

# Barrett's食管的研究现状

黄颖秋

黄颖秋, 本溪钢铁(集团)有限责任公司总医院消化内科 辽宁省本溪市 117000

黄颖秋, 本溪钢铁(集团)有限责任公司总医院消化内科主任, 主任医师, 中国医科大学教授、研究生导师, 主要从事胃肠动力疾病、消化道肿瘤及肝硬化的基础与临床研究。

通讯作者: 黄颖秋, 117000, 辽宁省本溪市平山区人民路29号, 本溪钢铁(集团)有限责任公司总医院消化内科。

huangyingqiu\_bx@126.com

电话: 0414-2215137

收稿日期: 2007-05-14 修回日期: 2007-08-13

## Current approaches to treating Barrett's esophagus

Ying-Qiu Huang

Ying-Qiu Huang, Department of Gastroenterology, General Hospital of Benxi Steel & Iron (Group) Co. Benxi 117000, Liaoning Province, China

Correspondence to: Ying-Qiu Huang, Department of Gastroenterology, General Hospital of Benxi Steel & Iron (Group) Co., 29 Renmin Road, Pingshan District, Benxi 117000, Liaoning Province, China. huangyingqiu\_bx@126.com

Received: 2007-05-14 Revised: 2007-08-13

## Abstract

Barrett's esophagus is a pre-malignant condition of the distal esophagus characterized by step-wise progression from metaplasia and dysplasia to adenocarcinoma of the esophagus. The author undertook a systematic review that included new concepts, and the pathogenesis, diagnostic methods, carcinogenesis with cyclooxygenases 2 inhibitors, ablation of the metaplastic area by endoscopic laser, plasma argon mucosectomy, and photodynamic therapy for Barrett's esophagus and esophageal adenocarcinoma. These new advanced treatment modalities may provide strategies for the elucidation of the mechanism involved, allow for early diagnosis as well as a radical cure of Barrett's esophagus, thus preventing esophageal adenocarcinoma.

**Key Words:** Barrett's esophagus; Pathogenesis; Diagnosis; Therapy; Advancement

Huang YQ. Current approaches to treating Barrett's esophagus. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007; 15(24): 2567-2571

## 摘要

Barrett's食管是以食管下段逐步肠化及不典型增生为主要特征的食管腺癌癌前状态。本文系统阐述了Barrett's食管定义、发病机制、诊断方法、环氧化酶2(COX-2)等癌基因治疗及内镜下激光、黏膜下切除、光动力治疗等最新进展,为Barrett's食管发病机制的揭示、早期诊断、根治性治疗以及食管腺癌的预防提供了新的思路。

**关键词:** Barrett's食管; 发病机制; 诊断; 治疗; 进展

黄颖秋. Barrett's食管的研究现状. *世界华人消化杂志* 2007;15(24):2567-2571

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/2567.asp>

## 0 引言

Barrett's食管(BE)是胃食管反流病(GERD)的并发症,为食管腺癌的癌前状态,是指食管下段的复层鳞状上皮被单层柱状上皮替代的一种病理现象<sup>[1]</sup>。随着基因芯片DNA测序等分子生物学技术的迅猛发展,内镜诊断和治疗技术的不断进步,人们对BE的定义及发病机制有了更新的认识,同时也为BE的诊断及治疗手段拓展了更大的空间。

## 1 Barrett's食管定义的新认识

BE早期的定义:食管下段的上皮化生包括贲门交界处上皮、胃底贲门样上皮和肠样上皮,且要求化生上皮长度大于3 cm。但诸多研究表明,尚无胃样上皮化生与食管腺癌发生直接相关的证据,而食管下段3 cm以内的肠化同样可导致食管腺癌的发生。因此,美国胃肠病学学会对BE的最新定义为:食管下段内任何长度的肠上皮化生存在,即可诊断BE,包括长节段BE,病变长度大于或等于3 cm;短节段BE,病变长度小于3 cm;超短节段BE,内镜下无明显病变,但病理证实有肠化。但日本及欧洲学者持不同观点,认为肠化并非BE诊断的必要条件<sup>[2-4]</sup>。

## ■背景资料

Barrett's食管(BE)是食管腺癌的癌前状态。研究发现,食管腺癌几乎都产生于BE,而食管腺癌的预后很差,5 a生存率不足10%。因此,探讨BE的发病机制,对BE及其相关食管腺癌的早期诊断、早期治疗尤为重要。分子生物学的发展促进了BE发病机制的更新认识,也为寻找血清标记物诊断BE提供了可能;内镜技术的进步为BE的早期诊断及治疗拓展了更广阔的空间。

## ■研发前沿

基因表达谱芯片在BE诱发的食管腺癌的基因组学研究方面发挥了重要的作用,尤其是他可以检测肿瘤组织和正常组织基因表达水平的差异,不仅为研究食管腺癌的发病机制提供了有利的工具,也为食管腺癌的早期诊断和治疗提供了更多的参考依据。

## 2 Barrett's食管发病机制的新认识

p16, p53基因异常与BE及食管腺癌密切相关。在BE及食管腺癌组织中, p16, p53基因呈现显著的异常表达, p16, p53基因突变率也显著增高,且突变率与BE的不典型增生程度呈显著正相关,提示p16, p53基因可能参与BE的发病机制<sup>[5-7]</sup>,但也有研究认为p53基因异常与BE不典型增生程度无关<sup>[8-9]</sup>。近期研究发现, APC, TIMP3, TERT 3种基因的甲基化可作为预见BE患者发生食管腺癌的标志物,提示APC, TIMP3, TERT基因异常在BE的发病机制中起一定作用<sup>[10]</sup>。转录因子CDX2是肠化过程中的关键性调节因子,在肠化及高度不典型增生的BE上皮及BE相关腺癌组织中,转录因子CDX2与黏蛋白基因MUC2均呈现显著高表达,而PITX1基因却呈现显著低表达,由此可见, CDX2, MUC2, PITX1等相关基因在BE的发生、发展及食管腺癌的致病机制中起重要作用<sup>[11-12]</sup>。转化生长因子 $\beta$ (TGF- $\beta$ )在各阶段的BE上皮中显著高表达,其可能通过抑制PAI, SMAD4基因而起致病作用<sup>[13]</sup>。

在高度不典型增生的BE上皮中,细胞增殖抗原Ki-67呈现显著的高表达,而当BE上皮消退时, Ki-67的活性却显著减低,提示Ki-67在BE向食管腺癌的转化过程中起重要作用<sup>[14-15]</sup>。此外,肝细胞抗原Hep、白介素4(IL-4)等在BE的上皮组织中均异常升高,说明二者可能也参与BE的发病过程<sup>[16-17]</sup>。

环氧合酶(COX)是前列腺素生物合成过程中一个重要的限速酶,可将花生四烯酸代谢成各种前列腺素产物,从而维持机体的各种生理功能,也参与病理过程。COX包括COX-1和COX-2 2种亚型。其中COX-2由于同多种肿瘤的发生关系密切,近年来倍受关注。BE黏膜、食管黏膜不典型增生及食管腺癌组织中COX-2蛋白依次递增的高表达<sup>[15]</sup>,说明COX-2在BE逐渐衍变成食管腺癌的过程中起重要作用,选择性COX-2抑制剂可显著降低BE相关食管腺癌患者癌细胞的生长,减少细胞增殖,增加细胞凋亡,从另一角度证实了COX-2在BE发生、发展中的病理生理学作用<sup>[15]</sup>。

谷胱甘肽S转移酶(GST)在BE及食管腺癌组织中呈低表达或缺失,而基质金属蛋白酶9(MMP-9)则呈递增的高表达,提示GST的缺失、MMP-9的获得可作为BE发生食管腺癌的高危标志<sup>[18]</sup>。

一氧化氮(NO)不仅在GERD的发病中起作用,过量的NO通过干扰线粒体硫铁蛋白功能、抑制DNA中 $O^6$ -甲基鸟嘌呤的修复、使DNA脱氨基以及致DNA基因突变等对食管上皮细胞有损伤作用。BE黏膜及食管腺癌组织中iNOS的表达率显著增高,提示NO在BE的形成和食管腺癌的发生中可能起一定作用<sup>[19]</sup>。

GERD患者中BE的发生率较高,患BE的风险与酸和/或胆汁相关,而且胆汁反流与短节段BE有关,近年研究发现,高达95%的BE患者存在酸碱混合反流,且BE及腺癌黏膜胆酸受体表达显著上调,说明酸碱混合反流与BE发生更为密切<sup>[20]</sup>。其原因是胃酸、胃蛋白酶,加上碱性胆汁、胰液的侵蚀作用,引发了食管下段的化学性炎症性改变,因为食管的复层鳞状上皮对胃酸、胆汁及胰液的耐受性远低于胃的单层柱状上皮,致使柱状上皮逐渐向上移行至食管下段替代之原有的复层鳞状上皮,胃酸和胆汁、胰液的反流较单纯的胃酸或十二指肠液反流更易引发BE。在上述的衍变过程中,食管下段黏膜复层鳞状上皮的多能干细胞在反流物的不断刺激下,其促上皮生长因子受体被激活,进而引发了细胞分化异常<sup>[21-22]</sup>。

BE患者较正常人有更多的食管酸暴露,这可能与食管下段括约肌张力下降,导致其对胃酸清除力减弱,加剧胃酸对食管下段黏膜的损害。酸暴露可能通过增加细胞增殖、减少细胞凋亡,在BE的癌变过程中有重要的病理生理学作用<sup>[23]</sup>。多发性内分泌腺瘤病(MEN- I)及胃泌素瘤患者,因其食管长期处于酸暴露状态,已发现其并发BE及食管腺癌的机率显著升高<sup>[24]</sup>。通过对BE患者酸抑制性治疗发现,患者食管内pH恢复正常后, BE细胞增殖程度显著降低,进一步证实了酸暴露在BE发生、发展中的致病作用。酸暴露是通过激活丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)途径导致BE相关腺癌细胞系(SEG-1)细胞增殖、细胞凋亡减少以及BE肠化上皮p38活性增加而在BE的腺癌癌变过程中起重要作用<sup>[25]</sup>。

BE患者的*H pylori*感染率很高,且部分患者仅有原发于BE的*H pylori*感染。因此,有理由相信, *H pylori*感染是导致BE的重要原因之一,也是形成食管腺癌的危险因素之一,而且*H pylori*可能并不依赖于胃食管反流而引起BE<sup>[22]</sup>。业已证实,离胃食管连接处稍远一些的贲门肠化常由*H pylori*直接导致,贲门部位的炎症可能与*H*

*pylori*感染有关,而与GERD无关<sup>[4]</sup>,但抗*H pylori*治疗能否降低BE引发食管腺癌的风险尚有待于深入研究。

### 3 Barrett's食管诊断技术的新尝试

光动力学诊断技术是利用外源性荧光物质在肿瘤组织聚集的原理,在应用外源性荧光物质后再利用激光诱导荧光光谱对疾病进行诊断。在诱导性继发性荧光的药物中,较为常用的是5-氨基乙酰基丙酸(5-ALA),其可选择性地造成食管黏膜内卟啉蓄积,其中的原卟啉IX即为产生继发性荧光的主要物质,高度不典型增生组织中继发性荧光强度显著增高。光动力学诊断技术在区分高度不典型增生及非不典型增生的BE黏膜的敏感性和特异性均较高<sup>[26-27]</sup>。

光学相干断层摄影技术(OCT)的原理是通过发射并收集机体组织反射回的光线,测量其延迟时间而成像。但因光速太快,几乎无法测量延迟时间,故应用低相关干涉测量法直接测得光反射所经过的距离而成像。OCT的分辨率极高,几乎与光学显微镜相当,所以OCT成像技术又称为光学活检。OCT对BE诊断的敏感性 & 特异性近乎100%,可见其用于BE诊断的前景较为乐观,但因其每次成像范围较小,OCT的应用尚有局限性<sup>[22]</sup>。

弹性散射分光术(ESS)可准确区分高度不典型增生、低度不典型增生及非不典型增生的BE黏膜及食管腺癌组织,并可进一步观察到上皮细胞内细胞核大小及排列分布密度,对于低度不典型增生的诊断十分有益<sup>[28]</sup>。

散射光分光术(LSS)和弥散反射分光术(DRS)均是通过检测组织对紫外线、可见光及接近红外线波长的光线吸收和散射能力的光谱活检技术,其原理为收集检测时经一次或多次散射后形成的背向散射光获得组织信息,对散射效应的综合分析得到上皮细胞内细胞核大小及排列分布密集程度,对于低度不典型增生的诊断也十分有益。研究发现,LSS和DRS对BE诊断的敏感性和特异性几乎达到100%,其对区分高度不典型增生、低度不典型增生及非不典型增生的BE黏膜的敏感性和特异性也在90%以上,因此LSS和DRS无疑是BE诊断技术的新尝试<sup>[28]</sup>。

激光诱导荧光光谱(LIF)是通过向组织发出一定波长的激光,并探测组织激发出的荧光,从而获得组织的成分和浓度的相关信息。因为机体组织内物质构成及其浓度是特定的,据此激

光诱导荧光光谱可以区分不同组织的特性,从而达到诊断目的。有研究发现,LIF区别高度不典型增生、低度不典型增生及非不典型增生的BE黏膜的敏感性和特异性均十分高。但目前LIF技术尚处于实验室阶段,由于LIF用于人体会受到多种因素的限制,该项技术真正意义上的临床应用尚待时日<sup>[29]</sup>。

共聚焦激光显微内镜(CLE)技术<sup>[30]</sup>是将传统电子内镜头端整合上一个小型的共聚焦激光显微镜,其成像原理是由激光器发出的激光束经过扩束透镜、物镜会聚在物镜焦点上,检测组织中荧光物质被激光激发的不同方向荧光而用以诊断BE和食管腺癌。由于癌细胞和杯状细胞在CLE下有突出的特点,其对BE和早期食管腺癌的诊断有显著优势,其敏感性和准确性都较高。

此外,染色内镜、变焦放大内镜、超声内镜及研磨球囊技术也已用于BE的诊断,但因其有一定的假阳性率和局限性,其应用前景尚待观察<sup>[4,22]</sup>。

### 4 Barrett's食管治疗技术的新进展

多种质子泵抑制剂(PPI)药物为内科治疗的首选,但PPI治疗后症状消失的BE患者中仍有部分人存在持续的酸和胆汁反流,此种情况可联合应用促动力药物或中和胆酸的药物。BE具有与食管动力异常相关的高频率反流,极易导致夜间酸暴露,经PPI持续强化治疗使食管黏膜正常,可减少细胞增殖,从而致BE黏膜上皮退化。但此观点尚存争议,因PPI在消除反流症状时并不能完全清除酸反流,酸性环境中酸和胆汁的混合刺激是导致BE发展成食管腺癌的重要原因。此外,一氨基丁酸及COX-2抑制剂治疗也是一种新尝试,但其疗效有待于进一步观察<sup>[1]</sup>。

光动力学治疗(PDT)原理<sup>[26,31]</sup>是通过注射光敏物质,在食管黏膜吸收光敏物质后采用特定波长的光线照射靶区使该处组织变性、坏死而达到治疗目的。采用不同光敏剂实施PDT治疗的随访结果均表明,多数高度或低度不典型增生的BE黏膜均被完全消融,若辅以PPI治疗其效果更为显著,且PDT治疗能显著降低高度不典型增生的发生率及食管腺癌的发生率<sup>[32]</sup>。

内镜技术的进步为BE的内镜治疗拓宽了思路,由于其具备微创性和可重复性的特点,内镜治疗具有其显著的优势<sup>[33]</sup>。

经内镜行Nd:YAG激光对高度不典型增生

#### ■创新盘点

以往关于BE的综述或类似文章只从单一角度加以阐述,而本文从BE的概念、发病机制、诊断及治疗手段的最新进展4个层面逐一评述,尤其是诊断和内镜治疗技术的新观点对临床工作有指导意义。

#### ■应用要点

本文详细介绍了BE各种诊断技术的新尝试,其中,共聚焦激光显微内镜、弹性散射分光、弥散反射分光等技术的应用为BE及食管腺癌的早期诊断提供了更多途径;而内镜下黏膜切除术等内镜治疗技术的应用则为BE的微创治疗开拓了新的思路。

## ■名词解释

共聚焦激光显微内镜: 将一小型共聚焦激光显微镜整合于电子内镜前端, 激光器发出的激光束经过扩束透镜、物镜会聚于物镜的焦点上, 由监视器接收被检组织中被激光激发的荧光物质向各方向的荧光, 经图像分析系统判断不同组织结构的微细差异而达到诊断目的。由于此成像方式为共聚焦成像, 因此称其为共聚焦激光显微内镜。

BE治疗后的组织学证实, BE组织几乎完全被根除, 仅极少数患者残留低度不典型增生BE上皮, 而联合Nd:YAG激光和PPI药物或抗反流手术治疗BE, 其疗效更为显著, 内镜及组织学均证实消融成功。Nd:YAG激光对早期食管腺癌的治疗不受病变部位的限制, 因此, 内镜下Nd:YAG激光气化切除术是一种安全有效的治疗手段, 其主要并发症为出血和食管狭窄<sup>[22]</sup>。

内镜下氩等离子凝固术(APC)治疗后的病理活检中未发现BE上皮组织残留, 提示APC是一种有价值的治疗手段, 应用APC结合PPI药物及Nissen胃底折叠术等抗反流治疗后随访发现, 除极少数患者BE上皮复发, 大多数患者BE上皮完全根除<sup>[34]</sup>。但更长时间的随访观察发现, APC治疗后BE上皮的复发率仍较高, 且存在食管狭窄、胸骨后疼痛等并发症, 其远期疗效有待于进一步证实。

多极电凝术(MPEC)联合PPI治疗BE后的随访观察发现, 大多数BE上皮得以逆转, 但少数患者的新生鳞状上皮有肠化出现。因此, MPEC治疗BE后的定期内镜活检十分必要。而内镜下热探头联合PPI对BE的治疗效果基本与上述几种热力学疗效相似<sup>[34]</sup>。

内镜下黏膜切除术(EMR)治疗BE及早期食管腺癌已较成熟, 现在也已有多种EMR方法, 其中, 透明帽法食管黏膜切除术的远期疗效较好<sup>[33]</sup>。

此外, 内镜下腔内折叠缝合术、内镜下加厚折叠术、内镜下射频消融术以及内镜下植入等治疗手段也对BE的治疗进行了有益的尝试, 但其远期效果尚有待于进一步观察<sup>[23,33,35]</sup>。

Nissen手术、Beley Mark IV手术、Hill手术、Guarner手术及Dor手术等多种传统术式目前仍是外科治疗BE的主要手段<sup>[36]</sup>。与应用PPI药物治疗相比, 单纯的手术治疗在预防BE进展方面并无明显区别, 但手术后辅以PPI治疗比单纯的外科治疗似乎更有益于减少并发症及BE上皮的复发率<sup>[37-39]</sup>。近年来, 腹腔镜抗反流手术的应用无疑拓宽了BE的治疗空间。电视辅助腹腔镜和胸腔镜联合治疗的应用为BE及食管腺癌的外科治疗提供了新的思路<sup>[40]</sup>。

## 5 展望

Barrett's食管作为食管腺癌的癌前病变, 已引起国内外学者的广泛关注。近年来, 随着分子生物学技术的迅猛发展, 人们对BE的病因学及其发

病机制有了更深层次的认识。各种细胞因子及癌相关基因介导BE发病机制的证据, 为人们寻找多种血清学标记物用以早期诊断BE引发的食管腺癌以及评估其病变程度提供了新的思路 and 更多途径。对BE患者的合理随访仍是预防食管腺癌的重要手段。各种内镜诊断和治疗技术的新进展, 更为BE及食管腺癌的早期治疗拓展了广泛的空间。但因有些技术还处于实验或起步阶段, 其远期疗效尚不十分清楚, 更广泛的临床应用有待于进一步深入研究。

## 6 参考文献

- 1 Tutuian R. Update in the diagnosis of gastroesophageal reflux disease. *J Gastrointest Liver Dis* 2006; 15: 243-247
- 2 Tang LH, Klimstra DS. Barrett's esophagus and adenocarcinoma of the gastroesophageal junction: a pathologic perspective. *Surg Oncol Clin N Am* 2006; 15: 715-732
- 3 Peters JH, Hagen JA, DeMeester SR. Barrett's esophagus. *J Gastrointest Surg* 2004; 8: 1-17
- 4 Odze RD. Diagnosis and grading of dysplasia in Barrett's oesophagus. *J Clin Pathol* 2006; 59: 1029-1038
- 5 Segal F, Kaspary AP, Prolla JC, Leistner S. p53 protein overexpression and p53 mutation analysis in patients with intestinal metaplasia of the cardia and Barrett's esophagus. *Cancer Lett* 2004; 210: 213-218
- 6 Leistner-Segal S, Kaspary AP, Lopez P, Pilger DA, Segal F. TP53 gene R72P polymorphism analysis in patients with Barrett esophagus. *Cancer Genet Cytogenet* 2006; 170: 76-77
- 7 Fitzgerald RC. Genetics and prevention of oesophageal adenocarcinoma. *Recent Results Cancer Res* 2005; 166: 35-46
- 8 Robert ME, Washington MK, Lee JR, Goldenring JR, Bronner MP, Goldblum JR, Greenson JK, Haber MM, Hart JA, Lamps LW, Lauwers GY, Lewin D, Lazenby AJ, Montgomery E, Crawford JM. Rab11a immunohistochemical analysis does not distinguish indefinite, low-, and high-grade dysplasia in Barrett esophagus. *Am J Clin Pathol* 2005; 124: 519-527
- 9 Williams LJ, Guernsey DL, Casson AG. Biomarkers in the molecular pathogenesis of esophageal (Barrett) adenocarcinoma. *Curr Oncol* 2006; 13: 33-43
- 10 Clement G, Braunschweig R, Pasquier N, Bosman FT, Benhattar J. Methylation of APC, TIMP3, and TERT: a new predictive marker to distinguish Barrett's oesophagus patients at risk for malignant transformation. *J Pathol* 2006; 208: 100-107
- 11 Lord RV, Brabender J, Wickramasinghe K, DeMeester SR, Holscher A, Schneider PM, Danenberg PV, DeMeester TR. Increased CDX2 and decreased PITX1 homeobox gene expression in Barrett's esophagus and Barrett's-associated adenocarcinoma. *Surgery* 2005; 138: 924-931
- 12 Hu Y, Jones C, Gellersen O, Williams VA, Watson TJ, Peters JH. Pathogenesis of Barrett esophagus: deoxycholic acid up-regulates goblet-specific gene MUC2 in concert with CDX2 in human esophageal

- cells. *Arch Surg* 2007; 142: 540-544; discussion 544-545
- 13 Onwuegbusi BA, Aitchison A, Chin SF, Kranjac T, Mills I, Huang Y, Lao-Sirieix P, Caldas C, Fitzgerald RC. Impaired transforming growth factor beta signalling in Barrett's carcinogenesis due to frequent SMAD4 inactivation. *Gut* 2006; 55: 764-774
- 14 van Baal JW, Milano F, Rygiel AM, Bergman JJ, Rosmolen WD, van Deventer SJ, Wang KK, Peppelenbosch MP, Krishnadath KK. A comparative analysis by SAGE of gene expression profiles of Barrett's esophagus, normal squamous esophagus, and gastric cardia. *Gastroenterology* 2005; 129: 1274-1281
- 15 Hammoud ZT, Badve S, Saxena R, Kesler KA, Rieger K, Malkas LH, Hickey RJ. A novel biomarker for the detection of esophageal adenocarcinoma. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2007; 133: 82-87
- 16 Steininger H, Pfofe DA, Muller H, Haag-Sunjic G, Fratianu V. Expression of CDX2 and MUC2 in Barrett's mucosa. *Pathol Res Pract* 2005; 201: 573-577
- 17 Dvorak K, Ramsey L, Payne CM, Sampliner R, Fass R, Bernstein H, Prasad A, Garewal H. Abnormal expression of biomarkers in incompletely ablated Barrett's esophagus. *Ann Surg* 2006; 244: 1031-1036
- 18 Herszenyi L, Hritz I, Pregun I, Sipos F, Juhasz M, Molnar B, Tulassay Z. Alterations of glutathione S-transferase and matrix metalloproteinase-9 expressions are early events in esophageal carcinogenesis. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 676-682
- 19 黄颖秋. 一氧化氮与消化系统疾病. 见萧树东. 胃肠病学和肝病学-基础理论与临床进展. 第1版. 上海: 上海世界图书出版公司, 2004: 52-59
- 20 Zaninotto G, Cassaro M, Pennelli G, Battaglia G, Farinati F, Ceolin M, Costantini M, Ruol A, Guirrola E, Rizzetto C, Portale G, Ancona E, Rugge M. Barrett's epithelium after antireflux surgery. *J Gastrointest Surg* 2005; 9: 1253-1260; discussion 1260-1261
- 21 Cowgill SM, Al-Saadi S, Villadolid D, Zervos EE, Rosemurgy AS 2nd. Does Barrett's esophagus impact outcome after laparoscopic Nissen fundoplication? *Am J Surg* 2006; 192: 622-626
- 22 Anandasabapathy S, Jhamb J, Davila M, Wei C, Morris J, Bresalier R. Clinical and endoscopic factors predict higher pathologic grades of Barrett dysplasia. *Cancer* 2007; 109: 668-674
- 23 Yeh RW, Triadafilopoulos G. Endoscopic antireflux therapy: the Stretta procedure. *Thorac Surg Clin* 2005; 15: 395-403
- 24 Hoffmann KM, Gibril F, Entsuaeh LK, Serrano J, Jensen RT. Patients with multiple endocrine neoplasia type 1 with gastrinomas have an increased risk of severe esophageal disease including stricture and the premalignant condition, Barrett's esophagus. *J Clin Endocrinol Metab* 2006; 91: 204-212
- 25 Kyrgidis A, Kountouras J, Zavos C, Chatzopoulos D. New molecular concepts of Barrett's esophagus: clinical implications and biomarkers. *J Surg Res* 2005; 125: 189-212
- 26 Foroulis CN, Thorpe JA. Photodynamic therapy (PDT) in Barrett's esophagus with dysplasia or early cancer. *Eur J Cardiothorac Surg* 2006; 29: 30-34
- 27 Rossi E, Villanacci V, Bassotti G, Casa DD, Missale G, Minelli L, Cestari R. Her-2/neu in barrett esophagus: a comparative study between histology, immunohistochemistry, and fluorescence in situ hybridization. *Diagn Mol Pathol* 2006; 15: 125-130
- 28 Lovat LB, Johnson K, Mackenzie GD, Clark BR, Novelli MR, Davies S, O'Donovan M, Selvasekar C, Thorpe SM, Pickard D, Fitzgerald R, Fearn T, Bigio I, Bown SG. Elastic scattering spectroscopy accurately detects high grade dysplasia and cancer in Barrett's oesophagus. *Gut* 2006; 55: 1078-1083
- 29 Falk GW, Skacel M, Gramlich TL, Casey G, Goldblum JR, Tubbs RR. Fluorescence in situ hybridization of cytologic specimens from Barrett's esophagus: a pilot feasibility study. *Gastrointest Endosc* 2004; 60: 280-284
- 30 Kiesslich R, Gossner L, Goetz M, Dahlmann A, Vieth M, Stolte M, Hoffman A, Jung M, Nafe B, Galle PR, Neurath MF. In vivo histology of Barrett's esophagus and associated neoplasia by confocal laser endomicroscopy. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2006; 4: 979-987
- 31 Mino-Kenudson M, Ban S, Ohana M, Puricelli W, Deshpande V, Shimizu M, Nishioka NS, Lauwers GY. Buried dysplasia and early adenocarcinoma arising in barrett esophagus after porfimer-photodynamic therapy. *Am J Surg Pathol* 2007; 31: 403-409
- 32 Globe J, Smythe A, Kelty CJ, Reed MW, Brown NJ, Ackroyd R. The effect of photodynamic therapy (PDT) on oesophageal motility and acid clearance in patients with Barrett's oesophagus. *J Photochem Photobiol B* 2006; 85: 17-22
- 33 Tokar JL, Haluszka O, Weinberg DS. Endoscopic therapy of dysplasia and early-stage cancers of the esophagus. *Semin Radiat Oncol* 2007; 17: 10-21
- 34 Rossi M, Barreca M, de Bortoli N, Renzi C, Santi S, Gennai A, Bellini M, Costa F, Conio M, Marchi S. Efficacy of Nissen fundoplication versus medical therapy in the regression of low-grade dysplasia in patients with Barrett esophagus: a prospective study. *Ann Surg* 2006; 243: 58-63
- 35 Pilloud R, Jaquet Y, Monnier P. Extensive circumferential endoscopic mucosal resection with a new rigid esophagoscope: an animal study. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2005; 130: 1399
- 36 Csendes A. Surgical treatment of Barrett's esophagus: 1980-2003. *World J Surg* 2004; 28: 225-231
- 37 Canon CL, Morgan DE, Einstein DM, Herts BR, Hawns MT, Johnson LF. Surgical approach to gastroesophageal reflux disease: what the radiologist needs to know. *Radiographics* 2005; 25: 1485-1499
- 38 Chang EY, Morris CD, Seltman AK, O'Rourke RW, Chan BK, Hunter JG, Jobe BA. The effect of antireflux surgery on esophageal carcinogenesis in patients with barrett esophagus: a systematic review. *Ann Surg* 2007; 246: 11-21
- 39 Oksala NK, Atalay M, Rantanen TK. Antireflux surgery and esophageal mucosal DNA damage. *Pathophysiology* 2006; 13: 23-27
- 40 Ng EK. Endoscopic therapy for oesophageal cancer. *Dig Dis* 2005; 23: 102-105

## ■同行评价

本文探讨了Barrett's食管的诊断和治疗进展,对认识Barrett's食管及食管腺癌的发生规律有一定帮助,行文流畅,综述全面,引用的参考文献较新,对临床有指导意义,有一定的参考价值。

编辑 程剑侠 电编 张敏



## 胸腔胃-气管(支气管)瘘的诊断与治疗进展

吴刚, 赵明, 韩新巍

### ■背景资料

各种原因引起胸腔内之胃腔与气道间相互沟通即形成胸腔胃-气管(支气管)瘘。临床医生对本病缺乏认识, 常漏诊或误诊为食管-气管瘘、误咽和放射性肺炎而贻误治疗。本病严重威胁患者生命, 预后极差。

吴刚, 赵明, 韩新巍, 郑州大学第一附属医院放射科 河南省郑州市 450052

韩新巍, 教授, 主任医师, 主要从事影像诊断与介入放射学研究。  
通讯作者: 韩新巍, 450052, 河南省郑州市建设东路1号, 郑州大学第一附属医院放射科, 河南省高校临床医学重点学科开放实验室。hanxinwei2006@163.com

电话: 0371-65165352 传真: 0371-66971086

收稿日期: 2007-07-13 修回日期: 2007-08-18

### Progress in treatment and diagnosis of thoracostomach-tracheal (principal bronchial) fistula

Gang Wu, Ming Zhao, Xin-Wei Han

Gang Wu, Ming Zhao, Xin-Wei Han, Department of Radiology, the First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, He'nan Province, China

Correspondence to: Xin-Wei Han, Department of Radiology, the First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, key open laboratory for clinical medicine of He'nan university, 1 Jianshe East Road, Zhengzhou 450052, He'nan Province, China. hanxinwei2006@163.com

Received: 2007-07-13 Revised: 2007-08-18

### Abstract

Thoracostomach-tracheal (principal bronchial) fistula represents an extremely rare, life-threatening complication of transthoracic esophagectomy. All previous reports have been case studies. It is easy to misdiagnose esophagotracheal fistula, mis-swallowing and radioactivity pneumonia. Provoked cauterize choke, pulmonary infection, gastric acid pneumonia, eating disorder, nutrition failure caused by the fistula could result in high mortality. In this report, we summarized the advances in understanding etiological factors, pathogenic mechanisms, clinical symptoms, diagnosis and treatment of thoracostomach-tracheal (principal bronchial) fistula.

**Key Words:** Thoracostomach-tracheal (principal bronchial) fistula; Etiology; Pathogenesis; Clinical manifestations

Wu G, Zhao M, Han XW. Progress in treatment and diagnosis of thoracostomach-tracheal (principal bronchial) fistula. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007; 15(24): 2572-2578

### 摘要

胸腔胃-气管(支气管)瘘是食管癌或贲门癌广泛切除行胸腔食管-胃弓上吻合术或颈部吻合术后引起的严重并发症。国内外文献报道的病例几乎均为个案病例, 鲜见详细的文献报道。由于人们对其了解甚少, 临床常常被误诊为误咽、食管-气管瘘、放射性肺炎等而贻误治疗, 瘘引发剧烈的烧灼样刺激性呛咳、顽固性肺部感染、胃酸刺激性化学性肺炎和进食障碍、营养衰竭, 具有极高的病死率。本文就胸腔胃-气管(支气管)瘘的病因、病理与病理生理机制、临床表现以及治疗进展作一综述。

**关键词:** 胸腔胃-气管(支气管)瘘; 病因; 病理与病理生理机制; 临床表现

吴刚, 赵明, 韩新巍. 胸腔胃-气管(支气管)瘘的诊断与治疗进展. *世界华人消化杂志* 2007; 15(24): 2572-2578

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/2572.asp>

### 0 引言

手术切除是食管、贲门疾病特别是食管癌和贲门癌的主要治疗手段, 食管切除后消化道重建是手术的重要步骤。自1933年Ohsawa第1例胃代食管手术成功以来, 胃以其操作简单、死亡率低和并发症发生率低的优点成为食管切除术后重建消化道的主要器官。目前, 食管癌手术治疗, 提倡食管广泛切除、主动脉弓上或颈部食管-胃吻合术, 胃上提胸腔走行于后纵隔原食管床区。但是由于胃代食管术后胃的解剖位置由腹部上提胸部、胃的血供及神经支配发生改变, 以及术后肿瘤残存、肿瘤复发、各种肿瘤治疗手段的综合应用等, 临床上不可避免的一些并发症也会发生。

胸腔胃-气管(支气管)瘘是其中的严重并发症之一。胸腔胃-气管(支气管)瘘指食管广泛切除术后胃上提胸腔内, 胸腔内胃走行于后纵隔原食管床区, 位居气管和主支气管后部, 与气管和主支气管密切相贴, 手术后出血、炎症、渗出、纤维化和机化使胸腔胃与气管和主支气管相互粘连融为一体。各种原因导致胃壁和气道

壁损伤破坏,胃腔与气管/支气管腔相互交通,胃腔内含有大量消化酶的酸性消化液溢入碱性环境的气道内而引起剧烈的如烈火般的烧灼样刺激性呛咳、患者强迫性坐立体位、顽固性肺炎、营养衰竭、水电解质紊乱等一系列临床症状群<sup>[1-2]</sup>。

胸腔胃-气管(支气管)瘘曾认为是食管癌切除后的罕见并发症,发生胸腔胃-气管(支气管)瘘的机率多年来认为不高,一旦发生,严重威胁患者生命,预后极差<sup>[3-4]</sup>。国内外见诸文献报道的病例仅40余例,几乎均为个案病例,鲜见详细的大宗文献报道。由于人们对其了解甚少,往往被误诊为误咽、食管-气管瘘、放射性肺炎等而贻误治疗<sup>[5-7]</sup>。瘘引发剧烈的如烈火般的烧灼样刺激性呛咳、顽固性肺部感染、酸性胃液刺激性化学性肺炎或/和胃液的消化性腐蚀性肺炎、和进食障碍、营养衰竭等,具有极高的病死率<sup>[8]</sup>。随着食管癌手术的广泛开展、尤其是手术后立体放射治疗如X线刀、 $\gamma$ 刀或适形调强放射的广泛实施,胸腔胃-气管(支气管)瘘的发生率愈来愈高,本病在临床并不少见。

## 1 病因

胸腔胃-气管(支气管)瘘在临床上普遍缺乏认识,其并非少见疾病,病因不明<sup>[9]</sup>,多数病例可能有食管外科手术切除自身的原因<sup>[10-11]</sup>,如手术直接损伤胃壁、手术损伤气道壁、手术导致胃壁或/和食道壁缺血、手术后食管床区细菌感染等破坏胃壁或食道壁;极罕见于异物<sup>[12]</sup>和外伤<sup>[13-14]</sup>直接损伤胸腔胃之胃壁和食道壁形成胸腔胃-气管(支气管)瘘;也可源于膈下脓肿<sup>[15]</sup>,细菌感染蔓延侵袭,破坏胸腔的胃壁或/和食道壁,形成胸腔胃-气管(支气管)瘘;胃消化性溃疡穿孔<sup>[16-17]</sup>,胃消化液继之腐蚀破坏邻近的气道壁,致使胃腔与气道相通,形成胸腔胃-气管(支气管)瘘;或局部肿瘤复发<sup>[18]</sup>,肿瘤直接浸润破坏胃壁和食道壁,形成胸腔胃-气管(支气管)瘘<sup>[11]</sup>。

国外文献就其病因亦提出几种假设理论:Bavry *et al*<sup>[19]</sup>提出胃气体膨胀理论,由于胃膨胀使胃黏膜拉伸变薄,促进胃酸分泌,胃酸过多,发生消化性溃疡而胃壁穿孔。另外还有胃泌素的高释放<sup>[20]</sup>、迷走神经的损伤<sup>[21]</sup>、胆汁酸的反流<sup>[22]</sup>和胃排空延迟<sup>[23-24]</sup>等使胃酸和胃蛋白酶对胃黏膜的损伤作用时间延长,易形成溃疡穿孔继而与气道相通。

新近国内韩新巍 *et al*<sup>[25]</sup>报告认为食管癌手术后,因可疑肿瘤切除不彻底即残留肿瘤追加放射治疗,特别是实施立体放射治疗,放射野内胃壁超剂量的放射性损伤,胃酸及胃蛋白酶加剧胃壁损伤、破坏胃壁、致使溃疡和穿孔;进而破坏气道壁,放射治疗使气道管壁也同时遭受了辐射损伤,是形成胸腔胃-气管(支气管)瘘的主要原因。食管癌根治性放射治疗,食管癌的治疗剂量和正常食管的放射线耐受剂量为6000-7000 cGy,而胃的耐受剂量仅为食管的一半左右3000-4000 cGy,胸腔内之胃接受过量的射线而导致放射性胃壁损伤、坏死溃疡、坏死穿孔和气管损伤,胃酸和胃蛋白酶的消化性作用和化学性刺激,局部炎症加剧这类损伤而导致胸腔胃-气管(支气管)瘘,并且这类瘘因辐射而形成难以自行愈合。

## 2 病理与病理生理机制

胸腔胃-气管(支气管)瘘的形成与局部肿瘤残留、复发和立体放射治疗关系密切<sup>[10,45]</sup>,手术前判断肿瘤分期不准,预测手术可切除性错误,手术切除肿瘤不彻底,残留肿瘤生长直接侵蚀胃壁,破坏胃壁,胃壁穿孔,胃内消化液外溢,胃液的消化作用和局部炎症,损伤破坏气道壁,形成胸腔胃-气管(支气管)瘘;也可能肿瘤先破坏气道壁,气道和纵隔炎症感染,从胃壁外层破坏胃壁致胃壁穿孔,形成胸腔胃-气管(支气管)瘘;或者局部肿瘤复发,既侵蚀破坏胃壁又破坏气道壁,胃腔与气道相互沟通,形成胸腔胃-气管(支气管)瘘。

食管癌的放射治疗剂量和食管的耐受剂量为6000-7000 cGy,而胃的耐受剂量仅相当于食管的一半左右。食管癌手术后肿瘤残留或复发,常规对原食管床的肿瘤区进行放射治疗,现代多选用立体放射技术,立体放射以定位准确、治疗靶区剂量有可靠保证为特点。手术后的胸腔胃走行于后纵隔的原食管床区,立体放射治疗锁定的肿瘤靶区恰好将胃包括在内,胸腔胃接受过量射线照射而导致放射性胃壁损伤、乃至坏死穿孔,胃液外溢,局部炎症和消化腐蚀食道壁,形成胸腔胃-气管(支气管)瘘;其实气道也处在放射野内,射线也一样导致食道壁损伤,胃壁和食道壁同时损伤破坏,相互沟通形成胸腔胃-气管(支气管)瘘;熟知胃具有自主性分泌功能,进食与否,胃每天均有一定的胃酸和胃蛋

## ■ 相关报道

查阅有关胸腔胃-气管(支气管)瘘的文献,均为个案报道,没有对该疾病进行详细描述的相关报道。

### ■创新盘点

本文总结分析了有关胸腔胃-气管(支气管)瘘文献,详细介绍了胸腔胃-气管(支气管)瘘的病因、病理与病理生理机制、临床表现以及诊治进展,提高人们对本病的认识。

白酶持续产生,胃酸和胃蛋白酶对胃壁也有腐蚀和损伤的作用,又加之术后胸腔胃易出现排空障碍,延长了胃酸和胃蛋白酶对胃壁的作用时间,更促进了瘘的形成。酸性胃液溢入碱性环境的气道和肺泡内,产生复杂的化学性、腐蚀性肺炎,继发的肺部感染更加剧肺部损伤,也加重瘘的程度,瘘的存在和加剧、促使更多的胃液溢入气管和肺泡内,形成恶性循环,并且放射损伤后形成的瘘难以自愈。胃内容物进入气道后,胃酸刺激支气管引起强烈的支气管痉挛,接着发生支气管上皮的急性炎症反应和支气管周围的炎症细胞浸润;进入肺泡的胃酸迅速向周围肺组织扩散,肺泡上皮细胞变性、破坏并累及间质组织如毛细血管壁,血管壁通透性增加和肺泡毛细血管壁破坏,形成间质性肺水肿、肺泡性肺水肿,肺水肿使肺组织弹性减弱,顺应性降低,肺容量减少,肺泡Ⅱ型细胞破坏,表面活性物质减少,使小气道闭合,肺泡萎陷引起肺不张,肺泡通气不足导致低氧血症甚至形成急性呼吸窘迫综合征。血管内液体大量渗出或反射性血管扩张,若血容量减少35%以上,可发生低血容量性低血压,影响全身血液循环<sup>[26-28]</sup>。

胃酸和胃内容物溢入气道引发剧烈的烧灼样刺激性呛咳,不能进食,机体能量等大量消耗导致机体抵抗力差,如不积极治疗,大多数因严重营养不良、反复的胃酸吸入性支气管痉挛、化学性肺炎、腐蚀性肺炎、多重感染性肺炎、肺脓肿、呼吸功能衰竭乃至窒息而死亡。

肺炎的严重程度与气道内溢入胃液的pH值、溢入量、溢入速度以及在肺内的分布情况和继发感染有关。溢入胃酸的pH<2.5时,可严重损伤肺组织,溢入液体量至50 mL即能引起肺损害,液体分布越广泛,损害也越严重<sup>[29]</sup>。

### 3 诊断

根据特征性的临床表现即剧烈的如烈火般的烧灼样刺激性呛咳,卧位加重而坐立位缓解,有学者称之为“卧位烧灼样刺激性呛咳综合征”<sup>[30]</sup>;平卧位时胸腔胃之胃内容物易于溢入气道而呛咳加重,坐立位或半坐位时胃内容物沉积于胃窦和胃体的下部不易进入气道而呛咳减轻。有食管癌切除胃代食管手术史,尤其术后残存食管癌立体放射治疗史,应高度怀疑胸腔胃-气管(支气管)瘘。细心排除误咽、食管狭窄、食管-气管瘘、食管吻合口狭窄和/或瘘口形成等原因

引起的呛咳,结合口服碘水数字化X线造影或胸部螺旋CT检查可明确诊断。

3.1 临床表现 (1)呛咳:胸腔胃-气管(支气管)瘘时随呼吸会有大量气体经瘘进入胃腔,形成胃内进食假象,刺激胃液分泌。酸性胃液溢入碱性环境的气道和肺内,产生剧烈的、如烈火般烧灼样刺激性呛咳,呛咳与进食与否无关;平卧位时胃内液体更便于溢入气道,故而呛咳加重;坐立位或半坐位时胃内液体沉积于胃腔下部不进入气道而呛咳减轻,为胸腔胃-气管(主支气管)瘘特异性临床表现,可称之为“卧位烧灼样刺激性呛咳综合征”,这类烧灼般刺激性呛咳单纯禁食水治疗无效,而抑制胃液分泌的抗酸治疗有效,胃腔插管持续负压减压彻底抽出胃液更有效。

(2)肺部感染:强酸性、含有大量消化酶的胃液溢入碱性环境的气道和肺泡内,产生剧烈的化学性、严重的腐蚀性肺炎;气管、支气管和肺泡内皮损伤、大量渗出形成良好的细菌培养基,口腔、气道、食道和食物中的大量细菌极易继发多重的肺部感染;腐蚀性肺炎与多重的肺部感染相互作用形成顽固性肺炎乃至肺脓肿。

(3)呼吸困难:胃酸刺激引起支气管严重痉挛,胃酸和消化酶的腐蚀引起大量肺泡内皮细胞损伤、肺泡间质损伤和肺毛细血管损伤等,既影响通气功能、也影响透气功能、更影响气血交换功能。继发的肺炎加剧这些损害,呼吸困难进行性加重,如不及时控制胃酸向气道内溢入,将导致呼吸功能衰竭。

(4)发热:因肺部损伤合并肺部感染,常伴有不同程度的发热,但也可能因患者体质过度虚弱,反应能力极度低下,难出现反应性体温升高。

(5)营养衰竭和水电解质紊乱:患者长期禁食水、剧烈呛咳大量排痰、呼吸困难、发热等使机体大量消耗,常出现严重的水、电解质紊乱、营养不良、甚至恶病质。

韩新巍 *et al* 根据瘘口与气道相通的具体部位可将“卧位烧灼样刺激性呛咳综合征”分为4型:①胸腔胃-气管瘘:胸腔胃之胃腔与气管相交通;②胸腔胃-隆突瘘:胸腔胃之胃腔与隆突区气道相交通;③胸腔胃-左主支气管瘘:胸腔胃之胃腔与左主支气管相交通;④胸腔胃-右主支气管瘘:胸腔胃之胃腔与右主支气管相交通。胸腔胃-气道瘘的分型对于指导治疗具有重要的临床



意义<sup>[31-33]</sup>。

**3.2 影像学表现** (1)胸部X线:肺部纹理增多;病情重或病史长者多伴有不同程度的肺段性的大叶性实变,以下肺为重,胸腔胃-气管瘘和胸腔胃-隆突瘘可累及双下肺,胸腔胃-左主支气管瘘主要累及左下肺,胸腔胃-右主支气管瘘累及右下肺;可伴有不等量的胸水,少量胸水特别左侧少量胸水要与经胸部食管手术的胸膜肥厚鉴别。

(2)上消化道造影:口服碘水上消化道造影显示对比剂通过残留食管进入胃腔内,经过胃壁瘘口溢入气道、旋即被剧烈呛咳弥散至肺内,支气管树显影,因对比剂进入气道引起剧烈呛咳,X线点片不易捕捉瘘口征象;数字化造影可连续摄影捕捉瞬间征象,动态观察对比剂经残留食管进入胃腔,后溢入气道和肺内,能够显示瘘口的具体位置,并能根据对比剂进入气道的具体位置判断相通的具体部位,以及通过对比剂进入肺内的速度和量间接判断瘘口的大小。黄九峰 *et al*<sup>[34]</sup>回顾性分析6例具有完整临床资料患者的胸腔胃-气管(支气管)瘘的临床和口服碘水数字化X线造影表现;认为胸腔胃-气管(支气管)瘘易于误诊,应注意与食管-气管瘘、食管吻合口狭窄、或/和瘘、或气管误咽相鉴别。根据特征性的临床表现和口服碘水造影可以确诊,并为下一步治疗方案提供依据。樊锐太 *et al*<sup>[35]</sup>报告也认为口服碘水常规X线造影不易捕捉到瘘口显影的直接征象,并可加剧呛咳症状,增加肺部感染机会,甚至患者出现窒息,推荐数字化的X线消化道造影。注意所有呛咳患者上消化道造影严禁口服钡剂、推荐使用水溶性碘剂<sup>[1]</sup>。

(3)胸部CT:肺窗显示两肺弥漫性肺间质纤维化;显示范围不等楔形或大片状肺段或肺叶型肺实变,内可见含气支气管征;并可判断有无肺部转移以及其他病变;可合并两侧或单侧胸腔积液;较大的瘘口可在肺窗显示,小的、倾斜或扭曲的瘘口可因部分容积效应被肺窗遮盖掉。纵隔窗直接显示胸腔胃-气管(主支气管)瘘的瘘口与瘘道更为清晰,既可明确瘘的确切位置、又可显示瘘口大小以及瘘与气管的毗邻关系;但过于消瘦的患者因胃壁和气管壁菲薄、部分容积效应有假阳性征象。韩新巍 *et al*<sup>[36]</sup>推荐使用特殊的脂肪窗条件(窗宽400 Hu、窗位-100 Hu)处理图像,显示胃与气道之间的瘘更为准确,可最大程度避免假阳性和假阴性征象,准确率达86%左右。韩新巍 *et al*<sup>[25]</sup>2002年回顾性分析5例具有完整临床资料的胸腔胃-气管(支气管)瘘患

者临床CT表现,认为螺旋CT扫描无创伤、无刺激性、不使用对比剂、不加剧肺部感染,直观显示胸腔胃-气道瘘之瘘口和瘘道,应成为胸腔胃-气管(支气管)瘘的首选筛选手段,可详细观察胸部情况,了解瘘与邻近结构的详细解剖,测量气管/支气管内径,并为下一步介入放射学制定气管内支架置入治疗瘘的方案提供详细资料。

(4)内窥镜:进行纤维内窥镜检查前应该先插入胃管持续负压胃减压,尽力排尽胃液,否则患者平卧引发剧烈呛咳而难以接受检查。应用电子式纤维胃镜和纤维支气管镜分别经胃腔或气管和支气管直接观察瘘口,瘘口周围黏膜充血水肿,瘘道可见有白苔附着,若为肿瘤侵犯或复发所致,可为污苔,瘘口黏膜凹凸不平、不规则。经胃镜可见胃壁瘘口有气泡冒出,瘘道较大时,可经胃镜看到气道的环状软骨而确诊;或经纤支镜看见胃腔胃黏膜皱襞而明确诊断。经纤维内镜可进行瘘口周围活检,以明确瘘的病理学原因。

## 4 治疗

胸腔胃-气管(支气管)瘘严重的肺部损伤与顽固性肺部感染和进食障碍是患者的主要死亡原因。肺部损伤的严重性和感染的顽固性在于不管进食与否,胃都有持续性的自主分泌功能,不断地分泌胃液经瘘道溢入肺内造成肺的持续性损伤。内科保守治疗可采用禁食水、抑制胃酸分泌、控制肺部感染等措施,但效果有限。外科手术修补瘘口,因患者体质差,瘘周严重感染和炎症,放射治疗的辐射损伤、或难以耐受手术、或手术效果不理想<sup>[37]</sup>。

近年来,随着介入放射学新技术的不断涌现,尽管变化巨大的胃腔无法使用内支架置入,可经气道进行内支架置入。气道内支架置入新技术的进步和支架材料与工艺的改进,气管或支气管支架在临床中应用越来越广泛<sup>[38-39]</sup>。以气道部分覆膜支架置入封堵胸腔胃与气道间的瘘口为主的综合治疗得到临床的应用,并取得理想疗效。

**4.1 内科保守治疗** 包括禁食、抑制胃酸分泌、胃肠减压、补液和营养支持治疗等。解建 *et al*<sup>[40]</sup>报告3例胸腔胃-支气管瘘,两例采取保守治疗,一例采用外科修补的方法治疗均获得痊愈,认为治疗应以保守为首选,对保守治疗无效,而又能耐手术者,亦可选择手术治疗。王峻峰 *et al*<sup>[41]</sup>报告1例食管癌术后胸腔胃支气管瘘,应用带膜

## ■应用要点

本文通过描述胸腔胃-气管(支气管)瘘的有关特征性表现,能够提高临床医生对该病的认识,减少误诊或漏诊率。早期诊断,及时治疗,提高患者生活质量,延长患者生命。

## ■名词解释

1 胸腔胃-气管(支气管)瘘:食管癌广泛切除、胃上提胸腔内行主动脉弓上或颈部吻合术后,胸腔胃走行于后纵隔原食管床区与气管、隆突和主支气管相互毗邻并粘连机化为一体,肿瘤复发、放射损伤、感染、缺血、胃溃疡等原因引起胃壁和气管壁破坏,胸腔内之胃腔与气道之间相互沟通。

2 卧位烧灼样刺激性呛咳综合征:剧烈如烈火或火焰般烧灼样刺激性呛咳、平卧位和进食水后加重、坐立位缓解,腐蚀性肺炎、呼吸困难、下肺呈肺叶或肺段性大叶样实变,为胸腔胃-气管(支气管)瘘特征性临床症状。

气管支架治疗后痊愈,但他认为治疗应以保守治疗为首选,一般患者不能耐受再次的全麻及较大的手术创伤,如保守治疗无效,可选择介入气管支架治疗。

韩新巍 *et al*<sup>[2]</sup>研究认为,禁食水、药物抑制胃酸分泌、胃腔插管持续负压胃肠减压排尽胃液和十二指肠以远空肠插管肠内营养支持治疗是有效的内科措施。对于缓解刺激性呛咳、减轻肺部损伤和感染、维持正常的营养和水电解质平衡、乃至维护生命至关重要<sup>[2,25,30,33]</sup>。

4.2 外科修补手术治疗 外科修补手术治疗的方式有直接缝合瘘口和应用移植肌肉瓣填塞瘘口。Okuyama *et al*<sup>[31]</sup>报告1例食管切除术后出现胸腔胃-支气管瘘的病例,通过2次手术移植胸大肌肌瓣成功修补瘘口,瘘愈合并见瘘口区上皮形成,认为外科手术行肌肉瓣移植可以成功修补胸腔胃-支气管瘘。

4.3 介入放射学气道内支架置入治疗 由于胃腔巨大、尤其内腔直径变化巨大,难以设计合适规格和型号的胃腔内支架经胃腔封堵瘘,目前无专门的胃腔内支架能够稳妥的置入胃腔内封堵瘘口。但是手术后胸腔胃与气道被牢固地纤维化和机化融合为一体,气道位置与直径相对恒定,可在气道的瘘口区域置入覆膜内支架以物理学方法封堵瘘口。

