达失衡, 导致IBS肠道炎症及其持续存在. 但仍不能否认TGF-β在IBS发病中的作用, 其在IBS发病机制中可能通过非直接的方式发挥作用.

肠道黏膜是机体免疫机制的一部分, 本研究表明IBS患者小肠及结肠黏膜内免疫细胞数增多, 这些免疫细胞与肠神经系统的轴突在解剖学上有着紧密连接, 细胞因子等炎症介质可直接作用于肠道初级传入纤维引起内脏感觉的高敏感性^[18], 同时还可通过脑-肠轴影响肠道运动和分泌功能^[19]. 肠道的低度炎症能破坏肠黏膜的屏障功能, 引起分泌、吸收障碍. 促炎细胞因子与抗炎细胞因子失衡, 以促炎因子的反应为特征, 引起肠道感觉异常, 排便性状改变等症状. 可能为IBS的一致病因素, 但仍需大样本临床研究以证实.

4 参考文献

- 1 Ohman L, Isaksson S, Lundgren A, Simrén M, Sjövall H. A controlled study of colonic immune activity and beta7+ blood T lymphocytes in patients with irritable bowel syndrome. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2005; 3: 980-986
- 2 陈浩, 柯美云. 肠易激综合征与炎症关系的研究现状. 国际消化病杂志 2007; 27: 172-174
- 3 李延青, 张海燕, 左秀丽, 袁海鹏, 卢雪峰, 李君曼. 肠易激综合征患者肠黏膜Th1/Th2漂移的研究. 中华消化杂志 2004; 24: 728-731
- 4 Tack J, Talley NJ, Camilleri M, Holtmann G, Hu P, Malagelada JR, Stanghellini V. Functional gastroduodenal disorders. *Gastroenterology* 2006; 130: 1466-1479
- 5 功能性胃肠病的罗马Ⅲ诊断标准. 现代消化及介入诊疗 2007; 12: 137-140
- 6 Borowiec AM, Fedorak RN. The role of probiotics in management of irritable bowel syndrome. *Curr Gastroenterol Rep* 2007; 9: 393-400
- 7 刘雁冰, 刘菲, 袁耀宗. 肠道炎症与肠易激综合征. 国外医学·消化系疾病分册 2004; 24: 326-329
- 8 鞠辉, 刘希双, 王光兰, 尹晓燕, 刘华, 戴素美. 感染后

■同行评价

本文科学性较好，方法先进，结果可靠，对IBS的临床防治有参考意义。

- 肠易激综合征与溃疡性结肠炎缓解期患者肠黏膜细胞因子表达的相关性. 世界华人消化杂志 2007; 15: 844-848
- 9 Dinan TG, Quigley EM, Ahmed SM, Scully P, O'Brien S, O'Mahony L, O'Mahony S, Shanahan F, Keeling PW. Hypothalamic-pituitary-gut axis dysregulation in irritable bowel syndrome: plasma cytokines as a potential biomarker? *Gastroenterology* 2006; 130: 304-311
 - 10 Oppmann B, Lesley R, Blom B, Timans JC, Xu Y, Hunte B, Vega F, Yu N, Wang J, Singh K, Zonin F, Vaisberg E, Churakova T, Liu M, Gorman D, Wagner J, Zurawski S, Liu Y, Abrams JS, Moore KW, Rennick D, de Waal-Malefyt R, Hannum C, Bazan JF, Kastelein RA. Novel p19 protein engages IL-12p40 to form a cytokine, IL-23, with biological activities similar as well as distinct from IL-12. *Immunity* 2000; 13: 715-725
 - 11 McGeachy MJ, Bak-Jensen KS, Chen Y, Tato CM, Blumenschein W, McClanahan T, Cua DJ. TGF-beta and IL-6 drive the production of IL-17 and IL-10 by T cells and restrain T(H)-17 cell-mediated pathology. *Nat Immunol* 2007; 8: 1390-1397
 - 12 Mangan PR, Harrington LE, O'Quinn DB, Helms WS, Bullard DC, Elson CO, Hatton RD, Wahl SM, Schoeb TR, Weaver CT. Transforming growth factor-beta induces development of the T(H)17 lineage. *Nature* 2006; 441: 231-234
 - 13 Veldhoen M, Hocking RJ, Atkins CJ, Locksley RM, Stockinger B. TGFbeta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. *Immunity* 2006; 24: 179-189
 - 14 Bettelli E, Carrier Y, Gao W, Korn T, Strom TB, Oukka M, Weiner HL, Kuchroo VK. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature* 2006; 441: 235-238
 - 15 Kolls JK, Lindén A. Interleukin-17 family members and inflammation. *Immunity* 2004; 21: 467-476
 - 16 Letterio JJ, Roberts AB. Regulation of immune responses by TGF-beta. *Annu Rev Immunol* 1998; 16: 137-161
 - 17 Shull MM, Ormsby I, Kier AB, Pawlowski S, Diebold RJ, Yin M, Allen R, Sidman C, Proetzel G, Calvin D. Targeted disruption of the mouse transforming growth factor-beta 1 gene results in multifocal inflammatory disease. *Nature* 1992; 359: 693-699
 - 18 Cenac N, Andrews CN, Holzhausen M, Chapman K, Cottrell G, Andrade-Gordon P, Steinhoff M, Barbara G, Beck P, Bunnett NW, Sharkey KA, Ferraz JG, Shaffer E, Vergnolle N. Role for protease activity in visceral pain in irritable bowel syndrome. *J Clin Invest* 2007; 117: 636-647
 - 19 Drossman DA, Camilleri M, Mayer EA, Whitehead WE. AGA technical review on irritable bowel syndrome. *Gastroenterology* 2002; 123: 2108-2131

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)

血浆凝溶胶蛋白与结直肠癌根治术化疗疗效及预后的关系

银新, 宁守斌, 任世奇, 沈恩允

银新, 河北北方学院 河北省张家口市 075000
宁守斌, 中国人民解放军空军总医院消化内科 北京市 100036
任世奇, 沈恩允, 北京同为时代生物技术有限公司 北京市 100176

作者贡献分布: 本课题设计由沈恩允完成, 并指导相关指标的实验室测定; 宁守斌指导临床资料整理及标本收集; 任世奇参与相关指标的实验室测定; 由银新具体实施并撰写论文。

通讯作者: 沈恩允, 副研究员, 硕士生导师, 100176, 北京市亦庄经济技术开发区西环南路16号嘉捷科技园15号楼, 北京同为时代生物技术有限公司。eyshen@cotimesbiotech.com

电话: 010-87850356

收稿日期: 2010-12-11 修回日期: 2011-02-18

接受日期: 2011-02-22 在线出版日期: 2011-04-08

Correlation of plasma gelsolin with chemotherapy efficacy and prognosis in patients with colorectal cancer after radical resection

Xin Yin, Shou-Bin Ning, Shi-Qi Ren, En-Yun Shen

Xin Yin, Hebei North University, Zhangjiakou 075000, Hebei Province, China

Shou-Bin Ning, Department of Gastroenterology, Air Force General Hospital of Chinese PLA, Beijing 100036, China

Shi-Qi Ren, En-Yun Shen, Beijing Cotimes Biotech Co., Ltd, Beijing 100176, China

Correspondence to: En-Yun Shen, Beijing Cotimes Biotech Co., Ltd, 15 Tower Jiajie Kejiyuan, 26 Xihuan South Road, Beijing Economic-Technological Development Area, Beijing 100176, China. eyshen@cotimesbiotech.com

Received: 2010-12-11 Revised: 2011-02-18

Accepted: 2011-02-22 Published online: 2011-04-08

Abstract

AIM: To investigate the correlation of plasma gelsolin, a substrate for matrix metalloproteinase, with tumor invasion and metastasis and to explore the possibility of using plasma gelsolin as a putative marker for prediction of chemotherapy efficacy and prognosis in patients with colorectal cancer after radical resection.

METHODS: The clinical data for 40 patients with pathologically confirmed colorectal cancer after surgery were retrospectively analyzed. These patients were divided into two groups according to the progression of the disease, with group A containing patients with stages I and II disease and group B containing those with stage

III disease. Patients in group B were further subdivided into group B1 and B2 according to prognosis, with B1 containing patients who underwent postoperative chemotherapy and had metastasis, and B2 containing those who underwent postoperative chemotherapy but had no metastasis. Chemiluminescence immunoassay was used for the monitoring of plasma concentration of gelsolin before and after the first cycle of chemotherapy.