近年来不断有新型气道内支架问世,气道内支架置入新技术的进步和支架材料与工艺的改进,气道内支架在临床中应用越来越广泛。胃与气道之间形成瘘道,依介入放射学治疗理念,应经胃腔以覆膜内支架从胃的一侧封堵瘘口,但胃的一侧封堵困难,或许可经气道以覆膜内支架从气道的一侧封堵瘘口。在气道内置入气管支架不失为1种可以尝试的治疗方法。韩新巍 *et al*<sup>[2]</sup>报告6例患者8处瘘在气道内置入8枚气道覆膜内支架封堵瘘口。6例内支架均置入成功,瘘口完全封闭,即刻消除呛咳症状。5例有效控制肺部感染,患者生活质量得以提高;1例支架置入5 d后因呼吸衰竭而死亡。随访4-15 mo,3例死于机体衰竭,1例死于呼吸衰竭,1例正常生活。结论认为气道覆膜内支架能有效封堵胸腔胃-气管(支气管)瘘,操作简单、安全、近期疗效满意。

韩新巍 *et al*<sup>[42]</sup>还报告应用气管-主支气管部分覆膜分支状内支架(中国专利:ZL03 2 35 769.9)治疗3例胸腔胃-主支气管瘘,1例胸腔胃-隆突瘘、1例胸腔胃-左主支气管瘘、1例胸腔胃-右主支气管瘘,内支架一次性置入成功,3

例胸腔胃-气道瘘完全封闭,即刻消除了呛咳症状,有效控制肺部感染,改善了呼吸状况。认为气管-主支气管覆膜分支状内支架能有效封堵胸腔胃-气管(支气管)瘘,操作简单、安全、近期疗效可靠。最近又报告了16例胸腔胃-气管(支气管)瘘通过应用气管金属支架置入气管支气管封堵瘘口,结果75%的患者瘘口被一次置入完全封堵,联合应用胃肠减压管和经鼻空肠营养管置入综合治疗,患者虽然在1 a内死亡,但死因多为非瘘相关性因素,最长生存了42 wk,平均生存时间为17±3.02 wk,认为气管支气管内置入气管支气管金属支架治疗胸腔胃-气管(支气管)瘘是安全有效的<sup>[43]</sup>。

## 5 展望

随着食管癌手术的开展和手术后立体放射等综合治疗的广泛应用,人们对胸腔胃-气管(支气管)瘘认识的逐渐深入和对其诊断水平的提高,临床病例会越来越多,气管或/和支气管支架的应用也会越来越多。但目前仍存在诸多亟待解决的难题,如何提高对本病的认识,怎样早期诊断本病,以什么方法有效治疗肺部的化学性损伤和合并的多重肺部感染,气道内支架作为一种“异物”,置入气道的远期疗效及安全性也有许多问题没有解决。

理想的气道内支架应该是:容易置入和取出;有足够的扩张能力又不引起对气道黏膜的损害;有多种不同的型号适用于各种气道瘘口位置;牢固维持原位而不移位;不刺激气道黏膜,不加重感染和促进肉芽组织形成;不阻塞气道血流;不抑制纤毛运动及对分泌物的清除功能<sup>[44-45]</sup>。

开发研制硬度和柔韧度适度、疗效更好、并发症更少的新型支架,是今后研究的方向,正在研制和临床试用的有药物涂层内支架、电气分解内支架、放射性内支架及生物可降解支架。以期在不久的将来能够应用于临床。临床医师应不断总结治疗经验,完善治疗技术,规范治疗操作,使支架置入成为更加安全、有效的治疗方式,让更多的胸腔胃-气管(支气管)瘘患者从中获益。

## 6 参考文献

- 1 Miwa K, Takamori S, Hayashi A, Shirouzu K. Gastrobronchial fistula after esophagectomy. *Eur J Cardiothorac Surg* 2004; 25: 460
- 2 韩新巍, 吴刚, 李永东, 高雪梅, 杨瑞民, 李天晓, 马南, 王艳丽. 覆膜内支架置入气道治疗胸腔胃-气道瘘. 郑州大学学报(医学版) 2004; 39: 71-73
- 3 Barcons M, Bethese A, Perez M, Vallverdu I, Net

- A, Mancebo J. Gastrobronchial fistula: report of an unusual case. *Intensive Care Med* 1996; 22: 271-272
- 4 Nagata K, Kamio Y, Ichikawa T, Kadokura M, Kitami A, Endo S, Inoue H, Kudo SE. Congenital tracheoesophageal fistula successfully diagnosed by CT esophagography. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 1476-1478
- 5 韩新巍, 李天晓, 王瑞林, 樊青霞. 癌性食管-气管瘘的被膜自膨胀式金属内支架植入治疗. *中华放射学杂志* 1997; 31: 741-743
- 6 孙兴旺, 王秀英, 崔进国, 何学问, 潘金元. 被覆金属内支架在治疗食管纵隔瘘和气管瘘中的临床应用. *中华放射学杂志* 1998; 32: 265-267
- 7 Song HY, Do YS, Han YM, Sung KB, Choi EK, Sohn KH, Kim HR, Kim SH, Min YI. Covered, expandable esophageal metallic stent tubes: experiences in 119 patients. *Radiology* 1994; 193: 689-695
- 8 薛敏娜, 潘纪成. 吸入性肺病的影像诊断. *国外医学(临床放射学分册)* 2002; 25: 83-85
- 9 Jha PK, Deiraniya AK, Keeling-Roberts CS, Das SR. Gastrobronchial fistula - a recent series. *Interact Cardiovasc Thorac Surg* 2003; 2: 6-8
- 10 Stal JM, Hanly PJ, Darling GE. Gastrobronchial fistula: an unusual complication of esophagectomy. *Ann Thorac Surg* 1994; 58: 886-887
- 11 Aguilo Espases R, Lozano R, Navarro AC, Regueiro F, Tejero E, Salinas JC. Gastrobronchial fistula and anastomotic esophagogastric stenosis after esophagectomy for esophageal carcinoma. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2004; 127: 296-297
- 12 Karcher JC, von Buch C, Waag KL, Reinshagen K. Gastrobronchial fistula after toothbrush ingestion. *J Pediatr Surg* 2006; 41: 1768-1770
- 13 Al-Qudah A. Traumatic gastrobronchial fistula: case report and review of the literature. *J Pediatr Surg* 1997; 32: 1798-1800
- 14 Purucker EA, Sudfeld S, Matern S. Gastrobronchial fistula after caustic injury due to lye ingestion. *Endoscopy* 2003; 35: 252
- 15 Angelillo VA, O'Donohue WJ Jr, Campbell JC, Hurley J, Fitzgibbons RJ Jr. Gastrobronchial fistula secondary to a subphrenic abscess. *Chest* 1983; 84: 85-86
- 16 Matsuoka T, Nagai Y, Muguruma K, Yoshikawa K, Higuchi K, Seki S, Satake K. Liver penetration and gastrobronchial fistula: unusual complication of a peptic ulcer. *Am Surg* 1995; 61: 492-494
- 17 Richardson AJ, Tait N, O'Rourke IO. Gastrobronchial fistula owing to non-malignant causes. *Br J Surg* 1992; 79: 331-332
- 18 Cameron EW, Colby JM, Swanson RS. Gastrobronchial fistula in untreated lymphoma. *J Thorac Imaging* 1996; 11: 150-152
- 19 Bavry AA, Solorzano CC, Hocking MP. Unusual presentation of hemoptysis in a 78-year-old with previous Nissen fundoplication. *Am Surg* 1998; 64: 1223-1225
- 20 Bushkin FL, Woodward ER, O'Leary JP. Occurrence of gastric ulcer after Nissen fundoplication. *Am Surg* 1976; 42: 821-826
- 21 Herrington JL Jr, Meacham PW, Hunter RM. Gastric ulceration after fundic wrapping. Vagal nerve entrapment, a possible causative factor. *Ann Surg* 1982; 195: 574-581
- 22 Bremner CG. Gastric ulceration after a fundoplication operation for gastroesophageal reflux. *Surg Gynecol Obstet* 1979; 148: 62-64
- 23 Little AG. Pathogenesis of esophagitis in patients with gastroesophageal reflux. *Proc Inst Med Chic* 1980; 33: 107-110
- 24 He MR, Song YG, Zhi FC. Gastrointestinal hormone abnormalities and G and D cells in functional dyspepsia patients with gastric dysmotility. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 443-446
- 25 韩新巍, 吴刚, 马南, 高雪梅, 王艳丽, 李永东. 胸腔胃-气管(主支气管)瘘临床与影像学诊断体会. *郑州大学学报(医学版)* 2003; 38: 395-397
- 26 Knight PR, Druskovich G, Tait AR, Johnson KJ. The role of neutrophils, oxidants, and proteases in the pathogenesis of acid pulmonary injury. *Anesthesiology* 1992; 77: 772-778
- 27 Martling CR, Lundberg JM. Capsaicin sensitive afferents contribute to acute airway edema following tracheal instillation of hydrochloric acid or gastric juice in the rat. *Anesthesiology* 1988; 68: 350-356
- 28 Nishina K, Mikawa K, Takao Y, Shiga M, Maekawa N, Obara H. Intravenous lidocaine attenuates acute lung injury induced by hydrochloric acid aspiration in rabbits. *Anesthesiology* 1998; 88: 1300-1309
- 29 Knight PR, Rutter T, Tait AR, Coleman E, Johnson K. Pathogenesis of gastric particulate lung injury: a comparison and interaction with acidic pneumonitis. *Anesth Analg* 1993; 77: 754-760
- 30 韩新巍, 吴刚, 赵明, 马骥, 管生, 水少锋, 马南, 王艳丽. 胸腔胃-气道瘘的临床表现与螺旋CT诊断. *世界华人消化杂志* 2007; 15: 905-908
- 31 Okuyama M, Saito R, Motoyama S, Kitamura M, Ogawa J. Histological confirmation of healing of gastrobronchial fistula using a muscle flap. *Ann Thorac Surg* 2002; 73: 1298-1299
- 32 Yang HS, Zhang LB, Wang TW, Zhao YS, Liu L. Clinical application of metallic stents in treatment of esophageal carcinoma. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 451-453
- 33 Filho AJ, Kondo W, Nassif LS, Garcia MJ, Tirapelle Rde A, Dotti CM. Gastrogastic fistula: a possible complication of Roux-en-Y gastric bypass. *JSLs* 2006; 10: 326-331
- 34 黄九峰, 韩新巍, 吴刚. 胸腔胃-气道瘘临床与数字化显影诊断的初步研究. *中原医刊* 2003; 30: 47-48
- 35 樊锐太, 欧阳松云, 李国文, 韩新巍. 癌性食管-气管瘘的内支架植入疗效探讨. *中国肿瘤临床* 1999; 26: 255-257
- 36 韩新巍, 吴刚, 王艳丽, 马南, 高雪梅, 李永东. 胸腔胃-气管(主支气管)瘘的CT诊断. *实用放射学杂志* 2005; 21: 1157-1159
- 37 Brega Massone PP, Infante M, Valente M, Conti B, Carboni U, Cataldo I. Gastrobronchial fistula repair followed by esophageal leak--rescue by transesophageal drainage of the pleural cavity. *Thorac Cardiovasc Surg* 2002; 50: 113-116
- 38 Balazs A, Galambos Z, Kupcsulik P. Esophago-respiratory fistulas of tumorous origin. *Magy Seb* 2005; 58: 297-304
- 39 Liu YH, Ko PJ, Wu YC, Liu HP, Tsai YH. Silicone airway stent for treating benign tracheoesophageal fistula. *Asian Cardiovasc Thorac Ann* 2005; 13: 178-180
- 40 解建, 刘培云, 孟凡利. 食管癌术后支气管胸腔胃瘘三

## ■同行评价

本文综述了胸腔胃-气管(支气管)瘘的病因, 病理, 临床表现及诊断治疗. 内容全面, 层次清楚, 结构严谨, 有重要的临床意义和参考价值.

- 例. 中华结核和呼吸杂志 1998; 21: 426
- 41 王峻峰, 陈淑章, 沈黎明. 应用带膜气管支架治疗食管癌术后胸腔胃支气管瘘1例. 东南国防医药 2003; 5: 202
- 42 韩新巍, 吴刚, 高雪梅, 李永东, 王艳丽, 马南. 气管-主支气管覆膜分支状内支架的设计及初步应用. 介入放射学杂志 2004; 13: 253-255
- 43 Li YD, Li MH, Han XW, Wu G, Li WB. Gastrotracheal and gastrobronchial fistulas: management with covered expandable metallic stents. *J Vasc Interv Radiol* 2006; 17: 1649-1656
- 44 Jacobs JP, Quintessenza JA, Botero LM, van Gelder HM, Giroud JM, Elliott MJ, Herberhold C. The role of airway stents in the management of pediatric tracheal, carinal, and bronchial disease. *Eur J Cardiothorac Surg* 2000; 18: 505-512
- 45 Zakaluzny SA, Lane JD, Mair EA. Complications of tracheobronchial airway stents. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2003; 128: 478-488

编辑 程剑侠 电编 郭海丽

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2007年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

### 第三届国际微创外科论坛暨 2007 年天津市 消化内镜学会征文通知

**本刊讯** 为了跟踪国际发展的最新态势, 加强该领域的交流与合作, 由天津市医学会主办, 天津市南开医院、天津市微创外科中心承办的“第三届国际微创外科论坛暨2007年天津市消化内镜学会”将于2007-11-02/04在天津举办。

本次会议还将邀请澳大利亚、奥地利、日本、香港等国家和地区及国内内镜、腹腔镜领域的知名专家与会, 以专题讲座及操作演示等方式展示当前微创外科(肝胆胰脾胃肠)领域的最新前沿技术, 其中包括: 大会专题演讲及大会论文交流; 微创手术实况演示; 内镜操作实况演示; 世界级大师精彩手术实况演示; 国家级继续教育项目; 微创手术新技术与新器械; 微创外科手术设备与器械展示。

#### 1 征文内容和要求

征文内容: 凡是与本次会议内容相关的实验研究、临床工作总结、新方法、新技术、新器械等论文, 尚未在全国性学术会议上交流和尚未在国内外正式刊物上发表过的论文。征文要求: 论文、摘要、软盘各一份, 论文字数限4000字以内, 摘要800字以内, 按“目的、方法、结果、结论”。摘要中写明: “题目、作者、单位(包括城市和邮编)。”

#### 2 联系方式

邹富胜, 300100, 天津市南开区三纬路122号, 天津市南开医院, 注明会议论文。

# 闭合性十二指肠损伤的早期诊断和术式选择

杨维良, 于洪亮

杨维良, 于洪亮, 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

杨维良, 哈尔滨医科大学附属第二医院普外科教授, 博士研究生导师, 主要从事胃肠外科及胆道外科方面的研究.

通讯作者: 杨维良, 150086, 黑龙江省哈尔滨市, 哈尔滨医科大学附属第二医院普外科. wlyang\_2008@163.com

电话: 0451-86605709

收稿日期: 2007-05-13 修回日期: 2007-08-16

## Early diagnosis and operation selection for closed duodenal injury

Wei-Liang Yang, Hong-Liang Yu

Wei-Liang Yang, Hong-Liang Yu, Department of General Surgery, the Second Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150086, Heilongjiang Province, China

Correspondence to: Wei-Liang Yang, Department of General Surgery, the Second Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150086, Heilongjiang Province, China. wlyang\_2008@163.com

Received: 2007-05-13 Revised: 2007-08-16

## Abstract

Closed duodenal injury constitutes a serious type of intra-abdominal injury. Most cases are complicated by other intra-abdominal organ injuries, which make diagnosis difficult and management complex. For surgeons, it is difficult to make a preoperative diagnosis, especially an early one. The misdiagnosis rate is thus high in clinical situations. Important points for therapy include early diagnosis, early operation and correct handling of indications for exploratory celiotomy, which is the most reliable method for diagnosing duodenal injury. The procedure to be performed is usually decided according to the location, extent, and type of injury, the time after injury and the patient's general condition.

**Key Words:** Duodenal injury; Exploratory celiotomy; Diagnosis

Yang WL, Yu HL. Early diagnosis and operation selection for closed duodenal injury. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007; 15(24): 2579-2582

## 摘要

闭合性十二指肠损伤是一种严重的腹内脏器

损伤. 由于往往合并其他脏器损伤, 而增加了其诊断的困难和处理的复杂性. 本病术前诊断比较困难, 特别是早期诊断更为困难. 临床上漏诊、误诊率较高. 治疗的成败关键在于能否早期诊断、早期手术和正确及时掌握剖腹探查的适应证, 剖腹探查术是诊断十二指肠损伤最可靠的方法. 应根据十二指肠损伤的部位、范围、类型、受伤时间以及患者全身情况等选择不同术式.

**关键词:** 十二指肠损伤; 剖腹探查; 诊断

杨维良, 于洪亮. 闭合性十二指肠损伤的早期诊断和术式选择. *世界华人消化杂志* 2007;15(24):2579-2582

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/2579.asp>

## 0 引言

闭合性十二指肠损伤(closed injury of the duodenum, CID)是一种严重的腹内脏器损伤, 约占腹内脏器损伤的2.5%-5%<sup>[1-2]</sup>. 由于十二指肠独特的解剖位置、结构和生理学特征, 决定了十二指肠受伤的机会不多, 大约有3.7%的外科剖腹探查患者存在十二指肠损伤; 往往合并其他脏器损伤, 因此增加了诊断的困难和处理的复杂性, 特别是早期诊断. 有相当一部分外科医生对十二指肠损伤缺乏足够的经验, 易造成漏诊及误诊, 误诊率高达25%-30%<sup>[3-4]</sup>, 可酿成严重后果, 甚至死亡. 我们统计Pubmed近30 a文献得出, 本病平均死亡率为19%, 最高可达47%<sup>[5-22]</sup>. 所以进一步提高十二指肠损伤的诊断率、降低死亡率, 实属必要.

## 1 CID的原因

胃正常蠕动时, 约1/3的时间幽门处于关闭状态, 十二指肠空肠曲受屈式韧带牵拉成锐角, 受伤时幽门和十二指肠空肠曲突然被暴力所关闭, 导致十二指肠呈闭袢性肠段, 外力作用, 腔内压力骤增, 造成十二指肠破裂, 尤其以无浆膜层的十二指肠第二、三部更易破裂; 腹部钝性损伤时, 前腹壁被暴力挤向脊柱, 将胰头及十二指肠第二、三部推向脊柱右侧, 胰体尾部和十二指

## ■背景资料

闭合性十二指肠损伤约占腹内脏器损伤的2.5%-5%, 往往合并其他脏器损伤. 早期诊断比较困难, 临床上易造成漏诊及误诊. 本病死亡率较高, 应引起广泛重视.



### ■应用要点

本文将有助于增强临床医师对本病的认识以及早期诊断和选择合理的手术方式治疗CID患者。

肠第一、四部推向脊柱左侧,造成一剪刀力,引起十二指肠损伤或破裂;腹部受钝性挫伤时,肝脏和膈肌上移,十二指肠由于屈式韧带固定而受牵拉,导致十二指肠撕裂伤。

## 2 CID的漏诊原因

主要有以下几点:(1)十二指肠后是腹膜后器官,位置深隐、周围解剖关系复杂,邻近胰腺、胆道、肝脏、右肾、门静脉、下腔静脉等重要脏器和血管。一旦十二指肠发生损伤,多合并其他脏器损伤,所以CID缺乏特殊的临床表现,尤其当损伤时间短、破口小、内容物溢出少时,更无明显的症状和体征;(2)CID的大多数患者合并有其他脏器损伤,而掩盖了十二指肠损伤的临床表现。哈尔滨医科大学附属第二医院普外科自1976-2006年共收治226例CID,有70.4%(154/226)合并其他脏器损伤的症状和体征,早期无十二指肠损伤的表现;(3)伤情较重,未能或不允许进行全面细致的检查,特别是BUS或CT等检查;(4)应诊医师经验不足,加之早期症状和体征表现不明显,在术前甚至在术中仍未考虑到十二指肠损伤。

## 3 CID早期诊断

CID术前诊断比较困难,特别是早期诊断更为困难,值得注意的是十二指肠腹膜后部分损伤早期诊断亦很困难。国外Cone *et al*<sup>[23]</sup>报道术前正确诊断率在10%以下。国内综合文献[3,24-27]报道243例中有48例确诊,占19.8%。由此可见术前正确诊断率不足20%。要做到早期诊断和术中及时发现十二指肠损伤,在诊断和手术中要注意如下几点:(1)凡有上腹部严重钝性损伤,尤其暴力作用的挤压伤,应警惕十二指肠损伤的可能性,特别是早期无特征表现者,必须留院观察至少24 h,观察期间2 h查体一次,若怀疑有十二指肠损伤时,应行腹腔穿刺和必要的辅助检查;(2)受伤之后,对上腹隐痛和腹部轻度压痛者,应动态观察,特别是腹膜后十二指肠损伤,临床表现较慢和晚,必须反复多次进行腹部检查,以期及早发现损伤的表现;(3)CID的患者,腹胀为其突出特点,因此外伤后出现明显的上腹膨胀者,必须警惕十二指肠损伤的可能性,再结合辅助检查的特点,积极剖腹探查术就不能漏诊;(4)正确应用实验室和辅助检查:血清淀粉酶测定值可以升高,尤其同时合并胰腺损伤的病例,阳性率高达90%;(5)BUS引导下腹腔试验穿刺术在腹

部闭合性损伤中有重要意义,腹腔穿刺如吸出血性或有胆汁的消化道液体,应考虑十二指肠损伤的可能,有时临床表现上腹明显腹胀、疼痛,但腹腔穿刺阳性率却不高;(6)如怀疑CID时,行X线检查,平片示右肾及右膈脚周围有游离气体,亦可见到腹腔游离气体或胆管内气体,右腰大肌及肾脏阴影模糊不清,均提示腹膜后积气,或经胃管注入造影剂或空气,X线片显示造影剂自十二指肠破口溢出或腹膜后积气增多,即证实十二指肠损伤<sup>[28]</sup>。上消化道造影亦可用于怀疑有十二指肠血肿患者的检查,血肿造成完全梗阻时,可呈现典型的“弹簧征”<sup>[29]</sup>;CID的CT特征是十二指肠腔外与右肾旁间隙即腹膜后有游离气体和(或)液体积聚,右肾周围阴影模糊,十二指肠扩张,造影剂前进中断,不再进入远端十二指肠<sup>[30]</sup>;B型超声显示腹腔部分有低回声或强光点,腹膜后为低回声影,时有强光点,此种表现说明十二指肠腹腔部分和腹膜后部分有积液和气体,为十二指肠破裂的征象;剖腹探查时,必须详尽细致,严防术中漏诊:(1)术中发现腹膜后胆汁染色者,后腹膜或右侧结肠系膜水肿、淤血、脂肪坏死和捻发音者,腹膜后十二指肠血肿者,右肾、肝、胰和下腔静脉有损伤者,应考虑十二指肠损伤可能性,此时均应探查十二指肠各部;(2)如行十二指肠探查必须做Kocher切口,观察胰头前后两面及十二指肠第二部,尤其腹膜后部分,同时必须切断屈氏韧带,充分显露和探查十二指肠第三、四部,以防漏诊;(3)探查时有十二指肠损伤可疑者,术中可将胃管引入十二指肠球部,经胃管内注入空气或美蓝,如腹膜后有气体或美蓝染色,则可确定有十二指肠损伤。

## 4 CID治疗

CID治疗的成败关键在于能否早期诊断、早期手术和正确及时掌握剖腹探查的适应证,剖腹探查术是诊断十二指肠损伤的最可靠的方法。选择合适的手术方式是降低手术并发症和降低死亡率的根本措施。手术方式的选择应根据十二指肠损伤的部位、范围、类型(AAST, 1990年按损伤程度分为5级)以及患者全身情况,受伤时间及腹腔内污染程度,选择不同术式。

**4.1 十二指肠壁血肿清除术** 十二指肠壁内血肿无破裂者,可行非手术治疗。若2 wk以上未能吸收,或血肿较大超过30 mL,有可能继发十二指肠梗阻,或压迫胰管、胆管发生急性胰腺炎或

出现梗阻性黄疸, 也可能自发性破裂到腹腔, 此时应积极手术探查。

**4.2 单纯缝合修补术** 十二指肠壁缺损小(1 cm至1/3周径以内), 边缘整齐, 并在伤后10 h以内, 可行单纯缝合修补术; 如超过10 h或缺损口大者, 并腹腔内污染严重者, 不宜采用本法, 以避免十二指肠漏, 乃至造成死亡。为避免缝合后狭窄以横行缝合为宜, 必要时作Kocher切口, 游离十二指肠可减少缝合处张力。

**4.3 空肠或胃组织补片修补法** 十二指肠损伤肠壁缺损较大, 裂伤边缘组织严重挫伤和水肿时, 无法缝合或缝合后有导致肠腔狭窄之危险, 可采用组织作“补片”<sup>[31]</sup>, 其方法有: (1)切取一段空肠袢, 自横结肠系膜切口拉向上方, 将此肠袢覆盖在已缝合或尚未完全缝合的肠壁缺损处, 使之彼此贴紧, 空肠远近段作侧侧吻合。(2)切取8-12 cm空肠一段, 保留肠系膜血供带蒂的空肠, 在其对系膜侧肠管纵向剪开, 剝除黏膜, 使成一片肠壁。将此片肠壁移植覆盖到已经修复或尚未完全缝合的缺损处, 用缝线间断将移植的肠壁边缘与十二指肠肠壁仔细缝合。空肠远近段作端端吻合。(3)胃窦切除后将去黏膜带血管蒂的胃窦组织浆膜面包绕覆盖破损处, 此胃窦面积大、血运良好和耐受十二指肠内容物侵蚀, 愈合可靠。尽管此等方法可以加强修补缝合处, 但操作复杂, 仅可选择适宜病例, 且以受伤10 h以内为宜。

**4.4 十二指肠空肠Roux-en-Y形吻合术** 利用十二指肠破口与空肠作端侧或侧侧Roux-en-Y形吻合术, 此法适于十二指肠缺损长度 $\leq 1/2$ 周径, 此种转流术, 目的在于转流十二指肠液、胆汁及胰液, 使肠腔减压, 避免发生十二指肠漏。

**4.5 十二指肠完全撕裂的处理法** 首选的处理方法是修整和游离后行一期端端吻合。第一、三、四部肠管游离并不困难, 而降部的血供和胰头血供关系密切, 在游离该部肠管时就很困难。若损伤发生在Vater壶腹的近段, 需胃窦切除、十二指肠断端缝闭, Billroth II法胃空肠吻合术或行胃空肠Roux-en-Y形吻合术; 若发生在Vater壶腹的远段, 则行十二指肠远端缝闭, 十二指肠近端空肠Roux-en-Y形吻合术。术后十二指肠肠腔内置放蕈形引流管, 利于十二指肠腔内减压, 防止十二指肠漏发生<sup>[32-33]</sup>。

**4.6 十二指肠憩室化手术及简化手术** 本法适于严重的十二指肠损伤, 病情危重或损伤处有感染或脓肿形成及腹腔污染较重者, 基本属于

AAST分级的III、IV级。(1)十二指肠憩室化手术及简化手术(Berne手术)<sup>[34]</sup>: 修补十二指肠的破口或置管造口减压, 切除胃窦, 作Billroth II式胃空肠吻合术, 必要时作胆道减压。术后胃内容物不进入十二指肠, 减少了十二指肠张力及胆汁、胰液的分泌, 有利于修补愈合, 即使发生漏, 也可减少消化液丢失和保持经口进食维持营养。本法的缺点是切除了健康的胃窦部, 且手术时间较长。(2)改良憩室化手术的简化手术(Cogbill手术)<sup>[35-38]</sup>: 严重十二指肠损伤修补后, 在胃窦部大弯侧离幽门1 cm处, 切开胃前壁约7 cm, 暴露出幽门部, 用可吸收缝线间断缝闭幽门, 胃壁切口作胃空肠侧侧吻合, 使胃内容物暂时转流, 术后3-4 wk, 缝线吸收后可再复通。此手术的优点是不切除胃窦, 可缩短手术时间。(3)Cogbill改良憩室化的再简化手术<sup>[1]</sup>: 十二指肠破裂处清创修补后; 距幽门3-5 cm的胃壁用可吸收线全层间断贯穿交锁缝合, 暂时阻断胃十二指肠的通路; 距屈氏韧带15和20 cm处, 分别行空肠造瘘置管, 近端导管逆行插入十二指肠破口附近, 作为十二指肠减压管, 远端导管插入空肠作空肠营养管, 从腹壁切口侧方引出并予以固定腹壁; 置鼻胃管或胃造瘘减压, 置腹腔引流管于十二指肠修补处。再简化手术的优点: 操作简单, 手术创伤小, 时间短; 十二指肠暂时与胃隔离, 十二指肠破口附近肠腔内有减压管引流胆汁和胰液, 使十二指肠为一低压憩室, 有利于修补处的愈合; 一旦肠道功能恢复, 经空肠造瘘管早期肠内营养, 可保证肠道黏膜屏障作用, 减少肠源性细菌感染并发症; 吸收线术后3-4 wk被吸收, 恢复胃肠道正常的生理通道; 破裂口附近引流可发现有无渗漏, 如有可及时引流。

**4.7 十二指肠造口减压术** 本法适于感染严重的晚期病例, 不适于其他手术, 可用裂口作十二指肠造口术, 但十二指肠乳头、壶腹、胰胆管末端无损伤<sup>[36]</sup>, 经治疗可自行愈合, 如不愈合, 待炎症消退后可行瘘管切除修补术。本法的缺点是病程拖长, 给患者带来较多负担。

**4.8 胰十二指肠切除术(whipple手术)** 适于严重的胰头、十二指肠损伤, 只有在十二指肠和胰头部广泛组织失活损伤或十二指肠乳头、胰头部或胆总管同时损伤时才使用, 因为紧急情况下行胰十二指肠切除术, 死亡率高达30%-60%<sup>[37,39]</sup>。

## 5 参考文献

- 1 何萍青, 何德安, 何奇, 周正群. 十二指肠损伤的诊断

## ■名词解释

**Cogbill手术:** 严重十二指肠损伤修补后, 在胃窦部大弯侧离幽门1 cm处, 切开胃前壁约7 cm, 暴露出幽门部, 用可吸收缝线间断缝闭幽门, 胃壁切口作胃空肠侧侧吻合, 使胃内容物暂时转流, 术后3-4 wk, 缝线吸收可再复通。此手术的优点是不切除胃窦, 可缩短手术时间。

## ■同行评价

本文较详实地介绍了闭合性十二指肠损伤的早期诊断及外科治疗,为进一步提高十二指肠损伤的诊断率提供了一些有意义的信息,具有一定的临床实用价值。

- 2 及治疗. 中华外科杂志 1998; 36: 292-294
- 3 郑凯, 王成友, 曾伟涛, 佟建蒙. 十二指肠损伤的术式选择. 中国普通外科杂志 1999; 8: 276-279
- 4 莫军. 十二指肠损伤20例诊治体会. 中国普通外科杂志 2003; 12: 946-947
- 5 李朝龙. 十二指肠损伤手术方式的选择. 临床外科杂志 2003; 11: 206-207
- 6 Adkins RB Jr, Keyser JE 3rd. Recent experiences with duodenal trauma. *Am Surg* 1985; 51: 121-131
- 7 Carrel T, Lerut J, Niederhauser U, Schweizer W, Blumgart LH. Diagnosis and treatment of traumatic injuries of the duodenum and pancreas: 21 cases. *J Chir (Paris)* 1990; 127: 438-444
- 8 Chew KH, Rauff A. Traumatic duodenal injuries. *Ann Acad Med Singapore* 1981; 10: 194-197
- 9 Corley RD, Norcross WJ, Shoemaker WC. Traumatic injuries to the duodenum: a report of 98 patients. *Ann Surg* 1975; 181: 92-98
- 10 Cuddington G, Rusnak CH, Cameron RD, Carter J. Management of duodenal injuries. *Can J Surg* 1990; 33: 41-44
- 11 Ivatury RR, Nallathambi M, Gaudino J, Rohman M, Stahl WM. Penetrating duodenal injuries. Analysis of 100 consecutive cases. *Ann Surg* 1985; 202: 153-158
- 12 Jansen M, Du Toit DF, Warren BL. Duodenal injuries: surgical management adapted to circumstances. *Injury* 2002; 33: 611-615
- 13 Kelly G, Norton L, Moore G, Eiseman B. The continuing challenge of duodenal injuries. *J Trauma* 1978; 18: 160-165
- 14 Kiss L, Remescu A. Injuries to the duodenum and pancreas in 42 operated cases. *Chirurgia (Bucur)* 2001; 96: 23-35
- 15 Levison MA, Petersen SR, Sheldon GF, Trunkey DD. Duodenal trauma: experience of a trauma center. *J Trauma* 1984; 24: 475-480
- 16 Matolo NM, Cohen SE, Fontanetta AP, Wolfman EF Jr. Traumatic duodenal injuries: an analysis of 32 cases. *Am Surg* 1975; 41: 331-336
- 17 Shorr RM, Greaney GC, Donovan AJ. Injuries of the duodenum. *Am J Surg* 1987; 154: 93-98
- 18 Snyder WH 3rd, Weigelt JA, Watkins WL, Bietz DS. The surgical management of duodenal trauma. Precepts based on a review of 247 cases. *Arch Surg* 1980; 115: 422-429
- 19 Stevens A, Little JM. Duodenal trauma. *Aust N Z J Surg* 1987; 57: 709-713
- 20 Stone HH, Fabian TC. Management of duodenal wounds. *J Trauma* 1979; 19: 334-339
- 21 Vadra JE, Altrudi RD, Yarrowe M, Lago ME, Vadra GD. Duodenal trauma. Our management. *Acta Gastroenterol Latinoam* 1988; 18: 139-152
- 22 Vagner EA, Urman MG, Firsov VD. Duodenal injuries. *Vestn Khir Im I I Grek* 1984; 133: 76-79
- 23 Verma GR, Wig JD, Khanna SK, Bose SM. Management of duodenal trauma. *Trop Gastroenterol* 1994; 15: 23-28
- 24 Cone JB, Eidt JF. Delayed diagnosis of duodenal rupture. *Am J Surg* 1994; 168: 676-678; discussion 678-679
- 25 李占飞, 邹声泉, 白祥军, 裘法祖. 十二指肠损伤34例的诊治分析. 普通外科学文献 2004; 1: 30-32
- 26 刘建, 马宁, 滕世刚, 刘忠诚. 闭合性十二指肠损伤的诊治体会. 中国普通外科杂志 2004; 13: 918-920
- 27 陶霖玉, 缪丁丁, 喻军, 林宗伟, 杨超. 十二指肠损伤的诊断与治疗. 中华胃肠外科杂志 2004; 7: 334
- 28 肖震宇, 陈孝平. 十二指肠损伤的诊断和治疗(综合文献145例报告). 中国现代普通外科进展 1998; 1: 60-61
- 29 Ivatury RR, Nassoura ZE, Simon RJ, Rodriguez A. Complex duodenal injuries. *Surg Clin North Am* 1996; 76: 797-812
- 30 Kadell BM, Zimmerman PT, DS-K L. Radiology of the abdomen. 10<sup>th</sup> ed. Stanford: Connecticut: Appleton and lange, 1997: 49
- 31 Riedl S, Buhr HJ, Herfarth C. Effect of diagnostic imaging techniques on choice of therapy and prognosis of traumatic pancreas and duodenal injuries. *Langenbecks Arch Chir* 1994; 379: 38-43
- 32 杨维良, 张滨, 王夫景. 闭合性十二指肠损伤几种术式的选择与评价. 中国普通外科杂志 1995; 4: 257-258
- 33 何裕隆. 十二指肠损伤的外科治疗. 腹部外科 2006; 19: 216-217
- 34 何裕隆, 詹文华. 十二指肠损伤的诊断和治疗. 腹部外科 2005; 18: 140-141
- 35 Berne CJ, Donovan AJ, White EJ, Yellin AE. Duodenal "diverticulization" for duodenal and pancreatic injury. *Am J Surg* 1974; 127: 503-507
- 36 Sriussadaporn S, Pak-art R, Sriussadaporn S, Kritayakirana K. Management of blunt duodenal injuries. *J Med Assoc Thai* 2004; 87: 1336-1342
- 37 Degiannis E, Boffard K. Duodenal injuries. *Br J Surg* 2000; 87: 1473-1479
- 38 Cogbill TH, Moore EE, Feliciano DV, Hoyt DB, Jurkovich GJ, Morris JA, Mucha P Jr, Ross SE, Strutt PJ, Moore FA. Conservative management of duodenal trauma: a multicenter perspective. *J Trauma* 1990; 30: 1469-1475
- 39 Martin TD, Feliciano DV, Mattox KL, Jordan GL Jr. Severe duodenal injuries. Treatment with pyloric exclusion and gastrojejunostomy. *Arch Surg* 1983; 118: 631-635
- 40 杨维良. 闭合性十二指肠损伤的诊断与治疗. 中国胃肠外科杂志 1999; 2: 135-140

编辑 程剑侠 电编 张敏

# 启膈散及其拆方对食管癌细胞Eca109 PLC- $\gamma$ 1介导的细胞信号转导的影响

司富春, 陈玉龙

司富春, 陈玉龙, 河南中医学院中医分子生物学实验室 河南省郑州市 450008

司富春, 1994年上海中医药大学博士, 1995-1998年韩国浦项科技大学博士后, 河南省特聘教授, 主要从事肿瘤中医方证研究。

国家自然科学基金资助项目, No. 30171160, No. 30371716

通讯作者: 司富春, 450008, 河南省郑州市, 河南中医学院中医分子生物学实验室. sifc2000@hotmail.com

电话: 0371-65680049

收稿日期: 2007-01-18 修回日期: 2007-08-10

## Effects of qigesan and its constituents on phospholipase-C- $\gamma$ 1-mediated signaling in esophageal carcinoma cell line Eca109

Fu-Chun Si, Yu-Long Chen

Fu-Chun Si, Yu-Long Chen, Laboratory of Molecular Biology for Traditional Chinese Medicine, He'nan College of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450008, He'nan Province, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30171160, No. 30371716

Correspondence to: Fu-Chun Si, Laboratory of Molecular Biology for Traditional Chinese Medicine, He'nan College of Chinese Traditional Medicine, Zhengzhou 450008, He'nan Province, China. sifc2000@hotmail.com

Received: 2007-01-18 Revised: 2007-08-10

## Abstract

**AIM:** To study the effects and mechanism of action of qigesan and its constituents on the human esophageal carcinoma cell line Eca 109 *in vitro*.

**METHODS:** The human esophageal carcinoma cell line Eca 109 was cultured and treated with different concentrations of qigesan as a whole (W group), water extracts of the constituents of qigesan that promote blood circulation (P group), and other water extracts of the constituents of qigesan that help prevent stasis (R group). Protein expression of phospholipase C (PLC)- $\gamma$ 1, epidermal growth factor receptor (EGFR) and protein kinase C (PKC) $\alpha$ , protein tyrosine phosphorylation level (PY99), intracellular calcium concentration ( $[Ca^{2+}]_i$ ), and PKC activity were

measured.

**RESULTS:** The protein expression levels of PLC- $\gamma$ 1, EGFR and PKC $\alpha$ , EGFR and PLC- $\gamma$ 1 tyrosine phosphorylation level,  $[Ca^{2+}]_i$  ( $169.65 \pm 30.54$  nmol/L,  $145.84 \pm 24.12$  nmol/L,  $214.94 \pm 37.14$  nmol/L *vs*  $231.86 \pm 51.10$  nmol/L;  $P > 0.05$ ,  $P < 0.05$ ,  $P > 0.05$ ) and PKC activity in the cultured esophageal cancer cells were inhibited by qigesan and its individual constituents at different concentrations. The greatest effects were seen in group P.

**CONCLUSION:** Qigesan and its individual constituents inhibit esophageal carcinoma cell growth by inhibiting PLC- $\gamma$ 1-mediated signal transduction.

**Key Words:** Qigesan; Esophageal carcinoma; Phospholipase C- $\gamma$ 1; Signal transduction; Separated prescription research

Si FC, Chen YL. Effects of qigesan and its constituents on phospholipase C- $\gamma$ 1-mediated signaling in esophageal carcinoma cell line Eca109. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007; 15(24): 2583-2588

## 摘要

**目的:** 观察启膈散及其活血和化痰两个拆方对人食管癌细胞株Eca109细胞磷脂酶C- $\gamma$ 1(PLC- $\gamma$ 1)介导的细胞信号转导的影响, 以研究启膈散治疗食管癌的作用机制。

**方法:** 用启膈散(W)及其活血(P)和化痰(R)两个拆方的水提物处理体外培养的人食管癌细胞株Eca109细胞, 测定细胞PLC- $\gamma$ 1、表皮生长因子受体(EGFR)和PKC $\alpha$ 蛋白表达水平、蛋白酪氨酸磷酸化(PY99)水平和豆蔻酰化富丙氨酸C激酶底物(MARCKS)(Ser152/156)磷酸化水平、细胞内游离钙离子 $[Ca^{2+}]_i$ 浓度及蛋白激酶C(PKC)活性。

**结果:** 1 mg/L的启膈散及其拆方明显抑制Eca109细胞PLC $\gamma$ 1蛋白表达(0.31%, 0.42%, 0.20%), 随着药物浓度增加其抑制作用分别

## ■背景资料

食管癌是世界上最常见的六大恶性肿瘤之一, 我国是世界上食管癌发病率和病死率最高的国家, 中晚期食管癌患者5 a生存率仅10%左右, 目前临床上诊断出的食管癌患者中80%左右均为中晚期, 寻找食管癌早期诊断的标志物和治疗药物是提高其生存率的关键。启膈散是清代名医程钟龄在他的《医学心悟》中为治疗噎膈病所创制的方剂, 临床上治疗食管癌有肯定疗效。

## ■研究前沿

磷脂酶C- $\gamma$ 1介导的信号转导是近20 a细胞信号转导研究的热点,其超量表达及信号转导增强促进了肿瘤的发生发展。

增强, 启膈散及其拆方对体外培养的食管癌细胞PLC- $\gamma$ 1、EGFR和PKC $\alpha$ 表达、PLC- $\gamma$ 1和EGFR酪氨酸磷酸化、MARCKS磷酸化、[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>浓度(169.65±30.54 nmol/L, 145.84±24.12 nmol/L, 214.94±37.14 nmol/L vs 231.86±51.10 nmol/L,  $P>0.05$ ,  $P<0.05$ ,  $P>0.05$ )及PKC活性均有不同程度的抑制作用, 以P组作用最强。

**结论:** 启膈散及其拆方通过不同程度的抑制食管癌细胞PLC- $\gamma$ 1介导的信号转导而抑制肿瘤细胞的生长。

**关键词:** 启膈散; 食管癌; 磷脂酶C- $\gamma$ 1; 信号转导; 拆方研究

司富春, 陈玉龙. 启膈散及其拆方对食管癌细胞Eca109 PLC- $\gamma$ 1介导的细胞信号转导的影响. 世界华人消化杂志 2007;15(24):2583-2588

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/2583.asp>

## 0 引言

多种生长因子及其受体参与了食管癌的发生发展, 其中表皮生长因子受体(EGFR)在食管癌细胞中高度表达, 表达及活性的强度与食管癌的恶性程度、耐药性及发展和预后相关<sup>[1-2]</sup>. 磷脂酶C- $\gamma$ 1(phospholipase C- $\gamma$ 1, PLC- $\gamma$ 1)是多种细胞生长因子信号传导的细胞内效应分子, 在细胞信号转导中起关键作用. PLC- $\gamma$ 1水解磷脂酰肌醇-4, 5-二磷酸(PIP<sub>2</sub>)产生第二信使三磷酸肌醇(IP<sub>3</sub>)和甘油三酯(DAG), IP<sub>3</sub>能引起细胞内钙库的释放, DAG能激活蛋白激酶C(PKC), 通过这2条通路和其他未知通路从而激活多种细胞反应. PLC- $\gamma$ 1在肿瘤发生和发展中起关键作用, 其超量表达和激活引起肿瘤发生、浸润和转移<sup>[3-5]</sup>. 我们研究发现, 食管癌组织内PLC- $\gamma$ 1超量表达, 说明EGFR-PLC- $\gamma$ 1介导的信号通路在食管癌发生发展中起着很重要的作用. 启膈散及其拆方对食管癌细胞Eca109生长具有不同程度的抑制作用, 为了进一步研究其作用的机制, 我们观察了启膈散及其拆方对食管癌细胞Eca109 PLC- $\gamma$ 1介导的细胞信号转导的影响。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 丹参、郁金、砂仁壳、沙参、贝母、茯苓购于河南中医学院第三附属医院. 分为全方组(W)、活血组(P)(丹参、郁金、砂仁壳)、化痰组(R)(沙参、贝母、茯苓), 每味药各10 g, 煎煮、浓缩、5000 g离心, 0.22  $\mu$ m过滤, 取部分干燥称

重, 置4℃冰箱备用. 人食管癌细胞株Eca109来自郑州大学医学院组胚教研室. DMEM高糖培养基(Gibco公司), 胎牛血清(Hyclone公司), PMSF与Leupeptin(Amresco公司), 丙烯酰胺(Biomol公司), 胰蛋白酶与山羊抗小鼠IgG-HRP(华美公司), ECL试剂盒(Santa Cruz公司), PLC- $\gamma$ 1 mAb(韩国浦项科技大学国家信号传导网络实验室惠赠), EGFR mAb(Santa Cruz公司), PKC $\alpha$ 多克隆抗体(Santa Cruz公司), Fura-2/AM(Sigma公司), 抗磷酸化酪氨酸mAb PY99(Santa Cruz公司), 抗磷酸化MARCKS(Ser152/156)多克隆抗体(Cell signal公司), 考马斯亮蓝G250(Amresco公司). Heraeus细胞培养箱(德国Kendro公司); 倒置显微镜(Zeiss公司), 紫外分光光度计(Thermo公司), SG-603生物安全柜(Bake公司), ELx800型酶标仪(Bio-Tek公司), 蛋白电泳系统(Bio-Rad公司), 荧光分光光度计(Shimadzu公司), 液体闪烁仪(Packard公司), 1470 $\gamma$ -计数器(Perkin Elmer公司), 低温台式离心机(Sigma公司). 细胞生长于含100 mL/L胎牛血清的DMEM培养液中, 置于37℃, 50 mL/L CO<sub>2</sub>培养箱, 每间隔48 h更换1次培养基, 待细胞生长至70%汇合率时, 用胰蛋白酶溶液[D-Hans液配制, 含2.5 g/L胰蛋白酶, 0.2 g/L乙二胺四乙酸二钠(EDTA), pH8.3]消化, 按实验要求接种于96孔培养板中或 $\Phi$ 100培养皿中。

### 1.2 方法

**1.2.1 ELISA法测定细胞PLC- $\gamma$ 1蛋白表达抑制率** 对数生长期的贴壁肿瘤细胞, 胰酶消化后, 调至1×10<sup>8</sup> 个/L的细胞悬液, 接种在96孔培养板中, 每孔200  $\mu$ L, 37℃, 50 mL/L CO<sub>2</sub>, 培养24 h, 分别加入W, R和P, 浓度分为1, 10, 20, 50, 100, 200, 400和800 mg/L 8个梯度, 每组3个复孔, 继续培养8 h, 每孔用40 g/L的中性甲醛125  $\mu$ L固定15 min; 双蒸水洗涤3次, 加入20 g/L BSA 250  $\mu$ L, 37℃温育1 h; 双蒸水洗涤3次, 加入PLC- $\gamma$ 1抗体, 室温反应4 h; 双蒸水洗涤3次, 加入羊抗鼠抗体IgG-HRP, 室温反应2 h; 双蒸水洗涤5次, 每孔加入底物邻苯二胺(*O*-PhenPhenylenediamine, OPD, 2 g/L)50  $\mu$ L, 室温20 min, 每孔加硫酸25  $\mu$ L, 酶标仪上492 nm测定光密度值. 按下式计算药物对肿瘤细胞PLC- $\gamma$ 1抑制率. 肿瘤细胞PLC- $\gamma$ 1抑制率%=(1-实验组光密度值/对照组光密度值)×100%。

**1.2.2 Western blot检测肿瘤细胞PLC- $\gamma$ 1、EGFR和PKC $\alpha$ 蛋白表达、蛋白酪氨酸磷酸化(PY99)水平和豆蔻酰化富丙氨酸C激酶底物**



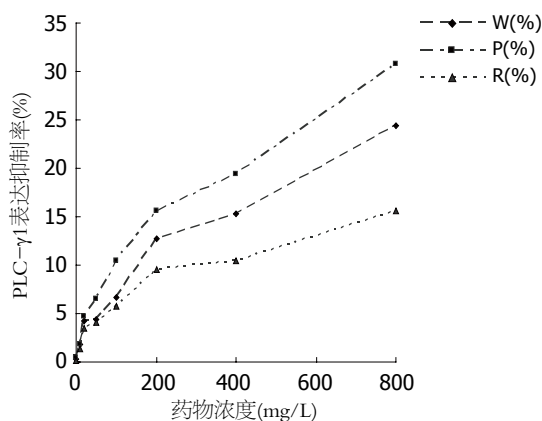
表 1 启膈散及其拆方对Eca109细胞PLC- $\gamma$ 1蛋白表达的抑制率

浓度(mg/L)	W(%)	P(%)	R(%)
1	0.3080	0.4217	0.2008
10	1.7485	1.8924	1.3174
20	4.1731	4.6275	3.5080
50	4.4350	6.5410	4.0413
100	6.6970	10.4546	5.7921
200	12.6667	15.6000	9.5991
400	15.3333	19.4363	10.4455
800	24.3271	30.7853	15.6598

(MARCKS)(Ser152/156)磷酸化水平 对数生长期的贴壁肿瘤细胞, 胰酶消化后, 调至 $1 \times 10^8$ 个/L的细胞悬液, 接种10 mL在 $\Phi 100$ 培养皿, 24 h后弃上清, 分别加入浓度为800 mg/L含W, R和P的培养基10 mL, 继续培养48 h, 收获细胞, 提取蛋白, 10  $\mu$ g/孔上样, SDS-PAGE凝胶电泳, 转至硝酸纤维素膜, 封闭、洗涤30 min, 加入一抗反应4 h、洗涤30 min, 加入二抗反应2 h, 洗涤30 min, 用增强化学发光(ECL)试剂曝光、显影、定影、洗片<sup>[6]</sup>, 重复3次。

**1.2.3 Fura-2/AM荧光标记方法测定细胞内游离钙离子 $[Ca^{2+}]_i$ 浓度** 细胞 $1 \times 10^6$ 个种入皿中, 24 h后加药, Eca109细胞与含W, R和P培养基共同孵育36 h后用Hanks buffer洗2次, Trypsin消化, 离心(1000 *g*, 10 min)洗1次, 将细胞悬浮于1 mL Hepes缓冲的Hanks+BSA液中, 细胞计数后, 使终浓度为 $1 \times (10^9-10^{10})$ /L。加入0.25 mmol/L Fura-2/AM 20  $\mu$ L, 使Fura-2/AM浓度为5  $\mu$ mol/L, 加入细胞悬液中, 37℃培养箱里温育0.5 h。离心, 然后用Hepes缓冲的Hanks buffer洗涤1次。使终浓度为 $2 \times 10^9$ /L, 上机检测<sup>[7-8]</sup>, 重复4次。

**1.2.4 PKC活性测定** 收集药物处理24 h和对照组细胞(加药时细胞数为 $6.25 \times 10^6$ 个), 冷生理盐水洗涤2次。加入缓冲液A(150 mmol/L Tris-HCl, pH7.5, 50 mmol/L  $\beta$ -巯基乙醇, 1 mmol/L PMSF, 2 mmol/L EGTA和10 g/L TritonX-100), 将细胞在冰浴中匀浆, 4℃, 100 000 *g*离心1 h, 将离心所得各上清通过DEAE-Sepharose柱(3.5 cm $\times$ 0.8 cm), 用平衡缓冲液(120 mmol/L Tris-HCl, 2 mmol/L DTT, 2 mmol/L EDTA, 2 mmol/L EGTA, 0.5 mmol/L PMSF)2 mL洗去杂蛋白, 然后用含0.3 mol/L NaCl的平衡缓冲液洗脱, 收集洗脱液用于测定PKC活性。反应总体积100  $\mu$ L, 含30 mmol/L Tris-HCl pH7.5, 5 mmol/L  $MgCl_2$ , 0.4 mmol/L

图 1 启膈散及其拆方抑制Eca109细胞PLC- $\gamma$ 1蛋白表达量效关系曲线。

## ■ 相关报道

EGFR是原癌基因C-erbB1表达的产物, 为跨膜酪氨酸激酶受体, 主要通过Ras-MAPK、PI3K-Akt/PKB、磷脂酶C- $\gamma$ 1-PKC介导的信号通路调节细胞的增殖和分化, 与细胞的再生和肿瘤的发生发展密切相关。

$CaCl_2$ , 0.2 mmol/L EGTA, 0.5 g/L histoneIII $\alpha$ , 0.1 g/L 磷酸酰丝氨酸, 0.1 mmol/L PMA, 部分纯化的酶蛋白10  $\mu$ g, 最后加0.12 mmol/L  $[\gamma-^{32}P]$ ATP( $2 \times 10^5$  cpm)启动反应, 在30℃准确温育10 min后, 迅速加入冷250 mL/L三氯醋酸1 mL终止反应, 沉淀物转移到微孔滤膜上, 用50 mL/L三氯醋酸洗3次, 烘干滤膜, 加闪烁液, 测cpm值, 重复4次<sup>[8]</sup>。

## 1.2.5 Bradford法测定蛋白浓度。

**统计学处理** 计量资料应用统计软件SPSS 11.0进行单项方差分析。

## 2 结果

**2.1 启膈散及其拆方对Eca109细胞PLC- $\gamma$ 1蛋白表达的抑制作用** 启膈散及其拆方明显抑制Eca109细胞PLC $\gamma$ 1蛋白表达, 随着药物浓度增加其抑制作用增强, 呈剂量-效应依赖关系, 其中以活血组最好, 全方组次之(表1, 图1)。

**2.2 启膈散及其拆方对Eca109细胞PLC- $\gamma$ 1、EGFR和PKC $\alpha$ 蛋白表达、蛋白酪氨酸磷酸化(PY99)和MARCKS磷酸化影响** 应用启膈散及其拆方处理的Eca109细胞PLC- $\gamma$ 1、EGFR和PKC $\alpha$ 蛋白表达水平、PLC- $\gamma$ 1、EGFR和MARCKS磷酸化水平与对照组相比降低, 说明对PLC- $\gamma$ 1和EGFR表达及酪氨酸磷酸化、PKC $\alpha$ 表达和PKC磷酸激酶活性具有一定的抑制作用, 其中P组最好, W组次之(图2A-E)。

**2.3 启膈散及其拆方对Eca109细胞胞内游离钙离子 $[Ca^{2+}]_i$ 浓度的影响** 对照组细胞内游离钙离子 $[Ca^{2+}]_i$ 浓度明显高于用药各组, 与活血组相比 $P < 0.05$ (表2), 说明活血组药物具有明显降低细胞内游离钙离子 $[Ca^{2+}]_i$ 浓度作用。

**2.4 启膈散及其拆方对Eca109细胞PKC活性的影响** 应用启膈散及其拆方处理的Eca109细胞PKC

# ■创新盘点

本文首次报道了启膈散及其拆方通过抑制PLC $\gamma$ 1介导的信号转导发挥对人食管癌Eca109细胞生长的抑制作用。

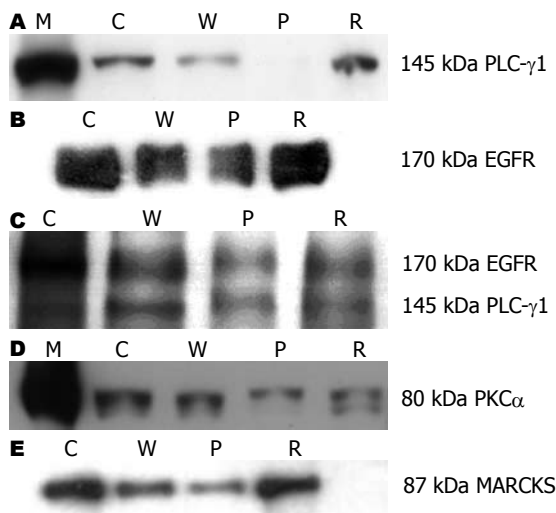


图2 启膈散及其拆方对Eca109细胞PLC- $\gamma$ 1、EGFR和PKC $\alpha$ 蛋白表达、蛋白酪氨酸磷酸化(PY99)和MARCKS磷酸化影响。A: PLC- $\gamma$ 1蛋白; B: EGFR蛋白; C: 蛋白酪氨酸磷酸化PY99; D: PKC $\alpha$ 蛋白; E: MARCKS磷酸化。M: 小鼠脑; C: 对照组; W: 全方组; P: 活血组; R: 化痰组。

活性明显减弱,表明启膈散及其拆方对PKC活性具有一定的抑制作用,其中P组最好,W组次之(图3)。

## 3 讨论

EGFR是原癌基因C-erbB1表达的产物,为跨膜酪氨酸激酶受体,EGFR与配体结合后可导致受体形成同源二聚体,也可与其他EGFR家族形成异源二聚体,促使EGFR胞内区6个特异的受体酪氨酸残基磷酸化,形成酪氨酸底物结合位点,使EGFR激活,再通过识别一系列底物酶将细胞外信号转导至胞内。EGFR主要通过Ras-MAPK、PI3K-Akt/PKB、磷脂酶C- $\gamma$ 1-PKC介导的信号通路调节细胞的增殖和分化,与细胞的再生和肿瘤的发生发展密切相关<sup>[2,9]</sup>。EGFR在食管癌中常常超量表达,与食管癌的发生、发展和预后密切相关<sup>[1]</sup>。我们以往研究发现,启膈散及其活血和化痰两个拆方能够不同程度地抑制食管癌细胞株Eca109的生长,其中P组作用最强,W组次之。本研究显示食管癌细胞株Eca109表达EGFR,用启膈散及其拆方干预细胞生长显示,W和P组可明显抑制细胞生长和EGFR表达,P组作用最强,W组作用较P组为次(图2B)。此结果表明,启膈散及其拆方抑制细胞生长作用与EGFR介导的信号转导通路相关。为了进一步研究启膈散及其拆方的作用机制,我们对EGFR介导的PLC $\gamma$ 1-PKC通路相关蛋白分子进行了检测。

PLC分为 $\beta$ 、 $\gamma$ 、 $\delta$  3型,每1型又分几种亚

表2 启膈散及其拆方对Eca109细胞内游离钙离子[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>浓度的影响

分组	n	浓度(nmol/L)
C	4	231.8633 ± 51.1017
W	4	169.6531 ± 30.5454
P	4	145.8391 ± 24.1226 <sup>a</sup>
R	4	214.9360 ± 37.1445

<sup>a</sup>P<0.05 vs C.