RESULTS: Mean plasma gelsolin before chemotherapy showed no significant differences between groups A and B (76.22 mg/L vs 56.15 mg/L, $P > 0.05$) and between groups B1 and B2 (62.04 mg/L vs 50.25 mg/L, $P > 0.05$). After one cycle of chemotherapy, plasma gelsolin was reduced to 54.33 mg/L in group B1, but increased to 84.20 mg/L in group B2 ($t = -2.540$, $P = 0.032$). Mean plasma gelsolin decreased by 10.56% in group B1 but increased by 47.36% in group B2, showing a significant difference between the two groups ($t = -4.430$, $P = 0.002$).

CONCLUSION: Monitoring of plasma gelsolin in patients with colorectal cancer after radical resection during early chemotherapy can help predict long-term efficacy of chemotherapy and prognosis.

Key Words: Plasma gelsolin; Colorectal cancer; Chemotherapy; Prognosis

Yin X, Ning SB, Ren SQ, Shen EY. Correlation of plasma gelsolin with chemotherapy efficacy and prognosis in patients with colorectal cancer after radical resection. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2011; 19(10): 1089-1093

摘要

目的: 验证血浆凝溶胶蛋白作为肿瘤侵袭转移关联基质金属蛋白酶类的作用底物, 对结直肠癌患者根治术后化疗疗效和预后复发的预测性。

方法: 将手术后病理证实的40例结直肠癌患者按照临床分期分为两组, A组: I、II期; B组: III期。并且, 根据B组病例随访预后复发情

■背景资料
结直肠癌(CRC)是当前最常见的消化系统恶性肿瘤之一。肝脏是CRC首发的血行转移和术后复发部位, 近半数的CRC患者在根治手术后发生异时性肝转移。转移性肝癌患者大多治疗困难, 预后差, 国内外学者都在探索更为有效的治疗方法, 但迄今为止, CRC肝转移的治疗仍没有突破性的进展。

■同行评议者
黄培林, 教授, 东南大学

■相关报道

已有研究显示gelsolin具有明显的肿瘤抑制作用，在多种肿瘤中表达明显降低，与恶性肿瘤的发生和发展密切相关。

况，又进一步将B组分为，B1组：术后辅助化疗转移组；B2组：术后辅助化疗未转移组。应用化学发光免疫分析方法时相性监测化疗前与第1周期化疗后血浆凝溶胶蛋白的含量，对检测数据进行系统分析，结合足疗程化疗后定期随访的影像学诊断结果，客观评价血浆凝溶胶蛋白检测与结直肠癌根治术后化疗疗效和预后的相关性。

结果：A组化疗前血浆凝溶胶蛋白检测均值为76.22 mg/L，高于B组均值56.15 mg/L(B1组62.04 mg/L, B2组50.25 mg/L)，无统计学差异($P = 0.215$)；B1、B2组化疗前比较，亦无统计学差异($P = 0.300$)。化疗1周期后，B1组均值降为54.33 mg/L，B2组升高至84.20 mg/L，两组出现了反向变化趋势，差异有显著性($t = -2.540$, $P = 0.032$)。对B1、B2组之间个体化疗前后变化率的均值进行比较，B1组均值下降了10.56%，而B2组均值升高了47.36%，差异亦有显著性($t = -4.430$, $P = 0.002$)。

结论：对结直肠癌根治术后化疗的患者，于化疗初期时相性监测血浆凝溶胶蛋白含量有助于预测远期的化疗疗效，进而早期判断预后。

关键词：血浆凝溶胶蛋白；结直肠癌；化疗；预后

银新，宁守斌，任世奇，沈恩允. 血浆凝溶胶蛋白对结直肠癌根治术化疗疗效及预后的预测. 世界华人消化杂志 2011; 19(10): 1089-1093

<http://www.wjnet.com/1009-3079/19/1089.asp>

0 引言

结直肠癌(colorectal cancer, CRC)是当前最常见的消化系统恶性肿瘤之一。肝脏是CRC首发的血行转移和术后复发部位^[1]，近半数的CRC患者在根治手术后发生异时性肝转移。转移性肝癌患者大多治疗困难，预后差，国内外学者都在探索更为有效的治疗方法，但迄今为止，CRC肝转移的治疗仍没有突破性的进展。目前认为，CRC肝转移的分子机制包括细胞外基质(extracellular matrix, ECM)的降解、细胞黏附性能的改变、肿瘤细胞局部浸润、肿瘤血管生成、肿瘤细胞循环内播散和免疫逃逸、肿瘤细胞血管内栓塞及肿瘤细胞在新的微环境重新生长等几方面^[2,3]。其中的多个机制都有基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMPs)的参与^[4,5]。在急性呼吸窘迫症、脓毒症、烧伤等多种危重症中，MMPs也直接参与了对血浆凝溶胶蛋白(gelsolin)的水解代谢和消耗，是血浆gelsolin水

平显著降低的原因之一^[6,7]；所以，gelsolin作为MMPs的直接和/或间接作用底物，理论上具备了与肿瘤增殖和侵袭转移直接关联的生物标志物的基本特征。但是，迄今为止，国内外未有相关文献报道。为论证该科研设想的可行性，我们首先分别针对30例初诊CRC患者血清和30例健康体检者血清进行了gelsolin检测，实验结果显示CRC患者血清gelsolin显著低于健康体检者，有显著的统计学意义，此预实验结果初步明确了gelsolin与肿瘤的直接关联性。因此本次临床研究拟进一步针对CRC根治术后患者首次化疗前后血清gelsolin的检测以及跟踪随访调查，观察血浆gelsolin对CRC根治术后化疗疗效评价的指示作用以及CRC根治术后肝转移的预后预测性。

1 材料和方法

1.1 材料 收集2009-02/2010-5在中国人民解放军空军总医院消化科住院的CRC患者40例，所有患者术前均接受影像学检查未发现转移，术后经病理证实为CRC，入院前未接受过放、化疗，其中男26例，女14例，按照临床分期分为两组：A组(11例)：I、II期(术后病理证实有脉管癌栓需接受辅助化疗)；B组(29例)：III期。根据B组病例随访预后复发情况，又进一步将B组分为：B1组(10例)：术后辅助化疗转移组；B2组(19例)：术后辅助化疗未转移组。中位年龄：A组59.5(25-76)岁，B组60.50(36-76)岁。其中，中分化腺癌24例，中-低分化腺癌16例，均于术后2-4 wk首次接受化疗，化疗方案为FORFOX 4-8周期，药物用量严格按照每位患者公斤体质量计算，并结合各自身体耐受情况进行适当调整剂量。术前和术后的影像学评价均采用了统一规范的方式和评判标准。滨松BHP9504微孔板发光分析仪及北京拓普分析仪器有限公司DEM-III型自动酶标洗板机。

1.2 方法 对入选的每一位患者在首次化疗前、第1周期化疗后10-12 d(即第2周期化疗前)采集空腹肘静脉血4 mL，分离血清，获取合格的样本，-40 °C低温保存。2 wk内采用双抗体夹心法测定gelsolin水平。具体检测方法：用一株单抗包被微孔板制成固相抗体，用另一株单抗标记辣根过氧化物酶制成酶标志物。在包被板微孔中加入含有gelsolin的校准品或待测血清及酶标记物，温育后即形成固相抗体-抗原-酶标抗体的复合物。充分洗涤后加入化学发光底物液，于3-10 min内测定其相对发光强度(relative luminescence

表 1 化疗前CRC患者基本特征

特征	I、II期(A组, n=11)	III期(B1+B2组, n=29)	P值
性别(男:女)	7:4	19:10	
中位年龄(范围)(岁)	59.5(25~76)	60.50(36~76)	
BV1 gelsolin(mg/L)	76.22 ± 43.09	56.15 ± 21.34	0.215

表 2 转移与未转移的 III 期患者化疗前后gelsolin的表达

	B1组(mg/L)	B2组(mg/L)	P值
BV1	62.04 ± 25.39	50.25 ± 21.40	0.300
BV2	54.33 ± 18.30	84.20 ± 40.95	0.032
Dec%	-10.56	47.36	0.002

intensity, RLU), 根据校准曲线即可算出样品中gelsolin的含量, 样品的RLU值随gelsolin浓度的增加而升高。gelsolin正常参考范围: 200 mg/L ± 50 mg/L。