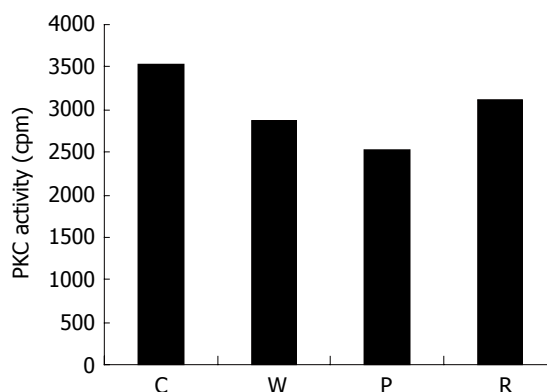


图3 启膈散及其拆方对Eca109细胞PKC活性的影响。

型,如PLC- $\gamma$ 分PLC- $\gamma$ 1和PLC- $\gamma$ 2。PLC- $\gamma$ 1由2个SH2(src homology domain)、1个SH3、1个PH(pleckstrin homology domain)和2个催化区等结构域组成。PLC- $\gamma$ 1是以生长因子受体为中心的多级蛋白质复合物的一个重要成员,其序列中几个酪氨酸能直接被生长因子受体酪氨酸激酶磷酸化而活化。PLC- $\gamma$ 1酶活化后,催化PIP2分解成产物IP3和DAG作为第二信使物质在细胞内发生作用。IP3能引起细胞内钙库的释放,DAG能激活PKC。PLC- $\gamma$ 1和其他类型PLC同工酶不同,不仅具有催化分解PIP2的脂酶的功能,而且也具有作为接合器蛋白的作用。即PLC- $\gamma$ 1除了由X和Y区构成的酶活性部位外,还有作为蛋白质相互结合的SH区,通过这些结构区域与其他信号传导分子的结合,从而激活多种细胞反应。PLC- $\gamma$ 1在细胞增生性疾病和癌细胞中如上皮过度增生、家族性肠息肉病、乳腺癌、结肠直肠癌、前列腺癌、卵巢癌等高度超量表达;用微量注射法将PLC- $\gamma$ 1蛋白注入静止期的小鼠成纤维细胞NIH3T3中即迅速诱导DNA合成;同样,用转基因技术造成大鼠成纤维细胞株3Y1细胞超量表达PLC- $\gamma$ 1使该细胞株发生恶性转变,将该细胞植入裸鼠体内很快形成肿瘤。这

些结果表明PLC- $\gamma$ 1在肿瘤发生和发展中起关键作用<sup>[10-13]</sup>。

由表1和图1可以看出, 启膈散及其活血和化痰两个拆方均能抑制Eca109细胞PLC- $\gamma$ 1蛋白表达, 活血组作用最强, 全方组次之, 化痰组作用最弱, 随着药物浓度增加, 各组对PLC- $\gamma$ 1表达抑制作用呈剂量依赖关系, 其趋势与其对Eca109细胞生长的抑制作用一致。从图2A也可以知道, 各组对Eca109细胞PLC- $\gamma$ 1表达的抑制作用强弱次序为: P组、W组、R组, 说明各用药组可能是通过下调细胞PLC- $\gamma$ 1表达从而通过其介导的信号转导通路发挥抑制细胞生长作用。为了观察启膈散及其拆方对EGFR-PLC- $\gamma$ 1信号转导的影响, 我们用能识别EGFR和PLC- $\gamma$ 1酪氨酸磷酸化的抗磷酸化酪氨酸单克隆抗体PY99对蛋白酪氨酸磷酸化水平进行检测, 发现与对照组相比各用药组在EGFR和PLC- $\gamma$ 1分别对应的170 kDa和145 kDa处磷酸化条带减弱(图2C), 即活血组、全方组、化痰组有不同程度地抑制EGFR和PLC- $\gamma$ 1蛋白酪氨酸磷酸化作用, 说明活血组、全方组、化痰组还可以通过抑制EGFR和PLC- $\gamma$ 1的酪氨酸磷酸化降低其活性, 从而减弱EGFR-PLC- $\gamma$ 1信号转导。

细胞内游离钙离子 $[Ca^{2+}]_i$ 参与了细胞多种生物行为包括细胞的收缩、运动、生长、分化和分泌。在外部刺激因子如EGF作用下,  $Ca^{2+}$ 离子从细胞内钙池内质网中释放出来或者细胞外的 $Ca^{2+}$ 离子从细胞膜钙离子通道进入, 从而升高 $[Ca^{2+}]_i$ , 这两种通路虽然不同, 但在同一刺激因子作用下可以协同作用。从细胞内钙池释放 $Ca^{2+}$ 需要依赖于IP3与内质网膜上的InsP3Rs结合引起钙通道打开, 很快内质网内 $Ca^{2+}$ 又通过内质网膜上的 $Ca^{2+}$ 泵、Na-Ca离子交换器、胞质中钙结合蛋白等作用恢复平衡。同时细胞膜上依赖于细胞内池 $Ca^{2+}$ 流的 $Ca^{2+}$ 通道打开, 引起持续小幅度 $[Ca^{2+}]_i$ 升高。细胞内的 $[Ca^{2+}]_i$ 作为信号传导的第二信使, 通过 $Ca^{2+}$ -CaM和激活PKC等通路引起细胞各种反应。丝裂素原通过细胞内 $Ca^{2+}$ 流在细胞增殖中发挥关键作用, 如可抑制 $Ca^{2+}$ 流以引起细胞在G2/M停滞<sup>[14-15]</sup>。在很多组织细胞如淋巴细胞、成纤维细胞、CEO细胞、内皮细胞的增殖依赖于持续的细胞内钙离子信号。细胞生长因子也可以通过刺激细胞内 $[Ca^{2+}]_i$ 升高而引起细胞增殖, PDGF引起的细胞内 $[Ca^{2+}]_i$ 可以引起小鼠成纤维细胞增殖、FGF可以通过引起 $[Ca^{2+}]_i$ 增高引起内皮细胞增殖等<sup>[16-17]</sup>。当这些

生长因子和受体结合后主要通过磷酸化激活细胞内效应蛋白如PLC- $\gamma$ 1、PI-3K等引起 $[Ca^{2+}]_i$ 升高<sup>[14,18-19]</sup>。本研究发现启膈散及其拆方可以降低Eca109细胞内 $[Ca^{2+}]_i$ , 其中活血组最强, 和对照组有显著差异( $P<0.05$ ), 全方组也可降低 $[Ca^{2+}]_i$ (均值明显低于对照组), 统计学虽没有意义, 但趋势明显, 可能因为样本少的缘故。说明启膈散全方和活血方可以通过抑制PLC- $\gamma$ 1及其他效应蛋白引起的 $[Ca^{2+}]_i$ 升高, 从而抑制细胞增殖。

蛋白激酶C(PKC)是PLC介导的细胞信号转导的重要环节, 他是丝氨酸和苏氨酸激酶, 具有多种亚型, PKC $\alpha$ 是其中重要的一个。当特异性配体和受体结合后PLC催化PIP2分解为钙离子动员物IP3和PKC激动剂DAG<sup>[3]</sup>。DAG促使PKC锚定于质膜, 增强了他对磷脂酰丝氨酸的亲性和性, 同时 $Ca^{2+}$ 也可以增加PKC的C区与阴离子膜的亲和性促使PKC转位。质膜与PKC的C1和C2区结合产生了足够的能量使PKC发生变构暴露出底物结合区。研究发现PKC $\alpha$ 而不是PKC $\beta$ 依赖PLC活性。活化后的PKC $\alpha$ 可由胞质中向胞膜转移, 再磷酸化多种底物, 通过raf-MAPK-AP1, bcl-2、p27和RhoA等通路, 发挥其调节细胞生长、分化、细胞周期调控、迁移、基因表达多种功能<sup>[20-21]</sup>。MARCKS是PKC的重要底物, 分布于各种细胞中, 参与细胞运动、有丝分裂、膜运输等细胞活动<sup>[22]</sup>, MARCKS停留于细胞膜, 依赖于PKC对其磷酸化往来于膜质之间<sup>[23-24]</sup>, 及调节其与钙调蛋白结合活性和与丝状肌动蛋白交联活性<sup>[25]</sup>, 而其他磷酸激酶都不能催化他, 因此, MARCKS已广泛用于对细胞PKC活性的检测<sup>[26]</sup>。本研究采用western blot分析MARCKS磷酸化水平和纯化PKC使HistoneIII $\phi$ 磷酸化2种体外测定方法检测PKC活性, 结果发现, 启膈散及其拆方对食管癌细胞PKC $\alpha$ 的表达和PKC的活性具有抑制作用, 强弱次序为: 活血组、全方组、化痰组。上述实验结果显示启膈散全方和活血药对EGFR-PLC $\gamma$ 1-PKC信号通路的蛋白表达具有同步抑制作用, 其中是由于抑制三者中一个表达后, 导致另外两者表达减少, 还是通过另外一种通路调节三者的蛋白表达, 需要进一步研究。同时, 启膈散及其拆方还对EGFR和PLC- $\gamma$ 1酪氨酸磷酸化及PKC活性具有抑制作用, 并能降低细胞内游离钙离子浓度。这些都表明启膈散及其拆方可以通过EGFR-PLC $\gamma$ 1-PKC信号转导通路发挥抑制细胞生长的作用。

#### ■同行评价

本文研究了中药启膈散对食管癌细胞Eca109 PLC- $\gamma$ 1介导的细胞信号转导的影响, 从EGFR-PLC $\gamma$ 1-PKC信号转导通路上不同层次、多种方法研究其机制, 具有一定新颖性和创新性, 结果和结论有说服力。

总之, 通过本实验我们可以知道: (1)启膈散及其拆方对人食管癌Eca109细胞EGFR- PLC $\gamma$ 1-PKC信号转导通路具有抑制作用, 以活血组药物作用最好; (2)启膈散及其拆方可能通过EGFR- PLC $\gamma$ 1-PKC信号转导通路发挥对Eca109细胞生长抑制作用; (3)启膈散及其拆方对EGFR- PLC $\gamma$ 1-PKC信号转导通路的蛋白表达和蛋白磷酸化的同步抑制机制及EGFR激活后EGFR- PLC $\gamma$ 1-PKC具体的信号转导过程需进一步研究。

#### 4 参考文献

- Mukaida H, Toi M, Hirai T, Yamashita Y, Toge T. Clinical significance of the expression of epidermal growth factor and its receptor in esophageal cancer. *Cancer* 1991; 68: 142-148
- Andl CD, Mizushima T, Nakagawa H, Oyama K, Harada H, Chruma K, Herlyn M, Rustgi AK. Epidermal growth factor receptor mediates increased cell proliferation, migration, and aggregation in esophageal keratinocytes in vitro and in vivo. *J Biol Chem* 2003; 278: 1824-1830
- Kim MJ, Si F, Kim SJ, Hong SB, Hwang JI, Lee HJ, Lee SJ, Chang JS, Lee YH, Ryu SH, Suh PG. The SH2-SH2-SH3 domain of phospholipase C-gamma1 directly binds to translational elongation factor-1alpha. *Mol Cells* 1999; 9: 631-637
- Thomas SM, Coppelli FM, Wells A, Gooding WE, Song J, Kassiss J, Drenning SD, Grandis JR. Epidermal growth factor receptor-stimulated activation of phospholipase Cgamma-1 promotes invasion of head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Res* 2003; 63: 5629-5635
- Piccolo E, Innominato PF, Mariggio MA, Maffucci T, Iacobelli S, Falasca M. The mechanism involved in the regulation of phospholipase Cgamma1 activity in cell migration. *Oncogene* 2002; 21: 6520-6529
- Sambrook J, Russell DW. Molecular Cloning. third edition. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press 2001; 16: 25-26
- Cobbold PH, Rink TJ. Fluorescence and bioluminescence measurement of cytoplasmic free calcium. *Biochem J* 1987; 248: 313-328
- Helfman DM, Barnes KC, Kinkade JM Jr, Vogler WR, Shoji M, Kuo JF. Phospholipid-sensitive Ca<sup>2+</sup>-dependent protein phosphorylation system in various types of leukemic cells from human patients and in human leukemic cell lines HL60 and K562, and its inhibition by alkyl-lysophospholipid. *Cancer Res* 1983; 43: 2955-2961
- Arteaga CL. Epidermal growth factor receptor dependence in human tumors: more than just expression? *Oncologist* 2002; 7 Suppl 4: 31-39
- Wells A, Grandis JR. Phospholipase C-gamma1 in tumor progression. *Clin Exp Metastasis* 2003; 20: 285-290
- Smith MR, Court DW, Kim HK, Park JB, Rhee SG, Rhim JS, Kung HF. Overexpression of phosphoinositide-specific phospholipase Cgamma in NIH 3T3 cells promotes transformation and tumorigenicity. *Carcinogenesis* 1998; 19: 177-185
- Ye K, Aghdasi B, Luo HR, Moriarity JL, Wu FY, Hong JJ, Hurt KJ, Bae SS, Suh PG, Snyder SH. Phospholipase C gamma 1 is a physiological guanine nucleotide exchange factor for the nuclear GTPase PIKE. *Nature* 2002; 415: 541-544
- Tan L, Xiao BX, Zeng WS, Lin J, Zou ZP, Xu AM, Luo SQ. Antitumour effects on human colorectal carcinomas cells by stable silencing of phospholipase C-gamma 1 with lentivirus-delivered siRNA. *Chin Med J (Engl)* 2007; 120: 749-754
- Munaron L. Calcium signalling and control of cell proliferation by tyrosine kinase receptors (review). *Int J Mol Med* 2002; 10: 671-676
- Moolenaar WH, Aerts RJ, Tertoolen LG, de Laat SW. The epidermal growth factor-induced calcium signal in A431 cells. *J Biol Chem* 1986; 261: 279-284
- Estacion M, Mordan LJ. Competence induction by PDGF requires sustained calcium influx by a mechanism distinct from storage-dependent calcium influx. *Cell Calcium* 1993; 14: 439-454
- Munaron L, Distasi C, Carabelli V, Baccino FM, Bonelli G, Lovisolo D. Sustained calcium influx activated by basic fibroblast growth factor in Balb-c 3T3 fibroblasts. *J Physiol* 1995; 484 ( Pt 3): 557-566
- Gusev K, Glouchankova L, Zubov A, Kaznacheyeva E, Wang Z, Bezprozvanny I, Mozhayeva GN. The store-operated calcium entry pathways in human carcinoma A431 cells: functional properties and activation mechanisms. *J Gen Physiol* 2003; 122: 81-94
- Nowycky MC, Thomas AP. Intracellular calcium signaling. *J Cell Sci* 2002; 115: 3715-3716
- Michie AM, Nakagawa R. The link between PKCalpha regulation and cellular transformation. *Immunol Lett* 2005; 96: 155-162
- Balboa MA, Firestein BL, Godson C, Bell KS, Insel PA. Protein kinase C alpha mediates phospholipase D activation by nucleotides and phorbol ester in Madin-Darby canine kidney cells. Stimulation of phospholipase D is independent of activation of polyphosphoinositide-specific phospholipase C and phospholipase A2. *J Biol Chem* 1994; 269: 10511-10516
- Ramsden JJ. MARCKS: a case of molecular exaptation? *Int J Biochem Cell Biol* 2000; 32: 475-479
- Ohmori S, Sakai N, Shirai Y, Yamamoto H, Miyamoto E, Shimizu N, Saito N. Importance of protein kinase C targeting for the phosphorylation of its substrate, myristoylated alanine-rich C-kinase substrate. *J Biol Chem* 2000; 275: 26449-26457
- Thelen M, Rosen A, Nairn AC, Aderem A. Regulation by phosphorylation of reversible association of a myristoylated protein kinase C substrate with the plasma membrane. *Nature* 1991; 351: 320-322
- Hartwig JH, Thelen M, Rosen A, Janmey PA, Nairn AC, Aderem A. MARCKS is an actin filament crosslinking protein regulated by protein kinase C and calcium-calmodulin. *Nature* 1992; 356: 618-622
- Fujise A, Mizuno K, Ueda Y, Osada S, Hirai S, Takayanagi A, Shimizu N, Owada MK, Nakajima H, Ohno S. Specificity of the high affinity interaction of protein kinase C with a physiological substrate, myristoylated alanine-rich protein kinase C substrate. *J Biol Chem* 1994; 269: 31642-31648

编辑 何燕 电编 何基才



# 温郁金提取液对化学致癌剂致大鼠胃癌的预防作用

徐磊, 吕宾, 俞林峰

徐磊, 吕宾, 俞林峰, 浙江中医药大学附属第一医院消化科  
浙江省杭州市 310006

徐磊, 浙江中医药大学消化内科硕士, 主要从事消化系统疾病的研究。

通讯作者: 吕宾, 310006, 浙江省杭州市邮电路54号, 浙江中医药大学附属第一医院消化科。lvbin@medmail.com.cn

电话: 0571-87032028 传真: 0571-87077785

收稿日期: 2007-03-19 修回日期: 2007-08-07

## Chemoprevention of gastric cancer in rats by a wet-distillation extract of *radix curcumae*

Lei Xu, Bin Lv, Lin-Feng Yu

Lei Xu, Bin Lv, Lin-Feng Yu, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Zhejiang University of Traditional Chinese Medicine, Hangzhou 310006, Zhejiang Province, China

Correspondence to: Bin Lv, the First Affiliated Hospital of Zhejiang University of Traditional Chinese Medicine, 54 Youdian Road, Hangzhou 310006, Zhejiang Province, China. lvbin@medmail.com.cn

Received: 2007-03-19 Revised: 2007-08-07

## Abstract

**AIM:** To study the chemopreventive effects of a wet-distillation extract of *radix curcumae* in a wistar rat model of stomach carcinogenesis induced by *N*-methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine (MNNG).

**METHODS:** Eighty 6-week-old male wistar rats were randomly divided into 5 groups of 16 animals each. Rats were given water and 5 mL normal saline daily (group A); MNNG and 5 mL normal saline daily (group B); 10 mg/kg celecoxib daily (group C); 1 kg/L wet-distillation extract of *radix curcumae*, 5 mL daily (group D); and 2 kg/L wet-distillation extract of *radix curcumae*, 5 mL daily (group E). Animals in groups B-E drank water containing MNNG (100 mg/L) and were given 100 g/L NaCl in the initial 6 wk. All animals received treatment for 40 weeks and were then sacrificed at week 41. Gastric tumors were evaluated histologically.

**RESULTS:** Thirty-two rats died during the experiment and 48 completed the experiment.

Incidence of gastric cancer was 0.0% in Group A, 44.4% in Group B, and 12.5% in Groups C-E. We found that there was a statistically significant difference in the incidence of tumor formation ( $P < 0.05$ ), and volume ( $4.4 \pm 0.8 \text{ cm}^3$ ,  $6.6 \pm 0.6 \text{ cm}^3$ ,  $3.4 \pm 0.6 \text{ cm}^3$  vs  $11.5 \pm 1.7 \text{ cm}^3$ ; all  $P < 0.01$ ) in Groups C-E compared with Group B.

**CONCLUSION:** The wet-distillation extract of *radix curcumae* can reduce the incidence of gastric cancer and tumor growth in rats.

**Key Words:** *Radix curcumae*; Gastric cancer; Chemoprevention

Xu L, Lv B, Yu LF. Chemoprevention of gastric cancer in rats by a wet-distillation extract of *radix curcumae*. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007; 15(24): 2589-2592

## 摘要

**目的:** 探讨温郁金蒸馏提取液对化学致癌剂 *N*-甲基-*N'*-硝基-亚硝基胍(MNNG)诱导Wistar大鼠胃癌的作用。

**方法:** ♂ Wistar大鼠80只随机分为A, B, C, D, E 5组, 每组16只, A组为对照组, B组为模型组, 分别自由饮用净化水和100 mg/L MNNG液同时予生理盐水5 mL ig 1次/d; C组为塞来昔布组, 饮用MNNG同B组, 同时予10 mg/kg塞来昔布5 mL ig 1次/d; D为低剂量郁金组, E组为高剂量郁金组, 饮用MNNG同B组, 同时分别予1和2 kg/L温郁金水蒸气蒸馏提取液5 mL ig 1次/d, 持续40 wk。41 wk后处死动物, 分组拍照片并行组织病理切片比较大体和组织学变化。

**结果:** 实验期间大鼠死亡32只, 余48只完成实验。A, B, C, D, E组胃癌发生率分别为0.0% (0/16), 44.4% (7/16), 12.5% (2/16), 12.5% (2/16), 12.5% (2/16); 与B组相比, C, D, E组胃癌发生率 ( $P < 0.05$ ) 和肿瘤体积 ( $4.4 \pm 0.8 \text{ cm}^3$ ,  $6.6 \pm 0.6 \text{ cm}^3$ ,  $3.4 \pm 0.6 \text{ cm}^3$  vs  $11.5 \pm 1.7 \text{ cm}^3$ ;  $P < 0.01$ ) 显著降低; C, D, E组相互比较差异无显著性 ( $P = 1.000$ )。

**结论:** 温郁金水蒸气蒸馏提取液对MNNG诱

## ■背景资料

目前, 针对天然药物对胃癌化学预防的研究甚少。现代研究发现郁金提取物对体内外肿瘤细胞的增殖均有抑制作用, 但对原发胃癌模型的研究少有报道。因此本文探讨温郁金水蒸气蒸馏提取液对化学致癌剂诱导大鼠胃癌的预防作用。



## ■创新盘点

国内外多单独研究郁金的水溶或醇溶成分,采用水蒸气蒸馏法制备提取液,既可以保留其挥发油成分,又保留水溶性成分,而且符合传统水煎服药方法,可以最大程度利用其有效活性成分,而且郁金提取物对原发胃癌模型的研究报道很少。

导的大鼠胃癌有预防作用。

**关键词:** 温郁金; 胃癌; 化学预防

徐磊, 吕宾, 俞林峰. 温郁金提取液对化学致癌剂致大鼠胃癌的预防作用. 世界华人消化杂志 2007;15(24):2589-2592  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/2589.asp>

## 0 引言

目前,针对胃癌化学预防的研究大多集中在抗 *H. pylori* 的感染、非甾体类消炎药及抗氧化剂等,对天然药物的研究甚少。温郁金是临床上常用的抗肿瘤中药,具有活血化淤,利胆退黄、抗炎、抗肿瘤的功效。现代研究发现郁金提取物对体内外肿瘤细胞的增殖均有抑制作用,但对原发胃癌模型的研究少有报道。我们探讨温郁金水蒸气蒸馏提取液对化学致癌剂 *N*-甲基-*N'*-硝基-亚硝基胍(MNNG)诱导大鼠胃癌的预防作用。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** ♂ Wistar大鼠6 wk 80只,体质量180-200 g,购自中科院上海动物研究所,饲养温度24±2℃,湿度55%±5%,噪音<50 db,每12 h一次亮暗循环,用全价营养颗粒饲料饲养,专人管理。MNNG购自Adrich公司,温郁金产自浙江温州,温郁金水蒸气提取液由本院制剂中心制备,塞来昔布购自Searle公司。

**1.2 方法** Wistar大鼠随机分为A, B, C, D, E 5组,每组16只, A组为对照组,自由饮用净化水同时予生理盐水5 mL ig每天1次; B组为模型组,自由饮用100 mg/L的MNNG液同时予生理盐水5 mL ig每天1次; C组为塞来昔布组,饮用MNNG同B组,同时予10 mg/kg塞来昔布5 mL ig每天1次; D组为低剂量郁金组, E组为高剂量郁金组,饮用MNNG同B组,同时分别予1和2 kg/L的温郁金水蒸气蒸馏提取液5 mL,每天ig 1次,持续40 wk。MNNG纯度>97%, NaCl为普通食盐, MNNG溶液新鲜配制,每天用分析天平称取0.288 g MNNG,加入净化水2880 mL中,避光用磁性搅拌机搅拌4 h,使之完全溶解后分装于16只外涂黑油漆的饮水瓶中,由动物自由饮用, B-E组实验前6 wk予100 g/L NaCl 1 mL每周ig 1次<sup>[1]</sup>。每周1次测动物体质量,分组记录,如发现在实验期间死亡的动物均进行解剖,大体观察并留取组织学标本。实验结束时大鼠禁食不禁水24 h, 25 g/L戊巴比妥钠ip麻醉后处死,在距贲门和幽门1.5 cm处结扎、离断,取出全胃,沿胃大弯剪开,

冰生理盐水冲洗,滤纸吸干后铺开,以大头针固定在泡沫上后行大体观察,做记录,拍照片,随后沿纵轴将腺胃分成5等分,若发现肿瘤则取下称质量,测量长和宽(cm),按照公式(长×宽<sup>2</sup>)/2计算出肿瘤的近似体积(cm<sup>3</sup>)。组织固定于40 g/L甲醛中,石蜡包埋,病理连续切片为3 μm厚, HE染色。

采用水蒸气蒸馏法制备温郁金水蒸气蒸馏液。把干燥粉碎的温郁金饮片粉500 g放入容积为2000 mL的长颈烧瓶中,加水1500 mL,密封,开始加热蒸馏,由冷凝管收集温郁金的挥发油成份,2 h左右,冷凝管不再收集到挥发成份,蒸馏完毕。拆开冷凝装置,把温郁金水煎部分稀释到5000 mL,过滤,离心,浓缩为250 mL(浓度相当于0.002 g/L),与收集到的挥发油成份相混和,乳化,分装于5 mL的小安瓿瓶中,密封,4℃避光冷藏备用。

**统计学处理** 应用SPSS11.0医学软件包,分别相互比较各组动物的体质量、肿瘤体积、肿瘤发生率(患肿瘤动物占实验动物的百分比)、癌前病变发生率。动物体质量、肿瘤体积采用 *t* 检验,肿瘤发生率、癌前病变发生率采用  $\chi^2$  检验,以 *P*<0.05为差异有显著性。

## 2 结果

**2.1 大体观察和平均体质量** 在实验过程中大鼠死亡32只,其中A组7只, B组6只, C组4只, D组7只, E组8只,实验前20 wk死亡24只,解剖发现肺淤血或者见两肺多个陈旧性出血点,胃大体未见明显异常,肠内无血便、溃疡、新生物等,肝脏色红柔软,腹腔内未见肿大淋巴结。死亡原因可能与ig时药物误吸入呼吸道有关,胃组织病理示黏膜慢性炎症,未见癌前病变和肿瘤。24 wk死亡4只,均死于肺淤血,2只有溃疡产生(B组和E组),36 wk死亡4只,其中1只病理示胃癌(B组), D组1只E组2只死于肺淤血,属D组者病理示有上皮内瘤变。实验期间死亡动物无论有无发生肿瘤,均作为有效动物,列入实验结果统计。40 wk实验结束时,共存活48只大鼠, A组(对照组)的体质量(477.9±42.5 g)明显大于B, C, D, E组(*vs* 380.4±39.3 g, 393.4±54.6 g, 388.9±67.9 g, 408.3±22.6 g, *P*<0.01), B组的体质量和C, D, E组相比无显著性差异(*P*>0.05); D, E组之间, C组和D, E组之间亦无显著性差异(*P*>0.05)。

**2.2 总体肿瘤发生率** 经组织学证实, A组无胃癌发生, B组胃癌发生率为44.4%(*vs* A组, *P*<0.01);

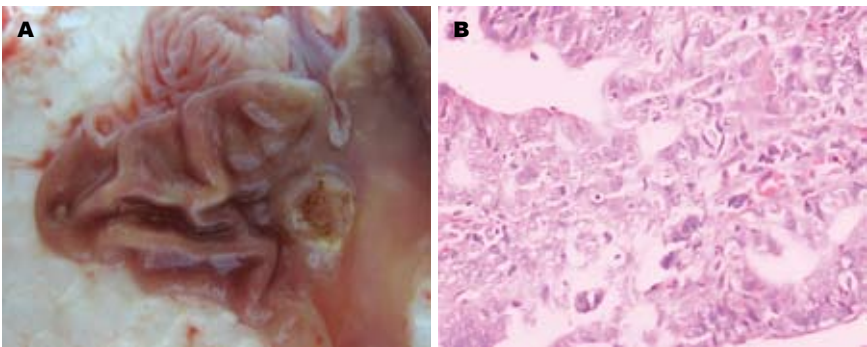


图 1 胃肿瘤. A: 大体观MMNG诱导大鼠胃肿瘤; B: 中分化腺癌(HE染色×200).

■应用要点  
温郁金不仅是发现新药的重要来源,而且可以为设计更理想的新药提供新的独特的化学结构,这些化学结构可被用做创制新药的先导化合物,本文研究发现温郁金对胃癌有化学预防作用,为后续有效成分分析、新药的开 发,打下了理论基础.

表 1 大鼠胃黏膜病变类型及发生率n(%)

分组	n	炎症	萎缩	肠化	上皮内瘤变	溃疡	胃癌
A	16	15(93.8)	0(0.0) <sup>a</sup>	0(0.0) <sup>a</sup>	0(0.0) <sup>a</sup>	0(0.0)	0(0.0) <sup>b</sup>
B	16	3(18.8)	2(12.5)	2(12.5)	1(6.3)	4(25.0)	7(44.4)
C	16	11(68.8)	2(12.5)	0(0.0)	1(6.3)	1(6.3)	2(12.5) <sup>a</sup>
D	16	9(56.3)	2(12.5)	1(6.3)	2(12.5)	0(0.0)	2(12.5) <sup>a</sup>
E	16	9(56.3)	3(18.8)	1(6.3)	1(6.3)	1(6.3)	2(12.5) <sup>a</sup>

<sup>a</sup>*P*<0.05, <sup>b</sup>*P*<0.01 vs B组.

表 2 完成实验大鼠胃黏膜病变类型及发生率n(%)

分组	n	炎症	萎缩	肠化	上皮内瘤变	溃疡	胃癌
A	9	8(93.8)	0(0.0) <sup>a</sup>	0(0.0) <sup>a</sup>	0(0.0) <sup>a</sup>	0(0.0)	0(0.0) <sup>b</sup>
B	10	0(0.0)	2(0.0)	2(20.0)	1(10.0)	3(30.0)	6(60.0)
C	12	7(58.3)	0(16.7)	0(0.0)	1(8.4)	1(8.4)	2(16.7) <sup>a</sup>
D	9	2(22.2)	1(22.2)	1(11.1)	1(11.1)	0(0.0)	2(22.2) <sup>a</sup>
E	8	3(37.5)	1(6.3)	1(6.3)	1(6.3)	0(0.0)	2(25.0)

<sup>a</sup>*P*<0.05, <sup>b</sup>*P* = 0.01 vs B组.

C, D, E组胃癌发生率均为12.5%, 均显著低于B组. 肉眼观察, 肿瘤多发生在胃窦部小弯侧, 与人类胃癌好发部位一致, 组织学诊断为腺癌(图1). 癌旁伴有萎缩、肠化和上皮内瘤变(表1).

2.3 完成实验大鼠肿瘤发生率 胃癌发生率A组0%, B组60%(6/10), C组16.7%(2/12), D组22.2%(2/9), E组25%(2/8); C, D组与B组比较差异均有统计学意义(*P*<0.05), E组胃癌发生率也较低(25% vs 70%, *P* = 0.058), 其他组织学变化如萎缩、肠上皮化生和上皮内瘤变等也均有发现(表2).

2.4 肿瘤体积 用游标卡尺测量肿瘤的长度和宽度, 按照公式(长×宽<sup>2</sup>)/2计算出肿瘤的近似体积, B组发生肿瘤的7只大鼠的平均肿瘤体积为(11.5±1.7)cm<sup>3</sup>; C, D, E组的平均肿瘤体积分别为(4.4±0.8)cm<sup>3</sup>, (6.6±0.6)cm<sup>3</sup>, (3.4±0.6)cm<sup>3</sup>, B组的平均肿瘤体积显著大于C, D, E组(*P*<0.01).

3 讨论

尽管在很多国家胃癌的发生率一直呈下降趋势, 但是最近的世界范围评估显示, 胃癌在所有癌症的发生中占第4位, 在癌症的死亡率排在第2位, 现有对进展期胃癌的治疗手段疗效均不尽如人意. 胃癌的发生可分为起动、促进和进展3个步骤, 是一个多步骤、多基因变化的过程. 从肿瘤的始发切断肿瘤发生的任一环节, 对肿瘤的预防及治疗具有重要意义. 天然药物不仅是发现新药的重要来源, 而且可以为设计更理想的新药提供新的独特的化学结构, 这些化学结构可被用做创制新药的先导化合物, 因此近年来备受重视. 目前国内外许多研究表明, 郁金的活性成分(姜黄色素类及挥发油)可抑制多种肿瘤细胞生长, 热点多集中在肿瘤发生、发展阶段, 而对肿瘤化学预防的研究鲜有报道, 而且这

### ■同行评价

本文采用动物实验的方法研究了温郁金提取液对MNNG诱导的大鼠胃癌发生的抑制作用。研究目的明确,思路清晰,方法可行,结果分析合理,并对在实验过程中死亡的动物进行了分析,可读性较强。

两种成分均存在吸收率低的问题,采用水蒸气蒸馏法制备提取液,既可以保留其挥发油成分,又符合传统水煎服药方法,可以最大程度利用其有效活性成分。

我们的研究表明,温郁金水蒸气蒸馏提取液能显著降低MNNG诱导的大鼠胃癌的发生率,肿瘤体积和瘤重也显著低于模型组,炎症、萎缩、肠化、上皮内瘤变的发生率未见显著降低。完成实验的大鼠未见消化道出血和其他器官明显损害,证明长期服用温郁金水蒸气蒸馏法提取液具有较高的安全性。本研究前6 wk采用100 g/L NaCl ig,全程予100 mg/L的MNNG自由饮用双重因素造模,40 wk时模型组的诱癌率为44.4%,显著高于对照组,说明这是一个成功的动物模型;实验结束时,采用选择性COX-2抑制剂塞来昔布干预的动物胃癌发生率显著低于模型组,且发生溃疡的比例和郁金组相比没有差异,证明塞来昔布具有预防胃癌的作用。

当前对温郁金抗癌机制的认识主要集中在抑制COX-2和脂氧合酶的表达、抑制血管生成作用、抗氧化、抑制癌基因表达,诱导凋亡;抑制端粒酶活性、调节细胞周期拮抗肿瘤相关细胞因子,抑制肿瘤细胞生长、侵袭和转移等方面<sup>[2-7]</sup>。我们在前期工作中发现温郁金能抑制胃癌细胞IGF- I, IGF- II的分泌,从而拮抗其促有丝分裂、抗细胞凋亡、促进肿瘤细胞增生和分化作用<sup>[8]</sup>,下调瘤灶中VEGF的表达,减少瘤灶内的MVD,抑制肿瘤生长<sup>[9]</sup>,并提高鼠胃组织生长抑素水平<sup>[10]</sup>。因此,我们认为,温郁金水蒸气蒸馏提取液可能通过上调胃肠道生长抑素的分泌,抑制IGF- I, IGF- II的分泌,并下调VEGF, COX-2的表达,干预胃癌的发生、发展。

胃癌化学预防的研究主要集中在选择性COX-2抑制剂、根除*H pylori*、抗氧化剂(类胡萝卜素、维生素C、维生素E和硒)上,根除*H pylori*可以降低高危人群发生胃癌的危险,但对胃黏膜萎缩、肠化的影响方面,结论还不一致。多项研究显示,长期服用NSAID的患者食管癌和胃癌发病危险性相应降低,然而传统NSAID因能引起严重的胃肠道副作用、肾功能损害而使其应用受到限制,高选择性COX-2抑制剂有望成为防治胃肠道肿瘤的新药。1999年, FDA批准celecoxib可用于遗传性家族性腺瘤性息肉病(FDP)的预防,这标志着COX-2抑制剂正式用于肿瘤预防。COX-2抑制剂可能通过抑制微

血管的生成,促进血管内皮细胞的凋亡,减少前列腺素的合成预防肿瘤,并能预防胃癌的淋巴转移。甲基硝基亚硝基胍(MNNG)诱发的Wistar大鼠胃癌模型与人类腺癌类似,是目前评价抗癌制剂的理想模型,被广泛应用于胃癌防治的研究。唐保东<sup>et al</sup><sup>[1]</sup>研究表明, celecoxib可显著降低MNNG诱导的大鼠胃癌发生率和多发数,与模型组相比,胃癌发生率降低56%,肿瘤多发数降低80%,肿瘤体积减少近1000倍。张丽<sup>et al</sup><sup>[11]</sup>发现,选择性COX-2抑制剂尼美舒利能显著降低ENNG诱导的大鼠胃癌率,缩小肿瘤体积,显著降低干预组大鼠胃腺部黏膜萎缩、肠化及上皮内瘤变发生率。

总之,温郁金水蒸气蒸馏提取液对胃癌有预防作用,为温郁金成为潜在的化学预防药物提供了证据。

### 4 参考文献

- 1 唐保东, 胡品津, 曾志荣, 林汉良, 何瑶. 特异性环氧化酶-2抑制剂预防胃癌的实验研究. 中华消化杂志 2004; 24: 158-161
- 2 Goel A, Boland CR, Chauhan DP. Specific inhibition of cyclooxygenase-2 (COX-2) expression by dietary curcumin in HT-29 human colon cancer cells. *Cancer Lett* 2001; 172: 111-118
- 3 Arbiser JL, Klauber N, Rohan R, van Leeuwen R, Huang MT, Fisher C, Flynn E, Byers HR. Curcumin is an in vivo inhibitor of angiogenesis. *Mol Med* 1998; 4: 376-383
- 4 Holy JM. Curcumin disrupts mitotic spindle structure and induces micronucleation in MCF-7 breast cancer cells. *Mutat Res* 2002; 518: 71-84
- 5 Squires MS, Hudson EA, Howells L, Sale S, Houghton CE, Jones JL, Fox LH, Dickens M, Prigent SA, Manson MM. Relevance of mitogen activated protein kinase (MAPK) and phosphatidylinositol-3-kinase/protein kinase B (PI3K/PKB) pathways to induction of apoptosis by curcumin in breast cells. *Biochem Pharmacol* 2003; 65: 361-376
- 6 Chen A, Xu J. Activation of PPAR{gamma} by curcumin inhibits Moser cell growth and mediates suppression of gene expression of cyclin D1 and EGFR. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2005; 288: G447-456
- 7 Lin JK, Lin-Shiau SY. Mechanisms of cancer chemoprevention by curcumin. *Proc Natl Sci Counc Repub China B* 2001; 25: 59-66
- 8 何必立, 吕宾, 徐毅, 苗青, 范一宏. 温郁金对胃癌细胞的抑制作用及其对IGF- I、IGF- II表达的影响. 世界华人消化杂志 2004; 12: 2761-2763
- 9 王佳林, 吕宾, 倪桂宝, 麻林爱, 徐毅. 温郁金对VEGF和MVD在人胃癌裸小鼠移植瘤中表达的研究. 肿瘤 2005; 25: 55-57
- 10 徐毅, 吕宾, 项柏康, 丁志山. 温郁金对鼠血浆和胃组织生长抑素水平的影响. 中国中西医结合消化杂志 2004; 12: 222-224
- 11 张丽, 陆红, 刘文忠, 陈晓宇, 施尧, 萧树东. 尼美舒利对乙基硝基亚硝基胍诱导大鼠胃癌的化学预防作用. 中华消化杂志 2003; 23: 391-394

# Smad7质粒转染对肝星形细胞 $\alpha 1(I)$ 和 $\alpha 1(III)$ 前胶原基因表达的影响

阮艺华, 刘海林

阮艺华, 刘海林, 上海交通大学医学院附属第九人民医院消化科 上海市 200011

阮艺华, 硕士研究生, 主要从事肝纤维化的临床与实验研究。

上海市科学技术委员会基金资助项目, No. 04JC14043

通讯作者: 刘海林, 200011, 上海市制造局路639号, 上海交通大学医学院附属第九人民医院消化科. liuhailin@medmail.com.cn

电话: 021-63138341-5166 传真: 021-63136856

收稿日期: 2007-04-16 修回日期: 2007-08-17

## Upregulation of Smad7 in the expression of procollagen $\alpha 1(I)$ and $\alpha 1(III)$ genes in hepatic stellate cells

Yi-Hua Ruan, Hai-Lin Liu

Yi-Hua Ruan, Hai-Lin Liu, Department of Gastroenterology, the Ninth People's Hospital Affiliated to Medical College of Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200011, China

Supported by: the Science and Technology Committee Foundation of Shanghai Municipality, No. 04JC14043

Correspondence to: Hai-Lin Liu, Department of Gastroenterology, the Ninth People's Hospital Affiliated to Medical College of Shanghai Jiaotong University, 639 Zhizaoju Road, Shanghai 200011, China. liuhailin@medmail.com.cn

Received: 2007-04-16 Revised: 2007-08-17

## Abstract

**AIM:** To investigate the effects of Smad7 on expressions of procollagen  $\alpha 1(I)$  and  $\alpha 1(III)$  genes in a cultured hepatic stellate cell line (HSC-T6).

**METHODS:** Smad7 plasmid was transfected into the HSC-T6 cell line by Eugene6. After 48 hours, the levels of procollagen  $\alpha 1(I)$  and  $\alpha 1(III)$  mRNA were determined by real-time polymerase chain reaction and reverse transcriptase-polymerase chain reaction, respectively.

**RESULTS:** Compared with the normal control and empty plasmid control groups, the expression of Smad7 mRNA was significantly increased in the Smad7 plasmid group after 48 hours ( $1.29 \pm 0.18$  vs  $0.11 \pm 0.02$ ,  $0.13 \pm 0.02$ , both  $P < 0.01$ ), and the level of procollagen  $\alpha 1(I)$  mRNA declined markedly ( $0.10 \pm 0.01$  vs  $1.18 \pm$

$0.15$ ,  $1.07 \pm 0.12$ , both  $P < 0.01$ ). However, there was no statistically significant variation of procollagen  $\alpha 1(III)$  mRNA among the three groups ( $0.72 \pm 0.00$  vs  $0.70 \pm 0.01$ ,  $0.75 \pm 0.01$ , both  $P > 0.05$ ).

**CONCLUSION:** Smad7 may significantly inhibit the transcription of procollagen  $\alpha 1(I)$  mRNA. The mechanism may involve Smad7 antifibrosis.

**Key Words:** Smad7; HSC-T6 cell line; Extracellular matrix; Procollagen  $\alpha 1(I)$ ; Procollagen  $\alpha 1(III)$ ; Real-time polymerase chain reaction

Ruan YH, Liu HL. Upregulation of Smad7 in the expression of procollagen  $\alpha 1(I)$  and  $\alpha 1(III)$  genes in hepatic stellate cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007; 15(24): 2593-2596

## 摘要

**目的:** 研究上调Smad7表达对肝星形细胞(HSC) $\alpha 1(I)$ 和 $\alpha 1(III)$ 前胶原基因转录的作用。

**方法:** 应用Eugene6介导Smad7质粒转染体外培养的HSC-T6细胞。继续培养48 h。同时使用实时定量聚合酶链式反应(Real time-PCR), 逆转录酶链式反应(RT-PCR)方法检测Smad7质粒组和正常对照组、空载质粒对照组 $\alpha 1(I)$ 和 $\alpha 1(III)$ 前胶原mRNA水平。

**结果:** 与正常对照组和空载质粒对照组相比, Smad7质粒转染HSC-T6细胞48 h后, Smad7 mRNA水平显著增高( $1.29 \pm 0.18$  vs  $0.11 \pm 0.02$ ,  $0.13 \pm 0.02$ , 均 $P < 0.01$ ),  $\alpha 1(I)$ 前胶原mRNA表达明显下降( $0.10 \pm 0.01$  vs  $1.18 \pm 0.15$ ,  $1.07 \pm 0.12$ , 均 $P < 0.01$ ), 但 $\alpha 1(III)$ 前胶原基因表达无明显改变( $0.72 \pm 0.00$  vs  $0.70 \pm 0.01$ ,  $0.75 \pm 0.01$ , 均 $P > 0.05$ )。

**结论:** Smad7能明显抑制HSC细胞 $\alpha 1(I)$ 前胶原mRNA转录。

**关键词:** Smad7; 肝星状细胞系; 细胞外基质;  $\alpha 1(I)$ 前胶原;  $\alpha 1(III)$ 前胶原; 实时定量聚合酶链式反应

## ■背景资料

转化生长因子- $\beta 1$ 能促进肝星形细胞活化, 使ECM合成增加, 降解减少, 是最主要的促肝纤维化细胞因子之一。Smad7能够通过抑制TGF- $\beta 1$ 的信号转导, 发挥抗肝纤维化作用。研究表明Smad7可抑制 $\alpha 1(I)$ 前胶原转录, 进而减少细胞外基质的合成, 而有关Smad7对 $\alpha 1(III)$ 型胶原合成影响的研究甚少。

## ■研究前沿

Smad7抗肝纤维化的机制是目前防治肝纤维化研究中的热点,研究表明Smad7可抑制 $\alpha 1(I)$ 前胶原转录,从而发挥其抗肝纤维化的作用,有关Smad7对III型胶原合成的影响还鲜见报道,且TGF- $\beta 1$ 对III型胶原合成影响的分子机制尚不明。

阮艺华, 刘海林. Smad7质粒转染对肝星形细胞 $\alpha 1(I)$ 和 $\alpha 1(III)$ 前胶原基因表达的影响. 世界华人消化杂志 2007;15(24):2593-2596

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/2593.asp>

## 0 引言

肝纤维化是由于细胞外基质(extracellular matrix, ECM)在肝内过多沉积的结果. 肝星形细胞(HSC)在肝纤维化的发生、发展过程中起主导作用. 激活的HSC合成大量的ECM, 其中I, III型胶原为主要组成成分. Smad7能够通过抑制转化生长因子- $\beta 1$ (transforming growth factor- $\beta$ , TGF- $\beta 1$ )的信号转导, 发挥抗肝纤维化作用<sup>[1-3]</sup>. 虽然有研究表明Smad7抑制 $\alpha 1(I)$ 前胶原转录<sup>[4-5]</sup>, 但大多采用RT-PCR方法, 定量的准确性不高. 有关Smad7对 $\alpha 1(III)$ 前胶原表达的作用, 少有报道. 本文应用Real time-PCR定量检测了Smad7对HSC-T6  $\alpha 1(I)$ 和 $\alpha 1(III)$ 前胶原基因表达的影响, 探讨其作用环节.

## 1 材料和方法

1.1 材料 HSC-T6细胞由上海中医药大学肝病研究所提供; pcDNA3.0-人Smad7重组质粒和pcDNA3.0空载质粒由本院组织工程实验室惠赠; Eugene6转染试剂购自Roche公司; TRIzol试剂盒购自Gibco公司; 各目的基因引物由上海生物工程公司合成.

1.2 方法 将HSC-T6细胞接种于6孔培养板中, 细胞浓度为 $1 \times 10^5/L$ , 每孔2 mL.  $37^\circ C$ , 50 mL/L  $CO_2$ 、饱和湿度培养24 h, 随机分为正常对照组、空载质粒对照组和Smad7质粒组, 每组4个复孔. 分别加入同体积的DMEM培养基、含2  $\mu g$  pcDNA3.0空载质粒或pcDNA3.0-人Smad7重组质粒的Eugene6(Roche公司)转染液, 继续培养48 h, 收集细胞进行各项相关检测. 用TRIzol试剂盒提取HSC-T6细胞总RNA. 取总RNA 2  $\mu g$ 根据RT试剂盒使用说明书, 逆转录为cDNA. 然后, 在Mx3000P实时荧光定量PCR仪(美国Stratagene公司)上定量检测Smad7,  $\alpha 1(I)$ 前胶原和 $\alpha 1(III)$ 前胶原mRNA水平. 各目的基因引物序列如下. Smad7: 5'-CAACTGCAGACTGTCCAGATG-3'(上游), 5'-CTGCTGCATAAACTCGTGGTC-3'(下游);  $\alpha 1(I)$ 前胶原: 5'-CCAATCTGGTTCCCTCC-3'(上游), 5'-AGGTTGAATGCACTTTTGG-3'(下游);  $\alpha 1(III)$ 前胶原: 5'-GTACAGCTGGCC TTCCTCAG-3'(上游), 5'-GGCCTTGCGTGTT

TGATATT-3'(下游); 反应体系为: ddH<sub>2</sub>O 10.125  $\mu L$ , cDNA 1  $\mu L$ ,  $2 \times$ SYBR Green QPCR master mix 12.5  $\mu L$ , ROX passive reference 0.375  $\mu L$ , Forward primer (10  $\mu mol/L$ ) 0.5  $\mu L$ , Reverse primer (10  $\mu mol/L$ ) 0.5  $\mu L$ , 总体积25  $\mu L$ . 每个样品设3个复孔, 并设置无模板对照. 各目的基因反应条件为: Smad7:  $95^\circ C$ 预变性10 min,  $95^\circ C$  2 min,  $60^\circ C$  30 s,  $72^\circ C$  1.5 min, 共40个循环;  $\alpha 1(I)$ 前胶原:  $95^\circ C$ 预变性10 min,  $94^\circ C$  30 s,  $60^\circ C$  30 s,  $72^\circ C$  30 s, 共40个循环;  $\alpha 1(III)$ 前胶原:  $95^\circ C$ 预变性10 min,  $94^\circ C$  30 s,  $55^\circ C$  45 s,  $72^\circ C$  30 s, 共40个循环. 循环结束后继续进行建立熔解曲线的反应, 最后用专用软件自动分析结果. mRNA水平用相对含量图表示. 同时采用PCR测定各目的基因mRNA水平. 除Smad7和 $\alpha 1(III)$ 前胶原为28个循环,  $\alpha 1(I)$ 前胶原扩增30个循环外, 引物和其他反应条件同上. PCR产物经12 g/L琼脂糖凝胶电泳后, 天能凝胶分析系统图像分析. 计算目的基因条带灰度值, 与内参 $\beta$ -actin条带灰度值的比值, 作为该目的基因表达的相对值.

统计学处理 数值用mean $\pm$ SD表示, 多组比较用方差分析, 两组间比较用 $t$ 检验.

## 2 结果

2.1 Smad7质粒的转染 Real time-PCR结果显示, 与正常对照组和空载质粒对照组相比, Smad7质粒组Smad7 mRNA水平显著增高( $P < 0.01$ , 图1A); RT-PCR测定Smad7质粒组、正常对照组和空载质粒对照组Smad7 mRNA表达相对含量分别为:  $1.29 \pm 0.18$ ,  $0.11 \pm 0.02$ 和 $0.13 \pm 0.02$ , 与正常对照组和空载质粒对照组相比, 差异有统计学意义( $P < 0.01$ ), 与Real time-PCR结果一致, 表明Smad7质粒在Eugene6介导下有效转染至HSC-T6细胞.

2.2  $\alpha 1(I)$ 前胶原和 $\alpha 1(III)$ 前胶原mRNA的表达 Real time-PCR检测Smad7质粒组 $\alpha 1(I)$ 前胶原mRNA水平较正常对照组和空载质粒对照组明显降低( $P < 0.01$ , 图1B), 但3组 $\alpha 1(III)$ 前胶原mRNA水平无显著差异( $P > 0.05$ , 图1C). RT-PCR测定Smad7质粒组、正常对照组和空载质粒对照组 $\alpha 1(I)$ 和 $\alpha 1(III)$ 前胶原mRNA表达相对含量与Real time-PCR结果一致[ $\alpha 1(I)$ :  $0.10 \pm 0.01$  vs  $1.18 \pm 0.15$ ,  $1.07 \pm 0.12$ , 均 $P < 0.01$ ;  $\alpha 1(III)$ :  $0.72 \pm 0.00$  vs  $0.70 \pm 0.01$ ,  $0.75 \pm 0.01$ , 均 $P > 0.05$ ].

## 3 讨论

I型胶原由两条 $\alpha 1(I)$ 前胶原和一条 $\alpha 2(I)$ 前



胶原组合而成; III型胶原由3条 $\alpha 1(III)$ 前胶原组合而成。肝纤维化时, 不仅总胶原含量显著增加, 而且各胶原成分的构成比与分布发生改变, 其中以I型胶原增加为主, 使I/III型比例增高。TGF- $\beta 1$ 能促进肝星形细胞活化, 使ECM合成增加, 降解减少, 是最主要的促肝纤维化细胞因子之一<sup>[6-8]</sup>。TGF- $\beta 1$ 通过TGF- $\beta 1$ /Smads信号转导通路发挥作用。TGF- $\beta 1$ 首先与其II型受体结合, 活化的II型受体蛋白激酶使I型受体磷酸化, 活化的I型受体蛋白激酶作用于Smad2, 3, 使其磷酸化, 随后Smad2, 3与4形成异源寡聚体复合物, 移入核内<sup>[9-13]</sup>。在核内其与目的基因启动子区的Smads反应元件结合, 启动基因转录, 包括胶原基因、Smad7基因等<sup>[14]</sup>。

活化的Smad2, 3和4形成的异源寡聚体复合物进入核内促进纤溶酶原激活物抑止因子-1(plasminogen activator inhibitor-1, PAI-1)和VII型胶原的表达, 进而使ECM合成增加而降解减少<sup>[15-16]</sup>。HSC合成量最大的I型胶原需要Smad3的作用, 在HSC内, Smad3, Sp1共同结合于 $\alpha 2(I)$ 胶原基因序列-313至-255位点, 该位点有很强的增强子活性, 结合Smad3, Sp1后胶原基因表达明显增加<sup>[17-20]</sup>。有关TGF- $\beta 1$ 对III型胶原合成影响的分子机制尚不明。

Smad7是TGF- $\beta 1$ /Smads信号转导通路中的主要抑制性调控蛋白, 通过与R-smads(Smad2, 3)竞争性结合TGF- $\beta 1$ 受体I(T $\beta$ R I), 抑制TGF- $\beta 1$ /Smads的信号转导; 另一方面Smad7还可与smurf1/2结合, 通过泛素化途径降解T $\beta$ R I, 对TGF- $\beta 1$ 细胞内信号转导进行负反馈调节<sup>[21-23]</sup>。Dooley *et al*<sup>[4]</sup>应用携带Smad7的腺病毒转染原代培养的HSC后, HSC活化被抑制,  $\alpha 1(I)$ 前胶原mRNA水平降低。对原代培养的HSC转染Smad7, 可显著抑制TGF- $\beta 1$ 诱导的 $\alpha 1(I)$ 前胶原基因表达<sup>[5]</sup>。本文采用Fugene6介导Smad7质粒转染HSC-T6细胞, 使Smad7过度表达, Real time-PCR和RT-PCR检测均表明 $\alpha 1(I)$ 前胶原mRNA水平显著下降, 提示抑制HSC  $\alpha 1(I)$ 前胶原基因转录可能是Smad7抗肝纤维化的作用机制之一。

关于Smad7对 $\alpha 1(III)$ 前胶原mRNA表达的作用, 目前尚未见报道。最近, 有人应用精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸(RGD)三肽引物与Smad7共同构建的重组质粒转染HSC, 测定细胞上清液中III型胶原蛋白含量减少。但本结果显示上调Smad7基因表达对 $\alpha 1(III)$ 前胶原mRNA水平无明显影响。推测这可能与RGD本身的作用有关。RGD三肽

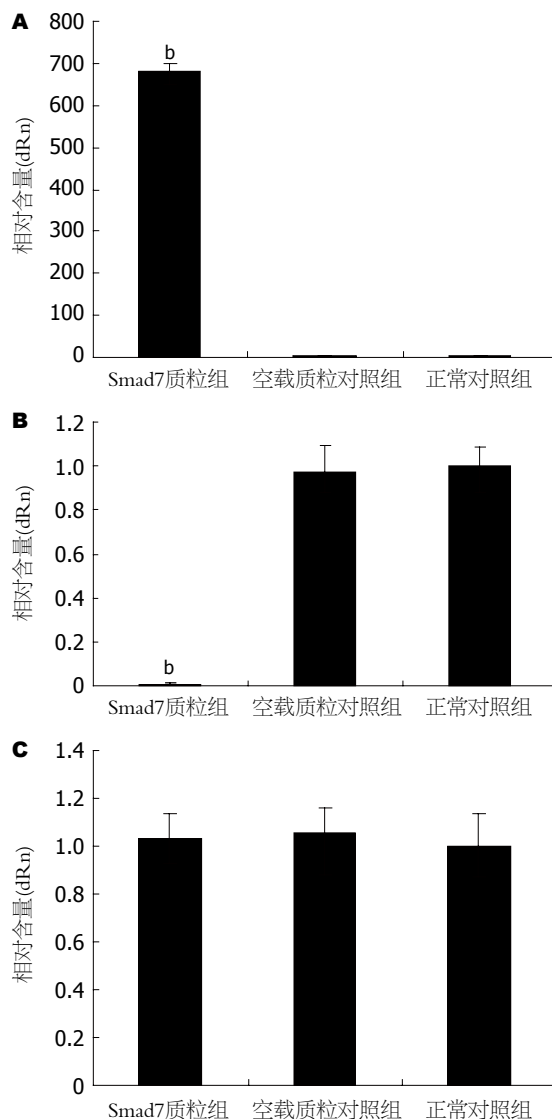


图1 Real time-PCR测定Smad7、 $\alpha 1(I)$ 和 $\alpha 1(III)$ 前胶原mRNA水平。A: Smad7; B:  $\alpha 1(I)$ ; C:  $\alpha 1(III)$ 。 <sup>b</sup> $P < 0.01$  vs 正常组。

可以促进HSC胶原酶的表达, 从而使胶原的降解增加<sup>[24]</sup>。同时, 还可拮抗TGF- $\beta 1$ 对ECM分泌的促进作用<sup>[25]</sup>。由于从基因转录到胶原合成分泌, 涉及转录后修饰、翻译、降解等多个环节, Smad7对 $\alpha 1(III)$ 型胶原生成的作用还有待进一步研究。

总之, 通过上调Smad7表达能够显著抑制HSC  $\alpha 1(I)$ 前胶原基因转录, 为今后用于肝纤维化防治提供了实验依据。

#### 4 参考文献

- 1 Ten Dijke P, Goumans MJ, Itoh F, Itoh S. Regulation of cell proliferation by Smad proteins. *J Cell Physiol* 2002; 191: 1-16
- 2 Hayashi H, Abdollah S, Qiu Y, Cai J, Xu YY, Grinnell BW, Richardson MA, Topper JN, Gimbrone MA Jr, Wrana JL, Falb D. The MAD-related protein Smad7 associates with the TGF $\beta$

#### ■ 创新盘点

虽然有研究表明Smad7抑制 $\alpha 1(I)$ 前胶原转录, 但大多采用RT-PCR方法, 定量的准确性不高。有关Smad7对 $\alpha 1(III)$ 前胶原表达的作用, 少有报道。本文应用Real time-PCR定量检测了Smad7对HSC-T6  $\alpha 1(I)$ 和 $\alpha 1(III)$ 前胶原基因表达的影响, 探讨其作用环节。

#### ■ 应用要点

本文通过Smad7质粒转染体外培养的HSC-T6细胞, 进而来研究Smad7表达的上调对HSC细胞 $\alpha 1(I)$ 前胶原以及 $\alpha 1(III)$ 前胶原的影响, 发现上调Smad7表达能够显著抑制HSC  $\alpha 1(I)$ 前胶原基因转录, 而上调Smad7基因表达对 $\alpha 1(III)$ 前胶原mRNA水平无明显影响, 为今后用于肝纤维化防治提供了实验依据。

### ■名词解释

泛素化途径:即泛素-蛋白酶体途径(ubiquitin-proteasome pathway, UPP)是细胞内降解蛋白质的重要途径,主要经细胞颗粒中的蛋白酶体降解泛素化的细胞内蛋白质,与细胞多种生理功能调节密切相关。

### ■同行评价

本文采用定量PCR的方法对于转染Smad7质粒后的肝星状细胞 $\alpha 1(I)$ 前胶原以及 $\alpha 1(III)$ 前胶原mRNA的表达进行定量的研究,有一定的新颖性,所采用的技术较得当,结果结论较可信,有一定的可读性和学术价值。

- 3 Chen Y, Bhushan A, Vale W. Smad8 mediates the signaling of the receptor serine kinase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 12938-12943
- 4 Dooley S, Hamzavi J, Breitkopf K, Wiercinska E, Said HM, Lorenzen J, Ten Dijke P, Gressner AM. Smad7 prevents activation of hepatic stellate cells and liver fibrosis in rats. *Gastroenterology* 2003; 125: 178-191
- 5 Tsukada S, Westwick JK, Ikejima K, Sato N, Rippe RA. SMAD and p38 MAPK signaling pathways independently regulate  $\alpha 1(I)$  collagen gene expression in unstimulated and transforming growth factor-beta-stimulated hepatic stellate cells. *J Biol Chem* 2005; 280: 10055-10064
- 6 Gressner AM, Weiskirchen R, Breitkopf K, Dooley S. Roles of TGF-beta in hepatic fibrosis. *Front Biosci* 2002; 7: d793-807
- 7 Zimmerman CM, Padgett RW. Transforming growth factor beta signaling mediators and modulators. *Gene* 2000; 249: 17-30
- 8 Lehmann TG, Wheeler MD, Schoonhoven R, Bunzendahl H, Samulski RJ, Thurman RG. Delivery of Cu/Zn-superoxide dismutase genes with a viral vector minimizes liver injury and improves survival after liver transplantation in the rat. *Transplantation* 2000; 69: 1051-1057
- 9 Calabrese F, Valente M, Giacometti C, Pettenazzo E, Benvegna L, Alberti A, Gatta A, Pontisso P. Parenchymal transforming growth factor beta-1: its type II receptor and Smad signaling pathway correlate with inflammation and fibrosis in chronic liver disease of viral etiology. *J Gastroenterol Hepatol* 2003; 18: 1302-1308
- 10 Dennler S, Goumans MJ, Ten Dijke P. Transforming growth factor  $\beta$  signal transduction. *J Leuk Biol* 2002; 71: 731-740
- 11 Varga J. Scleroderma and Smads: dysfunctional Smad family dynamics culminating in fibrosis. *Arthritis Rheum* 2002; 46: 1703-1713
- 12 Heldin CH, Miyazono K, ten Dijke P. TGF-beta signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. *Nature* 1997; 390: 465-471
- 13 Wrana JL, Attisano L, Wieser R, Ventura F, Massague J. Mechanism of activation of the TGF-beta receptor. *Nature* 1994; 370: 341-347
- 14 Uyama N, Shimahara Y, Okuyama H, Kawada N, Kamo S, Ikeda K, Yamaoka Y. Carbenoxolone inhibits DNA synthesis and collagen gene expression in rat hepatic stellate cells in culture. *J Hepatol* 2003; 39: 749-755
- 15 Vindevoghel L, Lechleider RJ, Kon A, de Caestecker MP, Uitto J, Roberts AB, Mauviel A. SMAD3/4-dependent transcriptional activation of the human type VII collagen gene (COL7A1) promoter by transforming growth factor beta. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95: 14769-14774
- 16 Dennler S, Itoh S, Vivien D, ten Dijke P, Huet S, Gauthier JM. Direct binding of Smad3 and Smad4 to critical TGF beta-inducible elements in the promoter of human plasminogen activator inhibitor-type 1 gene. *EMBO J* 1998; 17: 3091-3100
- 17 Poncelet AC, Schnaper HW. Sp1 and Smad proteins cooperate to mediate transforming growth factor-beta 1-induced  $\alpha 2(I)$  collagen expression in human glomerular mesangial cells. *J Biol Chem* 2001; 276: 6983-6992
- 18 Zhang W, Ou J, Inagaki Y, Greenwel P, Ramirez F. Synergistic cooperation between Sp1 and Smad3/Smad4 mediates transforming growth factor beta1 stimulation of  $\alpha 2(I)$ -collagen (COL1A2) transcription. *J Biol Chem* 2000; 275: 39237-39245
- 19 Chen SJ, Yuan W, Lo S, Trojanowska M, Varga J. Interaction of smad3 with a proximal smad-binding element of the human  $\alpha 2(I)$  procollagen gene promoter required for transcriptional activation by TGF-beta. *J Cell Physiol* 2000; 183: 381-392
- 20 Inagaki Y, Truter S, Ramirez F. Transforming growth factor-beta stimulates  $\alpha 2(I)$  collagen gene expression through a cis-acting element that contains an Sp1-binding site. *J Biol Chem* 1994; 269: 14828-14834
- 21 Kavsak P, Rasmussen RK, Causing CG, Bonni S, Zhu H, Thomsen GH, Wrana JL. Smad7 binds to Smurf2 to form an E3 ubiquitin ligase that targets the TGF beta receptor for degradation. *Mol Cell* 2000; 6: 1365-1375
- 22 Tajima Y, Goto K, Yoshida M, Shinomiya K, Sekimoto T, Yoneda Y, Miyazono K, Imamura T. Chromosomal region maintenance 1 (CRM1)-dependent nuclear export of Smad ubiquitin regulatory factor 1 (Smurf1) is essential for negative regulation of transforming growth factor-beta signaling by Smad7. *J Biol Chem* 2003; 278: 10716-10721
- 23 Ebisawa T, Fukuchi M, Murakami G, Chiba T, Tanaka K, Imamura T, Miyazono K. Smurf1 interacts with transforming growth factor-beta type I receptor through Smad7 and induces receptor degradation. *J Biol Chem* 2001; 276: 12477-12480
- 24 王连升, 陈颖伟, 张建华, 李定国, 陆汉明. RGD-M6P对原代肝星状细胞的影响. *上海第二医科大学学报* 2005; 25: 112-115
- 25 程计林, 周欣, 李定国, 魏红山, 黄新, 王志荣, 展玉涛, 张晶, 徐芹芳, 陆汉明. RGDS肽对TGF $\beta$ 刺激肝星状细胞分泌细胞外基质的影响. *临床肝胆病杂志* 2001; 17: 173-175

编辑 何燕 电编 张敏

# 珠子参对小鼠H<sub>22</sub>肝癌抑制作用及机制

陈涛, 胡卫, 崔帮平, 黎家华

陈涛, 胡卫, 三峡大学医学院中医系 湖北省宜昌市 443002  
崔帮平, 三峡大学第一临床医学院核医学科 湖北省宜昌市 443000  
黎家华, 三峡大学医学院形态学部 湖北省宜昌市 443002  
陈涛, 北京中医药大学博士, 教授, 主要从事中医药抗肿瘤研究.  
湖北省自然科学基金资助项目, No. 2006ABA200  
通讯作者: 陈涛, 443002, 湖北省宜昌市大学路8号, 三峡大学医学院中医系. chentao@ctgu.edu.cn  
电话: 0717-6397378 传真: 0717-6397328  
收稿日期: 2007-01-22 修回日期: 2007-08-23

## *Panax japonicus* var inhibition of proliferation of H<sub>22</sub> cells in mice and its mechanism of action

Tao Chen, Wei Hu, Bang-Ping Cui, Jia-Hua Li

Tao Chen, Wei Hu, Medical College of Three Gorges University, Yichang 443002, Hubei Province, China  
Bang-Ping Cui, Department of Nuclear Medicine, the First Clinical Medical College of Three Gorges University, Yichang 443000, Hubei Province, China  
Jia-Hua Li, Department of Morphology, Medical College of Three Gorges University, Yichang 443002, Hubei Province, China  
Supported by: Natural Science Foundation of Hubei Province, No. 2006ABA200  
Correspondence to: Tao Chen, Medical College of Three Gorges University, 8 University Avenue, Yichang 443002, Hubei Province, China. chentao@ctgu.edu.cn  
Received: 2007-01-22 Revised: 2007-08-23

## Abstract

**AIM:** To observe the action of *panax japonicus* var (PJ) on mouse liver cancer and its mechanism of action.

**METHODS:** Mouse models of solid tumor liver cancer were established. The rate of inhibition of solid tumors was observed. The cell cycle and apoptosis were measured by flow cytometry. The content of tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$  in serum was examined by radioimmunoassay. Optical and transmission electron microscopy were used to observe cytomorphological changes.

**RESULTS:** Low and high concentration of PJ obviously inhibited tumor growth. PJ decreased the number of cells in G<sub>0</sub>-G<sub>1</sub> ( $35.73\% \pm 5.90\%$ ,

$33.78\% \pm 6.12\%$  vs  $36.59\% \pm 2.61\%$ ) and S phase ( $42.51\% \pm 9.85\%$ ,  $50.48\% \pm 3.28\%$  vs  $52.46\% \pm 2.76\%$ ), and increased the number of cells in G<sub>2</sub>-M phase ( $21.76\% \pm 7.02\%$ ,  $15.73\% \pm 6.91\%$  vs  $10.96\% \pm 2.75\%$ , both  $P < 0.01$ ) and the number of apoptotic cells ( $26.88\% \pm 1.22\%$ ,  $27.69\% \pm 0.21\%$  vs  $9.45\% \pm 0.14\%$ , both  $P < 0.01$ ). The serum level of TNF- $\alpha$  in the two PJ groups was higher than that in the normal control group ( $12.89 \pm 1.10$  pmol/L,  $12.15 \pm 2.35$  pmol/L vs  $10.97 \pm 1.16$  pmol/L), but lower than that in the model control group ( $15.31 \pm 3.45$  pmol/L, both  $P < 0.05$ ). Transmission electron microscopy revealed that some cells in the solid tumors of the PJ group had some morphological characteristics of apoptosis.

**CONCLUSION:** PJ appears to suppress liver cancer in mice. The anticancer mechanism is probably associated with the arrest of the cell cycle at G<sub>2</sub>-M to G<sub>1</sub> phase transition, interference with DNA synthesis in the S phase, and the induction of cancer cell apoptosis. PJ also inhibits the abnormal elevation of TNF- $\alpha$  in tumor-bearing mice, and TNF- $\alpha$  is maintained at a certain level for anti-tumor effects and regulation of immunity.

**Key Words:** *Panax japonicus* var; Hepatocarcinoma 22 cell line; Tumor necrosis factor  $\alpha$ ; Cell cycle

Chen T, Hu W, Cui BP, Li JH. *Panax japonicus* var inhibition of proliferation of H<sub>22</sub> cells in mice and its mechanism of action. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2007; 15(24): 2597-2601

## 摘要

**目的:** 观察珠子参对小鼠移植性肝癌(H<sub>22</sub>)的增殖抑制作用及其作用机制。

**方法:** 建立H<sub>22</sub>小鼠肝癌实体瘤模型, 观察珠子参对荷瘤小鼠肿瘤生长的抑制作用, 放免法(RIA)检测血清中肿瘤坏死因子(TNF)- $\alpha$ 含量, 光镜(HE染色)观察肿瘤细胞生长增殖状态, 并在透射电镜下观察肿瘤细胞超微结构形态, 流式细胞仪技术(FCM)检测细胞凋亡并进行周期分析。

## ■背景资料

原发性肝癌是最常见的恶性肿瘤之一, 研制和开发治疗肝癌的高效低毒药物, 具有重要的意义。珠子参为五加科人参属植物大叶三七或羽叶三七的串珠状根茎, 具有活血散瘀、补血止血、消肿止痛之功。但珠子参在治疗肿瘤方面的报道尚属空白。

## ■相关报道

近年来,有关中药诱导肝癌细胞凋亡的研究报道逐年增多.珠子参诱导肝癌细胞凋亡可能与其细胞毒作用一起发挥抗癌效应.

**结果:**与模型对照组相比,珠子参低浓度和高浓度组和5-FU组小鼠平均肿瘤质量均显著降低( $1.66 \pm 0.96$  g,  $1.49 \pm 0.52$  g,  $1.56 \pm 0.19$  g vs  $2.70 \pm 0.90$  g, 均 $P < 0.01$ );珠子参低浓度和高浓度组小鼠胸腺平均质量和胸腺指数均高于模型对照组(胸腺平均质量:  $74.18 \pm 20.51$  mg,  $80.25 \pm 15.73$  mg vs  $61.82 \pm 12.26$  mg,  $P > 0.05$ ,  $P < 0.05$ ; 胸腺指数:  $3.17 \pm 1.28$  mg/g,  $3.36 \pm 1.17$  mg/g vs  $2.35 \pm 0.60$  mg/g);与5-FU组( $59.51 \pm 24.74$  mg,  $2.18 \pm 1.18$  mg/g)比较,珠子参高浓度组平均胸腺质量和胸腺指数均增高,且结果有显著差异(均 $P < 0.01$ );血清中TNF- $\alpha$ 浓度珠子参低浓度和高浓度组高于正常对照组( $12.89 \pm 1.10$  pmol/L,  $12.15 \pm 2.35$  pmol/L vs  $10.97 \pm 1.16$  pmol/L), 而比模型对照组低( $15.31 \pm 3.45$  pmol/L, 均 $P < 0.05$ );光镜观察到珠子参组小鼠肿瘤组织周围有大量的吞噬细胞和淋巴细胞浸润,电镜下可见珠子参组癌细胞胞质浓染,核固缩,线粒体明显减少;FCM分析显示,珠子参低浓度和高浓度组与模型组相比G<sub>0</sub>-G<sub>1</sub>期( $35.73\% \pm 5.90\%$ ,  $33.78\% \pm 6.12\%$  vs  $36.59\% \pm 2.61\%$ )和S期细胞( $42.51\% \pm 9.85\%$ ,  $50.48\% \pm 3.28\%$  vs  $52.46\% \pm 2.76\%$ )减少,而G<sub>2</sub>-M期细胞( $21.76\% \pm 7.02\%$ ,  $15.73\% \pm 6.91\%$  vs  $10.96\% \pm 2.75\%$ , 均 $P < 0.01$ )和凋亡细胞( $26.88\% \pm 1.22\%$ ,  $27.69\% \pm 0.21\%$  vs  $9.45\% \pm 0.14\%$ , 均 $P < 0.01$ )增加.

**结论:**珠子参对H<sub>22</sub>肝癌小鼠具有良好的抑瘤作用,其作用机制可能与珠子参阻止G<sub>2</sub>-M期细胞转换而影响癌细胞在细胞周期中的进程,干扰S期DNA合成以及诱导小鼠肝癌细胞凋亡有关.

**关键词:**珠子参;肝癌H<sub>22</sub>细胞株;肿瘤坏死因子 $\alpha$ ;细胞周期

陈涛, 胡卫, 崔帮平, 黎家华. 珠子参对小鼠H<sub>22</sub>肝癌抑制作用及机制. 世界华人消化杂志 2007;15(24):2597-2601  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/2597.asp>

## 0 引言

原发性肝癌(简称肝癌)是最常见的恶性肿瘤之一,开展中医药诊治肝癌的研究,研制和开发治疗肝癌的高效低毒药物,具有重要的意义<sup>[1]</sup>.珠子参[*Panax japonicus* var. *major*(Burk)C. Y. Wuetk. M. Feng]为五加科人参属植物大叶三七或羽叶三七的串珠状根茎,具有活血散瘀、补血止血、消肿止痛之功<sup>[2]</sup>.二十世纪八、九十年代以来对其有效成分和药理作用开展了研究,但珠

子参在治疗肿瘤方面的报道尚属空白.根据珠子参民间应用的经验及其成分和药理作用的分析,我们率先开展了珠子参抗肿瘤作用的实验研究,结果显示该药具有较好的抑瘤功效.在珠子参治疗肝癌的实验中,观察到珠子参对体外培养的人肝癌细胞(SMMC-7721)有良好的抑制作用<sup>[3]</sup>,并且形态学观察显示该药能明显诱导肝癌细胞凋亡.在此基础上,我们进一步研究了珠子参对肝癌H<sub>22</sub>荷瘤小鼠的抑瘤效应和诱导肝癌细胞凋亡的作用,并通过分析细胞周期来揭示其抑制肝癌细胞增殖和诱导肝癌细胞凋亡的可能机制.

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 昆明种封闭群小鼠:♂,体质量 $22 \pm 2$  g,共60只.购自湖北省实验动物中心(许可证号:SCXK(鄂)2003-0005).H<sub>22</sub>细胞株:华中科技大学同济医学院药系曾凡波老师惠赠,接种于K<sub>m</sub>小鼠腹腔内传代保存.珠子参购于宜昌市久康药房,经宜昌市药检所鉴定,产地:神农架;批号:2002-01.5-氟尿嘧啶(5-FU)(天津氨基酸公司人民制药厂):针剂,250 mg/支,灭菌生理盐水稀释至一定浓度,避光常温保存,用作阳性对照物.肿瘤坏死因子(TNF- $\alpha$ )放免分析药盒:购自北京北方生物技术研究所. Coulter DNA-Prep Reagents Kit:购自Coulter公司,批号:760204K. DFM-96型10管放射免疫 $\gamma$ 计数器;透射电子显微镜:日立H-7500;流式细胞仪(EPICS型):美国Beckman coulter公司;自动平衡离心机(LDZ5-2型):北京医用离心机厂;电子天平(MP200A型):上海良平仪器厂.

珠子参根茎烘干称质量,研磨成粗粉,装入圆底烧瓶内加10倍体积蒸馏水浸泡2 h,然后将圆底烧瓶置于电子恒温水浴锅中,恒温80℃加热8 h后,中性滤纸过滤后弃掉药渣,将所得的药液进一步浓缩至终浓度为660 g/L(即1 mL药液中含原生药0.66 g).分装于灭菌试管,4℃冰箱保存备用.5-FU:在超净工作台避光条件下,无菌生理盐水稀释5-FU针剂至2.5 g/L后分装于EP管并用锡纸遮盖保存于4℃冰箱.

**1.2 方法** 肝癌H<sub>22</sub>细胞株昆明小鼠体内连续传代3代后,抽取接种7 d左右种鼠腹水,呈乳白色,D-Hanks液洗涤离心(800 r/min $\times$ 5 min)3次,调整细胞浓度至 $1.0 \times 10^{10}$  个/L,台盼蓝拒染法检测存活率 $\geq 95\%$ ,将细胞悬液注射至健康小鼠右腋下,每只鼠0.2 mL.全程严格无菌操作,40 min



表 1 珠子参对 H<sub>22</sub>荷瘤小鼠瘤质量、胸腺质量和胸腺指数的影响(mean ± SD, n = 12)

分组	肿瘤质量(g)	抑瘤率(%)	胸腺质量(mg)	胸腺指数(10 mg/g)
模型对照	2.6989 ± 0.9041	—	61.8167 ± 12.26	23.5060 ± 6.05
5-FU	1.5617 ± 0.1917 <sup>b</sup>	42.14	59.5083 ± 24.74	21.8069 ± 11.83
PJ高浓度组	1.4872 ± 0.5191 <sup>b</sup>	44.89	80.2500 ± 15.73 <sup>ad</sup>	33.6484 ± 11.72 <sup>ad</sup>
PJ低浓度组	1.6653 ± 0.9630 <sup>b</sup>	38.28	74.1777 ± 20.51	31.7425 ± 12.82 <sup>c</sup>

<sup>a</sup>P<0.05, <sup>b</sup>P<0.01 vs 模型对照组; <sup>c</sup>P<0.05, <sup>d</sup>P<0.01 vs 5-FU组。

内完成。60只昆明小鼠分笼饲养, 自由摄食与饮水。造模后随机分组: 模型组, 模型+珠子参组(简称珠子参组), 模型+5-FU组(简称5-FU组), 珠子参组又分为高浓度和低浓度2组(PJ高浓度组和PJ低浓度组), 每组12只小鼠。造模后第2天起, PJ高浓度组每只小鼠按10 g生药/kg体质量ig给药, PJ低浓度组每只小鼠按5 g生药/kg体质量ig给药, 连续10 d; 同时给予模型对照组和5-FU组每只小鼠分别ig等体积生理盐水。5-FU组每只小鼠按25 mg/kg体质量ip给药, 隔天1次, 共5次; 同时给予模型对照组和珠子参各组每只小鼠ip等体积生理盐水。造模7 d后, 各组小鼠腋下均可触摸到瘤块, 接种成功率100%。

1.2.1 抑瘤率和胸腺指数检测 给药结束后第2天, 小鼠称重摘除眼球法取血处死, 完整剥离肿瘤组织和胸腺, 电子天平称质量, 计算抑瘤率和胸腺指数。抑瘤率 =  $(1 - \frac{\text{实验组肿瘤质量}}{\text{模型组肿瘤质量}}) \times 100\%$ , 胸腺指数 =  $\frac{\text{胸腺质量(mg)}}{\text{小鼠质量(g)}} \times 10$ 。

1.2.2 肿瘤细胞形态学改变 取各组小鼠肿瘤组织, 40 g/L甲醛固定, 常规脱水, 石蜡包埋, 切片, HE染色, 光镜下观察肿瘤生长、坏死及对周围组织的浸润等情况。取各组小鼠肿瘤组织, 按电镜标本常规处理, 透射电镜观察肿瘤细胞超微结构形态。

1.2.3 TNF-α活性检测 小鼠摘除眼球取血, 37℃孵育促凝血, 1500 r/min离心数次至血清析出, 取上清送至宜昌市中心医院放免科RIA检测。

1.2.4 细胞周期分析和细胞凋亡检测 取新鲜肿瘤组织剪碎, 用200目过滤制备单细胞悬液。离心(800 r/min × 5 min)洗涤3次后, 调整细胞浓度为1 × 10<sup>9</sup> 个/L, 4℃ 700 mL/L的乙醇固定30 min, 用含Rnase及碘化丙啶(PI)染色液染30 min后上流式细胞仪检测DNA含量的变化, 并用Multicycle软件分析细胞周期变化。

统计学处理 数据采用单因素方差分析, 应用SPSS10.0在PC上进行处理。

## ■创新盘点

本文充分挖掘民间用药经验, 率先开展了珠子参抗肿瘤的研究, 并从直接细胞毒作用、诱导肿瘤细胞分化年、诱导肿瘤细胞凋亡等几个方面研究其治疗肿瘤的机制, 有一定的创新性。

表 2 珠子参对荷瘤小鼠血清TNF-α浓度的影响(mean ± SD)

分组	n	血清TNF-α浓度(pmol/L)
模型对照	8	15.3123 ± 3.4513
正常对照	8	10.9661 ± 1.1565 <sup>a</sup>
5-FU	10	13.1310 ± 2.3333 <sup>a</sup>
PJ高浓度组	6	12.1463 ± 2.3489 <sup>a</sup>
PJ低浓度组	12	12.8931 ± 1.0960 <sup>a</sup>

<sup>a</sup>P<0.05 vs 模型对照组。

## 2 结果

2.1 抑瘤率和胸腺指数 与模型对照组相比, 珠子参各组 and 5-FU组小鼠平均肿瘤质量均显著降低(P<0.01, 表1)。PJ高浓度组小鼠胸腺平均质量和胸腺指数均高于模型对照组和5-FU组(P<0.05和P<0.01, 表1)。PJ低浓度组小鼠胸腺指数高于5-FU组(P<0.05, 表1)。

2.2 血清TNF-α浓度 与正常对照组相比, 珠子参组和5-FU组血清TNF-α水平升高, 但无统计学差异, 而模型对照组血清TNF-α水平显著高于其他各组(P<0.05, 表2)。

2.3 肿瘤细胞形态学改变 光镜HE染色可见: 模型组瘤细胞排列紊乱, 大量侵入骨骼肌, 核染色深, 异型性明显, 可见较多瘤巨细胞, 部分呈大片或带状凝固性坏死; 珠子参组肿瘤细胞排列紊乱, 核染色深, 大小不一, 可见瘤巨细胞, 坏死不如模型组严重, 肿瘤细胞周围可见大量淋巴细胞及巨噬细胞浸润; 5-FU组肿瘤组织较局限, 有纤维组织包裹, 少见瘤巨细胞。

透射电镜观察肿瘤细胞超微结构形态可见: 模型组细胞生长旺盛, 线粒体多且普遍增大; 5-FU组细胞变性坏死严重, 有大量细胞崩解、死亡。胞质中见大量肿胀线粒体, 细胞核高度异常, 可见核碎裂, 核染色质溶解, 胞质深染; 珠子参组可见: 有的瘤细胞线粒体明显减少, 线粒体



### ■同行评价

本文报道了珠子参对H<sub>22</sub>肝癌小鼠的抑瘤效应及其对肿瘤细胞周期和小鼠血清中TNF- $\alpha$ 含量的影响, 研究内容丰富, 采用的方法较得当, 结果结论较可信, 有一定的参考价值.

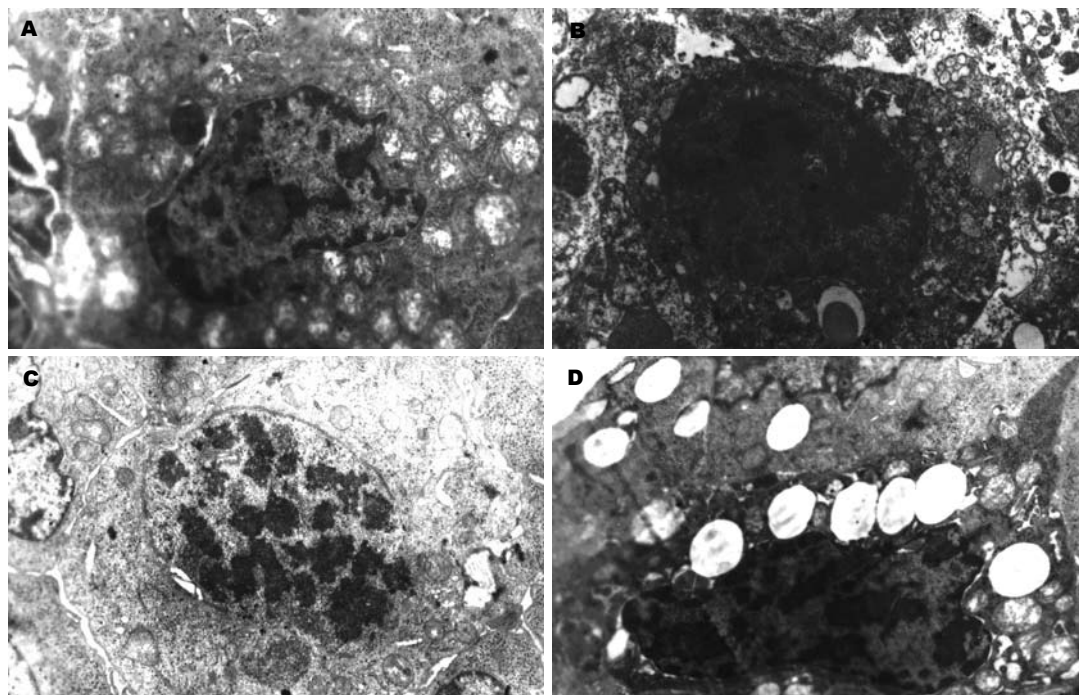


图1 透射电镜观察肿瘤细胞超微结构. A: 模型对照组( $\times 10\,000$ ); B: 5-FU组( $\times 8\,000$ ); C-D: 珠子参组( $\times 7\,000$ ).

表3 珠子参对肿瘤细胞周期和凋亡的影响

分组	<i>n</i>	G <sub>0</sub> /G <sub>1</sub>	S	G <sub>2</sub> /M	凋亡率(%)
模型对照	7	36.59 $\pm$ 2.61	52.46 $\pm$ 2.76	10.96 $\pm$ 2.75	9.45 $\pm$ 0.14
5-FU	8	36.80 $\pm$ 6.66	42.28 $\pm$ 5.74	20.92 $\pm$ 8.16 <sup>b</sup>	12.87 $\pm$ 0.11 <sup>a</sup>
PJ高浓度组	9	33.78 $\pm$ 6.12	50.48 $\pm$ 3.28	15.73 $\pm$ 6.91 <sup>b</sup>	27.69 $\pm$ 0.21 <sup>b</sup>
PJ低浓度组	9	35.73 $\pm$ 5.90	42.51 $\pm$ 9.85	21.76 $\pm$ 7.02 <sup>b</sup>	26.88 $\pm$ 1.22 <sup>b</sup>

<sup>a</sup> $P < 0.05$ , <sup>b</sup> $P < 0.01$  vs 模型对照组.

脊减少; 有的瘤细胞线粒体严重受损, 空泡化严重. 同时多处细胞有核固缩, 核边移胞质浓染或者细胞核染色质碎裂浓缩成不规则团块, 出现凋亡的形态改变(图1).

**2.4 肿瘤细胞周期及细胞凋亡发生的影响** FCM检测腹水中肝癌细胞的DNA含量, 细胞各期所占百分比如表3所示. 结果表明, 珠子参能诱导肝癌细胞凋亡, 其中珠子参高浓度组诱导的细胞凋亡率最高. 模型对照组细胞的凋亡为肿瘤细胞自发的凋亡. 从周期分析结果可以看出, 珠子参可使G<sub>2</sub>-M期细胞聚积, 阻止了M-G<sub>1</sub>期的转换, 从而干扰了小鼠肝癌H<sub>22</sub>细胞在细胞周期中的进程. 同时, 珠子参能使S期细胞减少, 可能与干扰了癌细胞DNA合成有关.

### 3 讨论

细胞凋亡是在一定的生理或病理条件下, 细胞

受到某种信号的触发后主动参与并遵循一定程序的死亡过程, 在整个过程中发生一系列特殊基因的改变及生化、形态特征的改变<sup>[4]</sup>. 肝癌细胞的凋亡在肝癌的发生发展, 转归及治疗等方面发挥着重要的作用, 近年来, 有关中药诱导肝癌细胞凋亡的研究报道逐年增多<sup>[5-10]</sup>. 珠子参诱导肝癌细胞凋亡可能与其细胞毒作用一起发挥抗癌效应. 周期分析结果表明: 珠子参可使G<sub>2</sub>-M期细胞聚积, 阻止了M-G<sub>1</sub>期的转换, 从而干扰了小鼠肝癌H<sub>22</sub>细胞在细胞周期中的进程. 同时, 珠子参能使S期细胞减少, 可能与干扰了癌细胞DNA合成有关.

TNF- $\alpha$ 具有抗肿瘤、抗病毒及免疫调节等广泛的生物学效应. 但实体瘤患者血清TNF- $\alpha$ 水平异常升高, 会严重破坏细胞因子之间正向的协调作用, 造成细胞因子网络功能紊乱, 并可引起脂肪降解、血管渗漏、内源性致热等病理损

伤. 因此, TNF- $\alpha$ 的生物学作用与其体内的水平高低密切相关. 实验结果显示: 珠子参组TNF- $\alpha$ 水平高于正常组, 但显著低于模型组, 表明珠子参具有抑制荷瘤机体TNF- $\alpha$ 水平异常升高的作用, 使其维持在一定水平而发挥抗肿瘤、调节机体免疫功能等积极作用, 至于其最佳水平范围则有待进一步探明.

本研究结果显示, 珠子参生药在5 g/kg和10 g/kg剂量下ig给药, 对小鼠移植性肝癌具有较好的抑瘤效果, 其作用机制可能与珠子参诱导肝癌细胞凋亡和影响细胞周期以及调节TNF- $\alpha$ 水平有关.

#### 4 参考文献

- 1 刘倩, 王文奇. 肝癌. 北京: 人民卫生出版社, 2000: 121,
- 2 宋立人, 洪恂, 丁续亮, 臧载阳. 现代中药学大辞典. 北京: 人民卫生出版社, 2001: 1633-1635
- 3 陈涛, 陈龙飞, 金国琴, 李丹. 珠子参体外诱导人肝癌细胞凋亡效应及机制研究. 肿瘤 2006; 26: 144
- 4 姜泊. 细胞凋亡基础与临床. 北京: 人民军医出版社, 1999: 293-293
- 5 许爱华, 贾筱琴, 陈华圣, 周振英, 朱月清. 银杏外种皮多糖抑制小鼠肝癌及诱导肝癌细胞凋亡的研究. 中药新药与临床药理 2001; 12: 340-341
- 6 徐学军, 周子成, 罗元辉, 鲁荣, 门荣甫, 房殿春.  $\beta$ -榄香烯诱导人肝癌细胞株SMMC-7721凋亡的研究. 第三军医大学学报 1999; 21: 268-271
- 7 刘琳, 秦叔逵, 陈惠英, 王锦鸿, 陈洪, 马军, 刘文虎. 三氧化二砷选择性诱导人肝癌细胞凋亡及相关基因的实验研究. 中华肝脏病杂志 2000; 8: 367-369
- 8 李锦毅, 李德新. 中药诱导肝癌小鼠细胞凋亡作用及细胞周期变化的实验研究. 中国中医基础医学杂志 2002; 8: 29-30
- 9 张天娥, 骆永珍, 闫智勇. 鹤莲克癌临对肝癌H<sub>22</sub>细胞周期及其细胞凋亡的影响. 成都中医药大学学报 1999; 22: 22-23

编辑 张焕兰 电编 何基才

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2007年版权归世界华人消化杂志

### • 消息 •

## 第四届哈尔滨全国消化内镜学术会议通知

**本刊讯** 为促进消化内镜诊治技术的发展和学术交流, 由中华消化内镜学会、黑龙江省医学会、黑龙江省医院、黑龙江省临床消化病研究所联合举办的第四届全国消化内镜学术会议定于2007-12-22/23在哈尔滨召开. 大会将邀请国内外著名专家作消化内镜进展方面专题报告及内镜演示, 并制定中华消化内镜学会消化内镜消毒指南(讨论稿). 欢迎消化届同仁积极投稿及参与, 参会代表授予国家继续教育 I 类学分.

#### 1 投稿要求

论著要求800字以内摘要(目的、方法、结果、结论), 电脑打印(WORD格式), 网上投稿. 截稿时间: 2007-10-31.

#### 2 联系方式

朱春兰, 150001, 哈尔滨和平邨宾馆(中山路171号), 哈尔滨市果戈里大街405号, 黑龙江省医院, 电话: 13845048249或0451-88025055, 传真: 0451-53625617, E-mail: zhuchulan@medmail.com.cn

# 吡咯烷二硫代氨基甲酸盐对大鼠急性坏死性胰腺炎肝损伤的保护作用

周家华, 朱海涛, 王凤臣, 杨德同

## ■背景资料

重症急性胰腺炎除了胰腺本身病变外, 心、肝、肺、脑等重要脏器功能常常发生损伤。NF- $\kappa$ B的异常活化引起炎症细胞过度活化以及炎症细胞因子失控释放, 是导致胰腺持续坏死以及胰外损伤的重要机制。

周家华, 朱海涛, 王凤臣, 杨德同, 东南大学附属中大医院胆胰外科 江苏省南京市 210009  
周家华, 副主任医师, 副教授, 主要从事肝胆胰外科的研究。  
江苏省东南大学科技基金资助项目, No. 9247341180  
通讯作者: 周家华, 210009, 江苏省南京市, 东南大学附属中大医院胆胰外科, zhoujiahua@hotmail.com  
电话: 025-83272195  
收稿日期: 2007-03-16 修回日期: 2007-08-10

## Protective effects of pyrrolidine dithiocarbamate on liver injury in rats with severe acute pancreatitis

Jia-Hua Zhou, Hai-Tao Zhu, Feng-Chen Wang, De-Tong Yang

Jia-Hua Zhou, Hai-Tao Zhu, Feng-Chen Wang, De-Tong Yang, Department of Bile-pancreatic Surgery, Zhongda Hospital of Southeast University, Nanjing 210009, Jiangsu Province, China

Supported by: Southeast University Science Foundation, No. 9247341180

Correspondence to: Jia-Hua Zhou, Department of Bile-pancreatic Surgery, Zhongda Hospital of Southeast University, Nanjing 210009, Jiangsu Province, China. zhoujiahua@hotmail.com

Received: 2007-03-16 Revised: 2007-08-10

## Abstract

**AIM:** To investigate the relationship between nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) activation and liver injury in rats with acute pancreatitis, and to assess the effectiveness of pyrrolidine dithiocarbamate (PDTC), an inhibitor of NF- $\kappa$ B, on experimental acute necrotizing pancreatitis.

**METHODS:** Sprague-Dawley rats were randomly divided into five groups: normal (Z), pancreatitis (Y), pre-intervention with intraperitoneal PDTC 1 h before modeling (A); post-intervention 1 hour after modeling (B); and PDTC 6 hours after modeling (C). Each group was randomly sub-divided into 6-, 12- and 24- hour groups, respectively. An acute pancreatitis rat model was produced by injecting taurocholate into the biliopancreatic duct. Sub-groups were sacrificed at 6, 12 or 24 hours after modeling. NF- $\kappa$ B activ-

ity in the pancreas and liver was examined by gel electrophoretic mobility shift assay. Levels of alanine aminotransferase (ALT) and amylase (AMY) were detected and pathological changes in liver and pancreas were observed.

**RESULTS:** NF- $\kappa$ B binding activity was not detected in the Z group. At 6, 12, 24 hour, NF- $\kappa$ B activities of the pancreas and liver in the Y group were significantly higher than that in the Z group ( $P < 0.001$ ). One hour before and 1 hour after PDTC, PDTC could effectively inhibit NF- $\kappa$ B activity in the pancreas and liver ( $18.14 \pm 3.30$ ,  $23.79 \pm 3.62$  vs  $24.82 \pm 4.57$ ;  $10.68 \pm 2.51$ ,  $13.83 \pm 2.70$  vs  $16.38 \pm 2.50$ ;  $P < 0.05$ ). NF- $\kappa$ B binding activity in the A group was more inhibited than that in groups Y or B. ALT and AMY were distinctly elevated in group Y. However there were no meaningful changes observed among groups A, B, C and Y. Phlogistic changes in the liver and pancreas could be observed in the Y group. After intervention with PDTC, pathological changes were significantly alleviated in group A.

**CONCLUSION:** There are clear relationships between NF- $\kappa$ B and liver injury in severe necrotizing pancreatitis. Early blockade of NF- $\kappa$ B activity may be effective for avoiding liver injury in acute necrotizing pancreatitis.

**Key Words:** Pyrrolidine dithiocarbamate; Severe acute pancreatitis; Nuclear factor-kappa B; Electrophoretic mobility shift assay

Zhou JH, Zhu HT, Wang FC, Yang DT. Protective effects of pyrrolidine dithiocarbamate on liver injury in rats with severe acute pancreatitis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007; 15(24): 2602-2606

## 摘要

**目的:** 探讨核因子 $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B)抑制剂吡咯烷二硫代氨基甲酸盐(PDTC)对大鼠急性坏死性胰腺炎(ANP)的预防治疗作用。

**方法:** 大鼠80只随机分为正常对照组(Z)、胰腺炎组(Y)和干预组。干预组又分为建模前1 h

PDTC干预组(A)、建模后1 h PDTC干预组(B)和建模后6 h干预组(C)。干预组按不同时间ip PDTC。建模后6, 12, 24 h分批处死, 临床全自动生化仪检测血清谷丙转氨酶(ALT)和淀粉酶(AMY), 用凝胶迁移率改变分析法(EMSA)测定胰腺和肝脏中NF- $\kappa$ B的活性。同时观察胰腺和肝脏的病理改变。

**结果:** 正常大鼠组织中几乎测不到NF- $\kappa$ B的活性, 与Z组比较, Y组胰腺和肝脏组织中6, 12, 24 h NF- $\kappa$ B活性分别明显增加( $P<0.001$ )。建模前1 h, 1 h后使用PDTC, 胰腺和肝脏组织中NF- $\kappa$ B活性均受到抑制( $18.14\pm3.30$ ,  $23.79\pm3.62$  vs  $24.82\pm4.57$ ;  $10.68\pm2.51$ ,  $13.83\pm2.70$  vs  $16.38\pm2.50$ ;  $P<0.05$ )。Y组血清ALT, AMY均高于对照组。病理学检查可以见到Y组和A, B, C组的胰腺和肝脏均有炎性改变, 但A组较Y组明显为轻。

**结论:** NF- $\kappa$ B的异常活化与SAP以及肝损伤有明显关系; PDTC对SAP时肝损伤的发生有一定的预防作用。

**关键词:** 吡咯烷二硫代氨基甲酸盐; 重症急性胰腺炎; 核因子 $\kappa$ B; 凝胶迁移率改变分析法

周家华, 朱海涛, 王凤臣, 杨德同. 吡咯烷二硫代氨基甲酸盐对大鼠急性坏死性胰腺炎肝损伤的保护作用. 世界华人消化杂志 2007;15(24):2602-2606

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/2602.asp>

## 0 引言

急性胰腺炎(acute pancreatitis, AP)是临床上常见的急症之一, 有相当一部分患者病情凶险, 除了胰腺本身的炎性肿胀、渗出、坏死外, 心、肝、肺、脑等重要脏器功能常常发生损伤。NF- $\kappa$ B的异常活化引起炎性细胞过度活化以及炎性细胞因子失控释放, 在急性重症胰腺炎(SAP)的病程中是关键因素, 是导致胰腺持续坏死以及胰外损伤的重要机制。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** Sprague-Dawley(SD)大鼠80只,  $\delta$ , 体重200-250 g, 由东南大学医学院实验动物中心提供。术前12 h开始禁食, 自由饮水。戊巴比妥钠50 mg/kg ip麻醉。用50 g/L牛黄胆酸钠1 mL/kg作胰管穿加压注射, 0.2 mL/min, 术毕生理盐水5 mL sc, 自由饮水。二硫代氨基甲酸吡咯烷(PDTC)干预组分别在模型建立前1 h, 模型建立后1, 6 h PDTC 100 mg/kg ip。将大鼠随机分为正

常对照组(Z组,  $n=8$ )、SAP(Y组,  $n=24$ , 于建模后6, 12, 24 h分批处死, 每次8只)和干预组( $n=48$ )。干预组再分为建模1 h前PDTC干预组(A组,  $n=16$ , 于建模后6, 12 h分批处死, 每次8只)、建模1 h后PDTC干预组(B组,  $n=16$ , 于建模后6, 12 h分批处死, 每次8只)及建模6 h后PDTC干预组(C组,  $n=16$ 于建模后12, 24 h分批处死, 每次8只)。建立ANP模型6, 12, 24 h后分别以切断右侧股动脉放血方法处死动物, 收集血清, 70℃保存, 分别摘取胰腺、肝脏, 无菌纱布拭去血液, 切一部分组织, 用液氮冷冻5 min后, -70℃保存, 以备提取组织NF- $\kappa$ B蛋白。其余组织用40 g/L甲醛固定, 以备病理学检查。

**1.2 方法**<sup>[1-2]</sup> 取动物组织100 mg, 用Dounce匀浆器匀浆, 加入缓冲液A 1 mL, 100 g/L NP-40 60  $\mu$ L后继续匀浆至液态, 以4℃, 266 g离心30 s, 上清为游离细胞和细胞核团, 将上清液冰浴30 min, 间断搅拌, 4℃, 13 054 g离心1 min, 弃上清, 沉淀为细胞核团。在细胞核团中加入缓冲液C 100  $\mu$ L, 冰浴30 min, 间断搅拌, 4℃, 13 054 g离心15 min。上清液即为核蛋白溶液, -70℃保存。并用Bradford方法检测样本的蛋白浓度。将1.75  $\mu$ mol/L NF- $\kappa$ B寡核苷酸单链(A, B链)2.0  $\mu$ L, 10  $\times$ 缓冲液1.0  $\mu$ L, 去离子无酶水3.5  $\mu$ L,  $\gamma$ -<sup>32</sup>P ATP 5000 Ci/mmol 2.5  $\mu$ L, T4多核酶1.0  $\mu$ L分别加入A管和B管37℃孵育20 min, 而后加入0.5 mmol/L EDTA 1  $\mu$ L终止反应, 再将A, B管混合, 37℃孵育60 min。加入TE缓冲液78  $\mu$ L, -40℃保存。核蛋白15.0  $\mu$ g, 5 $\times$ 结合缓冲液3.0  $\mu$ L, <sup>32</sup>P-标记的NF- $\kappa$ B DNA 1.0  $\mu$ g, 加入缓冲液, 反应总体积15.0  $\mu$ L。37℃孵育30 min, 加入loading Buffer 2  $\mu$ L, 在50 g/L非变性聚丙烯酰胺凝胶(Acr/Bis 30/0.8), 在缓冲液为1 $\times$ TBE, pH8.0, 50 V电压条件下预电泳30 min; 在缓冲液为1 $\times$ TBE, pH8.0, 恒压110.0 V, 恒温4℃下电泳。Storm仪同位素扫描磷屏成像, 采用计算机凝胶图像分析测定图像中结合条带的灰度值, 用灰度值表示NF- $\kappa$ B的活性。

**统计学处理** 数据以均值 $\pm$ 标准差(mean $\pm$ SD)表示, 两组间比较采用 $t$ 检验, 成组设计的多个样本均数比较采用单因素方差分析, 处理采用Prism3.0软件进行,  $P<0.05$ 认为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 病理组织学结果** 所有大鼠均成功建立了急

### ■研究前沿

SAP时NF- $\kappa$ B的过度活化可以促进单核/巨噬细胞释放大量炎症因子诱发SIRS及MODS, 特别是肝、肺损伤; PDTC对NF- $\kappa$ B的活化有明显的抑制作用从而有效控制细胞因子的表达水平, 将处于高平衡状态的细胞因子降低到较低水平的平衡状态, 减少胰外脏器的损伤特别是肝损伤, 但需解决PDTC的临床应用。



## ■相关报道

国外研究提示失控释放的炎性介质除直接导致胰腺损伤外,还通过循环而播散到远处脏器,以内分泌的方式作用于全身,最终引起胰外脏器的损伤,特别是肝、肺损伤。

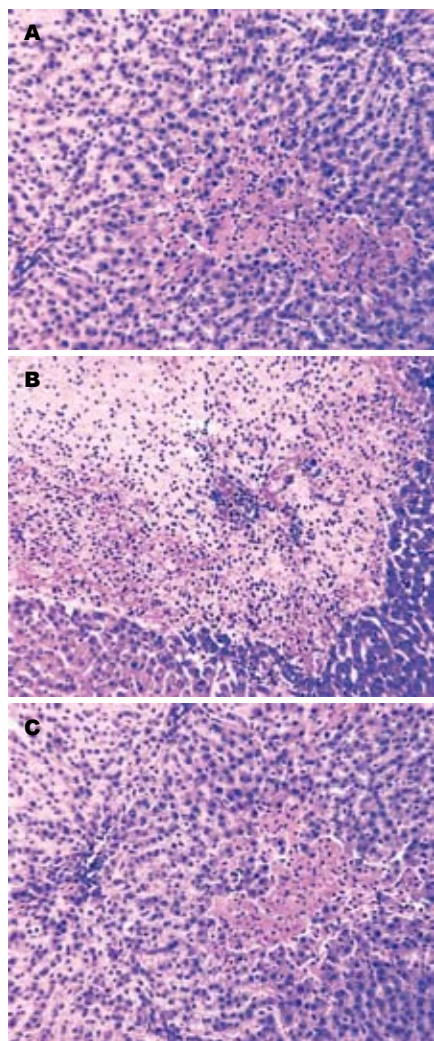


图1 大鼠肝脏病理变化(H&E × 200). A: Y 6 h; B: Y 24 h; C: A 6 h.