统计学处理 采用配对t检验评价治疗前(BV1)和第2周期化疗前(BV2)gelsolin水平的差异。gelsolin检测结果用mean±SD表示, 化疗前后gelsolin下降的百分比(Dec%)用(BV2-BV1)/BV1×100%计算, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 化疗前CRC患者的特征 40例CRC患者中, 其中39例(97.5%)患者化疗前gelsolin水平均明显低于临界值, 仅1例患者略高于临界值下限(图1)。

所有患者均接受结直肠癌根治术, 术后临床分期属于I、II期的11例, III期的29例, 在术后进行辅助化疗之前, 检测血浆gelsolin值分别为 76.22 ± 43.09 , 56.15 ± 21.34 , 无统计学差异($t = -1.323$, $P = 0.215$, 表1)。

2.2 III期患者化疗前后gelsolin变化趋势 病例平均随访时间为18 mo, I、II期患者(A组, 11例)都未见其他脏器转移, III期患者29例(B组), 其中10例(B1组)已经发生肝转移, 与没有出现转移的19例(B2组)III期患者相比, 化疗之前2组之间gelsolin检测均值无显著差异($t = 1.099$, $P = 0.300$); 接受1个周期化疗后, 2组gelsolin水平均出现了明显的变化趋势, 差异有显著性($t = -2.540$, $P = 0.032$)。对B1、B2组之间个体化疗前后变化率的均值进行比较, B1组均值下降了10.56%, 而B2组均值升高了47.36%, 有显著性差异($t = -4.430$, $P = 0.002$, 表2, 图2)。显示出化疗初期时相性监测gelsolin指标对于预测预后的潜

■应用要点

对结直肠癌根治术后化疗的患者, 于化疗初期时相性监测血浆凝溶胶蛋白含量有助于预测远期的化疗疗效, 进而早期判断预后。

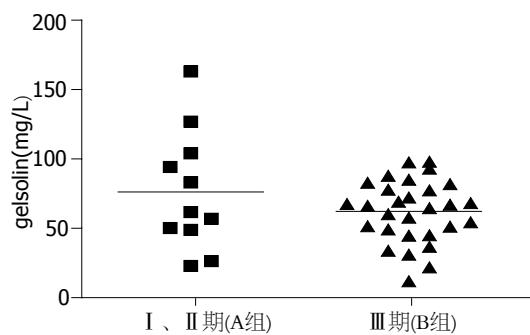


图 1 不同分期CRC患者化疗前血浆gelsolin检测水平.

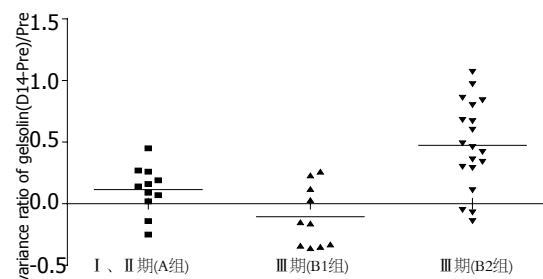


图 2 第1周期化疗前后个体之间变化率的比较.

在优势。

3 讨论

gelsolin是胞质内重要的actin调节蛋白, 在机体生命活动中发挥重要的作用^[8], 也已有研究显示gelsolin具有明显的肿瘤抑制作用, 在多种肿瘤中表达明显降低, 与恶性肿瘤的发生和发展密切相关, 被认为是1个候选的抑癌基因^[9,10]。本课题研究的对象-血浆gelsolin, 是一种分泌型的gelsolin异构体; 在血液中, 血浆gelsolin是肌动蛋白清除系统的重要成员, 在许多危重疾病中发挥机体保护作用; 由于在危重疾病中血浆gelsolin是MMPs的明确作用底物^[11,12], 同时, MMPs更是肿瘤增殖和侵袭转移的重要蛋白酶类, 因此, 本研究通过对CRC患者化疗初期动态监测gelsolin水平, 以验证其作为肿瘤侵袭转移关联蛋白酶的作用底物, 能否可以作为早期评估CRC根治术后辅助化疗的疗效, 以及预测肝脏转移可能性的有效指标。