性胰腺炎模型. 剖腹后发现腹腔内均有不等量血性腹水, 脏层腹膜明显充血, 胰腺有散在的出血点、皂化斑, 局部呈现暗紫红色. 镜下Y 6 h组胰腺病理可见胰腺组织明显水肿, 大量腺细胞坏死, 伴中性粒细胞浸润, Y 24 h组更为明显, 腺体广泛坏死; 使用PDTC干预后的A 6 h组胰腺坏死与Y 6 h比较有所减轻. 肝脏在肉眼没有明显改变. 镜下Y 6 h肝脏组织可见小片坏死, 伴粒细胞浸润, Y 24 h组坏死区域明显扩大, 中性细胞浸润显著, PDTC干预的A 6组肝脏坏死病变区较Y 6 h有所减轻, 建模后6 h使用PDTC不能显著减轻SAP的病理损伤(图1).

**2.2 血清酶的变化** SAP大鼠发病后血清AMY明显升高, SAP大鼠发病6 h后血清AMY浓度较正常组明显上升( $P<0.05$ ), 6 h后Y各组间AMY值没有统计学差异( $P>0.05$ ). Y组各个时间点与Z组比较AMY值的差异均有统计学意义( $P<0.05$ ). A, B,

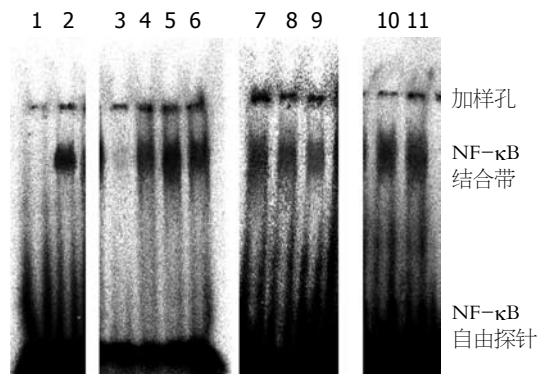


图2 大鼠胰腺NF-κB的EMSA电泳图. 1: 空白阴性对照组; 2: NF-κB标准品与探针; 3: 正常; 4-6: SAP 6, 12, 24 h; 7-9: Y 6 h, B 6 h, A 6 h; 10-11: Y 12 h, C 12 h.

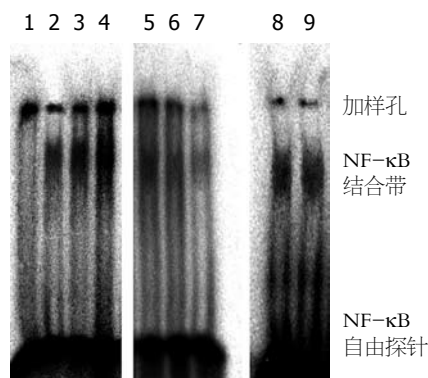


图3 大鼠肝脏NF-κB的EMSA电泳图. 1: 正常; 2-4: SAP 6, 12, 24 h; 5-7: Y 6 h, B 6 h, A 6 h; 8-9: Y 12 h, C 12 h.

Y×3组间AMY比较差异没有统计学意义. AMY值SAP在发病6 h后随着急性胰腺炎病程的进展没有表现进一步的升高. SAP发病后ALT, AST, LDH明显升高, 但Y各组间没有差异, 治疗组与非治疗组之间没有差异(表1).

**2.3 NF-κB活性及PDTC的作用** SAP时各时间点以及PDTC干预组的胰腺和肝组织中NF-κB都出现了不同程度的活化, 而正常胰腺组织经EMSA测定后没有出现明显的NF-κB结合条带(图2-3, 表2).

### 3 讨论

肝损伤是SAP严重并发症, 病情凶险. 研究表明, 在SAP时炎性介质失控释放, 是SAP出现全身性炎性病变的基础, 也是最主要的发生机制. 失控释放的炎性介质除直接导致胰腺损伤外, 还通过循环而播散到远处脏器, 以内分泌的方式作用于全身, 最终引起胰外脏器的损伤<sup>[3-4]</sup>, 特别是肝、肺损伤<sup>[5-8]</sup>. 而诸多炎症因子在基因水平上受到NF-κB的调节. NF-κB的过度活化可以促使



表 1 SAP大鼠血清淀粉酶, ALT, AST及LDH的活性U/L(mean  $\pm$  SD,  $n = 8$ )

分组			6 h	12 h	24 h
AMY	正常对照	Z	1269 $\pm$ 311	—	—
	重症胰腺炎 <sup>a</sup>	Y	3373 $\pm$ 1150	3930 $\pm$ 1809	5954 $\pm$ 5003
	1 h前PDTC	A	3293 $\pm$ 882.4	2587 $\pm$ 905	—
	1 h后PDTC	B	4478 $\pm$ 2879	3275 $\pm$ 1224	—
	6 h后PDTC	C	—	3201 $\pm$ 1869	4804 $\pm$ 2170
ALT	正常对照	Z	58.8 $\pm$ 5.9	—	—
	重症胰腺炎 <sup>a</sup>	Y	92.0 $\pm$ 16.6	83.8 $\pm$ 37.3	76.6 $\pm$ 29.1
	1 h前PDTC	A	89.9 $\pm$ 25.6	82.3 $\pm$ 30.3	—
	1 h后PDTC	B	123.1 $\pm$ 115.5	96.4 $\pm$ 69.6	—
	6 h后PDTC	C	—	111.8 $\pm$ 71.7	184.3 $\pm$ 130.1
AST	正常对照	Z	208.0 $\pm$ 29.04	—	—
	重症胰腺炎 <sup>a</sup>	Y	491.1 $\pm$ 138.7	347.5 $\pm$ 122.0	297.0 $\pm$ 80.39
	1 h前PDTC	A	338.0 $\pm$ 97.54	317.8 $\pm$ 71.08	—
	1 h后PDTC	B	399.0 $\pm$ 206.0	431.0 $\pm$ 454.4	—
	6 h后PDTC	C	—	548.0 $\pm$ 438.6	693.1 $\pm$ 356.6
LDH	正常对照	Z	2419 $\pm$ 480.1	—	—
	重症胰腺炎 <sup>a</sup>	Y	2385 $\pm$ 1247	1870 $\pm$ 522.5	1515 $\pm$ 808.3
	1 h前PDTC	A	2852 $\pm$ 1026	1671 $\pm$ 850.4	—
	1 h后PDTC	B	3003 $\pm$ 932.8	2060 $\pm$ 837.9	—
	6 h后PDTC	C	—	2399 $\pm$ 770.8	2564 $\pm$ 2089

<sup>a</sup> $P < 0.05$  vs Z组.表 2 胰腺和肝组织中NF- $\kappa$ B活性(积分灰度值  $\times 10^4$ , mean  $\pm$  SD,  $n = 8$ )

分组			6 h	12 h	24 h
胰腺	对照组	Z	0.31 $\pm$ 0.08	—	—
	重症胰腺炎 <sup>b</sup>	Y	24.82 $\pm$ 4.57	27.76 $\pm$ 4.13 <sup>c</sup>	26.76 $\pm$ 3.63 <sup>d</sup>
	1 h前PDTC	A	18.14 $\pm$ 3.30 <sup>d</sup>	—	—
	1 h后PDTC	B	23.79 $\pm$ 3.62 <sup>e</sup>	—	—
	6 h后PDTC	C	—	29.72 $\pm$ 3.21	—
肝	对照组	Z	0.45 $\pm$ 0.13	—	—
	重症胰腺炎 <sup>b</sup>	Y	16.38 $\pm$ 2.50	20.64 $\pm$ 4.20 <sup>c</sup>	23.90 $\pm$ 4.75 <sup>d</sup>
	1 h前PDTC	A	10.68 $\pm$ 2.51 <sup>d</sup>	—	—
	1 h后PDTC	B	13.83 $\pm$ 2.70 <sup>e</sup>	—	—
	6 h后PDTC	C	—	24.77 $\pm$ 5.07	—

<sup>b</sup> $P < 0.01$  vs Z组; <sup>c</sup> $P < 0.05$ , <sup>d</sup> $P < 0.01$  vs Y 6 h; <sup>e</sup> $P < 0.05$  vs A 6 h.

单核/巨噬细胞释放大量炎症因子而导致组织的炎性损伤, 最终诱发全身炎症反应综合征(SIRS)及多器官功能障碍综合征(MODS)<sup>[9-10]</sup>. SAP时, 胰腺及胰外组织中NF- $\kappa$ B出现了显著活化, 他不仅影响SAP的进程, 而且也参与了SIRS, 多器官功能衰竭(MOF)的发生与发展. 我们发现正常大鼠的肝脏和胰腺组织中几乎测不到NF- $\kappa$ B活性. 但SAP时, 胰腺组织以及肝脏组织中NF- $\kappa$ B蛋白的活性明显升高. 且胰腺组织NF- $\kappa$ B的活性增高

迅速, 但6 h后NF- $\kappa$ B活性没有出现进一步的升高. 肝脏中NF- $\kappa$ B的活性12 h后也没有出现进一步的升高. 镜下见肝细胞肿胀变性, 间质也出现粒细胞浸润; 随SAP病程发展, NF- $\kappa$ B的活化升高, 上述病理变化出现不同程度的加重, 肝脏出现斑片状坏死. 血清ALT, AST以及LDH水平明显升高.

PDTC对NF- $\kappa$ B的活化有明显的抑制作用, 从而达到抑制炎症的作用, 这一作用还与给药

## ■创新盘点

本文研究发现PDTC可以抑制NF- $\kappa$ B的活化, 从而达到抑制炎症的作用, 另外还发现这一抑制作用与给药时间相关.

### ■同行评价

本文探讨了大鼠急性坏死性胰腺炎中NF- $\kappa$ B活性的变化以及与其抑制剂吡咯烷二硫代氨基甲酸盐(PDTC)对SAP的预防治疗作用。研究内容较丰富,结论比较可信,有一定的临床意义。

时间有一定的关系。在肝脏,建模前与建模后1 h内给药对NF- $\kappa$ B的活化都有一定的抑制作用,肝脏的损伤程度减轻,但建模前1 h注射PDTC对NF- $\kappa$ B的抑制效应高于建模后1 h注射等量的PDTC,两者之间有统计学差异。在胰腺组织,建模后1 h给药不能有效抑制NF- $\kappa$ B的活性。使用PDTC抑制NF- $\kappa$ B的活性后,细胞因子的水平发生了下降,肝脏的损伤程度减轻,但ALT, AST以及LDH水平没有明显降低,也没有出现统计学意义上的上升(虽然均值表现为一定的上升趋势),这同有些研究结果不完全吻合。可能有以下原因:实验条件的不同、模型炎症的严重程度、动物种类的差异、PDTC使用的剂量、麻醉剂的选择;NF- $\kappa$ B的活化上调“保护性抗凋亡蛋白”的表达而发挥抗凋亡作用有关;PDTC在影响NF- $\kappa$ B的同时也必影响其他信号传导途径,此外由于NF- $\kappa$ B是普遍存在的核内转录因子,在抑制其活性的同时也将影响其他生物活性物质的表达。

NF- $\kappa$ B的抑制可以有效控制细胞因子的表达水平,也有助于将处于高平衡状态的细胞因子降低到较低水平的平衡状态,减少胰外脏器的损伤特别是肝损伤。

### 4 参考文献

- 1 Andrews NC, Faller DV. A rapid micropreparation technique for extraction of DNA-binding proteins from limiting numbers of mammalian cells. *Nucleic*

- 2 *Acids Res* 1991; 19: 2499
- 3 J.萨姆布鲁克, E.F.弗里奇, T.曼尼阿蒂斯著. 余冬雁, 梨孟枫译. 分子克隆实验指南. 第2版. 北京: 科学出版社, 1992: 495-569
- 4 Telek G, Feher J, Jakab F, Claude R. Acute pancreatitis: recent advances in understanding its pathophysiology. *Orv Hetil* 2000; 141: 267-278
- 5 Yamauchi J, Shibuya K, Sunamura M, Arai K, Shimamura H, Motoi F, Takeda K, Matsuno S. Cytokine modulation in acute pancreatitis. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 2001; 8: 195-203
- 6 Zhao YF, Zhai WL, Zhang SJ, Chen XP. Protection effect of triptolide to liver injury in rats with severe acute pancreatitis. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2005; 4: 604-608
- 7 Gray KD, Simovic MO, Chapman WC, Blackwell TS, Christman JW, May AK, Parman KS, Stain SC. Endotoxin potentiates lung injury in cerulein-induced pancreatitis. *Am J Surg* 2003; 186: 526-530
- 8 Murr MM, Yang J, Fier A, Kaylor P, Mastorides S, Norman JG. Pancreatic elastase induces liver injury by activating cytokine production within Kupffer cells via nuclear factor-Kappa B. *J Gastrointest Surg* 2002; 6: 474-480
- 9 Song AM, Bhagat L, Singh VP, Van Acker GG, Steer ML, Saluja AK. Inhibition of cyclooxygenase-2 ameliorates the severity of pancreatitis and associated lung injury. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2002; 283: G1166-1174
- 10 Murr MM, Yang J, Fier A, Gallagher SF, Carter G, Gower WR Jr, Norman JG. Regulation of Kupffer cell TNF gene expression during experimental acute pancreatitis: the role of p38-MAPK, ERK1/2, SAPK/JNK, and NF-kappaB. *J Gastrointest Surg* 2003; 7: 20-25
- 11 Rakonczay Z Jr, Jarmay K, Kaszaki J, Mandi Y, Duda E, Hegyi P, Boros I, Lonovics J, Takacs T. NF-kappaB activation is detrimental in arginine-induced acute pancreatitis. *Free Radic Biol Med* 2003; 34: 696-709

编辑 程剑侠 电编 张敏

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2007年版权归世界华人消化杂志

### • 消息 •

## 关于2006年度山西省期刊质量评估结果的通报

本刊讯 为推动期刊出版事业的繁荣和发展,中共山西省委宣传部、山西省新闻出版局、山西省科学技术厅共同组织了2006年度期刊质量评估工作。此次参评的为2005年度山西省出版的196种期刊,其中,社科期刊110种、科技期刊86种。评估结果如下:一级(优秀)期刊共88种,其中社科期刊42种,科技期刊46种,包括世界胃肠病学杂志和世界华人消化杂志;二级期刊共103种,其中社科期刊64种,科技期刊39种;三级期刊共5种,其中社科期刊4种,科技期刊1种。(中共山西省委宣传部、山西省新闻出版局、山西省科学技术厅)

# 树突状细胞转染绿色荧光蛋白基因后生长特性和表型的变化

张倩倩, 李春伶, 王运平, 李锦毅

张倩倩, 李春伶, 王运平, 李锦毅, 中国人民武装警察部队总医院中心实验室 北京市 100039  
张倩倩, 辽宁医学院2005级研究生, 消化内科专业, 主要从事消化道肿瘤的研究。  
国家自然科学基金资助项目, No.30672771  
通讯作者: 李锦毅, 100039, 北京市海淀区永定路69号, 中国人民武装警察部队总医院中心实验室. lijinyi.li@vip.sina.com  
电话: 010-88276846  
收稿日期: 2007-06-08 修回日期: 2007-08-19

## Changes of dendritic cell characteristics and phenotypes after green fluorescent protein tracing

Qian-Qian Zhang, Chun-ling Li, Yun-Ping Wang, Jin-Yi Li

Qian-Qian Zhang, Chun-ling Li, Yun-Ping Wang, Jin-Yi Li, Department of Central Laboratory, the General Hospital of Chinese People's Armed Police Forces, Beijing 100039, China  
Supported by: National Natural Science Foundation of China, No.30672771  
Correspondence to: Jin-Yi Li, Department of Central Laboratory, the General Hospital of Chinese People's Armed Police Forces, 69 Yongding Road, Haidian District, Beijing 100039, China. lijinyi.li@vip.sina.com  
Received: 2007-06-08 Revised: 2007-08-19

## Abstract

**AIM:** To trace plasmid EGFP-N1 marking of dendritic cells (DCs), and to follow growth and phenotypic expression.

**METHODS:** Plasmid EGFP-N1 was transformed into competent bacteria DH5 $\alpha$ . Bacteria were then amplified and cut by enzyme BamH1, and finally a plasmid containing EGFP-N1 was successfully constructed. After finishing transfection with pure plasmid EGFP-N1 into DCs, the difference in phenotypic expression of these cells was observed by fluorescence microscopy and flow cytometry.

**RESULTS:** Pure EGFP-N1 plasmid was successfully obtained. The cultured DCs had typical morphology and green fluorescent protein was effectively expressed in DCs. The DC surface

markers such as CD80 ( $81.90 \pm 2.44$  vs  $74.52 \pm 1.40$ ), CD86 ( $81.49 \pm 3.24$  vs  $78.61 \pm 1.64$ ), and CD1a ( $37.42 \pm 3.25$  vs  $18.56 \pm 2.36$ ) in the experimental group were respectively higher than those in the control group (all  $P < 0.05$ ). However DC viability in the experimental group was lower than that in the control group ( $67.41 \pm 3.17$  vs  $95.10 \pm 2.20$ ,  $P < 0.05$ ).

**CONCLUSION:** Green fluorescent protein is an effective approach for investigating DC growth, representing a new method to study metachrosis and tumor therapy because of its tracing ability.

**Key Words:** Dendritic cell; Green fluorescent protein; Immunotherapy; Transfection; Flow cytometry

Zhang QQ, Li CL, Wang YP, Li JY. Changes of dendritic cell characteristics and phenotypes after green fluorescent protein tracing. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2007; 15(24): 2607-2612

## 摘要

**目的:** 绿色荧光蛋白(EGFP-N1)标记树突状细胞, 示踪树突状细胞的生长并研究EGFP-N1对其表型表达的影响。

**方法:** 将EGFP-N1质粒转化入感受态菌DH5 $\alpha$ 中扩增, 经BamH I酶切鉴定后大量扩增, 再提取并纯化质粒将其转染入树突状细胞, 通过荧光显微镜和示踪转染前后树突状细胞的生长及表型表达的变化。

**结果:** 采用该方法可以获得纯度高的绿色荧光蛋白质粒, 经过培养得到了形态典型的树突状细胞。质粒绿色荧光蛋白能够在人树突状细胞中长期稳定表达, 转染后细胞表面标志CD80( $81.90 \pm 2.44$  vs  $74.52 \pm 1.40$ ), CD86( $81.49 \pm 3.24$  vs  $78.61 \pm 1.64$ ), CD1a( $37.42 \pm 3.25$  vs  $18.56 \pm 2.36$ )的表达量明显高于未转染细胞(均 $P < 0.05$ )。但是转染后细胞活性低于未转染细胞活性( $67.41 \pm 3.17$  vs  $95.10 \pm 2.20$ ,  $P < 0.05$ )。

## ■背景资料

树突状细胞是目前发现的功能最强大的抗原递呈细胞, 是肿瘤免疫治疗的理想细胞之一。他能够提高机体免疫组织的抗肿瘤效应, 被称为免疫治疗的天然佐剂。但DC在体内的形成、成熟情况、诱导后能否在体内存活, 特别是在肿瘤患者体内的杀伤作用等方面还缺乏检测手段。绿色荧光蛋白在一定波长激发下, 不需外源物质的参与便可发出可见的绿色荧光, 可以直接观测外源基因在活体中的表达。为检测肿瘤细胞的生长与转移提供了1种简便可行的新方法。

## ■研究前沿

目前研究的热点和重点仍集中在多效肿瘤疫苗的研发及其在体内免疫效力的监测等方面。亟待研究的问题主要是如何使输注的效应细胞特异性地到达靶部位及如何使其穿越肿瘤细胞周围的重重屏障而保证数量、功效不衰减等问题。

**结论:** 绿色荧光蛋白能够示踪树突状细胞的生长及变化过程, 为进一步研究肿瘤复发转移及治疗提供了一种简便的新方法。

**关键词:** 树突状细胞; 绿色荧光蛋白; 免疫治疗; 转染; 流式细胞仪

张倩倩, 李春伶, 王运平, 李锦毅. 树突状细胞转染绿色荧光蛋白基因后生长特性和表型的变化. 世界华人消化杂志 2007;15(24):2607-2612

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/2607.asp>

## 0 引言

树突状细胞(dendritic cell, DC)是目前发现的功能最强大的抗原递呈细胞(antigen presenting cells, APC), 具有强大的T细胞激活能力, 能活化初始T细胞, 刺激B细胞增殖成熟, 刺激Th细胞及NK细胞活化, 并且高表达共刺激因子, 是肿瘤免疫治疗的理想细胞之一<sup>[1-2]</sup>。他能够提高机体免疫组织的抗肿瘤效应, 被称为免疫治疗的天然佐剂<sup>[3]</sup>。但DC在体内的形成、成熟情况、诱导后能否在体内存活, 特别是在肿瘤患者体内的杀伤作用等方面还缺乏检测手段, 这些问题目前尚不能解决<sup>[4]</sup>。绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)在一定波长激发下, 不需外源物质的参与便可发出可见的绿色荧光, 且对细胞无毒性, 可以直接观测外源基因在活体中的表达<sup>[5]</sup>。GFP已成为细胞生物学和分子生物学中广泛应用的报告基因。GFP转染细胞后, 可以稳定而长时间持续表达, 在荧光显微镜下发出绿色荧光, 直接示踪体内DC的转归, 为检测肿瘤细胞的生长与转移提供了一种简便可行的新方法<sup>[6]</sup>。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** RPMI 1640培养基(Gibco公司), 淋巴细胞分离液(天津Tbd公司), rhGM-CSF, rhIL-4; PE标记鼠抗人CD80、CD86、CD1a、IgG mAb (Sigma公司), EGFP-N1质粒(军事医学科学院基础研究所惠赠), 人胃癌细胞SGC7901细胞系(北京大学临床肿瘤学院基础所惠赠), 大肠杆菌DH5 $\alpha$ (本研究室保存), 质粒提取试剂盒(金螺生物公司), 转染试剂(Tiagen公司)。

### 1.2 方法

**1.2.1 EGFP-N1质粒的转化、扩增及提取** 将EGFP-N1质粒转化入感受态菌DH5 $\alpha$ 中, 培养扩增后提取质粒DNA。质粒DNA经BamH I酶切, 电泳鉴定。大量扩增后提取并纯化质粒, 微孔滤膜过滤, 用紫外分光光度计测浓度, 用于树突状

细胞的转染。

**1.2.2 抗原制备** 取对数生长期的SGC7901细胞, 调整浓度为 $5 \times 10^9$  个/L, 移入EP管中, 放入-80℃冰箱3 min, 取出放入37℃的水浴箱中3 min, 如此反复4次, 400 g离心10 min, 取上清用0.22  $\mu$ m微孔滤器过滤, 43℃保存备用。

**1.2.3 DC的诱导培养和EGFP-N1质粒转染** 无菌条件下用淋巴细胞分离液(ficoll-hypaque)密度梯度离心, 分离浓缩白细胞中的单核细胞(PBMC), 离心20 min, 取白膜层即为PBMC, 用150 mL/L胎牛血清的RPMI 1640培养基培养2 h, 除去未贴壁细胞(多数为T淋巴细胞), 将获得的DC前体细胞, 加细胞因子诱导分化, 终浓度为rhGM-CSF 100  $\mu$ g/L, rhIL-4 50  $\mu$ g/L。24 h后, 吸弃上1/3培养液, 补全培养液及细胞因子<sup>[7-8]</sup>。培养6 d后的树突状细胞分组为: 未转染组, 不做特殊处理; 抗原刺激组, 按细胞数1:1加肿瘤抗原后培养1 d; pEGFP-N1转染组, 按质粒转染说明书将EGFP-N1质粒转染细胞后培养1 d。倒置显微镜观察细胞生长状况。培养6 d的DC用HE染色观察。转染后的DC用荧光倒置显微镜观察。

**1.2.4 流式细胞仪检测DC表型** 各组DC分别用PBS洗涤后重悬, 调整细胞密度为 $1 \times 10^9$  个/L, 分别装入4个EP管中, 每管200  $\mu$ L, 然后分别加入PE标记的鼠抗人mAb CD80, CD86, CD1a及阴性对照抗体IgG, 室温孵育15 min, 再用PBS洗涤1遍后加PBS 1 mL稀释, 上机检测细胞表型表达情况。

**1.2.5 苔盼蓝计活力** 取0.2 mL细胞悬液, 加等量4 g/L苔盼蓝溶液, 充分混匀, 取上述细胞悬液10  $\mu$ L加到细胞计数板上, 用低倍镜数200个细胞, 计数蓝染的细胞。结果示正常细胞不着色, 被染成蓝色的为死细胞。细胞活力(%) = (总细胞数-着色细胞数)/总细胞数 $\times 100\%$ 。

**统计学处理** 采用SPSS11.5统计软件, 结果用mean $\pm$ SD表示。

## 2 结果

质粒用BamH I酶切电泳后在4700 bp处可见清晰的基因片断条带(图1), 证实质粒EGFP-N1的存在。

**2.1 DC的形态** 倒置显微镜下可见从浓缩白细胞中分离得到的单核细胞数量多, 呈圆形, 体积小, 悬浮生长。贴壁筛选后的DC前体细胞为圆形, 体积大, 贴壁生长。细胞因子诱导后, 细胞体积逐渐增大, 呈细胞集落样生长, 数量增多, 3 d

表 1 质粒转染、抗原刺激对树突状细胞表型和活力的影响(mean  $\pm$  SD,  $n = 30$ )

分组	CD80	CD86	CD1a	树突状细胞活力
未转染	74.52 $\pm$ 1.40	78.61 $\pm$ 1.64	18.56 $\pm$ 2.36	95.10 $\pm$ 2.20
转染	81.90 $\pm$ 2.44 <sup>ac</sup>	81.49 $\pm$ 3.24 <sup>ac</sup>	37.42 $\pm$ 3.25 <sup>ac</sup>	67.41 $\pm$ 3.17 <sup>ac</sup>
抗原刺激	82.68 $\pm$ 2.17 <sup>a</sup>	85.30 $\pm$ 2.32 <sup>a</sup>	42.90 $\pm$ 3.28 <sup>a</sup>	94.72 $\pm$ 1.87

<sup>a</sup> $P < 0.05$  vs 未转染; <sup>c</sup> $P < 0.05$  vs 抗原刺激。

后细胞表面伸出少量毛刺样突起, 此后细胞呈梭形、逗点形等不规则的形状(图2A)。到6 d时, 细胞从集落上脱落, 分布均匀地悬浮生长, 大小不等, 形态极不规则, 有的表面布满毛刺样突起, 有的突起细而长, 形似树枝状, 呈典型的DC形态(图2B)。HE染色显示DC胞质染成红色, 核呈蓝色, 刺突仍可见, 周围小体积细胞为T淋巴细胞(图2C)。转染后荧光显微镜下可见绿色的树突状细胞, 数量少, 细胞周围刺突不明显(图2D)。

2.2 DC的表型 DC表型的流式细胞仪分析结果(图3), 统计分析结果表明肿瘤抗原和EGFP能促使DC成熟, 但EGFP的免疫源性弱于肿瘤抗原(表1)。

2.3 DC的活力 见表1, 转染组细胞活力与未转染组比较有统计学意义( $P < 0.05$ ), 与抗原刺激组比较也有统计学意义( $P < 0.05$ )。

### 3 讨论

近年来, 树突状细胞的研究取得了很大的进展, 并在肿瘤临床治疗上得到了广泛的应用。成熟的树突状细胞依赖细胞表面的共刺激因子、黏附分子及MHC类分子等可以诱导特异性CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup> T淋巴细胞活化, 进而杀伤肿瘤细胞, 因此DC在肿瘤临床治疗中的地位和作用就显得非常重要<sup>[9-10]</sup>。体外诱导培养的DC能否在体内长期存活? 细胞到底发挥了多大的杀伤效应? 回输的DC在体内作用过程如何? 这些问题一直缺乏直接证据。寻找一种稳定直观而又不影响细胞功能的标记方法, 是解决这些问题的关键所在。

最近一些研究进一步表明<sup>[11-12]</sup>, 肿瘤患者的DC缺陷不仅发生在肿瘤局部, 而是发生在全身。早期肿瘤患者外周血中DC的数量比正常人减少一半以上, 晚期相差更甚。因此, 用G-CSF刺激因子刺激骨髓产生多量的DC前体细胞后再从外周血中分离诱导DC, 从而获得足量的DC<sup>[13]</sup>。目前常用的方法是用密度梯度离心法从患者外周血中分离单核细胞, 经短暂培养后选取贴壁细胞在GM-CSF和IL-4作用下培养诱导成DC, 经抗原

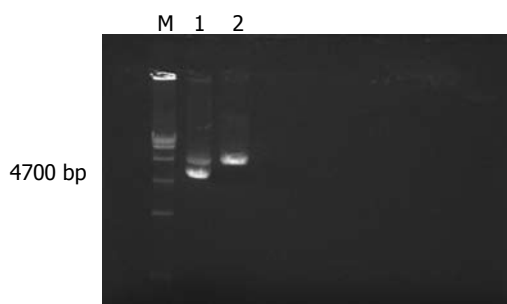


图 1 质粒EGFP-N1单酶切结果。M: Marker; 1: pEGFP-N1; 2: 未经酶切的质粒。

负载后促使DC成熟<sup>[2,14-16]</sup>。此种方法每100 mL外周血一般可得到 $2 \times 10^7$ 个DC。本实验在改良传统方法的基础上, 制备出了形态典型、高表达表面标志的DC, 达到了临床要求的数量级。

GFP来源于海洋生物水母, 在蓝光或紫光下可发出荧光, 其突变体-EGFP发射的荧光强度比GFP强六倍以上, 无细胞毒性, 可对细胞进行长效标记。作为报告基因, EGFP在研究基因表达, 细胞分化及蛋白在生物体内定位和转运方面作用显著<sup>[17-20]</sup>。本实验利用EGFP的这些特点, 将其DNA片段转化入大肠杆菌, 进行质粒扩增, 克隆出足量的目的DNA片段, 经酶切鉴定证实得到EGFP-N1质粒。由于绿色荧光蛋白的表达可直接通过荧光显微镜观测, 且其对树突状细胞表型表达和抗肿瘤功能无不良影响, 适合临床研究的展开, 用于监测细胞在体内的分布、分化情况, 分析细胞在组织中的含量及基因和蛋白的表达变化等<sup>[21]</sup>。

质粒转染的方式有病毒载体法和非病毒载体法, 虽然病毒载体的转染率高, 但考虑到病毒载体能在机体内复制且其免疫原性强等安全因素, 目前多采用脂质体等非病毒载体体外转染哺乳动物细胞。GFP质粒脂质体介导转染标记细胞的方式较病毒载体和转基因等方式更有操作方便等优点。但脂质体有一定的细胞毒性, 本试验中转染组细胞活力明显降低也证实了这点, 并且由于分化后的DC是悬浮生长细胞, 这使得

### ■ 相关报道

Dauer *et al*/2003年报道, 用与常规方法同样的细胞因子组合培养外周血CD14<sup>+</sup>细胞48 h便可成功获得成熟DC, 称fastDC, 并且此种方法所获得DC与常规培养所得的DC具有同样的形态学特点, 其表达的免疫表型分子的百分率相似。亦能诱导抗原特异性T细胞反应, 刺激IFN- $\gamma$ 产生及活化自身初始型T细胞。



# ■创新盘点

DC在体内的形成、成熟及诱导后能否在体内存活,特别是在肿瘤患者体内的杀伤作用等方面还缺乏检测手段,这些问题目前尚不能解决。绿色荧光蛋白在一定波长激发下,不需外源物质的参与便可发出可见的绿色荧光,且对细胞无毒性,可以直接观测外源基因在活体中的表达。本文将GFP转染细胞后,可以稳定而长时间的持续表达,在荧光显微镜下发出绿色荧光,直接示踪体内DC的转归,为检测肿瘤细胞的生长与转移提供了1种简便可行的新方法。

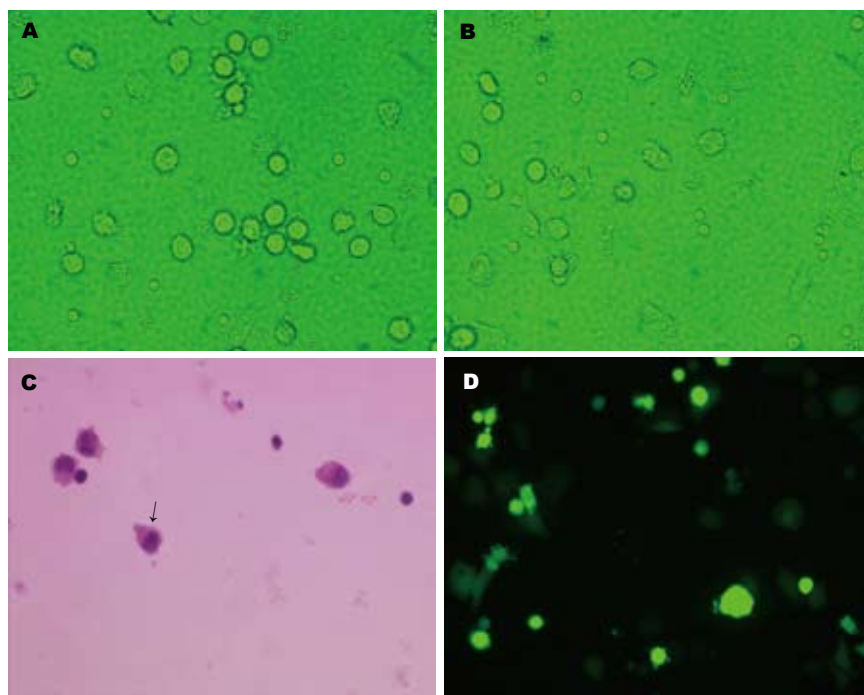


图 2 A: DC, 培养3 d; B-C: DC, 培养6 d; D: 质粒转染后的DC. A, B, D: 荧光显微镜×400; C: HE染色×400.

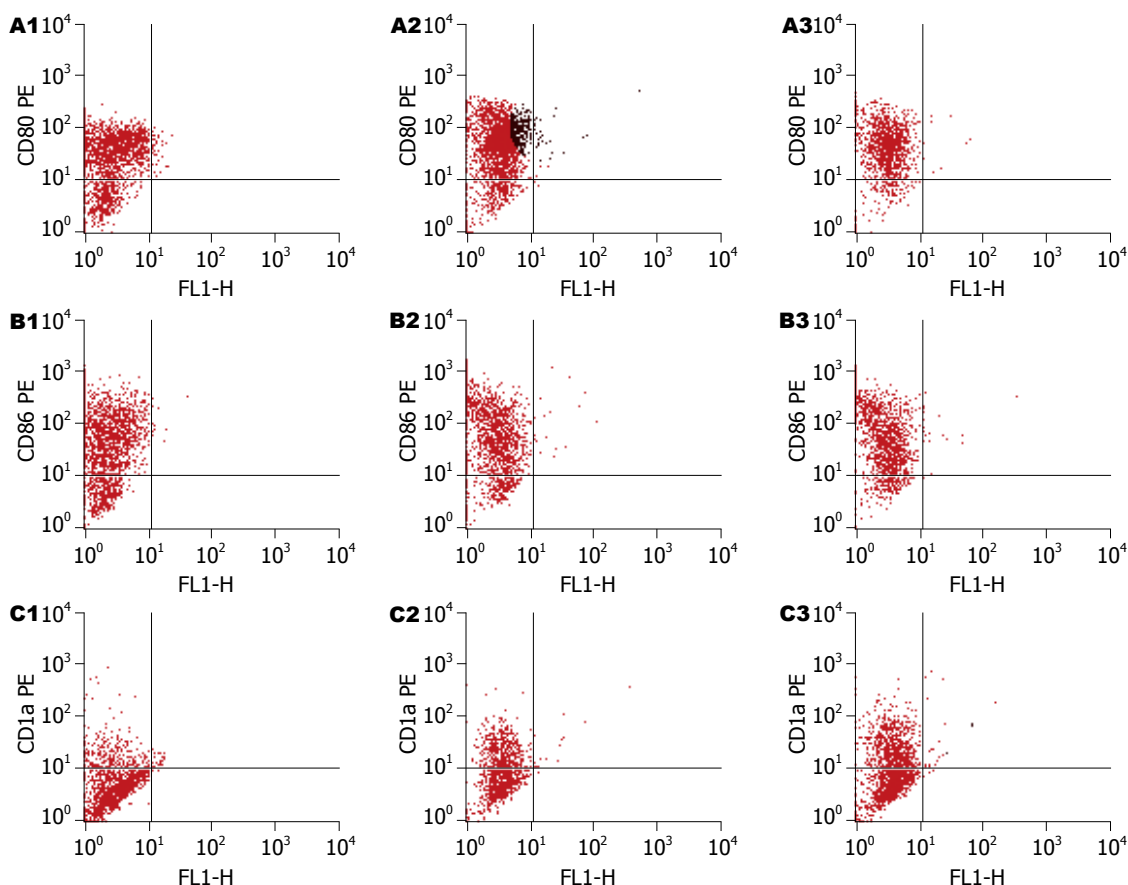


图 3 流式细胞仪检测细胞表型. A: CD80; B: CD86; C: CD1a. 1: 未转染组; 2: 转染组; 3: 抗原刺激组.

转染难度增加,转染率很难提高.因此,从DC疫苗应用方面考虑,需探索更有利的转染媒介.近来有人采用葡聚糖磁性纳米颗粒作为载体连接绿色荧光蛋白pEGFP-C1报告基因在体内转染

DC<sup>[22]</sup>,此实验证明,在细胞毒性方面葡聚糖磁性纳米颗粒较脂质体而言,有一定的优势.

机体中的DC存有3种不同的分化状态,即DC前体细胞、未成熟DC和成熟DC.成熟DC能

刺激初始T细胞成为细胞毒性T淋巴细胞, 是最有效的刺激2次T细胞反应的细胞<sup>[23]</sup>。成熟DC的特征包括MHC-II类分子表达的明显增高, 共刺激分子的高表达(如CD54、CD80、CD86、CD83等), 以及IL-12等细胞因子的分泌; 同时吞噬功能(如胞吞、胞饮、吞噬等)明显下调; DC成熟后对炎性刺激分子的反应能力减弱, 而对趋化因子的反应增强。本实验中转染后的细胞形态较未转染细胞形态无明显变化, 但在pEGFP-N1导入DC后, 其成熟标志CD80( $81.90 \pm 2.44$ ), CD86( $81.49 \pm 3.24$ )和CD1a( $37.42 \pm 3.25$ )与未转染细胞相比有明显的统计学差异, 该结果提示EGFP-N1质粒作为外源基因增强了DC的成熟度, 使其抗原呈递能力得到了促进, 具有更强的激活T淋巴细胞增殖的能力。这与Re *et al*<sup>[24]</sup>的研究中, GFP-肿瘤抗原负载和转染后的DC在加强肿瘤特异性T细胞表达方面均强于单纯抗原刺激的DC相符。由于GFP的促DC成熟能力, 使用绿色荧光蛋白标记的DC在研究抗原提呈加工的过程及DC迁移成熟发展过程的同时, 提高了DC的作用效能。GFP是1种理想的示踪标志物, 有良好的应用前景。

另外, 肿瘤抗原的选择对能否诱导肿瘤免疫反应十分重要<sup>[25-27]</sup>, 本实验的阳性对照选用了胃癌细胞SGC7901的冻融抗原, 优点在于此种抗原包含了多种表位肽基或是整个肿瘤的抗原库, 能使机体的MHC类分子从抗原的氨基酸序列中自行选择相匹配的表位肽, 从而启动针对多种肿瘤抗原的免疫反应, 是目前应用较广的方法之一。

#### 4 参考文献

- Walter T, Lee MD, Keiji Shimizu MD, Hide Kuriyama MD, Hiro Tanaka MD, Jorgen Kjaergaard PhD and Suyu Shu PhD. Tumor-dendritic cell fusion as a basis for cancer immunotherapy. *Otolaryngology-Head and Neck Surgery* 2005; 132: 755-764
- Cai YG, Fang DC, Chen L, Tang XD, Chen T, Yu ST, Luo YH, Xiong Z, Wang DX, Yang SM. Dendritic Cells Reconstituted with a Human Heparanase Gene Induce Potent Cytotoxic T-Cell Responses against Gastric Tumor Cells in vitro. *Tumour Biol* 2007; 28: 238-246
- Keto GB, West SE, Steiger S, Beck HP, Weiss N, Hynes NE. A DNA delivery system targeting dendritic cells for use in immunization against malaria: a rodent model. *Tanzan Health Res Bull* 2005; 7: 142-148
- Manickam A, Sivanandham M, Tourkova IL. Immunological role of dendritic cells in cervical cancer. *Adv Exp Med Biol* 2007; 601: 155-162
- Chen X, Wu R, Feng S, Gu B, Dai L, Zhang M, Zhao X. Single cell derived murine embryonic stem cell clones stably express Rex1-specific green fluorescent protein and their differentiation study. *Biochem Biophys Res Commun* 2007
- Zhong F, Zhong ZY, Liang S, Li XJ. Transfection of GFP mRNA in dendritic cells and analysis of some factors involved. *Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi* 2006; 22: 716-719
- Mu LJ, Kyte JA, Kvalheim G, Aamdal S, Dueland S, Hauser M, Hammerstad H, Waehre H, Raabe N, Gaudernack G. Immunotherapy with allotumour mRNA-transfected dendritic cells in androgen-resistant prostate cancer patients. *Br J Cancer* 2005; 93: 749-756
- Jarnjak-Jankovic S, Hammerstad H, Saeboe-Larssen S, Kvalheim G, Gaudernack G. A full scale comparative study of methods for generation of functional Dendritic cells for use as cancer vaccines. *BMC Cancer* 2007; 7: 119
- Donaghy H, Stebbing J, Patterson S. Antigen presentation and the role of dendritic cells in HIV. *Curr Opin Infect Dis* 2004; 17: 1-6
- Homma S, Matai K, Irie M, Ohno T, Kufe D, Toda G. Immunotherapy using fusions of autologous dendritic cells and tumor cells showed effective clinical response in a patient with advanced gastric carcinoma. *J Gastroenterol* 2003; 38: 989-994
- Yilmaz T, Gedikoglu G, Celik A, Onerci M, Turan E. Prognostic significance of Langerhans cell infiltration in cancer of the larynx. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2005; 132: 309-316
- Nakayama Y, Inoue Y, Minagawa N, Katsuki T, Nagashima N, Onitsuka K, Tsurudome Y, Sako T, Hirata K, Nagata N, Itoh H. Relationships between S-100 protein-positive cells and clinicopathological factors in patients with colorectal cancer. *Anticancer Res* 2003; 23: 4423-4426
- 史敦云, 张琼丽, 李玉珠, 李明, 许蕴. 从G-CSF动员的外周血细胞悬液培养的成纤维细胞样细胞的特性分析. *中国病理生理杂志* 2005; 21: 2264-2267
- Jiang S, Tsang J, Game DS, Stevenson S, Lombardi G, Lechler RI. Generation and expansion of human CD4+ CD25+ regulatory T cells with indirect allospecificity: Potential reagents to promote donor-specific transplantation tolerance. *Transplantation* 2006; 82: 1738-1743
- Kurlander RJ, Tawab A, Fan Y, Carter CS, Read EJ. A functional comparison of mature human dendritic cells prepared in fluorinated ethylene-propylene bags or polystyrene flasks. *Transfusion* 2006; 46: 1494-1504
- Wijewardana V, Sugiura K, Oichi T, Fujimoto M, Akazawa T, Hatoya S, Inaba M, Ikehara S, Jayaweera TS, Inaba T. Generation of canine dendritic cells from peripheral blood monocytes without using purified cytokines. *Vet Immunol Immunopathol* 2006; 114: 37-48
- Hanawa H, Hematti P, Keyvanfar K, Metzger ME, Krouse A, Donahue RE, Kepes S, Gray J, Dunbar CE, Persons DA, Nienhuis AW. Efficient gene transfer into rhesus repopulating hematopoietic stem cells using a simian immunodeficiency virus-based lentiviral vector system. *Blood* 2004; 103: 4062-4069
- Chen X, Wu R, Feng S, Gu B, Dai L, Zhang M, Zhao X. Single cell derived murine embryonic stem cell clones stably express Rex1-specific green fluorescent protein and their differentiation study.

#### ■应用要点

绿色荧光蛋白的表达可直接通过荧光显微镜观测, 且其对树突状细胞表型表达和抗肿瘤功能无不良影响, 适合临床研究的展开, 用于监测细胞在体内的分布、分化情况, 分析细胞在组织中的含量及基因和蛋白的表达变化等。

#### ■名词解释

脂质体转染法: 是Felgner *et al*于1987年首次报道的1种基因转移方法, 多用于转染真核细胞。其优点是: 转化效率较高, 细胞毒性低, 所需的细胞数少于电穿孔法; 转染细胞类型广泛, 几乎可转染已试用的所有类型细胞和细胞系; 操作十分简便易行。影响阳离子脂质体转染成功的主要因素是: 脂质体浓度、DNA浓度和脂质体复合物的孵育时间。

## ■同行评价

本文探讨了绿色荧光蛋白基因转染树突状细胞的方法和绿色荧光蛋白基因转染后染树突状细胞的生长和表型变化,设计合理,采用的方法较得当,图片较清晰,内容较丰富,得出的结论对同行有一定的参考意义。

- 19 Zhong F, Zhong ZY, Liang S, Li XJ. Transfection of GFP mRNA in dendritic cells and analysis of some factors involved. *Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi* 2006; 22: 716-719
- 20 Lin Y, Luo E, Chen X, Liu L, Qiao J, Yan Z, Li Z, Tang W, Zheng X, Tian W. Molecular and cellular characterization during chondrogenic differentiation of adipose tissue-derived stromal cells in vitro and cartilage formation in vivo. *J Cell Mol Med* 2005; 9: 929-939
- 21 Malecaze F, Couderc B, de Neuville S, Serres B, Mallet J, Douin-Echinard V, Manenti S, Revah F, Darbon JM. Adenovirus-mediated suicide gene transduction: feasibility in lens epithelium and in prevention of posterior capsule opacification in rabbits. *Hum Gene Ther* 1999; 10: 2365-2372
- 22 孙璇, 孙凯, 曹正国, 郭新, 庄乾元, 周四维. 葡聚糖磁性纳米颗粒在基因转染人树突状细胞中的研究. *中华实验外科杂志* 2005; 22: 1113-1121
- 23 Walter Lee MD, presenter, Kenji Shimizu, Hide Kuriyama MD, Hiro Tanaka MD, Jorgen Kjaergaard PhD and Suyu Shu PhD. Tumor-dendritic cell fusion as a basis for cancer immunotherapy. *Otolaryngology-Head and Neck Surgery* 2004; 131: 115-125
- 24 Re F, Srinivasan R, Igarashi T, Marincola F, Childs R. Green fluorescent protein expression in dendritic cells enhances their immunogenicity and elicits specific cytotoxic T-cell responses in humans. *Exp Hematol* 2004; 32: 210-217
- 25 Evans TG, Yamamoto Y, Jeffery WR, Krone PH. Zebrafish Hsp70 is required for embryonic lens formation. *Cell Stress Chaperones* 2005; 10: 66-78
- 26 Mazzolini G, Alfaro C, Sangro B, Feijó E, Ruiz J, Benito A, Tirapu I, Arina A, Sola J, Herraiz M, Lucena F, Olagüe C, Subtil J, Quiroga J, Herrero I, Sádaba B, Bendandi M, Qian C, Prieto J, Melero I. Intratumoral injection of dendritic cells engineered to secrete interleukin-12 by recombinant adenovirus in patients with metastatic gastrointestinal carcinomas. *J Clin Oncol* 2005; 23: 999-1010
- 27 张锦英, 束永前, 黄普文. 抗原负载树突状细胞刺激细胞因子诱导的杀伤细胞治疗晚期胃癌的临床观察. *中国生化药物杂志* 2005; 26: 336-343

编辑 何燕 电编 何基才

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2007年版权归世界华人消化杂志

## • 消息 •

## 2007 全国早期胃癌及消化病进展研讨会征文通知

本刊讯 由中华医学会消化内镜学会主办, 中华消化内镜学会胃病学组、浙江省消化内镜学会、温州医学院、上海市胃肠肿瘤重点学科承办的2007全国早期胃癌及消化病进展研讨会将于2007-11-16/18在浙江省温州市举行. 邀请国内外专家作专题讲演及内镜操作演示.

## 1 征文内容和要求

(1)有关早期胃癌及消化病进展; (2)胃癌及消化病诊疗的最新技术及研究成果. 投稿截止日期: 2007-10-10.

## 2 联系方式

贾国葆, 325000, 浙江省温州市学院西路109号, 温州医学院附属第二医院消化内科夏宣平或浙江省温州市温州医学院附属第一医院消化内科. Email: feyxh@163.com或xxpsummer@yahoo.com.cn.

# 非酒精性脂肪肝患者血清肿瘤坏死因子- $\alpha$ 、脂联素水平与胰岛素抵抗的相关性

林克荣, 杨慧莹, 张志坚, 王 雯, 乐乔良, 朱金照, 李达周, 刘建强, 柳 刚

林克荣, 张志坚, 王雯, 乐乔良, 朱金照, 李达周, 刘建强, 柳刚, 中国人民解放军南京军区福州总医院消化内科 福建省福州市 350025

杨慧莹, 中国人民解放军第180医院消化内科 福建省泉州市 362000

林克荣, 1999年第二军医大学硕士研究生, 副主任医师, 主要从事消化系统疾病的临床及消化内镜的研究。

通讯作者: 杨慧莹, 362000, 福建省泉州市花园路180号, 中国人民解放军第180医院消化内科. doctoryhy@sina.com

电话: 0595-22292209

收稿日期: 2007-05-25 修回日期: 2007-08-17

## Pilot study correlating tumor necrosis factor- $\alpha$ , adiponectin and insulin resistance in patients with non-alcoholic fatty liver

Ke-Rong Lin, Hui-Ying Yang, Zhi-Jian Zhang, Wen Wang, Qiao-Liang Le, Jin-Zhao Zhu, Da-Zhou Li, Jian-Qiang Liu, Gang Liu

Ke-Rong Lin, Zhi-Jian Zhang, Wen Wang, Qiao-Liang Le, Jin-Zhao Zhu, Da-Zhou Li, Jian-Qiang Liu, Gang Liu, Department of Gastroenterology, Fuzhou General Hospital of Nanjing Military Area Command of Chinese PLA, Fuzhou 350025, Fujian Province, China

Hui-Ying Yang, Department of Gastroenterology, 180 Hospital of Chinese PLA, Quanzhou 362000, Fujian Province, China

Correspondence to: Dr. Hui-Ying Yang, Department of Gastroenterology, 180 Hospital of Chinese PLA, 180 Huayuan Road, Quanzhou 362000, Fujian Province, China. doctoryhy@sina.com

Received: 2007-05-25 Revised: 2007-08-17

## Abstract

**AIM:** To measure serum tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$  and adiponectin (APN) levels in patients with non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD), and to explore the relationship between this and insulin resistance.

**METHODS:** Forty-two normal controls (NCs) and 120 patients with NAFLD were recruited. According to fasting plasma glucose (FPG), patients were divided into a group with NAFLD and type 2 diabetes (DFL;  $n = 32$ ) and a simple NAFLD group (FL;  $n = 88$ ). All patients with

NAFLD were divided into mild ( $n = 59$ ), moderate ( $n = 37$ ) and severe ( $n = 24$ ) categories, according to the results of B type ultrasound. Body mass index (BMI), waist-to-hip ratio (WHR), FPG, fasting insulin level in serum (FINS), serum APN and TNF- $\alpha$  were measured. Homeostasis model assessment (HOMA), insulin sensitive index (ISI) and insulin secretion (HOMA-IS) were applied to the status of insulin resistance (IR). Correlation analysis among these factors was analyzed.

**RESULTS:** Compared with the NC group, FINS and HOMA-IR levels in the DFL and FL groups were significantly increased, and ISI was significantly decreased (all  $P < 0.01$ ). Compared with the FL group, FINS and HOMA-IR levels in the DFL group were significantly increased, and ISI and HOMA-IS were significantly decreased (all  $P < 0.01$ ). The difference in HOMA-IR level was not significantly different between the mild and moderate NAFLD groups ( $P > 0.05$ ), which were both lower than the severe group (all  $P < 0.01$ ). TNF- $\alpha$  level in the DFL and FL groups was significantly higher, while serum APN was significantly lower than that in the NC group ( $P < 0.01$ ). Correlation analysis showed that APN was significantly negatively correlated with HOMA-IR and TNF- $\alpha$ , and positively correlated with ISI. TNF- $\alpha$  was significantly negatively correlated with APN and ISI, and positively correlated with FPG, FINS and IR. Multiple stepwise regression analysis showed that BMI, FPG, FINS and TNF- $\alpha$  were the main risk factors for IR. ISI and APN were the main risk factors for TNF- $\alpha$ . TNF- $\alpha$  was the main risk factor for APN.

**CONCLUSION:** Insulin resistance is uniformly present in subjects with NAFLD and is more obvious in patients with type 2 diabetes. There is a significant negative correlation between APN and TNF- $\alpha$ , and both have close correlations with IR. APN has a protective role, while TNF- $\alpha$  causes impairment, and both have important roles in the pathogenesis and progression of NAFLD.

## ■背景资料

近年来,随着人民生活水平提高和饮食结构的改变,NAFLD的发病率呈逐年上升趋势。在美国,脂肪肝已成为慢性肝脏疾病的主要原因,在普通人群患病率大约10%-40%(平均20%)。我国及亚太地区也明显升高,报道结果不一,在7%-40%左右,日趋超过病毒性肝炎和酒精性肝病。NAFLD的自然发展结局一般为良性,但也会导致肝硬化等严重后果,应该引起广大医务工作者对该病的重视并深入研究。

## ■相关报道

Maeda *et al*就TNF- $\alpha$ , APN的相互作用机制从分子生物学角度做了详细的阐释;杨辉 *et al*通过检测脂肪组织的APN基因表达论证了在NAFLD的发病过程中APN与IR的密切关系;而Hui *et al*颠覆了以往认为的TNF- $\alpha$ , APN等细胞因子与IR密切相关的理论,得出“在NASH的发生、发展过程中,低脂联素血症是不依赖于IR的独立特征”的结论。

**Key Words:** Non-alcoholic fatty liver; Tumor necrosis factor- $\alpha$ ; Adiponectin; Insulin resistance

Lin KR, Yang HY, Zhang ZJ, Wang W, Le QL, Zhu JZ, Li DZ, Liu JQ, Liu G. Pilot study correlating tumor necrosis factor- $\alpha$ , adiponectin and insulin resistance in patients with non-alcoholic fatty liver. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007; 15(24): 2613-2618

## 摘要

**目的:** 探讨非酒精性脂肪肝(NAFLD)患者肿瘤坏死因子- $\alpha$ 、脂联素水平与胰岛素抵抗等指标的相互关系。

**方法:** 120例NAFLD患者根据空腹血糖水平分为合并2型糖尿病(T2DM)者32例(DFL组), 不伴T2DM者88例(FL组), 所有NAFLD患者根据B超结果分为轻度、中度、重度3组。测定NAFLD患者及42例健康对照者的体质量指数(BMI)、腰臀比(WHR)、空腹血糖(FPG)、空腹胰岛素(FINS)、肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )、脂联素(APN)水平; 采用稳态模式计算胰岛素抵抗指数(HOMA-IR)、胰岛素敏感性指数(ISI)、反应胰岛 $\beta$ 细胞分泌功能的指标(HOMA-IS)等指标。

**结果:** NAFLD患者的FINS, HOMA-IR均显著升高, ISI显著低于NC组( $P < 0.01$ ); FPG, FINS, ISI, HOMA-IS是IR抵抗的主要相关因素; DFL组的FINS, HOMA-IR较FL组为高, ISI, HOMA-IS较FL组为低, 均有显著性差异( $P < 0.01$ ); NAFLD患者轻、中度两组间HOMA-IR无显著差异( $P > 0.05$ ), 而重度脂肪肝患者的HOMA-IR明显升高( $P < 0.01$ )。NAFLD患者血清TNF- $\alpha$ 显著升高, APN显著降低( $P < 0.01$ ); APN与TNF- $\alpha$ , IR呈显著负相关, 与ISI呈显著正相关; TNF- $\alpha$ 是影响APN水平的重要因素; TNF- $\alpha$ 与APN, ISI呈显著负相关, 与FPG, FINS, IR呈显著正相关, ISI, APN是其主要的影响因素。

**结论:** NAFLD患者普遍存在IR, 合并2型糖尿病的NAFLD患者体内胰岛素抵抗现象更为明显; TNF- $\alpha$ 与APN呈显著负相关, 且均与IR密切相关。APN作为保护性因子而TNF- $\alpha$ 作为损害性因子在NAFLD的发生、发展中起着重要作用。

**关键词:** 非酒精性脂肪肝; 肿瘤坏死因子- $\alpha$ ; 脂联素; 胰岛素抵抗

林克荣, 杨慧莹, 张志坚, 王雯, 乐乔良, 朱金照, 李达周, 刘建强,

柳刚. 非酒精性脂肪肝患者肿瘤坏死因子- $\alpha$ 、脂联素水平与胰岛素抵抗的相关性. *世界华人消化杂志* 2007; 15(24): 2613-2618  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/2613.asp>

## 0 引言

非酒精性脂肪性肝病(NAFLD)是指除外酒精和其他明确的损肝因素所致的, 以弥漫性肝细胞大泡性脂肪变为主要特征的临床病理综合征。研究表明NAFLD患者普遍存在胰岛素抵抗(IR)<sup>[1]</sup>。近年来发现脂肪组织不仅贮藏能量, 还能分泌多种影响胰岛素敏感性的细胞因子, 如肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )、脂联素(APN)等均可导致肌肉组织及全身性IR<sup>[2]</sup>。本研究旨在通过检测NAFLD患者血清APN, TNF- $\alpha$ 水平, 分析他们与IR等指标的相关性, 探讨APN, TNF- $\alpha$ 在IR和NAFLD的发生、发展中的作用, 以期临床防治脂肪肝提供有益参数。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 门诊和住院患者120例, 按照中华医学会肝脏病学分会脂肪肝和酒精性肝病学组2006-02修订的非酒精性脂肪性肝病的诊断标准<sup>[3]</sup>, 经询问病史、体格检查、相关实验室检查并由2位B超医师经B超检查确诊, 年龄在18-70岁, 根据空腹血糖水平, 分为合并T2DM者32例(DFL组), 其中男22例, 女10例, 平均年龄( $45.59 \pm 13.35$ )岁; 不伴T2DM者88例(FL组), 其中男55例, 女33例, 平均年龄( $46.19 \pm 13.70$ )岁; 正常对照组42例, 来自本院体检中心, 其中男25例, 女17例, 平均年龄( $45.02 \pm 8.88$ )岁, B超检查排除脂肪肝, 同时肝功能、血脂、肝炎标志物、体质量指数均在正常范围, 无饮酒史, 无任何肝病史。观察组与对照组平均年龄、性别构成比较, 差异无显著意义( $P > 0.05$ )。

**1.2 方法** 所有入选者在脱鞋、免冠、清晨空腹的相同条件下由专人测量身高、体质量、腰围(肋弓下缘和髂骨棘最高点连线的中点)、臀围(股骨大转子水平)。计算体质量指数:  $BMI = \text{体质量(kg)} / \text{身高}^2(\text{m}^2)$ 和腰臀比( $WHR = \text{腰围(cm)} / \text{臀围(cm)}$ )(正常男性 $< 0.9$ , 女性 $< 0.85$ ); 所有患者均在禁食8-12 h后, 于次日清晨外周静脉采集空腹血10 mL, 以1000 g离心力转10 min, 取5 mL血清即送生化检验室检测空腹血糖(FPG)、空腹胰岛素(FINS)及乙肝病毒标志物; 其余血清冻存于-20℃冰箱中, 所有血清标本收集后统一测定。APN试剂盒由上海麦莎科技生物有限公司



表 1 各组间年龄、性别、BMI、WHR比较(mean  $\pm$  SD)

分组	<i>n</i>	年龄(岁)	男女比( <i>n</i> / <i>n</i> )	BMI (kg/m <sup>2</sup> )	WHR
NC	42	45.02 $\pm$ 8.88	25/17	22.09 $\pm$ 1.07	0.83 $\pm$ 0.05
DFL	32	45.59 $\pm$ 13.35	22/10	25.63 $\pm$ 2.80 <sup>b</sup>	0.93 $\pm$ 0.05 <sup>b</sup>
FL	88	46.19 $\pm$ 13.70	55/33	25.70 $\pm$ 2.91 <sup>b</sup>	0.94 $\pm$ 0.07 <sup>b</sup>

<sup>b</sup>*P* < 0.01 vs NC.表 2 各组间空腹血糖、空腹胰岛素、胰岛素抵抗、TNF- $\alpha$ 、APN的比较(mean  $\pm$  SD)

分组	<i>n</i>	FPG (mmol/L)	FINS ( $\mu$ g/L)	HOMA-IR	ISI	HOMA-IS	APN ( $\mu$ g/L)	TNF- $\alpha$ ( $\mu$ g/L)
NC	42	5.02 $\pm$ 0.76	8.15 $\pm$ 2.09	1.78 $\pm$ 0.36	-1.60 $\pm$ 0.08	2.10 $\pm$ 0.37	15.66 $\pm$ 6.86	34.48 $\pm$ 8.71
DFL	32	8.00 $\pm$ 1.65 <sup>b</sup>	14.04 $\pm$ 4.96 <sup>b</sup>	4.94 $\pm$ 1.93 <sup>b</sup>	-2.02 $\pm$ 0.16 <sup>b</sup>	1.80 $\pm$ 0.24 <sup>b</sup>	6.20 $\pm$ 3.69 <sup>b</sup>	74.49 $\pm$ 27.57 <sup>b</sup>
FL	88	5.16 $\pm$ 0.48 <sup>d</sup>	11.02 $\pm$ 4.36 <sup>bd</sup>	2.55 $\pm$ 1.15 <sup>bd</sup>	-1.73 $\pm$ 0.16 <sup>bd</sup>	2.11 $\pm$ 0.18 <sup>d</sup>	7.21 $\pm$ 3.96 <sup>b</sup>	62.46 $\pm$ 39.64 <sup>b</sup>

ISI, HOMA-IS取自然对数值统计; <sup>b</sup>*P* < 0.01 vs NC; <sup>d</sup>*P* < 0.01 vs DFL.表 3 NAFLD患者脂肪肝严重程度与BMI, HOMA-IR, APN, TNF- $\alpha$ 的关系(mean  $\pm$  SD)

分组	<i>n</i>	BMI (kg/m <sup>2</sup> )	HOMA-IR	APN ( $\mu$ g/L)	TNF- $\alpha$ ( $\mu$ g/L)
轻度	59	25.07 $\pm$ 2.29	2.79 $\pm$ 1.77	9.29 $\pm$ 3.30	47.73 $\pm$ 30.88
中度	37	26.09 $\pm$ 3.05	2.93 $\pm$ 1.12	5.70 $\pm$ 3.26 <sup>b</sup>	75.99 $\pm$ 34.26 <sup>b</sup>
重度	24	26.56 $\pm$ 3.57 <sup>a</sup>	4.58 $\pm$ 1.83 <sup>bd</sup>	3.06 $\pm$ 1.53 <sup>bd</sup>	93.83 $\pm$ 32.41 <sup>bd</sup>

<sup>a</sup>*P* < 0.05, <sup>b</sup>*P* < 0.01 vs 轻度; <sup>d</sup>*P* < 0.01 vs 中度.

提供; TNF- $\alpha$ 试剂盒购自深圳晶美生物工程有限公司, 均采用ELISA方法测定. 采用稳态模式评估法<sup>[4]</sup>(homeostasis model assessment, HOMA)计算胰岛素抵抗指数(IR)、胰岛素敏感指数(ISI)和胰岛素分泌指数(HOMA-IS), 其中HOMA-IR = (FPG  $\times$  FINS)/22.5; ISI = 1/(FPG  $\times$  FINS); HOMA-IS = 20  $\times$  FINS/(FPG-3.5). 因为数据呈非正态分布, 统计时取其自然对数.

**统计学处理** 采用SPSS11.5统计软件, 计量资料采用(mean  $\pm$  SD)表示, 行正态性 $D$ 检验, 非正态数据进行自然对数转换, 多组数据比较采用单因素方差分析, 多组间比较采用最小显著差异法(LSD), 对双变量相关分析采用Pearson相关分析, 多因素变量采用多元逐步回归分析, *P* < 0.05为有显著性差异.

## 2 结果

**2.1 年龄、性别、BMI、WHR比较** 3组之间年龄、性别差异无显著性(*P* > 0.05); 脂肪肝患者BMI, WHR明显高于NC组, 有显著性差异(*P* < 0.01); DFL组和FL组之间BMI, WHR无显著

性差异(*P* > 0.05)(表1).

**2.2 胰岛素抵抗等指标及血清TNF- $\alpha$ 、APN水平比较** DFL组和FL组FINS, HOMA-IR显著高于NC组, DFL组ISI, HOMA-IS显著低于NC组, 有显著性差异(*P* < 0.01); DFL组FPG, FINS, HOMA-IR显著高于FL组和NC组, ISI, HOMA-IS显著低于FL组和NC组, 有显著性差异(*P* < 0.01); DFL组和FL组TNF- $\alpha$ 均显著高于NC组; APN均显著低于NC组, 有显著性差异(*P* < 0.01); 但两组间无显著性差异(*P* > 0.05)(表2).

**2.3 脂肪肝严重程度与BMI, HOMA-IR, APN, TNF- $\alpha$ 的关系** 120例NAFLD患者中, 轻度59例, 中度37例, 重度24例; 从轻度、中度到重度NAFLD, BMI, TNF- $\alpha$ 逐渐增高, APN逐渐降低, 有显著性差异(*P* < 0.01). 轻度与中度之间BMI, HOMA-IR无显著性差异(*P* > 0.05)(表3).

**2.4 APN, TNF- $\alpha$ 与其他指标的相关分析** Pearson相关分析显示: TNF- $\alpha$ 与FPG(*r* = 0.214, *P* = 0.019)、FINS(*r* = 0.441, *P* = 0.000)、IR(*r* = 0.397, *P* = 0.000)呈显著正相关, 与ISI(*r* = -0.463, *P* = 0.000)、APN(*r* = -0.399, *P* = 0.000)呈显著负

## ■创新盘点

本文就IR与TNF- $\alpha$ 、APN的相互关系及在NAFLD发病过程中的作用做了初步探讨, 国内外已有一些关于TNF- $\alpha$ 、APN的基因型及其在NAFLD, T2DM, CHD等代谢综合征的发病过程中具体分子生物学机制的报道. 本文的创新点在于: (1)是收集的病例数量较多, 涵盖不同程度的NAFLD患者; (2)是按照不同的分组标准多角度地进行分析.

## ■应用要点

本文通过分析NAFLD患者中不同组群人的血清TNF- $\alpha$ 、APN浓度与IR等指标的相关性, 得出结论, 合并2型糖尿病的NAFLD患者体内IR现象更为明显; 血清TNF- $\alpha$ 、APN浓度随着脂肪肝严重程度呈现逐渐升高与逐渐降低的梯度变化, 对指导临床有一定意义.

## ■名词解释

1 非酒精性脂肪肝病(NAFLD):是指除外酒精和其他明确的损肝因素所致的,以弥漫性肝细胞大泡性脂肪变为主要特征的临床病理综合征。

2 胰岛素抵抗(IR):是指胰岛素作用的组织、器官对一定量的胰岛素不能产生正常的生理生物学反应作用,即胰岛素敏感性降低;是众多临床慢性代谢疾病,如2型糖尿病、高血压、脂质代谢紊乱等的共同代谢缺陷;高胰岛素血症是胰岛素抵抗的重要标志。

表 4 APN和TNF- $\alpha$ 为因变量的多元逐步回归分析(stepwise法)

因变量	变量	B	SE	$\beta$	<i>t</i>	<i>P</i>
APN	常数	12.283	1.382	—	8.888	0.000
	TNF	-0.042	0.009	-0.396	-4.760	0.000
	ApoA	-2.177	1.021	-0.177	-2.133	0.035
TNF- $\alpha$	常数	-91.529	27.620	—	-3.314	0.001
	ISI	-70.023	13.292	-0.392	-5.268	0.000
	APN	-2.539	0.698	-0.267	-3.641	0.000
	TG	4.274	2.057	0.152	2.078	0.040

相关; APN与IR( $r = -0.205$ ,  $P = 0.025$ )、TNF- $\alpha$ ( $r = -0.399$ ,  $P = 0.000$ )呈显著负相关, 与ISI( $r = 0.216$ ,  $P = 0.018$ )呈显著正相关。

2.5 APN, TNF- $\alpha$ 与其他指标的多元逐步回归分析 分别以APN, TNF- $\alpha$ 为因变量, 年龄, 性别, BMI, WHR, FPG, FINS, TG, TC, HDL-C, LDL-C, ApoA, ApoB, APN, TNF- $\alpha$ 为自变量, 多元逐步回归分析显示: ApoA, TNF- $\alpha$ 为影响APN的主要因素(表4)。ISI, APN, TG为影响TNF- $\alpha$ 的主要因素(表4)。

## 3 讨论

IR是指胰岛素作用的组织、器官对一定量的胰岛素不能产生正常的生理生物学反应作用, 是众多临床慢性代谢疾病, 如2型糖尿病、高血压、脂质代谢紊乱等的共同代谢缺陷<sup>[5]</sup>; 高胰岛素血症是胰岛素抵抗的重要标志。近年来, 越来越多研究表明NAFLD与IR关系密切, NAFLD是IR在肝脏的一个表现<sup>[6]</sup>, 但两者的相关关系及何为原发因素尚存在争论<sup>[7]</sup>。本研究结果显示, 脂肪肝患者的FINS, HOMA-IR均显著高于NC组, ISI和HOMA-IS显著低于NC组; DFL组的FINS, HOMA-IR显著高于FL组, ISI, HOMA-IS显著低于FL组, 提示脂肪肝患者不仅存在明显的胰岛素高分泌状态和胰岛素抵抗, 且合并2型糖尿病的NAFLD患者体内IR现象更为明显。有资料表明NAFLD伴有T2DM患者比不伴T2DM患者具有更高的总体死亡率和肝病相关死亡率<sup>[8]</sup>。因此, 对NAFLD患者的OGTT检查对发现早期DM, IGT具有重要意义<sup>[9]</sup>。NAFLD患者轻、中度两组间HOMA-IR无显著差异, 而重度脂肪肝患者的HOMA-IR却明显升高, 说明在脂肪肝形成的初始阶段, IR可能是NAFLD形成的始动因素; 随着脂肪肝程度的加重, IR也会进一步加重, 而与脂肪肝形成互为因果的恶性循环。早期研究认为肥胖者脂肪细胞体积增大, 胰岛素受体数目下

降、密度减少、亲和力减弱, 胰岛素敏感性下降。近年来研究表明脂肪组织还是一个重要的内分泌代谢器官, 可分泌几十种生物活性因子<sup>[10]</sup>, 其中包括TNF- $\alpha$ , APN等, 他们在脂肪肝的发病中起着重要作用<sup>[11-12]</sup>。

TNF- $\alpha$ 是由单核-巨噬细胞分泌的细胞因子, 一般在机体炎症免疫反应时表达增加。近年来的研究发现TNF- $\alpha$ 参与肥胖相关的IR, 肥胖者机体过度地表达TNF- $\alpha$ , 并且与IR的程度呈正相关<sup>[13]</sup>。研究显示ob/ob鼠脂肪肝局部及血中TNF- $\alpha$ 增高, 输入TNF- $\alpha$ 抗体可改善肝脏脂肪浸润, 改善IR, 证明了TNF- $\alpha$ 对肝脏的损害作用<sup>[14]</sup>。本研究相关分析表明TNF- $\alpha$ 与FPG, FINS, IR呈显著正相关, 逐步回归分析表明ISI, APN是其主要的影响因素, 提示TNF- $\alpha$ 与胰岛素敏感性指数及APN浓度降低密切相关, 因各组患者体内均无炎症、肿瘤、应激等导致其升高的情况, 故可推测NAFLD患者血清TNF- $\alpha$ 升高可能是由脂肪组织分泌过多引起及APN因子的保护作用降低所致; DFL组和FL组TNF- $\alpha$ 水平明显高于NC组, 且TNF- $\alpha$ 水平随着脂肪肝由轻度、中度到重度程度的加重而逐渐升高, 提示TNF- $\alpha$ 在NAFLD发生、发展中起重要作用。深入研究TNF- $\alpha$ 的致病机制, 改善IR, 对预防、治疗NAFLD具有重要意义<sup>[15]</sup>。

APN是一种由脂肪细胞分泌、由APM1基因编码、具有脂肪组织特异性的血浆蛋白<sup>[16]</sup>。APN可以在血管壁受损处聚集, 并可以抑制TNF- $\alpha$ 诱导的黏附分子在血管内皮细胞的表达; APN能抑制骨髓单核细胞的增殖, 并抑制吞噬细胞活化和巨噬细胞产生TNF- $\alpha$ 等炎性因子, 从而发挥抗动脉硬化和抗炎作用<sup>[17]</sup>, 在2型糖尿病、代谢综合征等与肥胖相关的IR中起重要作用<sup>[18]</sup>。APN是目前已知的唯一1个与肥胖呈负性相关的脂肪分泌蛋白, 肥胖者脂肪组织的

APN基因表达明显降低<sup>[19]</sup>。本研究经多元逐步回归分析显示TNF- $\alpha$ 为影响APN水平的重要因素,提示体内的损害性因子的升高是导致APN水平下降并进一步引发NAFLD的重要原因,与国外报道相同<sup>[20]</sup>。APN水平与IR的关系十分密切,APN在一定程度上是一种依赖于糖浓度的胰岛素促泌剂。他通过抑制胰岛素在低糖环境下的胰岛素分泌和促进高糖时的胰岛素分泌,从而起到对胰岛 $\beta$ 细胞的保护作用<sup>[21]</sup>。相关性分析发现,APN与IR呈显著负相关,与ISI呈显著正相关,提示APN可直接或间接提高胰岛素的敏感性。低脂联素血症是NAFLD及NASH的重要特征,在胰岛 $\beta$ 细胞功能损害发展过程中起重要作用<sup>[22]</sup>。APN的降低与肥胖和IR存在密切联系,可能是导致NAFLD发生的因素之一<sup>[23]</sup>。但也有研究认为在NASH的发生、发展过程中,低脂联素血症是不依赖于IR的独立特征<sup>[24]</sup>。已有的研究表明:APN, TNF- $\alpha$ 在基因水平相互抑制彼此的表达,表现出许多相反的作用<sup>[25]</sup>。TNF- $\alpha$ 是IR的原因,而APN增加胰岛素敏感性;APN有抗动脉粥样硬化的作用<sup>[26]</sup>,而TNF- $\alpha$ 有助于动脉硬化的起始。本研究结果显示APN与TNF- $\alpha$ 显著负相关,提示APN与TNF- $\alpha$ 可能有相互抑制的作用。研究表明APN与TNF- $\alpha$ 在三维结构上具有相似性使他们能在受体结合水平上互相竞争,并且两者共享最后的信号转导通路NF- $\kappa$ B信号通路, TNF- $\alpha$ 通过抑制APN基因启动子的活性抑制脂肪细胞分泌APN<sup>[27]</sup>,且其抑制作用呈时间剂量依赖性<sup>[28]</sup>。因此APN和TNF- $\alpha$ 在胰岛素敏感性和炎症方面的作用是相互拮抗的,这两种脂质因子系统的失衡是NAFLD发病机制的一个关键因素。

总之,NAFLD普遍存在肥胖、IR、高TNF- $\alpha$ 血症及低APN血症,但TNF- $\alpha$ 的升高和APN的降低与IR究竟何为因,何为果?其发生、发展的内在具体机制是怎样的?有待于更进一步的深入研究。

#### 4 参考文献

- 1 Choudhury J, Sanyal AJ. Insulin resistance and the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease. *Clin Liver Dis* 2004; 8: 575-594, ix
- 2 Borst SE. The role of TNF-alpha in insulin resistance. *Endocrine* 2004; 23: 177-182
- 3 中华医学会肝脏病学分会脂肪肝和酒精性肝病学组. 非酒精性脂肪性肝病诊疗指南. 中华肝病杂志 2006; 14: 161-163
- 4 李光伟, 潘孝仁, Stephen Lillioja, Peter H. Bennett. 检测人群胰岛素敏感性的一项新指数. 中华内科杂志

- 1993; 32: 656-660
- 5 Qureshi K, Abrams GA. Metabolic liver disease of obesity and role of adipose tissue in the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 3540-3553
- 6 Utzschneider KM, Kahn SE. Review: The role of insulin resistance in nonalcoholic fatty liver disease. *J Clin Endocrinol Metab* 2006; 91: 4753-4761
- 7 Bugianesi E, Zannoni C, Vanni E, Marzocchi R, Marchesini G. Non-alcoholic fatty liver and insulin resistance: a cause-effect relationship? *Dig Liver Dis* 2004; 36: 165-173
- 8 Younossi ZM, Gramlich T, Matteoni CA, Boparai N, McCullough AJ. Nonalcoholic fatty liver disease in patients with type 2 diabetes. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2004; 2: 262-265
- 9 Su CC, Wang K, Hsia TL, Chen CS, Tung TH. Association of nonalcoholic fatty liver disease with abnormal aminotransferase and postprandial hyperglycemia. *J Clin Gastroenterol* 2006; 40: 551-554
- 10 Jude-Aubry CE, Somm E, Chicheportiche R, Burger D, Pernin A, Cuenod-Pittet B, Quinodoz P, Giusti V, Dayer JM, Meier CA. Regulatory effects of interleukin (IL)-1, interferon-beta, and IL-4 on the production of IL-1 receptor antagonist by human adipose tissue. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89: 2652-2658
- 11 Wong VW, Hui AY, Tsang SW, Chan JL, Tse AM, Chan KF, So WY, Cheng AY, Ng WF, Wong GL, Sung JJ, Chan HL. Metabolic and adipokine profile of Chinese patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2006; 4: 1154-1161
- 12 Marchesini G, Marzocchi R, Agostini F, Bugianesi E. Nonalcoholic fatty liver disease and the metabolic syndrome. *Curr Opin Lipidol* 2005; 16: 421-427
- 13 杨生, 岳桂英. 2型糖尿病合并脂肪肝患者血清肿瘤坏死因子- $\alpha$ 水平增高与胰岛素抵抗指数相关分析. 世界华人消化杂志 2004; 12: 1485-1487
- 14 Li Z, Yang S, Lin H, Huang J, Watkins PA, Moser AB, Desimone C, Song XY, Diehl AM. Probiotics and antibodies to TNF inhibit inflammatory activity and improve nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2003; 37: 343-350
- 15 Diehl AM. Tumor necrosis factor and its potential role in insulin resistance and nonalcoholic fatty liver disease. *Clin Liver Dis* 2004; 8: 619-638, x
- 16 Vasseur F, Helbecque N, Dina C, Lobbens S, Delannoy V, Gaget S, Boutin P, Vaxillaire M, Lepretre F, Dupont S, Hara K, Clement K, Bihain B, Kadowaki T, Froguel P. Single-nucleotide polymorphism haplotypes in the both proximal promoter and exon 3 of the APM1 gene modulate adipocyte-secreted adiponectin hormone levels and contribute to the genetic risk for type 2 diabetes in French Caucasians. *Hum Mol Genet* 2002; 11: 2607-2614
- 17 Diez JJ, Iglesias P. The role of the novel adipocyte-derived hormone adiponectin in human disease. *Eur J Endocrinol* 2003; 148: 293-300
- 18 Kadowaki T, Yamauchi T, Kubota N, Hara K, Ueki K, Tobe K. Adiponectin and adiponectin receptors in insulin resistance, diabetes, and the metabolic syndrome. *J Clin Invest* 2006; 116: 1784-1792
- 19 Baranova A, Gowder SJ, Schlauch K, Elariny H, Collantes R, Afendy A, Ong JP, Goodman Z, Chandhoke V, Younossi ZM. Gene expression of leptin, resistin, and adiponectin in the white

#### ■同行评价

本文对非酒精性脂肪肝患者血清中TNF- $\alpha$ 、脂联素与胰岛素抵抗的相关性进行了初步分析,行文流畅,设计合理,统计方法正确,对临床有一定的指导意义。

- adipose tissue of obese patients with non-alcoholic fatty liver disease and insulin resistance. *Obes Surg* 2006; 16: 1118-1125
- 20 Hector J, Schwarzloh B, Goehring J, Strate TG, Hess UF, Deuretzbacher G, Hansen-Algenstaedt N, Beil FU, Algenstaedt P. TNF-alpha alters visfatin and adiponectin levels in human fat. *Horm Metab Res* 2007; 39: 250-255
- 21 宁光, 顾卫琼, 徐敏, 杜鹏飞, 洪洁, 张翼飞, 李小英. 脂联素: 从胰岛素抵抗到胰岛 $\beta$ 细胞功能. *中华内分泌代谢杂志* 2004; 20: 4a5-4a6
- 22 Musso G, Gambino R, Biroli G, Carello M, Faga E, Pacini G, De Michieli F, Cassader M, Durazzo M, Rizzetto M, Pagano G. Hypoadiponectinemia predicts the severity of hepatic fibrosis and pancreatic Beta-cell dysfunction in nondiabetic nonobese patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Am J Gastroenterol* 2005; 100: 2438-2446
- 23 Yang H, Li YY, Nie YQ, Zhou YJ, DU YL, Sha WH, Hong Y. The relationship between insulin resistance and adiponectin gene expression in nonalcoholic fatty liver disease. *Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi* 2007; 15: 525-528
- 24 Hui JM, Hodge A, Farrell GC, Kench JG, Kriketos A, George J. Beyond insulin resistance in NASH: TNF-alpha or adiponectin? *Hepatology* 2004; 40: 46-54
- 25 Marchlewska A, Stenvinkel P, Lindholm B, Danielsson A, Pecoits-Filho R, Lonnqvist F, Schalling M, Heimburger O, Nordfors L. Reduced gene expression of adiponectin in fat tissue from patients with end-stage renal disease. *Kidney Int* 2004; 66: 46-50
- 26 Haluzik M. Adiponectin and its potential in the treatment of obesity, diabetes and insulin resistance. *Curr Opin Investig Drugs* 2005; 6: 988-993
- 27 Maeda N, Takahashi M, Funahashi T, Kihara S, Nishizawa H, Kishida K, Nagaretani H, Matsuda M, Komuro R, Ouchi N, Kuriyama H, Hotta K, Nakamura T, Shimomura I, Matsuzawa Y. PPARgamma ligands increase expression and plasma concentrations of adiponectin, an adipose-derived protein. *Diabetes* 2001; 50: 2094-2099
- 28 Fasshauer M, Kralisch S, Klier M, Lossner U, Bluher M, Klein J, Paschke R. Adiponectin gene expression and secretion is inhibited by interleukin-6 in 3T3-L1 adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 301: 1045-1050

编辑 何燕 电编 张敏

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2007年版权归世界华人消化杂志

## • 消息 •

### 欢迎订阅 2008 年《世界华人消化杂志》

**本刊讯** 《世界华人消化杂志》为中国科技核心期刊、2003年百种中国杰出学术期刊、《中文核心期刊要目总览》2004年版内科学类的核心期刊、中国科技论文统计源期刊,《世界华人消化杂志》发表的英文摘要被美国《化学文摘(Chemical Abstracts)》,荷兰《医学文摘库/医学文摘(EMBASE/Excerpta Medica)》,俄罗斯《文摘杂志(Abstracts Journals)》收录。

《世界华人消化杂志》综合介绍以下领域的内容: 消化基础研究、消化临床研究、消化内科、消化内镜、消化外科、消化肿瘤、消化介入治疗、消化护理、消化医学影像、消化病理、消化预防医学、消化误诊误治、消化中西医结合、消化检验、消化新技术应用、消化病诊断、消化病治疗、消化新药应用。

《世界华人消化杂志》2008年由北京报刊发行局发行,国际标准刊号 ISSN 1009-3079,国内统一刊号 CN 14-1260/R,邮发代号82-262,出版日期每月8, 18, 28日,月价72.00,年价864元。欢迎广大消化科医务工作者及科教人员、各大图书馆订阅。联系地址: 100023,北京市2345信箱。联系电话: 010-85381901-1020; 传真: 010-85381893; E-mail: wcjd@wjgnet.com; <http://www.wjgnet.com>。

# 肿瘤芽殖与大肠癌生物学行为及预后的关系

高照华, 王振宁, 王梅先

高照华, 王振宁, 王梅先, 中国医科大学附属第一医院肿瘤外科 辽宁省沈阳市 110001

高照华, 中国医科大学附属第一医院肿瘤学硕士, 主治医师, 主要从事肿瘤外科的研究。

教育部新世纪优秀人才支持计划, NCET-06-0296

通讯作者: 王振宁, 110001, 辽宁省沈阳市, 沈阳市和平区南京北街155号, 中国医科大学附属第一医院肿瘤外科。

josieon826@yahoo.com.cn

电话: 024-83283556

收稿日期: 2007-05-26 修回日期: 2007-08-16

## Relationship between tumor budding and prognosis and biological behavior of colorectal cancer

Zhao-Hua Gao, Zhen-Ning Wang, Mei-Xian Wang

Zhao-Hua Gao, Zhen-Ning Wang, Mei-Xian Wang, Department of Surgical Oncology, the First Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China

Supported by: Program for New Century Excellent Talents in University, NCET-06-0296

Correspondence to: Dr. Zhen-Ning Wang, Department of Surgical Oncology, the First Affiliated Hospital of China Medical University, 155 Nanjing North Street, Heping District, Shenyang 110001, Liaoning Province, China. josieon826@yahoo.com.cn

Received: 2007-05-26 Revised: 2007-08-16

## Abstract

**AIM:** To investigate the clinical value of the intensity of tumor budding, and to assess the relationship between the intensity of tumor budding and prognosis and biological behavior in colorectal carcinoma.

**METHODS:** The relationship between the intensity of tumor budding and prognosis and biological behavior was retrospectively studied in 94 patients with colorectal cancer who underwent radical excision from January 2000 to December 2001.

**RESULTS:** The intensity of tumor budding correlated with lymph node metastasis ( $P < 0.001$ ), depth of cancer invasion ( $P = 0.004$ ), and tumor differentiation ( $P = 0.03$ ). Five-year survival rates in different groups were significantly different between high- and low-grade budding (20% vs

90%), the  $T_2$  (33% vs 90%) and  $T_3$  (26% vs 90%) phases, and swelling (33% vs 88%) and ulcer (18% vs 91%) types. Further, histological grade I was 25% vs 92% for high- and low-grade budding, respectively. High- and low-grade budding were related to growth and recurrence ( $P < 0.001$ ). Multivariate Cox model analysis showed that the intensity of tumor budding was a significant independent prognostic factor.

**CONCLUSION:** The intensity of tumor budding is an objective, simple and reproducible indicator, as well as a good index for estimating prognosis and any aggressive biological behavior of colorectal cancer.

**Key Words:** Tumor budding; Diagnosis and treatment of colorectal carcinoma; Evaluation of prognosis; Pathological diagnosis

Gao ZH, Wang ZN, Wang MX. Relationship between tumor budding and prognosis and biological behavior of colorectal cancer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007; 15(24): 2619-2625

## 摘要

**目的:** 探讨肿瘤芽殖强度与大肠癌生物学行为及预后的关系及其临床应用价值。

**方法:** 回顾性调查施行根治手术并具有完整临床病理资料的大肠癌94例, 分析肿瘤芽殖强度与患者预后及反映大肠癌生物学行为的病理因素间的相关性。

**结果:** 肿瘤芽殖强度与淋巴结转移数( $P < 0.001$ )、浸润深度( $P = 0.004$ )、肿瘤分化( $P = 0.03$ )相关; 高和低芽殖组间(20% vs 90%),  $T_2$  (33% vs 90%)和 $T_3$  (26% vs 90%)期, 隆起型(33% vs 88%)和溃疡型(18% vs 91%), 组织学分级1级(即高分化腺癌)(25% vs 92%)的高、低芽殖组间5 a生存率差异具有极显著意义( $P < 0.001$ ); 高低芽殖组在肿瘤复发病例分布中有显著性差异( $P < 0.001$ )。Cox模型分析表明肿瘤芽殖强度是反映大肠癌预后的独立指标之一。

## ■背景资料

大肠癌是常见的恶性肿瘤, 发病率高, 预后差。在临床实践中我们会经常看到相同的Dukes分期, 甚至相同的T分期及N分期的患者预后却截然不同。因此, 有必要寻找一个能够代表大肠癌恶性侵袭性生物学行为, 反映其预后更加敏感的指标, 以便临床选择更合理的治疗方案, 更准确的判断预后。



## ■研究前沿

肿瘤芽殖的分子机制及在肿瘤复发和转移过程中的作用,是目前的研究热点。

**结论:** 肿瘤芽殖强度是反映大肠癌恶性生物学行为和估计预后的良好指标,并具有简单、客观、易操作、较好的可重复性及易于推广应用的特点。

**关键词:** 肿瘤芽殖; 大肠癌诊疗; 预后评估; 病理诊断

高照华, 王振宇, 王梅先. 肿瘤芽殖与大肠癌生物学行为及预后的关系. 世界华人消化杂志 2007;15(24):2619-2625

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/2619.asp>

## 0 引言

大肠癌是常见的恶性肿瘤,发病率高,预后差,其复发和转移是影响患者疗效和预后的首要因素. 肿瘤芽殖是浸润转移过程的第一步,即癌细胞与原发癌灶脱离. Morodomi *et al*<sup>[1]</sup>首先提出肿瘤芽殖的概念,即位于浸润前缘孤立的单个癌细胞或少于5个癌细胞的癌细胞簇. 本文回顾性调查中国医科大学肿瘤外科施行根治手术并具有完整临床病理资料大肠癌病例,分析其肿瘤芽殖的有无及强度与大肠癌生物学行为及预后的关系,旨在为早期预测复发转移和制定合理的治疗方案提供依据.

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 2000-01/2001-12中国医科大学肿瘤外科施行根治手术大肠癌患者94例,男50例,女44例,平均年龄57.5(36-86)岁. 入选病例术后均系统门诊复查随访,术后复发转移情况明确,复发转移病例经临床、CT、B超、X线摄片等诊断,随访期间 $\geq 5$  a.

**1.2 方法** 入选病例的病理淋巴结检测均大于12个. 大肠癌大体类型、组织学分型、组织学分级均按WHO 2000年分类标准进行. T分期、N分期、TNM分期均按1997年UICC的TNM分期标准执行. Dukes分期按全国大肠癌病理研究协作组最新修订标准. 芽殖存在与否根据Ueno *et al*<sup>[2]</sup>的标准判定,即一个孤立的单个癌细胞或由少于5个癌细胞组成的一个癌细胞簇显现从大的癌体浸润前缘的发芽.

对于肿瘤芽殖的定量<sup>[3]</sup>: 每例病理片用低倍光镜( $\times 10$ 倍物镜)细查,并选择3个最高密度区,再用20倍物镜计数每个区域的芽殖灶数量,以其中数量最多的作为该例肿瘤芽殖的程度,并用强度这个名词代表;按芽殖强度 $< 10$ 和 $\geq 10$ 把患者分成2组. 生存时间,以手术日至末次随访

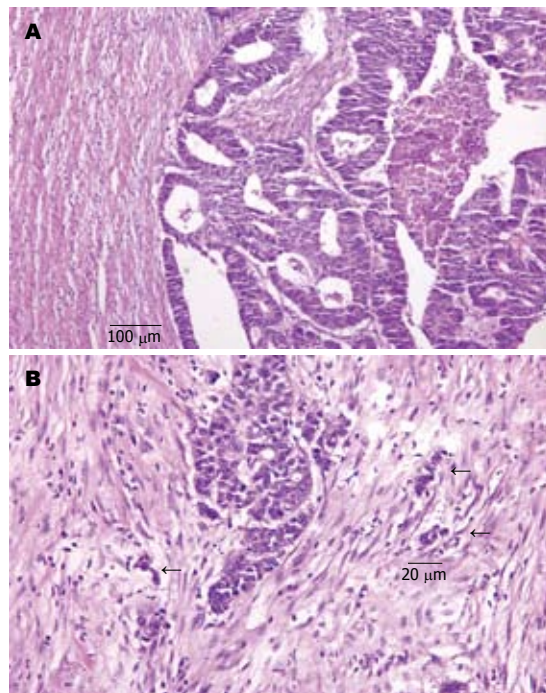


图1 大肠癌病理图片(H&E  $\times 100$ ). A: 肿瘤浸润前缘未见芽殖细胞; B: 如箭头所示肿瘤浸润前缘可见多个芽殖细胞.

的时间为准.

**统计学处理** 采用 $\chi^2$ 检验分析变量之间的联系,利用Kaplan-Meier方法计算术后5 a生存率并绘制生存曲线;应用Log-rank方法比较各组间生存曲线差异. 用Cox比例风险模型分析变量对预后独立影响的作用,统计分析采用SPSS13.0软件.

## 2 结果

**2.1 大肠癌HE染色典型芽殖图片** 在肿瘤浸润前缘可见散在的芽殖灶(图1).

**2.2 芽殖强度的分布、发生率、与临床病理指标的关系** 在观察的病例中,肿瘤芽殖强度 $< 5$ 的病例出现的频率最多,约占50%;其次,芽殖强度5-9之间组,约占20.2%(图2). 芽殖强度 $\geq 10$ 组约占29.8%. 肿瘤芽殖强度分布与淋巴结转移数、Dukes分期、TNM分期( $P < 0.0001$ )、浸润深度( $P = 0.004$ )、肿瘤分化( $P = 0.03$ )等有显著性相关,而与年龄、性别、肿瘤最大直径、生长方式、肿瘤类型等无显著性关系(表1).

**2.3 肿瘤芽殖和术后生存率的关系** 高芽殖组(budding $\geq 10$ )与低芽殖组(budding $< 10$ )患者5 a生存率分别为20%和90%,生存曲线的差异有显著性意义( $P < 0.0001$ );随着芽殖强度的增加术后生存率逐渐下降(图3A). II期高芽殖组与低芽殖组生存曲线的差异亦有显著意义( $P < 0.001$ )(图

表 1 肿瘤芽殖和临床病理因素之间的关系

临床病理因素	n	肿瘤芽殖强度分组		P值
		0-9	≥10	
年龄 <sup>1</sup>	57.5	56.89	58.93	NS
性别				
男	50	39	11	0.078
女	44	27	17	
肿瘤最大直径	5.631	5.618	5.661	NS
肿瘤类型				
腺癌	73	50	23	0.497
黏液腺癌	21	16	5	
分化				
高分化(1级)	48	38	10	0.03
中分化(2级)	21	10	11	
低分化(3级)	25	18	7	
淋巴结转移数量				
0个	57	50	7	<0.0001
1-3个	19	12	7	
≥4个	18	4	14	
生长方式				
膨胀型	48	34	14	0.921
浸润型	46	32	14	
淋巴管浸润				
无	87	63	24	0.1
有	7	3	4	
脉管浸润				
无	85	62	23	0.075
有	9	4	5	
浸润深度				
pT <sub>2</sub>	23	20	3	0.004
pT <sub>3</sub>	61	43	18	
pT <sub>4</sub>	10	3	7	
Dukes分期				
A期	18	18	0	<0.0001
B期	39	32	7	
C1期	19	12	7	
C2期	18	4	14	
TNM分期				
I期	18	18	0	<0.0001
II期	39	32	7	
III期	37	16	21	

<sup>1</sup> 平均数; NS(差别无显著意义).

3B); 而II期芽殖组与III期生存曲线间的差异无统计学意义(图3C,  $P = 0.116$ ).

2.4 T分期与芽殖强度的关系 T<sub>2</sub>期高芽殖组与低芽殖组术后5 a生存率分别为33%和90%, 生存曲线间的差异有显著性意义( $P < 0.001$ , 图4A); T<sub>3</sub>期高芽殖组与低芽殖组术后5 a生存率分别为26%和90%, 生存曲线间的差异亦有显著意义

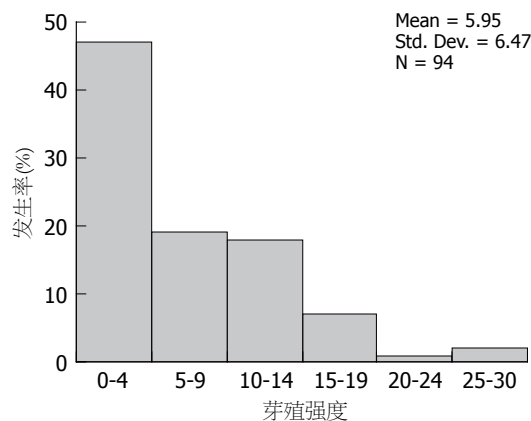


图 2 不同芽殖强度的患者分布.

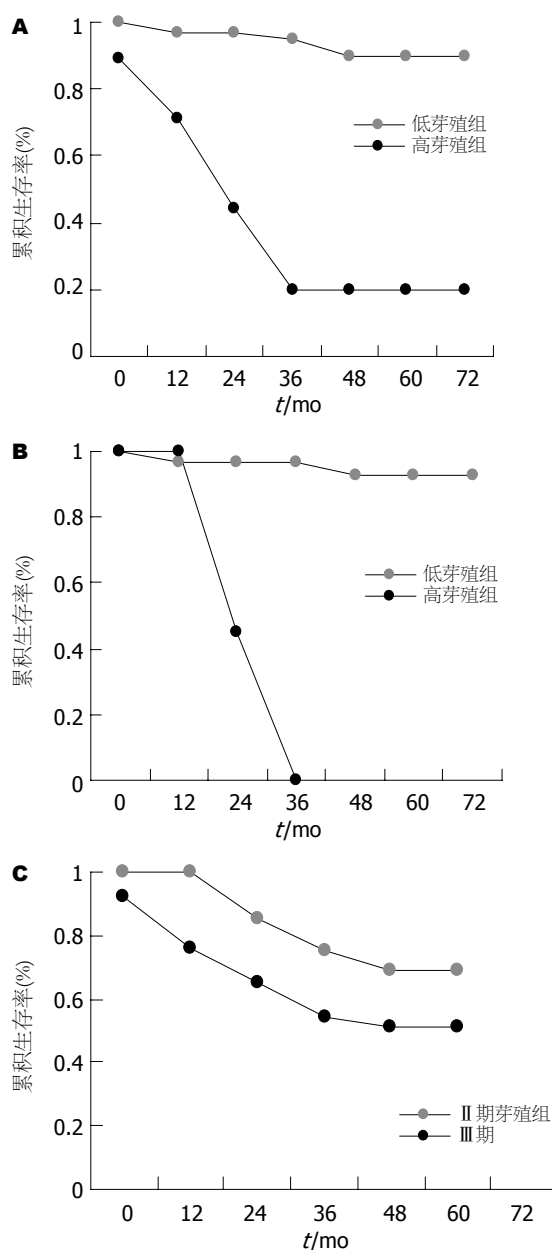


图 3 肿瘤芽殖和术后生存率的关系. A: 高低芽殖组比较的生存曲线; B: TNM分期II期高低芽殖组生存曲线; C: TNM分期II期芽殖组与III期生存曲线.

## ■ 创新盘点

本文首次报道, 肿瘤芽殖强度与大体类型、组织学分级、生长方式等代表大肠癌恶性侵袭性生物学行为病理参数的联系.

### 应用要点

肿瘤芽殖在常规HE染色病理片下就可观察,其检测简单、易操作、有较好的可重复性,并客观、实用,易于推广。可作为临床判断预后和指导治疗的有效指标。

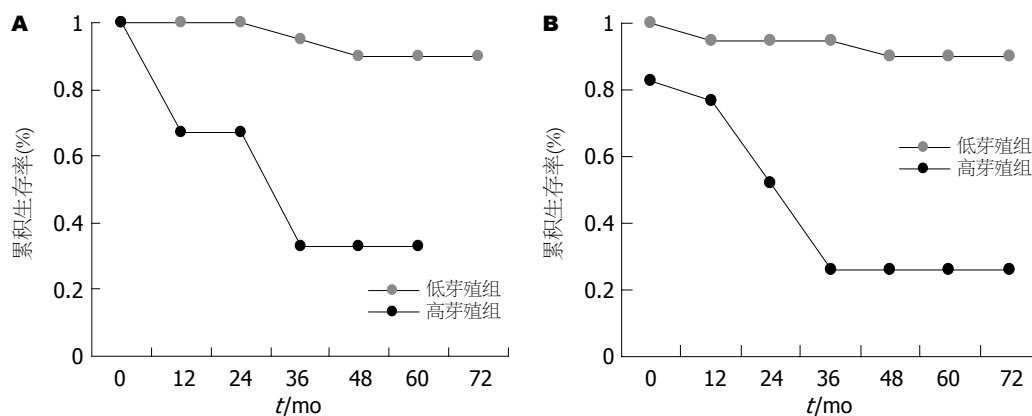


图4 T分期与高低芽殖强度组的生存曲线。A: T<sub>2</sub>期; B: T<sub>3</sub>期。

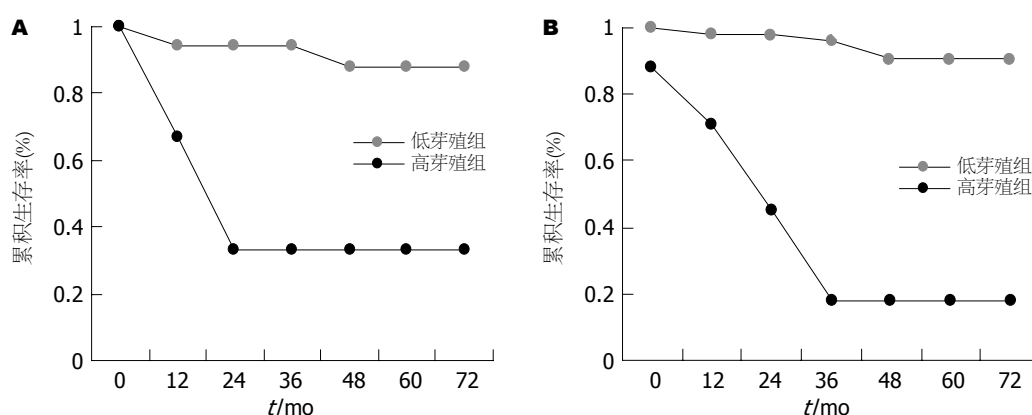


图5 大体类型与高低芽殖强度组的生存曲线。A: 隆起型; B: 溃疡型。

( $P < 0.001$ , 图4B)。

**2.5 大体类型与芽殖强度的关系** 隆起型高低芽殖组间比较术后5 a生存率分别为33%和88%, 生存曲线间的差异有显著性意义( $P < 0.0001$ , 图5A); 溃疡型高低芽殖组间比较术后5 a生存率分别为18%和91%, 生存曲线间的差异也具有显著性意义( $P < 0.0001$ , 图5B)。

**2.6 组织学分级与芽殖强度的关系** 组织学分级1级(即高分化腺癌)高低芽殖组术后5 a生存率分别为25%和92%, 2组生存曲线间的差异有显著性意义( $P < 0.0001$ , 图6A)。组织学分级1级高芽殖组与组织学分级2级(即中分化腺癌)组生存曲线间的差异有显著性意义( $P = 0.015$ , 图6B), 前者较后者预后更差。

**2.7 生长方式与芽殖强度的关系** 膨胀型生长高低芽殖组间生存曲线间的差异具有显著性意义( $P < 0.001$ , 图7A)。浸润型生长高低芽殖组间生存曲线间的差异也具有非常显著性意义( $P < 0.001$ , 图7B)。

**2.8 肿瘤芽殖和术后复发的关系** 肿瘤芽殖强

表2 治愈性切除术后复发方式和肿瘤芽殖强度的关系

复发方式		n		P值
		芽殖(0-9)	芽殖( $\geq 10$ )	
血源性	有	3	17	<0.001
	无	63	11	
非血源	有	1	4	0.012
	无	65	24	
总复发	有	4	21	<0.001
	无	62	7	

度与肝、肺、骨等血源性复发有显著相关性( $P < 0.001$ ); 亦与局部复发、腹膜复发等非血源性复发有显著相关性( $P = 0.012$ ); 与术后总复发也存在显著相关性( $P < 0.001$ , 表2)。

**2.9 Cox比例风险模型的多因素生存分析** 如表3, 根据Cox比例风险模型的多因素分析, 肿瘤芽殖与淋巴结转移数量、肿瘤分化程度、浸润深度等临床病理指标一起被做为独立变量。肿瘤芽殖强度是影响大肠癌预后的最主要独立变量之一(相对危险度: 40.574; 相对危险度的95%置信

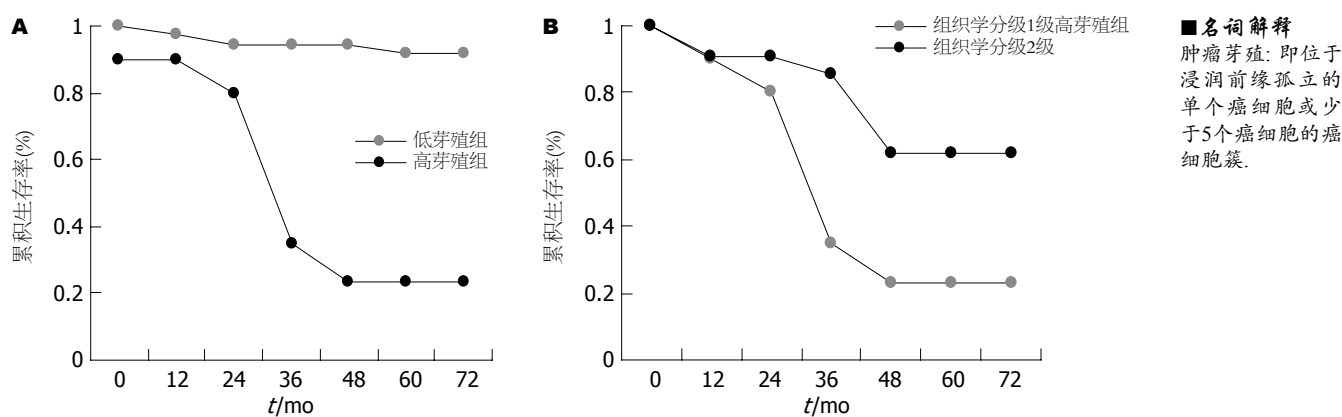


图6 组织学分级与高低芽殖强度组的生存曲线. A: 组织学分级1级; B: 组织学分级1级高芽殖组与组织学分级2级比较的生存曲线.