■同行评价

本文科学性、实用性较好，但可读性一般。

研究数据显示：在40例样本中，39例(97.5%)CRC根治术后患者化疗前gelsolin水平均明显低于正常临界值，仅1例患者略高于正常临界值下限。该结果进一步应证了血浆gelsolin与恶性肿瘤密切相关的设想；而且，由于是针对术后肿瘤患者血浆gelsolin的检测，所以，血浆gelsolin水平不对应于原发灶肿瘤，而很可能是与潜在或隐性的转移灶肿瘤密切关联。进而，我们又比较分析了大肠癌根治术后辅助化疗前后血浆gelsolin水平，观察血浆gelsolin同化疗疗效及肿瘤预后复发的相关性；截至目前为止，病例随访时间平均为18 mo，I、II期患者都未见其他脏器转移，而部分III期患者已经发生肝转移，所以将III期患者进一步分为转移组和未转移组分析，采用化疗前后gelsolin变化率进行比较，结果显示：转移组gelsolin化疗前后值变化呈下降趋势，而未转移组均升高了近半数，两组数据显示出明显的反向趋势，经统计学分析，差异有显著性。转移灶肿瘤在继发部位的新生和增殖需要大量MMPs的参与，化疗药物对肿瘤的杀伤也直接阻止了MMPs的表达和分泌，最终抑制了血浆gelsolin的降解，所以，血浆gelsolin化疗后的升高最终预示着化疗药物对转移灶肿瘤的有效杀伤效果，反之则反之。该III期CRC根治术后患者都经过相同的FORFOX 4-8周期方案化疗，该数据显示出首次化疗第1周期前后动态监测血浆gelsolin水平对结直肠癌根治术后辅助化疗疗效及肿瘤预后复发有明确的预测性，同时证明了该临床检测方法的科学性。虽然，血浆gelsolin只是MMPs的作用底物，与肿瘤发生发展过程不直接关联，但是，通过与肿瘤直接关联的MMPs蛋白酶作用的生物信号放大，反而提升了血浆gelsolin作为肿瘤发生发展指示作用的灵敏度。血浆gelsolin与CEA、AFP、PSA和CA系列等等肿瘤自身抗原所代表的常规肿瘤标志物比较，具有完全不同的特殊代表性，属于非肿瘤源性的间接肿瘤指示性生物标志物，该间接性的生物信号放大特征为新型肿瘤标志物的筛选提供了完全新颖的科研设计思路。

在此次临床研究中，我们还按照临床分期对该40例CRC根治术后患者gelsolin水平进行了比较，试图发现gelsolin水平与肿瘤临床分期的相关性，进一步找寻gelsolin与肿瘤侵袭转移乃至隐性肿瘤转移灶预测的关联依据，检测结果发现I、II期患者血浆gelsolin高于III期，但没有统计学意义。I、II期患者潜在肿瘤转移的

风险低于III期，也就是说，I、II期患者所代表肿瘤转移代表特征的MMPs低于III期，进而提示gelsolin水平I、II期患者高于III期。该检测结果有一定的高低趋势，但是，由于血浆gelsolin正常值范围广(150-250 mg/L)，个体差异性大，因而在小样本病例中不能得到统计学依据。考虑到血浆gelsolin个体差异性大的因素，对肿瘤患者时相性监测，个体监测数据前后分析更符合血浆gelsolin的生物学特征，进而突出了血浆gelsolin作为肿瘤标志物个体化时相性诊断的临床应用价值。

总之，血浆gelsolin在首次化疗第1周期前后的时相性监测对结直肠癌根治术后辅助化疗疗效及肿瘤预后复发有明确的预测性；血浆gelsolin不同于肿瘤抗原类常规肿瘤标志物，属于非肿瘤源性的间接肿瘤指示性生物标志物，该间接性的生物信号放大特征为新型肿瘤标志物的筛选提供了完全新颖的科研设计思路；在检测方法上，时相性监测血浆gelsolin以及个体化数据分析更符合血浆gelsolin的生物学特征，突出了血浆gelsolin作为肿瘤标志物，个体化时相性诊断的临床应用价值。