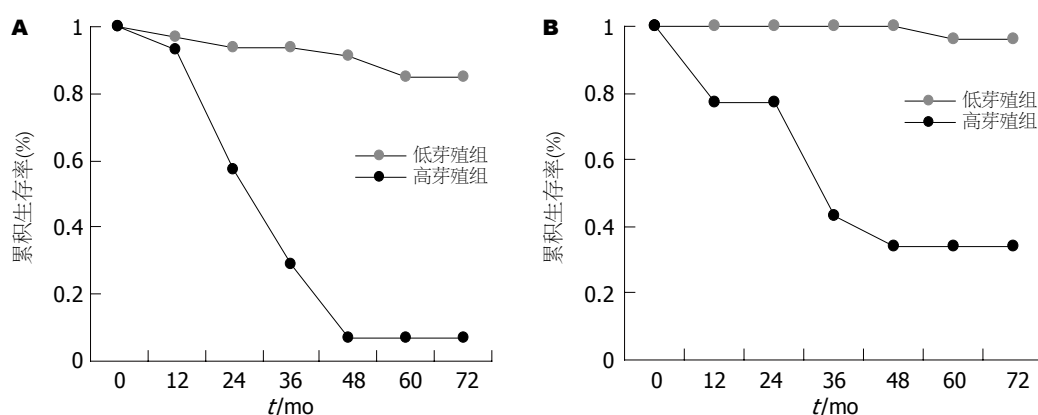


图7 生长方式与高低芽殖强度组的生存曲线. A: 膨胀型; B: 浸润型.

表3 Cox比例风险模型的多因素生存分析

变量	回归系数(B)	$\chi^2$	P值	相对危险度(RR)	相对危险度的95%置信区间(CI)
肿瘤芽殖	3.703	23.999	<0.001	40.574	9.222-178.516
淋巴结转移数量	1.128	6.681	0.010	3.089	1.313-7.265
分化	2.189	4.390	0.036	8.927	1.152-69.190
浸润深度	0.771	4.072	0.044	2.162	1.022-4.574

区间: 9.222-178.516;  $P < 0.001$ ).

### 3 讨论

目前, 在临床上对大肠癌最常用的分期方法是Dukes分期和TNM分期. 他们是指导大肠癌临床合理治疗和判断预后的重要分期系统, 主要包括肿瘤浸润深度和淋巴结转移2个参数, 被普遍作为判断大肠癌预后的最佳指标. 但是, 在临床实践中我们会经常看到相同的Dukes分期, 甚至相同的T分期及N分期的患者预后却截然不同. 因此, 有必要寻找一个能够代表大肠癌恶性侵袭性生物学行为, 反映其预后更加敏感的指标;

以便临床选择更合理的治疗方案, 更准确的判断预后. 多年来外科及病理学者们一直致力于寻找一种反映恶性肿瘤生物学行为的敏感指标及合理的肿瘤分期方法. 人们研究发现实体瘤浸润和转移的第一步是浸润前缘的去分化和离解, 随后肿瘤细胞移行出主瘤体<sup>[4]</sup>. Zmai于1949年首先描述了在肿瘤浸润前缘的芽殖这一病理特征. 随后许多研究者注意到了这种组织学现象, 并用肿瘤芽殖这一名称代表这一事件, 报道了这种组织学特征及其与转移<sup>[1-2,9-11]</sup>和长期生存率<sup>[3,6,12-15]</sup>的关系. Morodomi *et al*<sup>[1]</sup>提出肿瘤芽殖的概念, 即肿瘤浸润前缘孤立的单个癌细胞或

### ■同行评价

本文分析了肿瘤芽殖强度与淋巴结转移数、浸润深度、肿瘤分化、生长方式以及复发的相关性。得出肿瘤芽殖强度是反映大肠癌恶性生物学行为和估计预后的指标。文章立题新颖,设计合理,层次清楚,分析有据,具有一定的可读性和参考性。

少于5个癌细胞的癌细胞簇。本研究表明,肿瘤芽殖与淋巴结转移数<sup>[16-17]</sup>、Dukes分期、TNM分期( $P<0.0001$ )、浸润深度( $P=0.004$ )、肿瘤分化( $P=0.03$ )等临床病理指标有显著性相关;此结果与研究类似<sup>[2-3,6,18-21]</sup>。相同TNM分期高芽殖组与低芽殖组预后的差异具有显著性( $P<0.001$ ),Ⅱ期芽殖组与Ⅲ期病例预后差异无显著性( $P=0.116$ )<sup>[6-8]</sup>,提示肿瘤芽殖的有无及其强度可能是判断预后的良好指标。相同T分期高芽殖组与低芽殖组预后的差异具有显著性( $P<0.001$ );相同大体类型高芽殖组与低芽殖组预后差异显著( $P<0.001$ );相同生长方式高芽殖组与低芽殖组预后差异显著( $P<0.001$ );提示肿瘤芽殖强度是独立于T分期、大体类型、生长方式等代表大肠癌恶性侵袭性生物学行为的又一良好参数。相同组织学分级中高芽殖组较低芽殖组预后明显差( $P<0.0001$ );高分化高芽殖组与中分化组生存曲线间的差异有显著性意义( $P=0.015$ ),前者较后者预后更差,提示肿瘤芽殖强度较组织学分级可能更好地反映大肠癌恶性侵袭性生物学行为。肿瘤芽殖强度和术后复发关系的研究表明高芽殖组术后复发率明显高于低芽殖组,2组间的差异具有非常显著性意义<sup>[3-8]</sup>( $P=0.001$ ),提示肿瘤芽殖强度是预测肿瘤复发和转移的良好指标。

为了探讨肿瘤芽殖强度与影响大肠癌预后因素的关系,本研究采用了UICC推荐的Cox模型进行多因素分析,结果表明,肿瘤芽殖强度可能是反映大肠癌预后最主要的独立指标。

我们认为肿瘤芽殖强度较好地反映了大肠癌的生物行为,是指导大肠癌治疗、判断预后的良好指标,其检测简单、易操作、有较好的可重复性,并客观、实用,易于推广。我们的结果提示芽殖能为临床提供较为可信的预后评估,可能是分级系统的一个重要参数,可在大肠癌常规病理检查中采用并推广。

我们研究结果受取材及切片数量等因素的影响,且肿瘤芽殖确切的分子机制目前仍不清楚<sup>[13,22]</sup>,我们将在进一步研究中应用组织微阵列技术,增加样本量,以期提高结果的可靠性,从基因和分子水平进一步探讨肿瘤芽殖的发生机制。

### 4 参考文献

- Morodomi T, Isomoto H, Shirouzu K, Kakegawa K, Irie K, Morimatsu M. An index for estimating the probability of lymph node metastasis in rectal cancers. Lymph node metastasis and the

histopathology of actively invasive regions of cancer. *Cancer* 1989; 63: 539-543

- Ueno H, Murphy J, Jass JR, Mochizuki H, Talbot IC. Tumour 'budding' as an index to estimate the potential of aggressiveness in rectal cancer. *Histopathology* 2002; 40: 127-132
- Park KJ, Choi HJ, Roh MS, Kwon HC, Kim C. Intensity of tumor budding and its prognostic implications in invasive colon carcinoma. *Dis Colon Rectum* 2005; 48: 1597-1602
- Gabbert H, Wagner R, Moll R, Gerharz CD. Tumor dedifferentiation: an important step in tumor invasion. *Clin Exp Metastasis* 1985; 3: 257-279
- Ueno H, Price AB, Wilkinson KH, Jass JR, Mochizuki H, Talbot IC. A new prognostic staging system for rectal cancer. *Ann Surg* 2004; 240: 832-839
- Hase K, Shatney C, Johnson D, Trollope M, Vierra M. Prognostic value of tumor "budding" in patients with colorectal cancer. *Dis Colon Rectum* 1993; 36: 627-635
- Okuyama T, Oya M, Ishikawa H. Budding as a useful prognostic marker in pT3 well- or moderately-differentiated rectal adenocarcinoma. *J Surg Oncol* 2003; 83: 42-47
- Okuyama T, Nakamura T, Yamaguchi M. Budding is useful to select high-risk patients in stage II well-differentiated or moderately differentiated colon adenocarcinoma. *Dis Colon Rectum* 2003; 46: 1400-1406
- Morodomi T. Clinicopathological studies of advanced rectal cancers--prediction of the degree of lymph node metastasis from histopathological finding of pre-operative biopsy specimens. *Nippon Geka Gakkai Zasshi* 1988; 89: 352-364
- Araki Y, Isomoto H, Shirouzu K, Miura K, Iwanaga H, Okita A, Sasatomi T, Ogata Y, Morodomi T, Kakegawa T. Clinicopathological characteristics of colorectal submucosal carcinoma with lymph node metastasis. *Kurume Med J* 1993; 40: 123-127
- Park SY, Choe G, Lee HS, Jung SY, Park JG, Kim WH. Tumor budding as an indicator of isolated tumor cells in lymph nodes from patients with node-negative colorectal cancer. *Dis Colon Rectum* 2005; 48: 292-302
- Okuyama T, Oya M, Yamaguchi M. Budding (sprouting) as a useful prognostic marker in colorectal mucinous carcinoma. *Jpn J Clin Oncol* 2002; 32: 412-416
- Masaki T, Matsuoka H, Sugiyama M, Abe N, Izumisato Y, Sakamoto A, Atomi Y. Laminin-5 gamma2 chain expression as a possible determinant of tumor aggressiveness in T1 colorectal carcinomas. *Dig Dis Sci* 2003; 48: 272-278
- Prall F, Nizze H, Barten M. Tumour budding as prognostic factor in stage I/II colorectal carcinoma. *Histopathology* 2005; 47: 17-24
- Nilsson PJ, Rubio C, Lenander C, Auer G, Glimelius B. Tumour budding detected by laminin-5 {gamma}2-chain immunohistochemistry is of prognostic value in epidermoid anal cancer. *Ann Oncol* 2005; 16: 893-898
- Okuyama T, Oya M, Ishikawa H. Budding as a risk factor for lymph node metastasis in pT1 or pT2 well-differentiated colorectal adenocarcinoma. *Dis Colon Rectum* 2002; 45: 628-634
- Masaki T, Matsuoka H, Sugiyama M, Abe N,



- Sakamoto A, Watanabe T, Nagawa H, Atomi Y. Tumor budding and evidence-based treatment of T2 rectal carcinomas. *J Surg Oncol* 2005; 92: 59-63
- 18 Hase K, Shatney CH, Mochizuki H, Johnson DL, Tamakuma S, Vierra M, Trollope M. Long-term results of curative resection of "minimally invasive" colorectal cancer. *Dis Colon Rectum* 1995; 38: 19-26
- 19 Tanaka M, Hashiguchi Y, Ueno H, Hase K, Mochizuki H. Tumor budding at the invasive margin can predict patients at high risk of recurrence after curative surgery for stage II, T3 colon cancer. *Dis Colon Rectum* 2003; 46: 1054-1059
- 20 Hase K, Ueno H, Kurihara H, Yoshimura K, Ozawa K, Hashiguchi Y, Mochizuki H, Shimazaki H, Aida S, Matsukuma S, Kanai T, Bekku S. Risk factors for an adverse outcome in early invasive colorectal carcinoma. *Gastroenterology* 2004; 127: 385-394
- 21 Minsky BD, Mies C, Rich TA, Recht A. Lymphatic vessel invasion is an independent prognostic factor for survival in colorectal cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1989; 17: 311-318
- 22 Masaki T, Sugiyama M, Matsuoka H, Abe N, Izumisato Y, Sakamoto A, Atomi Y. Coexpression of matrilysin and laminin-5 $\gamma$ 2 chain may contribute to tumor cell migration in colorectal carcinomas. *Dig Dis Sci* 2003; 48: 1262-1267

编辑 程剑侠 电编 张敏

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2007年版权归世界华人消化杂志

## • 消息 •

### 2007 年国际会议

Meeting Falk Workshop: Mechanisms of Intestinal Inflammation  
10 October 2007  
Dresden  
symposia@falkfoundation.de

Meeting APDW 2007 - Asian Pacific Digestive Disease Week 2007  
15-18 October 2007  
Kobe  
apdw@convention.co.jp

Meeting Falk Symposium 161: Future Perspectives in Gastroenterology  
11-12 October 2007  
Dresden  
symposia@falkfoundation.de

15th United European Gastroenterology Week, UEGW  
27-31 October 2007  
Le Palais des Congrès de Paris, Paris, France

American College of Gastroenterology Annual Scientific Meeting  
12-17 October 2007  
Pennsylvania Convention Center  
Philadelphia, PA

Meeting The Liver Meeting® 2007 - 57th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases  
2-6 November 2007  
Boston - MA  
www.aasld.org

# 磁共振技术对脂肪性肝病诊断的进展

田 艳, 范竹萍, 顾海燕

## ■背景资料

非酒精性脂肪性肝病(NAFLD)是一类肝组织学改变与酒精性肝病相似,但无过量饮酒史的临床病理综合征,主要包括单纯性脂肪肝、非酒精性脂肪性肝炎(NASH)和脂肪性肝硬化3种类型。NAFLD患者症状隐匿或轻微常不被重视,存在不良预后。对其诊断主要通过饮酒史、生化学指标、影像学检查及组织学检查。而影像学作为一项非侵入性检查手段,有着重要的诊断价值。

田艳, 范竹萍, 上海交通大学医学院附属仁济医院消化内科, 上海市消化疾病研究所 上海市 200001

顾海燕, 上海交通大学医学院附属仁济医院放射科 上海市 200001

通讯作者: 范竹萍, 200001, 上海市, 上海交通大学医学院附属仁济医院消化内科, 上海市消化疾病研究所。

zhuping\_fan@163.com

电话: 021-53882001

收稿日期: 2007-05-14 修回日期: 2007-08-15

## Application of magnetic resonance imaging to diagnosis of fatty liver disease

Yan Tian, Zhu-Ping Fan, Hai-Yan Gu

Yan Tian, Zhu-Ping Fan, Department of Gastroenterology, the Affiliated Renji Hospital of Medical College, Shanghai Jiaotong University; Institute of Digestive Disease in Shanghai City, Shanghai 200001, China

Hai-Yan Gu, Department of Gastroenterology, the Affiliated Renji Hospital of Medical College, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200001, China

Correspondence to: Zhu-Ping Fan, Department of Gastroenterology, the Affiliated Renji Hospital of Medical College, Shanghai Jiaotong University; Institute of Digestive Disease in Shanghai City, Shanghai 200001, China. zhuping\_fan@163.com

Received: 2007-05-14 Revised: 2007-08-15

## Abstract

The current near epidemic prevalence of obesity and diabetes mellitus in the general population has meant that non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) has become the most common cause of chronic liver disease in many countries. NAFLD includes a broad spectrum of liver abnormalities, ranging from simple steatosis, which has a benign course, to non-alcoholic steatohepatitis, which includes necroinflammatory changes and fibrosis. Currently, liver biopsy is the gold standard diagnostic test for liver fibrosis, but due to its limitations, there is a need to develop effective non-invasive tests. With the global increase in cases of fatty liver disease, people now pay more attention to non-invasive diagnostic tests. This review considers the recent advances in the role of magnetic resonance imaging for the evaluation of fatty liver disease.

Key Words: Non-alcoholic fatty liver disease; Mag-

netic resonance imaging

Tian Y, Fan ZP, Gu HY. Application of magnetic resonance imaging to diagnosis of fatty liver disease. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007; 15(24): 2626-2630

## 摘要

随着人群中肥胖及糖尿病发病率的升高,非酒精性脂肪性肝病(NAFLD)在众多国家成为最常见的慢性肝病。疾病谱随病程的进展表现不一,包括单纯脂肪肝、脂肪性肝炎、脂肪性肝纤维化和肝硬化。虽然单纯性脂肪肝的预后良好,但是脂肪性肝炎仍可进一步发展成肝硬化、肝癌,甚至发生肝衰竭而导致死亡,所以对脂肪肝及相关肝病的诊断越发受到人们重视。目前肝脏活检是诊断脂肪肝的金标准,但是由于活检自身的限制需要发展有效的非侵入性检查方法。其中,磁共振技术作为一项非侵入性检查手段,在对脂肪性肝病的早期诊断方面具有广阔的应用前景。本文主要从三方面列举并评估了磁共振技术对脂肪性肝病的诊断进展。

关键词: 非酒精性脂肪性肝病; 磁共振技术

田艳, 范竹萍, 顾海燕. 磁共振技术对脂肪性肝病诊断的进展. *世界华人消化杂志* 2007; 15(24): 2626-2630

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/2626.asp>

## 0 引言

脂肪肝在人群中的发病率很高(约15%),其中大量饮酒者(每天>60 g)发病率45%,肥胖者(体质指数BMI>30)发病率75%,而肥胖且大量饮酒者发病率高达95%<sup>[1]</sup>。虽然单纯性脂肪肝预后良好,但是脂肪性肝炎仍可发展为肝纤维化、肝硬化。所以临床上对脂肪肝的早期诊断与检测有着十分重要的意义。由于可以评价脂肪性肝病的脂肪变、炎症和纤维化程度,肝活检一直被作为诊断脂肪性肝病的金标准。但肝活检是一项创伤性检查,患者依从性差,且存在取样少、取样误差、不能应用于某些特殊患者及存在并发症危险(如感染、出血、胆管漏)等缺点,

因此限制了肝穿刺在临床上的广泛应用<sup>[2-4]</sup>。目前临床上使用的脂肪性肝病非创伤性诊断方法有超声、CT、MRI等, 其中磁共振成像(MRI)技术更具有开拓性。磁共振技术没有放射性危害, 并且MRI信号强度是多种组织特征参数的可变函数, 他所反映的病理生理较超声和CT更广泛、更有灵活性<sup>[1,5-6]</sup>。磁共振成像技术在脂肪肝定量诊断方面已有广泛的应用<sup>[7]</sup>, 本综述在脂肪肝定量诊断的基础上, 增加了对脂肪性肝病的炎症及纤维化磁共振诊断的应用, 以说明磁共振技术作为脂肪性肝病非创伤性检查的目前情况和发展前景。

## 1 对肝内脂肪的定量诊断

**1.1 磁共振脂肪抑制技术** 在一定条件下, 脂肪和水以相同或相反相位发生共振, 所获的相应图像为IP像(in-phase image)或OP像(out-phase image)。IP像上脂肪和水信号相加; 而在OP像上两者信号相互抵消, 因此观察IP像和OP像上组织信号有无下降可推测该组织是否含有脂质<sup>[8-9]</sup>。Qayyum *et al*<sup>[10]</sup>把脂肪肝患者分为伴肝纤维化及无肝纤维化, 结合组织病理做统计分析, 比较两种MRI定量诊断方法。方法1采用屏气同相位与反相位T1加权梯度回波序列, 观测T1WI同相位与反相位像上的信号变化, 得到肝脏信号强度衰减率(liver signal intensity attenuation ratio, SILAR)。方法2快速自旋回波序列结合脂肪饱和与不用脂肪饱和, 观测T2值的变化。得出结论, 对于无纤维化的脂肪肝患者, 方法2比方法1更有相关性; 对于伴纤维化的脂肪肝患者, 只有方法2有相关性。因此, 利用脂肪饱和快速自旋回波序列获得T2值的变化, 是较好的MRI脂肪肝定量诊断方法, 尤其对于伴肝纤维化的脂肪肝患者<sup>[8]</sup>。Hussain *et al*<sup>[11]</sup>用双脉冲角度(70度20度)和梯度回波序列获得IP像和OP像。这一技术可以快速获得全肝的IP像和OP像, 而且IP像和OP像同时获得。同时用软件重建了肝脏脂肪分数图, 并用彩色图像表示脂肪含量的百分数值。因此用肉眼观察IP像和OP像的变化或者测量信号强度的衰减值, 就能定量肝内的脂质含量。这是一种快速、准确的脂肪肝定量的方法。Rinella *et al*<sup>[12]</sup>采用双梯度回波、化学位移梯度回波成像, 定量测定肝脏捐献者肝脏的脂肪含量及其脂肪变程度, 并与病理活检对照, 发现磁共振成像脂肪变指标与病理活检脂肪变分级呈正相关, 相关系数为0.84; 脂肪含量大于0.2者可明确诊

断脂肪肝, 而对于病理活检脂肪含量在15%左右的则无法测得。该作者提出, 结合脂肪饱和法能进一步加强MRI诊断的准确性。在成人可以测量腰臀比估计内脏脂肪含量, 但在儿童不适用。Fishbein *et al*<sup>[13]</sup>在Dixon法的基础上结合快速梯度回波技术, 测定非酒精性脂肪性肝病的儿童肝内脂肪含量和体内脂肪分布情况。

**1.2 <sup>1</sup>H磁共振波谱分析(MRS)** 1984年Dixon J首先提出化学位移成像, 运用化学位移的方法研究分子结构即为频谱分析。磁共振波谱分析技术是利用体内含奇数质子的原子核自身的磁性及外加磁场的作用使其磁化及振动, 产生磁共振信号, 经傅立叶公式转换成频率(波谱)。原子核的共振频率与磁场强度成正比, 但原子核并非孤立存在, 位于不同种类化学键上的原子会产生不同频率的信号。因分子环境(即核外电子结构)不同引起共振频率上的差异, 称作化学位移。由于这种化学位移, 在磁共振中的峰值也会有微小变化, 这些变化经磁共振扫描仪采集后转化为数值波谱, 并代表相应代谢物浓度。目前体内用于磁共振波谱分析的含奇数质子的原子核有氢<sup>1</sup>H、碳<sup>13</sup>C、磷<sup>31</sup>P、氮<sup>15</sup>N、氟<sup>19</sup>F等, 其中<sup>1</sup>H和<sup>31</sup>P是最常用的。

磁共振氢质子波谱是一种无创性获得活体生理及病理物质代谢的检查方法, 越来越广泛的应用于临床。用于检测氢质子波谱的MR有多种序列, 包括深度分辨表面线圈波谱(depth-resolved surface coil spectroscopy, DRESS)、点分辨表面线圈波谱(point-resolved surface coil spectroscopy, PRESS)、空间分辨波谱(spatially resolved spectroscopy, SPARS)和激励回波采集方式(stimulated-echo method, STEAM)。

近年来, <sup>1</sup>H-MRS已经被用于脂肪性肝病的脂质定量诊断, 可以直接测定肝内TG含量<sup>[14]</sup>。Thomas *et al*<sup>[15]</sup>采用PRESS序列(TR1500 ms/TE135 ms), 20 mm×20 mm×20 mm VOI, 128次信号激励的<sup>1</sup>H-MRS检测了24例肝内脂肪含量。其中11例为活检证实的脂肪肝, 23例为健康志愿者。使用MRUI软件包内的AMARES规则分析得到的数值波谱。证实健康志愿者的甘油三酯(TG)含量显著低于脂肪肝患者( $P = 0.02$ )。Szczepaniak *et al*<sup>[16]</sup>应用<sup>1</sup>H-MRS多次检测2349例志愿者肝内TG含量, 发现重复测定的TG含量之间高度相关( $r = 0.99, P < 0.001$ ), 测量值间变异系数仅8.5, 说明<sup>1</sup>H-MRS具有很好的可重复性, 进一步证实了是定量诊断脂肪性肝病的可靠方法。

## ■研究前沿

肝纤维化早期诊断的非侵入性检查逐渐受到重视, 磁共振成像技术中的弹性成像技术的应用, 显示出良好的研究和应用前景。他提供了一种全新的无创性反映组织生物力学特性的检查手段, 这是其他检查方法都无法实现的。

## ■创新盘点

本文从更广泛更深入的方面,描述了磁共振技术对脂肪性肝病诊断的现状与展望。包括对肝脏脂肪定量、炎症及纤维化方面的应用,引用文献均来自最近国外发表的文章,力求追踪最新的热点。

## ■应用要点

随着医学影像技术的发展及临床应用,脂肪肝早期诊断的灵敏度和特异性不断提高。本文对脂肪性肝病的磁共振诊断方面作一综述,为临床早期诊断、系统治疗后的疗效评价提供可靠的评估手段。

脂肪肝患者可在单纯性脂肪肝的基础上伴发炎症、坏死及肝纤维化甚至肝硬化,因此早期诊断肝内炎症及纤维化的发生尤其重要。磁共振技术作为一项非侵入性的检查手段,不但可以对脂肪肝进行定量诊断,还可以对肝内炎症及纤维化的程度进行诊断<sup>[17-18]</sup>。

## 2 脂肪肝伴发炎症的诊断

人在体肝脏MRS中,研究相对较多的是<sup>31</sup>P谱,肝脏<sup>31</sup>P谱有6个主要波峰,即磷酸单脂(PME)、磷酸二脂(PDE)、无机磷(Pi)、3个三磷酸腺苷( $\alpha$ -ATP,  $\beta$ -ATP,  $\gamma$ -ATP)。磷脂细胞膜前体(包括磷酸胆碱PC, 磷酸乙醇胺PE)、单磷酸腺苷AMP、糖酵解中间物(如6-磷酸-果糖)组成PME波峰。磷脂细胞膜崩解产物,包括甘油磷酸胆碱(GPC)、甘油磷酸乙醇胺(GPE)和来自内质网的磷脂,组成PDE波峰。因此, PME和PDE的信号主要反映细胞的崩解与再生。而Pi和ATP主要反映能量代谢信息<sup>[19]</sup>。

人在体肝脏<sup>31</sup>P MRS的研究主要应用代谢产物的比值。PME的信号主要来自于细胞膜的前体, PDE的信号主要来自细胞膜的崩解产物。因此, PME/PDE的比值可以反映肝细胞损伤及再生的情况。Corbin *et al*<sup>[20]</sup>对慢性肝病的小鼠模型使用<sup>31</sup>P MRS检查, 结果表明在从慢性肝病到肝硬化的过程中, 肝内ATP水平呈进行性减少。因此, 说明肝脏<sup>31</sup>P MRS可以对慢性肝病的小鼠提供一个非侵入性诊断方法。Ishak *et al*<sup>[21]</sup>研究发现PME/PDE比值升高与肝炎症坏死相关, 可以反映肝脏慢性炎症的组织学变化程度。Cortez-Pinto *et al*<sup>[22]</sup>对8例非酒精性脂肪肝患者和7例健康者进行研究, 得出结论, 非酒精性脂肪性肝病患者在静脉内注射果糖后ATP耗竭的恢复能力降低。van Wassenae-van Hall *et al*<sup>[23]</sup>对38例有不同弥漫性肝病的患者和22例健康者, 进行<sup>31</sup>P MRS与血清学、临床症状和肝脏活检的相关分析, 发现PME/Pi与肝活检的炎症和坏死相关。得出结论, <sup>31</sup>P MRS对弥漫性肝病患者的诊断有限, 但是可以用于评估其存在的炎症。<sup>31</sup>P MRS可提供很多肝组织的生化信息, 反映脂肪肝所处的炎症状态, 是一种有价值的非侵入性检查方法, 但目前还缺少大样本的临床研究<sup>[24]</sup>。

## 3 对脂肪肝进展为纤维化的早期诊断

脂肪性肝病在临床上常见, 虽然单纯性脂肪肝预后良好, 但脂肪肝特别是伴发炎症和坏死的

大泡性脂肪变可以进展为肝纤维化、肝硬化、甚至肝细胞癌<sup>[25]</sup>。脂肪性肝病中发生肝纤维化的早期诊断非常重要, 但目前诊断的金标准仍是肝活检。因此, 有必要发展一种非侵入性的检查手段, 不但可以避免活检侵入性损伤引起的并发症, 还有利于观察疾病的发展及治疗的效果, 弹性测定技术是一项极有发展前景的技术。其中, 超声弹性成像是发展较早的一种影像方法, 但其信噪比和侧向分辨率较低, 而且受到观察窗限制。与超声弹性成像技术比较, 磁共振弹性成像(MRE)具有更多的优势。这得益于磁共振技术的发展, 比如不需要“声窗”, 可以对肝内脂肪含量进行定量诊断, 并可以同时显示传统的肝脏磁共振图像<sup>[26]</sup>。

**3.1 MRE的基本原理** 疾病状态可以明显地改变正常组织的弹性, 从而使正常组织和病理组织的弹性产生较大差异; 人体不同组织之间弹性模量的差异程度明显大于其他物理特性。MRE因能够提供软组织(如肝、脑、肌肉、实性肿瘤等)弹性模量的定量信息, 已经在生物和医学领域受到了极大的关注<sup>[27]</sup>。MRE采用外部激发装置产生低频率剪切波在介质内传播, 介质的弹性与在该介质中所传播的剪切波的波长相关, 从而可获得弹性模量的量化值。相位图通过图像处理估算出局部剪切波的波长, 才能转化为弹性图, MRE的相位图可显示剪切波在介质内的传播, 弹性图可量化和显示介质的弹性模量<sup>[28-30]</sup>。

**3.2 MRE在脂肪性肝病中的应用** 1995年Muthupillai *et al*<sup>[31]</sup>报道, 应用相位对比MRI技术显示了剪切波在体模中的传播, 并通过估算相位图像中剪切波的波长, 得到了体模中模拟材料的剪切模量, 与力学方法测量的结果有高度相关性。Hamhaber *et al*<sup>[32]</sup>对类组织琼脂糖凝胶模型进行MRE和机械压缩试验, 对两者的值进行比较分析, 两种方法测量结果高度一致。磁共振弹性技术越来越引起相关研究人员的关注。

MRE的研究多采用体模、动物离体器官等。Othman *et al*<sup>[33]</sup>把MRE应用到显微镜水平, 即显微磁共振弹性成像(microscopic magnetic resonance elastography,  $\mu$ MRE)技术。 $\mu$ MRE可以应用琼脂糖凝胶模型、青蛙卵母细胞、组织工程的脂肪组织等, 进行弹性测定研究。 $\mu$ MRE可以为目前的MRE技术提供关于正常组织和异常组织的基本定量弹性模量信息, 更好地为临床服务。目前一些研究者已开展了初步临床研究, Rou-

viere *et al*<sup>[34]</sup>对12例健康人和12例慢性肝病患者进行研究, 得出健康人肝脏弹性1.7-2.4(平均2.0±0.3) kPa; 而被活检证实有肝纤维化的肝病患者, 其肝脏弹性2.7-19.2(平均5.6±5.0) kPa; 健康组与患者组的肝脏弹性值差异有统计学意义( $P<0.001$ ). 从而提出, MRE可以是诊断评估弥漫性肝纤维化的非侵入诊断方法, 但是还需要进一步的研究以确定他的敏感度和特异度. Huwart *et al*<sup>[35]</sup>对25例怀疑慢性肝病患者进行肝活检, 根据Metavir评分系统进行纤维化分期, 并对这些患者进行磁共振弹性成像检查. 通过放置在患者背部的探头, 发射65 Hz机械波达到肝脏, 相位图经过图像处理得到剪切弹性图. 得出结论: (1)肝脏平均剪切弹性随着肝纤维化程度的升高而升高, F0-F1期11例患者的弹性值为2.2±0.2 kPa, F2-F3期4例患者弹性值为2.6±0.2 kPa, F4期10例患者弹性值为4.7±1.6 kPa. (2)各组之间的弹性值的差别有统计学意义( $P\leq 0.05$ ). 进一步说明MRE是估计肝纤维化分期可行的非侵入性方法. MRE作为一种新的能直观显示和量化组织弹性的非侵入性成像方法, 尽管在肝脏方面的研究尚处于起步阶段, 但显示出良好的研究和应用前景.

#### 4 展望

磁共振技术作为一项非侵入性的诊断技术, 可以进行脂肪定量、炎症和纤维化的诊断, 在脂肪性肝病的诊断中有着重要的应用价值及发展前景<sup>[36-37]</sup>. 但在脂肪性肝病的临床应用方面, 磁共振波谱分析及磁共振弹性成像技术还多为小样本研究, 有待进一步开展一系列的研究以深入探讨他们在脂肪性肝病诊断中的应用.

#### 5 参考文献

- Hamer OW, Aguirre DA, Casola G, Lavine JE, Woenckhaus M, Sirlin CB. Fatty liver: imaging patterns and pitfalls. *Radiographics* 2006; 26: 1637-1653
- Choudhury J, Sanyal AJ. Clinical aspects of fatty liver disease. *Semin Liver Dis* 2004; 24: 349-362
- Ramesh S, Sanyal AJ. Evaluation and management of non-alcoholic steatohepatitis. *J Hepatol* 2005; 42 Suppl: S2-12
- Merriman RB, Ferrell LD, Patti MG, Weston SR, Pabst MS, Aouizerat BE, Bass NM. Correlation of paired liver biopsies in morbidly obese patients with suspected nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2006; 44: 874-880
- Semelka RC, Martin DR, Balci NC. Magnetic resonance imaging of the liver: how I do it. *J Gastroenterol Hepatol* 2006; 21: 632-637
- Schick F. Whole-body MRI at high field: technical limits and clinical potential. *Eur Radiol* 2005; 15: 946-959
- Prasad SR, Wang H, Rosas H, Menias CO, Narra VR, Middleton WD, Heiken JP. Fat-containing lesions of the liver: radiologic-pathologic correlation. *Radiographics* 2005; 25: 321-331
- Merkle EM, Nelson RC. Dual gradient-echo in-phase and opposed-phase hepatic MR imaging: a useful tool for evaluating more than fatty infiltration or fatty sparing. *Radiographics* 2006; 26: 1409-1418
- Martin DR, Semelka RC. Magnetic resonance imaging of the liver: review of techniques and approach to common diseases. *Semin Ultrasound CT MR* 2005; 26: 116-131
- Qayyum A, Goh JS, Kakar S, Yeh BM, Merriman RB, Coakley FV. Accuracy of liver fat quantification at MR imaging: comparison of out-of-phase gradient-echo and fat-saturated fast spin-echo techniques--initial experience. *Radiology* 2005; 237: 507-511
- Hussain HK, Chenevert TL, Londy FJ, Gulani V, Swanson SD, McKenna BJ, Appelman HD, Adusumilli S, Greenson JK, Conjeevaram HS. Hepatic fat fraction: MR imaging for quantitative measurement and display--early experience. *Radiology* 2005; 237: 1048-1055
- Rinella ME, McCarthy R, Thakrar K, Finn JP, Rao SM, Koffron AJ, Abecassis M, Blei AT. Dual-echo, chemical shift gradient-echo magnetic resonance imaging to quantify hepatic steatosis: Implications for living liver donation. *Liver Transpl* 2003; 9: 851-856
- Fishbein MH, Mogren C, Gleason T, Stevens WR. Relationship of hepatic steatosis to adipose tissue distribution in pediatric nonalcoholic fatty liver disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2006; 42: 83-88
- Tanoli T, Yue P, Yablonskiy D, Schonfeld G. Fatty liver in familial hypobetalipoproteinemia: roles of the APOB defects, intra-abdominal adipose tissue, and insulin sensitivity. *J Lipid Res* 2004; 45: 941-947
- Thomas EL, Hamilton G, Patel N, O'Dwyer R, Dore CJ, Goldin RD, Bell JD, Taylor-Robinson SD. Hepatic triglyceride content and its relation to body adiposity: a magnetic resonance imaging and proton magnetic resonance spectroscopy study. *Gut* 2005; 54: 122-127
- Szczepaniak LS, Nurenberg P, Leonard D, Browning JD, Reingold JS, Grundy S, Hobbs HH, Dobbins RL. Magnetic resonance spectroscopy to measure hepatic triglyceride content: prevalence of hepatic steatosis in the general population. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2005; 288: E462-468
- Cox IJ, Sharif A, Cobbald JF, Thomas HC, Taylor-Robinson SD. Current and future applications of in vitro magnetic resonance spectroscopy in hepatobiliary disease. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 4773-4783
- Lim AK, Patel N, Hamilton G, Hajnal JV, Goldin RD, Taylor-Robinson SD. The relationship of in vivo 31P MR spectroscopy to histology in chronic hepatitis C. *Hepatology* 2003; 37: 788-794
- Khan SA, Cox IJ, Hamilton G, Thomas HC, Taylor-Robinson SD. In vivo and in vitro nuclear magnetic resonance spectroscopy as a tool for investigating hepatobiliary disease: a review of H and P MRS applications. *Liver Int* 2005; 25: 273-281
- Corbin IR, Buist R, Peeling J, Zhang M, Uhanova J, Minuk GY. Hepatic 31P MRS in rat models of

#### ■名词解释

T1, T2: 如射频脉冲符合Larmor频率, 被激励的质子群发生共振, 宏观磁化矢量M离开平衡状态. 但脉冲停止后, 宏观磁化矢量M又自发地回复到平衡状态, 这个过程称之为“核磁驰豫”. 由于在驰豫过程中磁化矢量M强度并不恒定, 纵、横向部分必须分开讨论. 驰豫过程可用两个时间值描述, 即纵向驰豫时间(T1)和横向驰豫时间(T2).



## ■同行评价

本文对MRI在脂肪性肝病诊断方面的研究与应用作了较全面的综述,论点清晰,论据较充分,对于临床应用MRI诊断脂肪性肝病有一定的参考价值。

- chronic liver disease: assessing the extent and progression of disease. *Gut* 2003; 52: 1046-1053
- 21 Ishak K, Baptista A, Bianchi L, Callea F, De Groote J, Gudat F, Denk H, Desmet V, Korb G, MacSween RN. Histological grading and staging of chronic hepatitis. *J Hepatol* 1995; 22: 696-699
- 22 Cortez-Pinto H, Chatham J, Chacko VP, Arnold C, Rashid A, Diehl AM. Alterations in liver ATP homeostasis in human nonalcoholic steatohepatitis: a pilot study. *JAMA* 1999; 282: 1659-1664
- 23 van Wassenaeer-van Hall HN, van der Grond J, van Hattum J, Kooijman C, Hoogenraad TU, Mali WP. 31P magnetic resonance spectroscopy of the liver: correlation with standardized serum, clinical, and histological changes in diffuse liver disease. *Hepatology* 1995; 21: 443-449
- 24 Solga SF, Horska A, Clark JM, Diehl AM. Hepatic 31P magnetic resonance spectroscopy: a hepatologist's user guide. *Liver Int* 2005; 25: 490-500
- 25 Bellentani S, Bedogni G, Miglioli L, Tiribelli C. The epidemiology of fatty liver. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2004; 16: 1087-1093
- 26 Talwalkar JA. Shall we bury the sword? Imaging of hepatic fibrosis. *Gastroenterology* 2006; 131: 1669-1671
- 27 Lorenzen J, Sinkus R, Adam G. Elastography: Quantitative imaging modality of the elastic tissue properties. *Rofo* 2003; 175: 623-630
- 28 Suga M, Matsuda T, Minato K, Oshiro O, Chihara K, Okamoto J, Takizawa O, Komori M, Takahashi T. Measurement of in vivo local shear modulus using MR elastography multiple-phase patchwork offsets. *IEEE Trans Biomed Eng* 2003; 50: 908-915
- 29 Manduca A, Oliphant TE, Dresner MA, Mahowald JL, Kruse SA, Amromin E, Felmlee JP, Greenleaf JF, Ehman RL. Magnetic resonance elastography: non-invasive mapping of tissue elasticity. *Med Image Anal* 2001; 5: 237-254
- 30 Bieri O, Maderwald S, Ladd ME, Scheffler K. Balanced alternating steady-state elastography. *Magn Reson Med* 2006; 55: 233-241
- 31 Muthupillai R, Lomas DJ, Rossman PJ, Greenleaf JF, Manduca A, Ehman RL. Magnetic resonance elastography by direct visualization of propagating acoustic strain waves. *Science* 1995; 269: 1854-1857
- 32 Hamhaber U, Grieshaber FA, Nagel JH, Klose U. Comparison of quantitative shear wave MR-elastography with mechanical compression tests. *Magn Reson Med* 2003; 49: 71-77
- 33 Othman SF, Xu H, Royston TJ, Magin RL. Microscopic magnetic resonance elastography (microMRE). *Magn Reson Med* 2005; 54: 605-615
- 34 Rouviere O, Yin M, Dresner MA, Rossman PJ, Burgart LJ, Fidler JL, Ehman RL. MR elastography of the liver: preliminary results. *Radiology* 2006; 240: 440-448
- 35 Huwart L, Peeters F, Sinkus R, Annet L, Salameh N, ter Beek LC, Horsmans Y, Van Beers BE. Liver fibrosis: non-invasive assessment with MR elastography. *NMR Biomed* 2006; 19: 173-179
- 36 Bhakoo KK, Bell JD, Cox IJ, Taylor-Robinson SD. The application of magnetic resonance imaging and spectroscopy to gene therapy. *Methods Enzymol* 2004; 386: 303-313
- 37 Aguirre DA, Behling CA, Alpert E, Hassanein TI, Sirlin CB. Liver fibrosis: noninvasive diagnosis with double contrast material-enhanced MR imaging. *Radiology* 2006; 239: 425-437

编辑 何燕 电编 张敏

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2007年版权归世界华人消化杂志

## • 消息 •

## 世界华人消化杂志关于作者署名的声明

本刊讯 世界华人消化杂志要求所有署名人写清楚自己对文章的贡献。第一方面是直接参与,包括:(1)酝酿和设计实验;(2)采集数据;(3)分析/解释数据。第二方面是文章撰写,包括:(1)起草文章;(2)对文章的知识性内容作批评性审阅。第三方面是工作支持,包括:(1)统计分析;(2)获取研究经费;(3)行政、技术或材料支持;(4)指导;(5)支持性贡献。每个人必须在第一至第三方面至少具备一条,才能成为文章的署名作者。世界华人消化杂志不设置共同第一作者和共同通信作者。

# 肿瘤表观遗传学研究进展

郑丹, 刘彬彬, 刘银坤

郑丹, 刘彬彬, 刘银坤, 复旦大学上海医学院中山医院肝癌研究所 上海市 200032

郑丹, 复旦大学上海医学院肝癌研究所在读硕士, 主要从事肝细胞癌表观遗传学特征的研究。

国家自然科学基金资助项目, No. 30500484

通讯作者: 刘彬彬, 200032, 上海市, 复旦大学上海医学院中山医院肝癌研究所. eastank@sohu.com

电话: 021-64041990-2137

收稿日期: 2007-07-25 修回日期: 2007-08-19

## Research progress in the field of tumor epigenetics

Dan Zheng, Bin-Bin Liu, Yin-Kun Liu

Dan Zheng, Bin-Bin Liu, Yin-Kun Liu, Liver Cancer Institute, Zhongshan Hospital of Fudan University, Shanghai 200032, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30500484

Correspondence to: Bin-Bin Liu, Liver Cancer Institute, Zhongshan Hospital of Fudan University, Shanghai 200032, China. eastank@sohu.com

Received: 2007-07-25 Revised: 2007-08-19

## Abstract

A growing body of evidence suggests that almost all tumors result from both epigenetic abnormality and gene mutation, which then promote tumor progression. Epigenetic abnormality mainly includes changes in DNA methylation and the modification of histone. These two regulatory modes and the corresponding interacting network between them can lead to the loss of imprinting, chromatin remodeling, transcription of repeat sequences, abnormal activation of genes, and inactivation of tumor suppressors. Furthermore, they also have a vital role in aberrant cell proliferation and in the earliest stages of tumorigenesis. Research into yeast models provides a basis for a better understanding and definition of cancer stem cells and the relative molecular mechanisms that induce tumors. Research in the field of tumor epigenetics shows promise as a way to understand the various characteristics of tumors, to optimize the early diagnosis of tumors, and to improve the prognosis for patients with tumors.

Key Words: Epigenetics; Tumor; DNA methylation;

## Histone modification

Zheng D, Liu BB, Liu YK. Research progress in the field of tumor epigenetics. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007; 15(24): 2631-2637

## 摘要

对肿瘤研究的不断深入使人们认识到几乎所有人类肿瘤都是由表观遗传学异常与基因改变共同引起并促进其演变的。表观遗传学改变主要包括DNA甲基化改变和组蛋白修饰,这两种调控模式本身及之间的相互作用网络可导致印记丢失,染色质重塑,非必需重复序列的转录、基因的异常活化以及抑制肿瘤发生和演进基因的异常沉默等,在异常的克隆性增生和癌性增生的级联事件起始中发挥重要作用,在酵母模型中的研究更深入地理解了肿瘤干细胞的定义以及引起肿瘤的相关分子机制。表观遗传学的研究为进一步了解肿瘤的各种特性,优化肿瘤的早期诊断,改善肿瘤的预后提供了新的策略。

关键词: 表观遗传学; 肿瘤; DNA甲基化; 组蛋白修饰

郑丹, 刘彬彬, 刘银坤. 肿瘤表观遗传学研究进展. 世界华人消化杂志 2007;15(24):2631-2637

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/2631.asp>

## 0 引言

表观遗传是指表型状态发生改变而基因型未发生变化,有可逆潜能,但是在细胞分化期间通常保持稳定,是一种对肿瘤演进具有重要作用的可遗传的基因表达模式。他在整体上可以影响染色体的包装,局部则影响与肿瘤发生、发展相关的重要基因的转录。最新的研究表明,肿瘤表观遗传改变在干细胞的基因表达上发挥举足轻重的作用,通过DNA甲基化和组蛋白修饰协同作用促进肿瘤发生。

## 1 肿瘤表观遗传异常在肿瘤演进中的地位

研究表明,几乎所有类型的人类肿瘤中都存在

## ■背景资料

几乎所有人类肿瘤都是由表观遗传学异常与基因改变共同引起并促进其演变的。与染色质相关的异常变化常出现在恶性肿瘤产生之前。DNA甲基化改变和组蛋白修饰,这两种表观遗传学改变及之间相互作用网络可导致印记丢失,染色质重塑,基因的异常活化以及沉默等,在异常的克隆性增生和癌性增生的级联事件起始中发挥重要作用。

## ■ 研发前沿

目前倍受关注的就是由一系列甲基化修饰和组蛋白修饰导致的启动子区域CpG岛的高甲基化导致的抑癌基因转录沉默和癌基因低甲基化导致的过度激活,这也很可能是癌性增生的最初表现。最近人们认为染色体标记可能是同细胞谱系定型阶段相伴随的,或者可能是在这些阶段发挥控制作用。

表观遗传上的异常,这种改变可导致DNA结构功能的改变、非必需重复序列的转录、基因的异常活化、染色体复制调控机制的破坏以及抑制肿瘤发生和演进基因(其中涉及到经典的抑癌基因,肿瘤演进过程中的转录因子,组织重塑基因, DNA修复基因, 细胞周期调控基因, 抗凋亡基因以及在肿瘤发生中阻止异常发育通路活化的基因)的异常沉默等。在癌基因中进行的沉默基因的随机筛查表明在任何的肿瘤中都可能隐藏着异常沉默的基因<sup>[1]</sup>。通常基因的沉默只涉及到少数的基因,但最近的报道表明,在结肠癌中,基因的沉默涉及到染色体臂上的广泛区域<sup>[2]</sup>。这种大范围的基因沉默使基因群更易于发生染色质改变以及伴随的大量基因的转录抑制。然而抑癌基因功能的丢失更大程度上是由表观遗传的异常而不是基因的变化引起的<sup>[3]</sup>。染色质的凝集和修饰也控制基因表达的模式。在哺乳动物细胞中,存在一个动态的调控模式来调节基因CpG岛胞嘧啶的甲基化修饰、核小体重塑和一系列的组蛋白修饰,以保证DNA的正确组装从而调节转录抑制与激活之间的平衡。基因组DNA的高度甲基化是转录抑制的显著特征,高甲基化DNA处于一种紧密结构中,这种结构维持其抑制状态<sup>[4]</sup>。而处于转录活跃状态的基因启动子和一系列具有协同作用的调控基因则维持在一个较开放的转录构型状态。这种抑制或开放的状态与染色质的状态相关,其中涉及到组蛋白不同程度激活或抑制的修饰<sup>[5-6]</sup>。最近在基因组范围内对染色体标记的描述又有了新的进展,人们认为染色体标记可能是同细胞谱系定型阶段相伴随的,或者可能是在这些阶段发挥控制作用<sup>[7]</sup>。肿瘤表观遗传改变会影响干细胞表型的维持从而诱发肿瘤的生成;他还与衰老,应激反应等诱导细胞发生异常克隆的肿瘤诱因相关。这些信息将有利于理解表观遗传学改变在异常的克隆性增生和癌性增生的级联事件的起始中发挥的重要作用。

## 2 肿瘤细胞表观遗传学异常的分子机制

**2.1 印记丢失** 肿瘤表观遗传学异常的提出源于在肿瘤中发现了遗传印记的异常。遗传印记是指来自父母双方的等位基因在通过精子和卵子传递给子代时发生了修饰,使带有亲代印记的等位基因具有不同的表达特性。正常的基因印记受DNA甲基化和组蛋白乙酰化和甲基化修饰的调控,以保证父系基因的决定地位,即一对等

位基因中一个发生转录而另外一个受到抑制。肿瘤中一些基因丢失其遗传印记后会导致异常情况发生,比如两个等位基因在肿瘤中共表达。印记丢失引起的肿瘤发生可以在胚胎衍生的过程中找到明确的证据:胚胎在只具有母系来源的染色体的情况下将形成卵巢畸胎瘤,而在只具有父系染色体的情况下则形成了葡萄胎。在成人肿瘤中研究最明确的就是类胰岛素生长因子2(IGF2)基因,当他的等位基因发生共表达后则会产生一个过度强效的生长因子<sup>[8]</sup>。IGF2的印记丢失可在结肠癌的患者正常结肠上皮中发现,与不断增高的结肠癌风险相关<sup>[9]</sup>。另一个例子是Wilm's瘤, IGF2的印记丢失后产生了一种异常的未分化细胞,这种细胞可以不断的增生并且不受相关的修复和调控基因的影响,从而引发肾癌。IGF2基因印记丢失的机制包括H19基因启动子甲基化的异常增多而导致其转录沉默以及位于同一个染色体远端的增强子发生转移等<sup>[10]</sup>。

最近Holm *et al*<sup>[11]</sup>通过破坏DNA甲基化转移酶DNMT1暂时诱导基因组DNA脱甲基化,从而建立了一个基因印记丢失的小鼠模型。从这些小鼠获得的成纤维细胞可在免疫缺陷型小鼠身上形成肿瘤而且还具有体外永生的特性。当这些细胞在转入H-Ras癌基因后可以被完全诱导同步化。Holm认为单独的印记丢失就可以使细胞形成癌性增生,细胞通过印记丢失降低了其转化为永生性细胞的域值。在没有基因突变的情况下,可遗传基因表达模式的变化导致干细胞的异常增生,并进一步诱发肿瘤的发生、发展。

**2.2 DNA甲基化** 肿瘤表观遗传学异常以DNA甲基化模式的改变为主,包括整体基因组的低甲基化和启动子的高甲基化,目前倍受关注的就是启动子区域CpG岛的高甲基化导致的抑癌基因转录沉默,这也很可能是癌性增生的最初表现。Issa *et al*<sup>[12]</sup>证实了CpG岛甲基化表型(CpG island methylator phenotype, CIMP)的存在,其特征是同时存在的多种基因具有肿瘤特异性的CpG岛甲基化。常见的抑癌基因p16<sup>ink4A</sup>就是由于启动子区域CpG岛的高甲基化而丧失功能<sup>[13]</sup>。来自基因敲除小鼠的数据显示该基因的丢失可以延长干细胞的寿命<sup>[14]</sup>。p16<sup>ink4A</sup>的丢失以及随之产生的基因不稳定状态使早期的癌性增生易于发生<sup>[15]</sup>。

与肿瘤异常甲基化状态相关的DNA甲基化转移酶DNMTs,通过共价的形式在CpG岛的胞嘧啶上结合一个甲基基团。使用5-aza-2-

deoxycytidine(胞嘧啶类似物)抑制DNMT的活性后,可延缓小鼠肺癌模型中的癌性增生<sup>[16]</sup>。在胃,膀胱,非白血性白血病,大肠,肺等各种组织类型的肿瘤中DNMT蛋白和活动水平都提高。哺乳动物的DNA甲基化模式多来自于对正常小鼠的研究。任何一种Dnmt基因(Dnmt1, Dnmt3a, Dnmt3b)的纯合型缺失对小鼠都是致死性的<sup>[17]</sup>。研究表明Dnmt3a, Dnmt3b的缺失阻止了从头甲基化,而Dnmt1缺失导致大量DNA去甲基化,反映了Dnmt1的维持甲基化的作用<sup>[18]</sup>。然而在结肠癌和其他肿瘤细胞中同时运用基因敲除和RNA干扰技术方法去除Dnmt1<sup>[19]</sup>后,发现严重的Dnmt1的缺失却只使整体DNA甲基化水平产生了微弱的减少,沉默的抑癌基因也未检测到有重新表达<sup>[20]</sup>。Yan *et al*<sup>[21]</sup>的研究发现了MDA-MB-231和Hs578t这2株乳腺癌细胞需要DNMT1来维持雌激素受体的甲基化和抑制状态。这种对DNMT1不同需要量的机制可能涉及到人类肿瘤细胞中的DNMTs之间在维持DNA甲基化时具有协同效应。从DNMT1<sup>-/-</sup>的大肠癌细胞HCT116中敲除从头甲基化酶DNMT3b,可导致95%的基因组5-甲基化胞嘧啶去甲基化,全部启动子去甲基化以及沉默基因的重新表达<sup>[22]</sup>。尽管DNMT1对于未甲基化的物质几乎没有从头甲基化活性,但其过度表达依然导致了人类成纤维细胞中的CpG岛序列的从头甲基化。未甲基化的人类CpG岛是DNMT1从头甲基化活性的良好的底物<sup>[23]</sup>。因此DNMT1很可能在肿瘤细胞中有引发CpG岛的异常高甲基化的能力。

**2.3 组蛋白修饰与染色质重塑** 组蛋白是核小体的重要组成部分。核小体由147个DNA碱基对包裹在核心组蛋白(H2A, H2B, H3, H4)上组成,核小体中组蛋白和147个DNA碱基的位置以及组蛋白的修饰(包括赖氨酸乙酰化,赖氨酸和精氨酸甲基化,丝氨酸和苏氨酸磷酸化,谷氨酸ADP核糖基化,赖氨酸泛素化)对维持基因的表达模式和染色体正常的结构功能发挥作用,以此来调控正常的表观遗传。核小体的这些组分处于一个精细的稳定状态,任何外界微小变化就会对细胞表型和转录模式产生巨大的影响。在酵母中,组蛋白SIR2单个拷贝的变化就可以引起一个区带的基因发生转录沉默,如果发生在染色体着丝点将会影响更多的基因<sup>[24]</sup>。