4 参考文献

- 1 Bruin SC, Klijn C, Liefers GJ, Braaf LM, Joosse SA, van Beers EH, Verwaal VJ, Morreau H, Wessels LF, van Velthuysen ML, Tollenaar RA, Van't Veer LJ. Specific genomic aberrations in primary colorectal cancer are associated with liver metastases. *BMC Cancer* 2010; 10: 662
- 2 Valcárcel M, Arteta B, Jaureguibetia A, Lopategi A, Martínez I, Mendoza L, Muruzabal FJ, Salado C, Vidal-Vanaclocha F. Three-dimensional growth as multicellular spheroid activates the proangiogenic phenotype of colorectal carcinoma cells via LFA-1-dependent VEGF: implications on hepatic micrometastasis. *J Transl Med* 2008; 6: 57
- 3 Rudmik LR, Magliocco AM. Molecular mechanisms of hepatic metastasis in colorectal cancer. *J Surg Oncol* 2005; 92: 347-359
- 4 Hald A, Rønø B, Melander MC, Ding M, Holck S, Lund LR. MMP9 is protective against lethal inflammatory mass lesions in the mouse colon. *Dis Model Mech* 2011; 4: 212-227
- 5 Roy R, Yang J, Moses MA. Matrix metalloproteinases as novel biomarkers and potential therapeutic targets in human cancer. *J Clin Oncol* 2009; 27: 5287-5297
- 6 Park SM, Hwang IK, Kim SY, Lee SJ, Park KS, Lee ST. Characterization of plasma gelsolin as a substrate for matrix metalloproteinases. *Proteomics* 2006; 6: 1192-1199
- 7 Rothenbach PA, Dahl B, Schwartz JJ, O'Keefe GE, Yamamoto M, Lee WM, Horton JW, Yin HL, Turnage RH. Recombinant plasma gelsolin infusion attenuates burn-induced pulmonary microvascular dysfunction. *J Appl Physiol* 2004; 96: 25-31

- 8 Hu S, Biben T, Wang X, Jurdic P, Géminard JC. Internal dynamics of actin structures involved in the cell motility and adhesion: Modeling of the podosomes at the molecular level. *J Theor Biol* 2011; 270: 25-30
- 9 Li GH, Arora PD, Chen Y, McCulloch CA, Liu P. Multifunctional roles of gelsolin in health and diseases. *Med Res Rev* 2010; : [Epub ahead of print]
- 10 Osborn TM, Verdrehn M, Stossel TP, Tarkowski A, Bokarewa M. Decreased levels of the gelsolin plasma isoform in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 2008; 10: R117
- 11 Lee PS, Patel SR, Christiani DC, Bajwa E, Stossel TP, Waxman AB. Plasma gelsolin depletion and circulating actin in sepsis: a pilot study. *PLoS One* 2008; 3: e3712
- 12 Wang H, Cheng B, Chen Q, Wu S, Lv C, Xie G, Jin Y, Fang X. Time course of plasma gelsolin concentrations during severe sepsis in critically ill surgical patients. *Crit Care* 2008; 12: R106

编辑 李军亮 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, T1/2不能写成tl/2或T_{1/2}, V_{max}不能V_{max}, μ不写为英文u. 需排斜体的外文字, 用斜体表示. 如生物学中拉丁学名的属名与种名, 包括亚属、亚种、变种. 如幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *H.pylori*), *Ilex pubescens* Hook, et Arn.var.*glaber* Chang(命名者勿划横线); 常数K; 一些统计学符号(如样本数n, 均数mean, 标准差SD, F检验, t检验和概率P, 相关系数r); 化学名中标明取代位的元素、旋光性和构型符号(如N, O, P, S, d, l)如n-(normal, 正), N-(nitrogen, 氮), o-(ortho, 邻), O-(oxygen, 氧, 习惯不译), d-(dextro, 右旋), p-(para, 对), 例如n-butyl acetate(醋酸正丁酯), N-methylacetanilide(N-甲基乙酰苯胺), o-cresol(邻甲酚), 3-O-methyl-adrenaline(3-O-甲基肾上腺素), d-amphetamine(右旋苯丙胺), l-dopa(左旋多巴), p-aminosalicylic acid(对氨基水杨酸). 拉丁字及缩写*in vitro*, *in vivo*, *in situ*; *Ibid*, et al, po, vs; 用外文字母代表的物理量, 如m(质量), V(体积), F(力), p(压力), W(功), v(速度), Q(热量), E(电场强度), S(面积), t(时间), z(酶活性, kat), t(摄氏温度, °C), D(吸收剂量, Gy), A(放射性活度, Bq), ρ(密度, 体积质量, g/L), c(浓度, mol/L), φ(体积分数, mL/L), w(质量分数, mg/g), b(质量摩尔浓度, mol/g), l(长度), b(宽度), h(高度), d(厚度), R(半径), D(直径), T_{max}, C_{max}, Vd, T_{1/2}, Cl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.