对于DNA包装来说,组蛋白修饰和DNA甲基化之间有密切的联系。研究表明选择型组蛋白去乙酰化酶HDACs I 和 II、各种DNMTs的

复合体、特定甲基化CpG序列结合的蛋白质家族MBDs之间相互关联<sup>[25]</sup>。MBDs具有特异结合基因启动子的能力,和DNA高甲基化和肿瘤中异常沉默的基因相关。转录活跃的基因由乙酰化组蛋白包围,转录抑制的基因就由去乙酰化组蛋白包围<sup>[26]</sup>。在调控基因转录时甲基化和赖氨酸乙酰化虽然相互协作,但甲基化是占主导地位的。例如必须在抑制 I 和 II 型HDACs之前首先用去甲基化因素减少甲基化,才能有效的激活转录<sup>[1]</sup>;去甲基化也可导致MBDs蛋白以及HDACs从启动子里释放。

组蛋白乙酰基转移酶(HATs)和组蛋白去乙酰化酶(HDACs)相互作用调节组蛋白乙酰化的平衡,同时组蛋白甲基化转移酶(HMTs)和组蛋白去甲基化酶有效的调控着组蛋白甲基化<sup>[27]</sup>。组蛋白赖氨酸乙酰化与转录激活相关联,而这些残基的甲基化则同时与激活以及抑制状态有关<sup>[28]</sup>。组蛋白乙酰化和甲基化模式通过不同的效应蛋白而体现,含有bromo结构域的蛋白质,可以识别乙酰化的赖氨酸残基和chromo结构域,从而结合到甲基化的赖氨酸残基上,作用于组蛋白并引起基因转录。赖氨酸甲基化有单甲基化,双甲基化以及三甲基化3种不同的形式,他们显著扩大了组蛋白复合体的密码信息。比如,H3K9乙酰化和H3K4甲基化是表达的活跃标志;而H3K9和H3K27的单、双和三甲基化的大量出现则是转录抑制相关的组蛋白甲基化的标志。H3K9的三甲基化和异染色质的高度紧密的结构相关,H3K9双甲基化和常染色质的沉默相关,H3K27甲基化则与♀哺乳动物的X染色体的失活相关<sup>[26]</sup>。从果蝇属到人类H3K27甲基化均由一种蛋白质复合体PcG(polycomb protein complexes)定位,PcG参与调节基因的长期沉默,在癌基因沉默的起始也具有重要作用<sup>[29]</sup>。这种复合体至少有4个组群,包括维持复合体PRC1(RNF2, HPC, ECR, BMI1组成)和起始复合体(从PRC2到PRC4)。PRC2复合物中EZH2的SET结构域可以催化H3K27和H1K26的甲基化,而在所有的高甲基化的DNA和癌基因的启动子区域都可以发现H3K27甲基化<sup>[26]</sup>。EZH2的表达水平和前列腺癌和乳腺癌的发生及预后相关<sup>[30]</sup>。PRC2的另一个复合物SUZ12,在结肠癌,乳腺癌以及肝癌中表达上调<sup>[15]</sup>。也有报道称PRC1的组分Bmi1在肿瘤中表达增加并且导致造血系统和脑部的异常的克隆增生<sup>[31]</sup>。最近一些研究还认为EZH2和Bmi1作用还与DNMTs相关<sup>[32]</sup>,导致DNA高甲基化和

#### ■ 相关报道

最近Guillermo Barreto *et al*报道了Gadd45 $\alpha$ (生长抑制和DNA损伤诱导蛋白45  $\alpha$ ),一种涉及基因组稳定,DNA修复&细胞生长抑制的核蛋白,在促进DNA去甲基化过程中发挥重要作用。Gadd45 $\alpha$ 通过DNA修复解除基因表观遗传学沉默,其过表达激活去甲基化信号质粒(methylation-silenced reporter plasmids)同时促进整体基因组去甲基化。

## ■创新盘点

本文阐述了肿瘤表观遗传改变在干细胞的基因表达中举足轻重的作用,通过DNA甲基化和组蛋白修饰协同作用促进肿瘤发生。同时强调了“肿瘤干细胞”的新观点,认为肿瘤增生是由肿瘤干细胞引起的,肿瘤干细胞内的一些分子可以促进肿瘤的发展。本文还进一步系统阐述了早期肿瘤表观遗传改变调控的潜在性网络。

基因沉默。

2.4 早期肿瘤表观遗传改变调控的潜在性网络  
表观遗传学改变在干细胞的异常克隆性增生以及肿瘤的易感性等方面发挥关键性作用。对慢性炎症导致肿瘤的研究人们发现肿瘤的表现遗传调控具有一个潜在性的网络(图1)。正常组织对细胞应激和损伤的应答是暂时的,通过反馈通路调控对应激的抵抗力,细胞更新,组织修复和凋亡反应之间相互协调。其中凋亡反应取决于p53基因介导的细胞周期检查点机制,增加能够产生DNA损伤的活性氧而抑制细胞存活<sup>[33]</sup>。然而慢性暴露于应激状态下则引起上述应答反应的异常延长从而可能导致异常的克隆增生。这种异常的应答反应涉及SIRT1的持续性增加,抑癌基因p53的转录抑制以及抑癌基因HIC1的沉默。SIRT1是一个多功能的应激敏感蛋白,是组蛋白去乙酰化酶(HDACs)III的一种,其去乙酰化活性参与了p53基因的翻译后修饰从而下调了p53基因的转录活性<sup>[34]</sup>。HIC1基因是锌指结构域的一个成员,包含转录抑制物POZ家族。他本身也是一个p53基因的转录激活目标<sup>[35]</sup>。HIC1和SIRT1组成一个复合体并向SIRT1启动子聚集,抑制SIRT1的转录<sup>[36]</sup>。

实验证明, HIC1基因纯合型敲除的小鼠具有多种致命的上皮缺陷,在胚胎性成纤维细胞中SIRT1的水平增高8倍;杂合型小鼠则具有肿瘤易感性。这表明HIC1基因功能的表现遗传丢失可以增加SIRT1,从而降低p53基因对正常细胞的作用。研究发现增加SIRT1家族中的Sir2基因的一个拷贝,就可以延长有机体包括从新杆状线虫到哺乳动物的细胞寿命。HIC1缺陷的小鼠和人类肿瘤细胞在对DNA损伤引发的凋亡应答过程中,都有p53的减少和SIRT1的增加。HIC1基因表达异常可以抑制凋亡反应并延长细胞寿命,从而使早期异常克隆性增生易于发生。

SIRT1还可以进一步引起其他的表现遗传学改变。如SIRT1去乙酰化可导致染色体末端着丝点和配对区域基因的转录沉默,并且维持这种抑制的状态<sup>[37]</sup>。Pruitt *et al*<sup>[38]</sup>诱导降低SIRT1的活性,发现可以使这些沉默基因的重新表达。这一过程涉及到了Wnt发育信号通路<sup>[39]</sup>。Wnt发育信号通路对成人细胞更新时干细胞的扩增以及维持具有重要作用。在结肠癌中,由于对抗Wnt信号通路的SFRPs基因家族(编码细胞表面的膜蛋白)<sup>[40]</sup>首先发生了基因沉默<sup>[41]</sup>,随后当下游通路基因(如APC和 $\beta$ -catenin)突变时因缺少拮抗作

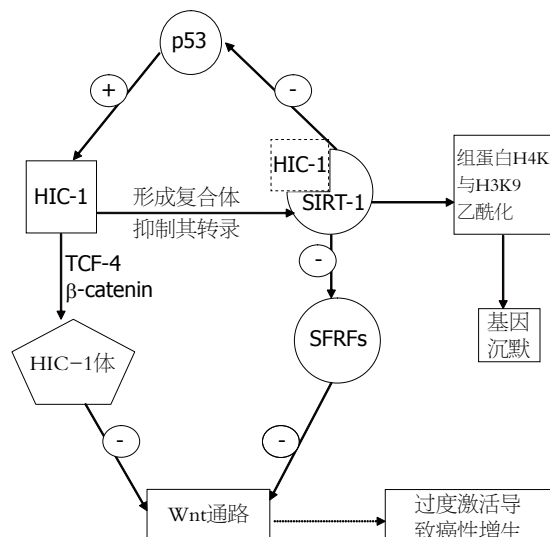


图1 早期肿瘤表观遗传改变的调控的潜在性网络。

用而使Wnt通路被过度激活,从而促进了肿瘤的发展<sup>[42]</sup>。在肿瘤细胞中实验性的敲除SIRT1可以使已经沉默的对抗Wnt通路的基因(SFRPs)的重新激活,从而逆转了在乳腺癌和结肠癌细胞中的Wnt通路的过度激活。值得一提的是HIC1基因的表现遗传沉默也涉及到其他路径, HIC1基因沉默后可导致Wnt通路的过度激活。HIC1结合TCF-4后可以募集 $\beta$ -catenin到紧凑的核结构上,构成HIC1体,就会妨碍驱动正常的Wnt通路的正常核 $\beta$ -catenin-TCF复合体的形成<sup>[43]</sup>。另一方面, SIRT1和PcG复合物在肿瘤中异常的基因沉默维持过程中可能共同发挥重要作用。SIRT1作用的具体机制以及SIRT1在建立和维持DNA甲基化的整体作用越来越被人们重视<sup>[44]</sup>。

## 3 肿瘤表观遗传学在干细胞以及酵母模型中的研究

关于“肿瘤干细胞”,过去的观点认为成熟的干细胞发生异常的克隆增生,这导致了细胞异质性的不断增强,因此很多肿瘤就呈现出一系列的演进步骤<sup>[45]</sup>。新的观点强调肿瘤增生是由肿瘤干细胞引起的,肿瘤干细胞内的一些分子可以促进肿瘤的发展。例如,特定干细胞基因Oct4的过表达可以促进肠和其他器官的上皮细胞的肿瘤迅速发生<sup>[46]</sup>。

最近一些报道表明胚胎干细胞可以通过染色体的组建来保持自身的状态。在鼠和人的胚胎干细胞中,细胞干细胞化的转录因子,包括OCT4, NANOG和SOX2,都定位在一个限制性的启动子区域<sup>[7]</sup>。这些转录因子、细胞增殖调控



基因、组织分化调控基因等都普遍和干细胞的多潜能性相关。他们在干细胞中大部分保持一种低表达的状态, 他们近侧的启动子区包含PcG蛋白和重要的抑制标志-三甲基化的H3K23。胚胎发育状态的稳定依赖于基因的表达模式。例如当基因需要表达的时候, 这种PcG的影响可以被逆转或消失<sup>[5]</sup>。直到细胞后续的成熟阶段或在成熟细胞的分化阶段, PcG复合物的作用可能重新发挥, 保持长时间的基因沉默<sup>[47]</sup>。PcG蛋白保持一个精确协调的、可塑的基因表达模式, 其诱导的染色体标记在胚胎发育过程中能够保持干细胞和分化发育细胞表型之间的平衡。

PcG在正常的干细胞中的最开始的标记很可能涉及到一类非编码RNA。从植物到酵母的研究证实了是由这类非编码RNA参与而触发了转录抑制<sup>[48]</sup>。在酵母中这种RNA可以作用于组蛋白修饰性酶, 特别是催化H3K9和H3K27的酶类参与并触发了转录抑制。最近的研究认为HDACs在酵母转录沉默最初建立的过程中扮演重要的角色<sup>[49]</sup>, 同时一些研究发现dsRNA作用于基因的启动子区可以重建哺乳动物模型中的基因沉默<sup>[50]</sup>。在这种类型的沉默中可以发现在组蛋白H3K9上抑制性标记明显增多<sup>[51]</sup>。这种dsRNA依赖的转录抑制(RdTS)是否直接和DNA的甲基化相关还有待进一步的证实。但RdTS和组蛋白修饰之间的有力的联系预示着RdTS可能是一种内源性的机制, 细胞通过这个机制建立表观遗传调控。

总之, 尽管肿瘤表观遗传学的研究进展十分迅速, 仍有许多分子机制和人类肿瘤发生演进的关系有待更深入的了解。表观遗传学的研究为进一步了解肿瘤的各种特性, 优化肿瘤的早期诊断, 丰富肿瘤的治疗方式, 改善肿瘤的预后提供了新的策略, 具有重要的临床治疗意义。无论从基础研究还是从临床研究的角度, 表观遗传学状态的建立和平衡维持都将我们对肿瘤的研究带进了一个崭新的时代, 也为我们指明了一个新的有潜力的方向。

#### 4 参考文献

- 1 Suzuki H, Gabrielson E, Chen W, Anbazhagan R, van Engeland M, Weijenberg MP, Herman JG, Baylin SB. A genomic screen for genes upregulated by demethylation and histone deacetylase inhibition in human colorectal cancer. *Nat Genet* 2002; 31: 141-149
- 2 Frigola J, Song J, Stirzaker C, Hinshelwood RA, Peinado MA, Clark SJ. Epigenetic remodeling

in colorectal cancer results in coordinate gene suppression across an entire chromosome band. *Nat Genet* 2006; 38: 540-549

- 3 Jones PA, Baylin SB. The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat Rev Genet* 2002; 3: 415-428
- 4 Robertson KD. DNA methylation and human disease. *Nat Rev Genet* 2005; 6: 597-610
- 5 Bernstein BE, Mikkelsen TS, Xie X, Kamal M, Huebert DJ, Cuff J, Fry B, Meissner A, Wernig M, Plath K, Jaenisch R, Wagschal A, Feil R, Schreiber SL, Lander ES. A bivalent chromatin structure marks key developmental genes in embryonic stem cells. *Cell* 2006; 125: 315-326
- 6 Boyer LA, Plath K, Zeitlinger J, Brambrink T, Medeiros LA, Lee TI, Levine SS, Wernig M, Tajonar A, Ray MK, Bell GW, Otte AP, Vidal M, Gifford DK, Young RA, Jaenisch R. Polycomb complexes repress developmental regulators in murine embryonic stem cells. *Nature* 2006; 441: 349-353
- 7 Lee TI, Jenner RG, Boyer LA, Guenther MG, Levine SS, Kumar RM, Chevalier B, Johnstone SE, Cole MF, Isono K, Koseki H, Fuchikami T, Abe K, Murray HL, Zucker JP, Yuan B, Bell GW, Herbolzheimer E, Hannett NM, Sun K, Odom DT, Otte AP, Volkert TL, Bartel DP, Melton DA, Gifford DK, Jaenisch R, Young RA. Control of developmental regulators by Polycomb in human embryonic stem cells. *Cell* 2006; 125: 301-313
- 8 Feinberg AP, Ohlsson R, Henikoff S. The epigenetic progenitor origin of human cancer. *Nat Rev Genet* 2006; 7: 21-33
- 9 Sakatani T, Kaneda A, Iacobuzio-Donahue CA, Carter MG, de Boom 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
- 10 Kato Y, Sasaki H. Imprinting and looping: epigenetic marks control interactions between regulatory elements. *Bioessays* 2005; 27: 1-4
- 11 Holm TM, Jackson-Grusby L, Brambrink T, Yamada Y, Rideout WM 3rd, Jaenisch R. Global loss of imprinting leads to widespread tumorigenesis in adult mice. *Cancer Cell* 2005; 8: 275-285
- 12 Issa JP. CpG island methylator phenotype in cancer. *Nat Rev Cancer* 2004; 4: 988-993
- 13 Belinsky SA. Gene-promoter hypermethylation as a biomarker in lung cancer. *Nat Rev Cancer* 2004; 4: 707-717
- 14 Janzen V, Forkert R, Fleming HE, Saito Y, Waring MT, Dombkowski DM, Cheng T, DePinho RA, Sharpless NE, Scadden DT. Stem-cell ageing modified by the cyclin-dependent kinase inhibitor p16INK4a. *Nature* 2006; 443: 421-426
- 15 Reynolds PA, Sigaroudinia M, Zardo G, Wilson MB, Benton GM, Miller CJ, Hong C, Fridlyand J, Costello JF, Tlsty TD. Tumor suppressor p16INK4A regulates polycomb-mediated DNA hypermethylation in human mammary epithelial cells. *J Biol Chem* 2006; 281: 24790-24802
- 16 Belinsky SA, Nikula KJ, Baylin SB, Issa JP. Increased cytosine DNA-methyltransferase activity is target-cell-specific and an early event in lung cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93: 4045-4050
- 17 Okano M, Bell DW, Haber DA, Li E. DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are

#### ■应用要点

对于染色质结构, 组蛋白修饰, DNA甲基化研究的深入, 以及肿瘤表观遗传学改变的可逆性, 为人们提供了新的肿瘤的治疗方法和预防策略。异常的表观遗传学修饰可能成为肿瘤治疗的新靶点, 同时异常DNA甲基化模式提供了三个强有力的诊断应用: 分级标志物、敏感检测标志物、风险评估标志物。

# ■名词解释

染色质重塑: 指在能量驱动下核小体的置换或重新排列, 暴露基因转录启动子区中的顺式作用元件, 增加了转录因子和启动子的可接近性从而导致基因活化和转录。他主要有2种类型: 一是依赖ATP的物理修饰; 二是共价化学修饰: 多发生在组蛋白N末端尾巴, 尤其组蛋白H3和H4的修饰, 包括乙酰化、磷酸化、甲基化和泛素化等, 他们控制着基因转录和其他染色质调控过程。

- essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell* 1999; 99: 247-257
- 18 Gruenbaum Y, Cedar H, Razin A. Substrate and sequence specificity of a eukaryotic DNA methylase. *Nature* 1982; 295: 620-622
- 19 Ting AH, Jair KW, Schuebel KE, Baylin SB. Differential requirement for DNA methyltransferase 1 in maintaining human cancer cell gene promoter hypermethylation. *Cancer Res* 2006; 66: 729-735
- 20 Suzuki H, Watkins DN, Jair KW, Schuebel KE, Markowitz SD, Chen WD, Pretlow TP, Yang B, Akiyama Y, Van Engeland M, Toyota M, Tokino T, Hinoda Y, Imai K, Herman JG, Baylin SB. Epigenetic inactivation of SFRP genes allows constitutive WNT signaling in colorectal cancer. *Nat Genet* 2004; 36: 417-422
- 21 Yan L, Nass SJ, Smith D, Nelson WG, Herman JG, Davidson NE. Specific inhibition of DNMT1 by antisense oligonucleotides induces re-expression of estrogen receptor-alpha (ER) in ER-negative human breast cancer cell lines. *Cancer Biol Ther* 2003; 2: 552-556
- 22 Suzuki M, Sunaga N, Shames DS, Toyooka S, Gazdar AF, Minna JD. RNA interference-mediated knockdown of DNA methyltransferase 1 leads to promoter demethylation and gene re-expression in human lung and breast cancer cells. *Cancer Res* 2004; 64: 3137-3143
- 23 Jair KW, Bachman KE, Suzuki H, Ting AH, Rhee I, Yen RW, Baylin SB, Schuebel KE. De novo CpG island methylation in human cancer cells. *Cancer Res* 2006; 66: 682-692
- 24 Kimura A, Umehara T, Horikoshi M. Chromosomal gradient of histone acetylation established by Sas2p and Sir2p functions as a shield against gene silencing. *Nat Genet* 2002; 32: 370-377
- 25 Burgers WA, Fuks F, Kouzarides T. DNA methyltransferases get connected to chromatin. *Trends Genet* 2002; 18: 275-277
- 26 McGarvey KM, Fahrner JA, Greene E, Martens J, Jenuwein T, Baylin SB. Silenced tumor suppressor genes reactivated by DNA demethylation do not return to a fully euchromatic chromatin state. *Cancer Res* 2006; 66: 3541-3549
- 27 Yamane K, Toumazou C, Tsukada Y, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Wong J, Zhang Y. JHDM2A, a JmJC-containing H3K9 demethylase, facilitates transcription activation by androgen receptor. *Cell* 2006; 125: 483-495
- 28 Briggs SD, Xiao T, Sun ZW, Caldwell JA, Shabanowitz J, Hunt DF, Allis CD, Strahl BD. Gene silencing: trans-histone regulatory pathway in chromatin. *Nature* 2002; 418: 498
- 29 Pirrotta V, Gross DS. Epigenetic silencing mechanisms in budding yeast and fruit fly: different paths, same destinations. *Mol Cell* 2005; 18: 395-398
- 30 Matsukawa Y, Semba S, Kato H, Ito A, Yanagihara K, Yokozaki H. Expression of the enhancer of zeste homolog 2 is correlated with poor prognosis in human gastric cancer. *Cancer Sci* 2006; 97: 484-491
- 31 Bruggeman SW, Valk-Lingbeek ME, van der Stoep PP, Jacobs JJ, Kieboom K, Tanger E, Hulsman D, Leung C, Arsenijevic Y, Marino S, van Lohuizen M. Ink4a and Arf differentially affect cell proliferation and neural stem cell self-renewal in Bmi1-deficient mice. *Genes Dev* 2005; 19: 1438-1443
- 32 Vire E, Brenner C, Deplus R, Blanchon L, Fraga M, Didelot C, Morey L, Van Eynde A, Bernard D, Vanderwinden JM, Bollen M, Esteller M, Di Croce L, de Launoit Y, Fuks F. The Polycomb group protein EZH2 directly controls DNA methylation. *Nature* 2006; 439: 871-874
- 33 Lu H, Ouyang W, Huang C. Inflammation, a key event in cancer development. *Mol Cancer Res* 2006; 4: 221-233
- 34 Langley E, Pearson M, Faretta M, Bauer UM, Frye RA, Minucci S, Pelicci PG, Kouzarides T. Human SIR2 deacetylates p53 and antagonizes PML/p53-induced cellular senescence. *EMBO J* 2002; 21: 2383-2396
- 35 Guerardel C, Deltour S, Pinte S, Monte D, Begue A, Godwin AK, Leprince D. Identification in the human candidate tumor suppressor gene HIC-1 of a new major alternative TATA-less promoter positively regulated by p53. *J Biol Chem* 2001; 276: 3078-3089
- 36 Chen WY, Wang DH, Yen RC, Luo J, Gu W, Baylin SB. Tumor suppressor HIC1 directly regulates SIRT1 to modulate p53-dependent DNA-damage responses. *Cell* 2005; 123: 437-448
- 37 Suka N, Luo K, Grunstein M. Sir2p and Sas2p opposingly regulate acetylation of yeast histone H4 lysine16 and spreading of heterochromatin. *Nat Genet* 2002; 32: 378-383
- 38 Pruitt K, Zinn RL, Ohm JE, McGarvey KM, Kang SH, Watkins DN, Herman JG, Baylin SB. Inhibition of SIRT1 reactivates silenced cancer genes without loss of promoter DNA hypermethylation. *PLoS Genet* 2006; 2: e40
- 39 Gregorieff A, Clevers H. Wnt signaling in the intestinal epithelium: from endoderm to cancer. *Genes Dev* 2005; 19: 877-890
- 40 Lacher MD, Siegenthaler A, Jager R, Yan X, Hett S, Xuan L, Saurer S, Lareu RR, Dharmarajan AM, Friis R. Role of DDC-4/sFRP-4, a secreted frizzled-related protein, at the onset of apoptosis in mammary involution. *Cell Death Differ* 2003; 10: 528-538
- 41 Akino K, Toyota M, Suzuki H, Mita H, Sasaki Y, Ohe-Toyota M, Issa JP, Hinoda Y, Imai K, Tokino T. The Ras effector RASSF2 is a novel tumor-suppressor gene in human colorectal cancer. *Gastroenterology* 2005; 129: 156-169
- 42 Baylin SB, Ohm JE. Epigenetic gene silencing in cancer - a mechanism for early oncogenic pathway addiction? *Nat Rev Cancer* 2006; 6: 107-116
- 43 Valenta T, Lukas J, Doubravska L, Fafulek B, Korinek V. HIC1 attenuates Wnt signaling by recruitment of TCF-4 and beta-catenin to the nuclear bodies. *EMBO J* 2006; 25: 2326-2337
- 44 Kuzmichev A, Margueron R, Vaquero A, Preissner TS, Scher M, Kirmizis A, Ouyang X, Brockdorff N, Abate-Shen C, Farnham P, Reinberg D. Composition and histone substrates of polycomb repressive group complexes change during cellular differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102: 1859-1864
- 45 Valk-Lingbeek ME, Bruggeman SW, van Lohuizen M. Stem cells and cancer; the polycomb connection. *Cell* 2004; 118: 409-418
- 46 Hochedlinger K, Yamada Y, Beard C, Jaenisch R. Ectopic expression of Oct-4 blocks progenitor-cell differentiation and causes dysplasia in epithelial

- tissues. *Cell* 2005; 121: 465-477
- 47 Ringrose L, Paro R. Epigenetic regulation of cellular memory by the Polycomb and Trithorax group proteins. *Annu Rev Genet* 2004; 38: 413-443
- 48 Cam H, Grewal SI. RNA interference and epigenetic control of heterochromatin assembly in fission yeast. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 2004; 69: 419-427
- 49 Yamada T, Fischle W, Sugiyama T, Allis CD, Grewal SI. The nucleation and maintenance of heterochromatin by a histone deacetylase in fission yeast. *Mol Cell* 2005; 20: 173-185
- 50 Ting AH, Schuebel KE, Herman JG, Baylin SB. Short double-stranded RNA induces transcriptional gene silencing in human cancer cells in the absence of DNA methylation. *Nat Genet* 2005; 37: 906-910
- 51 Morris KV, Chan SW, Jacobsen SE, Looney DJ. Small interfering RNA-induced transcriptional gene silencing in human cells. *Science* 2004; 305: 1289-1292

编辑 程剑侠 电编 张敏

## ■同行评价

本文论述了肿瘤表观遗传学的研究进展, 题目和内容相应, 摘要简明扼要, 文章层次分明, 内容新颖, 反映了表观遗传学方面的进展, 参考文献较新, 而且文献来源杂志级别较高, 有较高的学术价值。

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2007年版权归世界华人消化杂志

## • 消息 •



APASL 2008 Seoul

**The 18<sup>th</sup> Conference of the Asian Pacific Association for the Study of the Liver**

March 23 (Sun) - 26 (Wed), 2008

COEX Convention Center, Seoul, Korea

Online abstract submission and registration is available at [www.apaslseoul2008.org](http://www.apaslseoul2008.org)**Tentative Scientific Program****1** Postgraduate Courses: Viral Hepatitis; present and future

**2** Symposia: Liver cancer: a critical reappraisal of current practice; New insights in NAFLD; New therapeutic approach to HCC; Therapy for viral hepatitis: promises and pitfalls; Management for complications of liver cirrhosis; Liver pathology: an update; Metabolic and autoimmune liver diseases

**3** Plenary Presentations**4** New APASL Guideline of Chronic Hepatitis B Treatment**5** Research Workshop**6** State-of-the-art Lectures**7** Imaging Courses**8** Surgical Hepatology/ Transplantation**9** Endoscopy Course**10** AASLD-APASL Joint Workshop**Contact:** APASL 2008 Seoul Secretariat, Tel: +82-2-3452-7241/Fax: +82-2-521-8683,E-mail: [info@apaslseoul2008.org](mailto:info@apaslseoul2008.org)[www.wjgnet.com](http://www.wjgnet.com)

# 延迟的丙酮酸乙酯治疗对重症急性胰腺炎大鼠胰外脏器损伤的影响及其机制

杨智勇, 凌燕, 陶京, 周峰, 熊炯炘, 吴河水, 王春友

## ■背景资料

重症急性胰腺炎发病凶险, 死亡率极高。其早期死亡多与全身炎症反应所致的多器官功能不全密切相关。因此早期调控炎症和保护脏器功能具有十分重要的意义。

杨智勇, 凌燕, 陶京, 周峰, 熊炯炘, 吴河水, 王春友, 华中科技大学同济医学院附属协和医院胰腺外科 湖北省武汉市 430022

国家自然科学基金资助项目, No. 30600593

通讯作者: 杨智勇, 430022, 湖北省武汉市解放大道1277号, 华中科技大学同济医学院附属协和医院胰腺外科. dryzy@163.com  
电话: 027-85351621

收稿日期: 2007-06-14 修回日期: 2007-08-18

## Effects and mechanism of delayed ethyl pyruvate therapy on distant organ injury in rats with severe acute pancreatitis

Zhi-Yong Yang, Yan Ling, Jing Tao, Feng Zhou, Jiong-Xin Xiong, He-Shui Wu, Chun-You Wang

Zhi-Yong Yang, Yan Ling, Jing Tao, Feng Zhou, Jiong-Xin Xiong, He-Shui Wu, Chun-You Wang, Department of Pancreatic Surgery, Union Hospital Affiliated to Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, Hubei Province, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30600593

Correspondence to: Zhi-Yong Yang, Department of Pancreatic Surgery, Union Hospital Affiliated to Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, 1277 Jiefang Road, Wuhan 430022, Hubei Province, China. dryzy@163.com

Received: 2007-06-14 Revised: 2007-08-18

## Abstract

**AIM:** To investigate the effects of delayed ethyl pyruvate (EP) delivery on distant organ injury and serum high mobility group box protein 1 (HMGB1) levels in rats with severe acute pancreatitis (SAP).

**METHODS:** The SAP animal model was induced by retrograde injection of artificial bile into the pancreatic duct in rats. Rats were randomly divided into three groups; sham, AHNP and delayed EP treatment ( $n = 32$  in each group). Rats in the delayed EP treatment group received EP (30 mg/kg) at 12, 18 and 30 hours after induction of SAP. Animals were sacrificed and samples were obtained at 24 and 48 hours after induction of SAP. Levels of serum HMGB1,

aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), blood urea nitrogen (BUN), and creatinine (Cr) were measured. Lung wet-to-dry weight (W/D) ratio and histological score were calculated to evaluate lung injury.

**RESULTS:** Delayed EP treatment significantly reduced serum HMGB1 levels and protected against liver, kidney and lung injury, with a reduced lung W/D ratio ( $8.22 \pm 0.42$  vs  $9.76 \pm 0.45$ ,  $P < 0.01$ ), pulmonary histological score ( $7.1 \pm 0.7$  vs  $8.4 \pm 1.1$ ,  $P < 0.01$ ), serum AST ( $667 \pm 103$  IU/L vs  $1368 \pm 271$  IU/L,  $P < 0.01$ ), ALT ( $446 \pm 91$  IU/L vs  $653 \pm 98$  IU/L,  $P < 0.01$ ), BUN ( $38 \pm 4$  mg/dL vs  $41 \pm 4$  mg/dL,  $P > 0.05$ ) and Cr ( $1.2 \pm 0.3$  mg/dL vs  $1.8 \pm 0.3$  mg/dL,  $P < 0.01$ ) levels.

**CONCLUSION:** Delayed EP therapy protects against distant organ injury by reducing serum HMGB1 levels in rats with experimental SAP. EP appears to be an effective new therapeutic option against inflammatory responses and multiple organ dysfunction syndrome in SAP patients.

**Key Words:** Severe acute pancreatitis; High mobility group box protein 1; Ethyl pyruvate; Multiple organ dysfunction syndrome

Yang ZY, Ling Y, Tao J, Zhou F, Xiong JX, Wu HS, Wang CY. Effects and mechanism of delayed ethyl pyruvate therapy on distant organ injury in rats with severe acute pancreatitis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007; 15(24): 2638-2642

## 摘要

**目的:** 探讨延迟的丙酮酸乙酯(EP)治疗对重症急性胰腺炎(SAP)大鼠血清高迁移率族蛋白1(HMGB1)水平和胰外脏器损伤的影响。

**方法:** 96只大鼠随机分为3组, 假手术组(Sham组,  $n = 32$ )、重症急性胰腺炎组(SAP组,  $n = 32$ )和丙酮酸乙酯延迟治疗组(EP组,  $n = 32$ ), 采用胰胆管逆行灌注人工胆汁的方法复制大鼠SAP模型。EP组建模12, 18, 30 h分别尾静脉

注射1次EP溶液30 mg/kg. 建模后24和48 h处死动物取材, 取血清检测HMGB1水平及肝肾功能生化指标, 取肺组织用于肺损伤检测.

**结果:** 延迟的EP治疗能有效降低SAP大鼠血清HMGB1水平. EP组血清丙氨酸转氨酶(ALT,  $446 \pm 91$  IU/L vs  $653 \pm 98$  IU/L,  $P < 0.01$ )、天冬氨酸转氨酶(AST,  $667 \pm 103$  IU/L vs  $1368 \pm 271$  IU/L,  $P < 0.01$ )、尿素氮(BUN,  $38 \pm 4$  mg/dL vs  $41 \pm 4$  mg/dL,  $P > 0.05$ )和肌酐(Cr,  $1.2 \pm 0.3$  mg/dL vs  $1.8 \pm 0.3$  mg/dL,  $P < 0.01$ )水平以及肺湿/干比( $8.22 \pm 0.42$  vs  $9.76 \pm 0.45$ ,  $P < 0.01$ )和组织学评分( $7.1 \pm 0.7$  vs  $8.4 \pm 1.1$ ,  $P < 0.01$ )均明显低于SAP组.

**结论:** 延迟的EP治疗通过下调血清HMGB1水平减轻SAP大鼠胰外脏器损伤. EP可能是SAP患者抗炎治疗和脏器功能保护的有效选择.

**关键词:** 重症急性胰腺炎; 高迁移率族蛋白1; 丙酮酸乙酯; 多脏器功能不全

杨智勇, 凌燕, 陶京, 周峰, 熊炯析, 吴河水, 王春友. 延迟的丙酮酸乙酯治疗对重症急性胰腺炎大鼠胰外脏器损伤的影响及其机制. 世界华人消化杂志 2007;15(24):2638-2642  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/2638.asp>

## 0 引言

重症急性胰腺炎(SAP)患者早期的死亡与多脏器功能不全(MODS)密切相关. 炎症因子过度释放是导致SAP患者发生MODS的重要原因<sup>[1]</sup>. 这些炎症因子包括肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )和白介素-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )等. 针对这些炎症因子的治疗似乎是防治MODS的有效途径. 但TNF- $\alpha$ 和IL-1 $\beta$ 等细胞因子均在早期释放, 在启动全身炎症反应后又迅速下调, 对其进行针对性治疗的时窗较窄. 在患者诊断明确并开始接受治疗时, 由TNF- $\alpha$ 和IL-1 $\beta$ 等细胞因子触发的“瀑布样”炎症反应往往已经发生, 因此, 针对上述细胞因子的拮抗治疗往往难以奏效<sup>[2]</sup>.

30年来, 高迁移率族蛋白1(HMGB1)一直被认为是1种DNA结合蛋白, 广泛存在于真核细胞内. 近年来发现, HMGB1作为重要的晚期炎症介质参与了脓毒症的病理生理过程<sup>[3]</sup>. 脓毒症<sup>[3-5]</sup>, 出血性休克<sup>[6]</sup>, 急性肺损伤<sup>[7-8]</sup>, 风湿性关节炎<sup>[9]</sup>和弥散性血管内凝血<sup>[10]</sup>患者血清HMGB1水平均升高. 研究表明, 注射抗HMGB1抗体能提高内毒素血症小鼠的生存率<sup>[3]</sup>. HMGB1之所以被称为晚期炎症介质, 是因为他在内毒素血

症模型中与TNF- $\alpha$ 和IL-1 $\beta$ 早期释放的特点不同, 具有延迟释放的特征. 内毒素血症小鼠血清HMGB1水平在建模后8-32 h升高, 此时TNF- $\alpha$ 和IL-1 $\beta$ 的释放高峰已过并已下调<sup>[3]</sup>. 由此可见, 针对HMGB1的治疗措施(如抗HMGB1抗体和HMGB1拮抗剂等)似乎有治疗与HMGB1过度释放相关疾病的潜力, 而且他延迟释放的动力学特点为治疗提供了较宽的时窗<sup>[11]</sup>.

我们在前期研究中发现, SAP大鼠血清HMGB1水平在建模后12 h开始升高, 一直高水平持续至48 h<sup>[12]</sup>. 国外有研究显示, SAP患者血清HMGB1水平升高且与疾病严重程度相关<sup>[13]</sup>, 早期使用抗HMGB1抗体可减轻SAP小鼠的脏器损害<sup>[14]</sup>. 因此, 我们认为下调HMGB1水平是治疗SAP的有效途径, 而且延迟治疗可能对SAP大鼠仍然有效.

丙酮酸乙酯(EP)最早被用于保护缺血再灌注组织损伤的研究<sup>[15]</sup>. 后续研究表明, EP可提高致死性失血性休克模型的存活率<sup>[16-17]</sup>; 可抑制脓毒症小鼠TNF- $\alpha$ 和IL-1 $\beta$ 的释放下调全身炎症反应, 在延迟24 h开始用药仍然有效<sup>[18]</sup>. 因此, 我们推测延迟的EP治疗可下调SAP大鼠血清HMGB1水平, 减轻脏器损害.

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 成年 $\delta$  Wistar大鼠, 体质量200-250 g, 清洁级, 华中科技大学同济医学院实验动物学部; 牛磺胆酸钠(纯度>95%)、丙酮酸乙酯(纯度>99%)(均购自美国Sigma-Aldrich公司); 浓缩纯化离心管(Centricon YM-100、Centricon YM-3, 美国Millipore公司); 0.45  $\mu$ m硝酸纤维素膜(德国Pall公司); 兔抗HMGB1多克隆抗体(美国BD Pharmingen公司); 碱性磷酸酶标记羊抗兔二抗、BCIP/NBT(北京中山生物公司). EP溶液含130 mmol/L Na<sup>+</sup>, 4 mmol/L K<sup>+</sup>, 2.7 mmol/L Ca<sup>2+</sup>, 139 mmol/L Cl<sup>-</sup>和32 mmol/L EP, pH值为7.0.

### 1.2 方法

**1.2.1 动物模型的构建** 大鼠术前禁食12 h, 自由饮水. 参照Aho *et al*<sup>[19]</sup>的方法制备SAP模型. 动物以10 g/L戊巴比妥钠(35 mg/kg)ip麻醉, 上腹正中切口进入腹腔, 显露胰胆管, 以血管夹阻断近肝门处胰胆管后, 用4号头皮静脉针于十二指肠乳头附近经十二指肠壁穿刺, 逆行刺入胰胆管, 在十二指肠乳头处用手指捏闭胆总管末端, 恒速注入50 g/L牛磺胆酸钠生理盐水溶液1 mL/kg, 0.06 mL/min. 观察10-20 min, 证实建模成功后

## ■ 研发前沿

目前, 重症急性胰腺炎的临床抗炎治疗尚未得到圆满解决. 本研究提出将晚期炎症介质HMGB1作为抗炎靶点, 为重症急性胰腺炎提供了新的治疗策略.



# ■ 创新盘点

高迁移率族蛋白1具有延迟释放、持续时间长的特点。针对高迁移率族蛋白1的治疗具有更宽的治疗时窗,更适合临床应用,尤其是对于错过了最初治疗时机的患者。本文针对这一现象进行了深入探讨有一定的新颖性。

表 1 各组大鼠的血生化指标

分组	ALT (IU/L)	AST (IU/L)	BUN (mg/dL)	Cr (mg/dL)
Sham	154 ± 20	51 ± 9	26 ± 3	0.4 ± 0.1
SAP	653 ± 98 <sup>b</sup>	1368 ± 271 <sup>b</sup>	41 ± 4 <sup>b</sup>	1.8 ± 0.3 <sup>b</sup>
EP	446 ± 91 <sup>bd</sup>	667 ± 103 <sup>bd</sup>	38 ± 4 <sup>b</sup>	1.2 ± 0.3 <sup>bd</sup>

<sup>b</sup>*P*<0.01 vs Sham; <sup>d</sup>*P*<0.01 vs SAP.

关腹。术后皮下注射生理盐水40 mL/kg行液体复苏。

1.2.2 分组 96只大鼠随机分为3组(*n* = 32), 每组分为两个亚组(*n* = 16)分别在建模后24和48 h杀动物取材。假手术组(Sham组)开腹后轻揉胰腺, 关腹并sc生理盐水(40 mL/kg); 重症急性胰腺炎组(SAP组)和丙酮酸乙酯延迟治疗组(EP组)建模后sc生理盐水每6 h 1次(40 mL/kg), EP组建模12, 18, 30 h分别尾静脉注射1次EP溶液30 mg/kg。SAP组同时点尾静脉注射等量不含EP的上述溶液。建模后24和48 h, 乙醚麻醉动物, 下腔静脉采血留置血清检测HMGB1水平及生化指标; 取肺用于肺损伤检测。

1.2.3 Western blot法检测HMGB1的表达 先用Centricon YM-100浓缩纯化离心管清除血清中的细胞碎片和凝血时形成的大分子复合物, 然后用Centricon YM-3将血清浓缩15倍, 再经120 g/L SDS-PAGE电泳, 并电转至硝酸纤维素膜上, 按常规进行Western blot分析, 兔抗HMGB1多克隆抗体工作浓度为1:800, 4℃过夜, AP-羊抗兔IgG工作浓度1:600, 常温下摇晃1 h, BCIP/NBT显色, 待特异性蛋白带颜色深度达到要求后, 终止显色反应。拍照分析30 kDa显色条带的光密度值, 以小鼠胸腺核提取物作为阳性对照<sup>[3]</sup>。

1.2.4 血生化指标检测 血清丙氨酸转氨酶(ALT)、天冬氨酸转氨酶(AST)、血肌酐和尿素氮水平均由临床自动生化分析仪测定。

1.2.5 肺湿/干比(W/D)和组织学评分 取左肺组织以滤纸吸干, 称得湿质量后置于60℃烘箱中72 h, 待重量恒定时称得干质量。计算肺湿/干比 = 肺湿质量/干质量。取右肺组织进行常规石蜡切片, HE染色。采用Gloor评分系统<sup>[20]</sup>对肺泡水肿、肺泡出血和中性粒细胞浸润分别进行评分(正常0分、轻度1分、中度2分、重度3分、极重度4分), 结果以总分表示。

统计学处理 实验结果均以mean ± SD表示, 采用SPSS10.0软件包分析, 组间比较采用*t*检验。

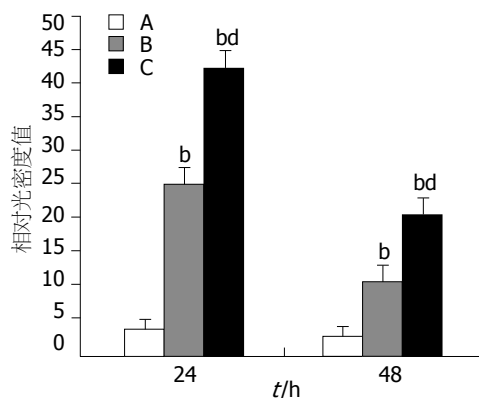


图 1 各组大鼠血清HMGB1水平. A: Sham组; B: EP组; C: SAP组. <sup>b</sup>*P*<0.01 vs Sham; <sup>d</sup>*P*<0.01 vs EP.

## 2 结果

2.1 血清HMGB1水平 建模后24和48 h, EP组大鼠血清HMGB1水平均低于SAP组(均*P*<0.01)。延迟的EP治疗明显降低了SAP大鼠血清HMGB1水平(图1)。

2.2 肺损伤评估 建模后24 h, SAP组大鼠肺湿/干(g/g)比Sham组明显增高(9.76 ± 0.45 vs 5.43 ± 0.21, *P*<0.01)。EP组大鼠肺湿/干虽然高于Sham组(8.22 ± 0.42 vs 5.43 ± 0.21, *P*<0.01), 但较SAP组明显降低(*P*<0.01)。EP组大鼠肺组织学评分(7.1 ± 0.7)高于Sham组(0.5 ± 0.1)(*P*<0.01), 明显低于SAP组(8.4 ± 1.1)(*P*<0.01)。

2.3 肝肾功能评估 建模后24 h, SAP组和EP组血清AST、ALT、BUN和Cr水平均高于Sham组。EP组血清AST、ALT和Cr水平较SAP组明显降低(表1)。

## 3 讨论

近年来, 研究显示HMGB1是脓毒症的晚期炎症介质<sup>[3,5,21-24]</sup>。我们在前期研究中发现, SAP大鼠血清HMGB1水平在建模后12 h开始升高, 此时TNF和IL-1已过峰值并开始下调<sup>[12]</sup>。国外有研究显示, SAP患者血清HMGB1水平升高且与疾病严重程度相关<sup>[13]</sup>; 早期使用抗HMGB1抗体可减轻SAP小鼠的脏器损害<sup>[14]</sup>。HMGB1延迟释放的动力学特点为SAP的治疗提供了较宽的时窗。EP可通过阻断NF-κB and p38 MAPK信号途径抑制巨噬细胞释放HMGB1, 从而下调脓毒症小鼠血清HMGB1水平<sup>[18]</sup>。本研究显示, 即使在建模12 h后开始使用EP治疗, 仍能有效降低SAP大鼠血清HMGB1水平。

重症急性胰腺炎(SAP)患者多死于MODS。过度激活的单核/巨噬细胞和中性粒细胞释放的

炎症因子是导致SAP患者胰外脏器损伤的重要原因<sup>[1]</sup>。细胞外HMGB1具有典型的细胞因子活性,可刺激单核/巨噬细胞、中性粒细胞和血管内皮细胞释放多种炎症介质,表达黏附分子和趋化因子等<sup>[24-27]</sup>。有研究显示早期使用HMGB1抗体可减轻SAP小鼠胰外脏器损伤<sup>[14]</sup>。本研究中,延迟的EP治疗有效降低了SAP大鼠血清AST、ALT和Cr水平,减轻了肝肾损害。在EP组,反映肺水肿的指标肺湿/干比和综合评价肺损伤的指标肺组织学评分均较SAP组低,显示肺损伤减轻。

本研究显示,延迟的EP治疗通过下调血清HMGB1水平减轻SAP大鼠胰外脏器损伤,提示EP可能是SAP患者抗炎治疗和防治MODS的有效药物。即使错过了最初的治疗时机,延迟给药可能依然有效。

#### 4 参考文献

- Lankisch PG, Lerch MM. Pharmacological prevention and treatment of acute pancreatitis: where are we now? *Dig Dis* 2006; 24: 148-159
- Abraham E, Anzueto A, Gutierrez G, Tessler S, San Pedro G, Wunderink R, Dal Nogare A, Nasraway S, Berman S, Cooney R, Levy H, Baughman R, Rumbak M, Light RB, Poole L, Allred R, Constant J, Pennington J, Porter S. Double-blind randomised controlled trial of monoclonal antibody to human tumour necrosis factor in treatment of septic shock. NORASEPT II Study Group. *Lancet* 1998; 351: 929-933
- Wang H, Bloom O, Zhang M, Vishnubhakat JM, Ombrellino M, Che J, Frazier A, Yang H, Ivanova S, Borovikova L, Manogue KR, Faist E, Abraham E, Andersson J, Andersson U, Molina PE, Abumrad NN, Sama A, Tracey KJ. HMG-1 as a late mediator of endotoxin lethality in mice. *Science* 1999; 285: 248-251
- Yang H, Ochani M, Li J, Qiang X, Tanovic M, Harris HE, Susarla SM, Ulloa L, Wang H, DiRaimo R, Czura CJ, Wang H, Roth J, Warren HS, Fink MP, Fenton MJ, Andersson U, Tracey KJ. Reversing established sepsis with antagonists of endogenous high-mobility group box 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101: 296-301
- Sunden-Cullberg J, Norrby-Teglund A, Rouhiainen A, Rauvala H, Herman G, Tracey KJ, Lee ML, Andersson J, Tokics L, Treutiger CJ. Persistent elevation of high mobility group box-1 protein (HMGB1) in patients with severe sepsis and septic shock. *Crit Care Med* 2005; 33: 564-573
- Ombrellino M, Wang H, Ajemian MS, Talhouk A, Scher LA, Friedman SG, Tracey KJ. Increased serum concentrations of high-mobility-group protein 1 in haemorrhagic shock. *Lancet* 1999; 354: 1446-1447
- Abraham E, Arcaroli J, Carmody A, Wang H, Tracey KJ. HMG-1 as a mediator of acute lung inflammation. *J Immunol* 2000; 165: 2950-2954
- Ueno H, Matsuda T, Hashimoto S, Amaya F, Kitamura Y, Tanaka M, Kobayashi A, Maruyama I, Yamada S, Hasegawa N, Soejima J, Koh H, Ishizaka A. Contributions of high mobility group box protein in experimental and clinical acute lung injury. *Am J Respir Crit Care Med* 2004; 170: 1310-1316
- Taniguchi N, Kawahara K, Yone K, Hashiguchi T, Yamakuchi M, Goto M, Inoue K, Yamada S, Ijiri K, Matsunaga S, Nakajima T, Komiya S, Maruyama I. High mobility group box chromosomal protein 1 plays a role in the pathogenesis of rheumatoid arthritis as a novel cytokine. *Arthritis Rheum* 2003; 48: 971-981
- Hatada T, Wada H, Nobori T, Okabayashi K, Maruyama K, Abe Y, Uemoto S, Yamada S, Maruyama I. Plasma concentrations and importance of High Mobility Group Box protein in the prognosis of organ failure in patients with disseminated intravascular coagulation. *Thromb Haemost* 2005; 94: 975-979
- Yang H, Wang H, Czura CJ, Tracey KJ. HMGB1 as a cytokine and therapeutic target. *J Endotoxin Res* 2002; 8: 469-472
- 杨智勇, 王春友, 熊炯焯, 陶京, 许逸卿, 刘涛. 重症急性胰腺炎大鼠血清高迁移率族蛋白-1水平的时相变化及意义. *华中科技大学学报(医学版)* 2004; 33: 466-468
- Yasuda T, Ueda T, Takeyama Y, Shinzeki M, Sawa H, Nakajima T, Ajiki T, Fujino Y, Suzuki Y, Kuroda Y. Significant increase of serum high-mobility group box chromosomal protein 1 levels in patients with severe acute pancreatitis. *Pancreas* 2006; 33: 359-363
- Sawa H, Ueda T, Takeyama Y, Yasuda T, Shinzeki M, Nakajima T, Kuroda Y. Blockade of high mobility group box-1 protein attenuates experimental severe acute pancreatitis. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 7666-7670
- Sims CA, Wattanasirichaigoon S, Menconi MJ, Ajami AM, Fink MP. Ringer's ethyl pyruvate solution ameliorates ischemia/reperfusion-induced intestinal mucosal injury in rats. *Crit Care Med* 2001; 29: 1513-1518
- Tawadrous ZS, Delude RL, Fink MP. Resuscitation from hemorrhagic shock with Ringer's ethyl pyruvate solution improves survival and ameliorates intestinal mucosal hyperpermeability in rats. *Shock* 2002; 17: 473-477
- Yang R, Gallo DJ, Baust JJ, Uchiyama T, Watkins SK, Delude RL, Fink MP. Ethyl pyruvate modulates inflammatory gene expression in mice subjected to hemorrhagic shock. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2002; 283: G212-221
- Ulloa L, Ochani M, Yang H, Tanovic M, Halperin D, Yang R, Czura CJ, Fink MP, Tracey KJ. Ethyl pyruvate prevents lethality in mice with established lethal sepsis and systemic inflammation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99: 12351-12356
- Aho HJ, Koskensalo SM, Nevalainen TJ. Experimental pancreatitis in the rat. Sodium taurocholate-induced acute haemorrhagic pancreatitis. *Scand J Gastroenterol* 1980; 15: 411-416
- Gloor B, Blinman TA, Rigberg DA, Todd KE, Lane JS, Hines OJ, Reber HA. Kupffer cell blockade reduces hepatic and systemic cytokine levels and lung injury in hemorrhagic pancreatitis in rats. *Pancreas* 2000; 21: 414-420
- Wang H, Yang H, Tracey KJ. Extracellular role of HMGB1 in inflammation and sepsis. *J Intern Med*

#### ■应用要点

丙酮酸乙酯为廉价、使用广泛且无毒的食品添加剂,若能用于重症急性胰腺炎的治疗,将具有很好的临床应用前景。

## ■同行评价

本文与以往针对早期细胞因子治疗胰腺炎不同的是选择延迟释放的HMGB1为靶点,通过应用丙酮酸乙酯延迟治疗,观察到肝肾功能损害较对照组明显减轻,表明丙酮酸乙酯可通过延迟HMGB1释放来减轻细胞因子对胰外脏器的损伤,有较好的学术价值和潜在的应用前景。

- 2004; 255: 320-331
- 22 Qin S, Wang H, Yuan R, Li H, Ochani M, Ochani K, Rosas-Ballina M, Czura CJ, Huston JM, Miller E, Lin X, Sherry B, Kumar A, Larosa G, Newman W, Tracey KJ, Yang H. Role of HMGB1 in apoptosis-mediated sepsis lethality. *J Exp Med* 2006; 203: 1637-1642
- 23 Angus DC, Yang L, Kong L, Kellum JA, Delude RL, Tracey KJ, Weissfeld L. Circulating high-mobility group box 1 (HMGB1) concentrations are elevated in both uncomplicated pneumonia and pneumonia with severe sepsis. *Crit Care Med* 2007; 35: 1061-1067
- 24 Andersson U, Wang H, Palmblad K, Aveberger AC, Bloom O, Erlandsson-Harris H, Janson A, Kokkola R, Zhang M, Yang H, Tracey KJ. High mobility group 1 protein (HMG-1) stimulates proinflammatory cytokine synthesis in human monocytes. *J Exp Med* 2000; 192: 565-570
- 25 Park JS, Arcaroli J, Yum HK, Yang H, Wang H, Yang KY, Choe KH, Strassheim D, Pitts TM, Tracey KJ, Abraham E. Activation of gene expression in human neutrophils by high mobility group box 1 protein. *Am J Physiol Cell Physiol* 2003; 284: C870-879
- 26 Treutiger CJ, Mullins GE, Johansson AS, Rouhiainen A, Rauvala HM, Erlandsson-Harris H, Andersson U, Yang H, Tracey KJ, Andersson J, Palmblad JE. High mobility group 1 B-box mediates activation of human endothelium. *J Intern Med* 2003; 254: 375-385
- 27 Fan J, Li Y, Levy RM, Fan JJ, Hackam DJ, Vodovotz Y, Yang H, Tracey KJ, Billiar TR, Wilson MA. Hemorrhagic shock induces NAD(P)H oxidase activation in neutrophils: role of HMGB1-TLR4 signaling. *J Immunol* 2007; 178: 6573-6580

编辑 何燕 电编 何基才

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2007年版权归世界华人消化杂志

## •消息•

## 中华医学会第五届消化内镜学分会青年委员会成立大会暨第三届学会研讨会通知

**本刊讯** 由中华医学会消化内镜学分会主办,江西省医学会消化内镜专业委员会、南昌大学第一附属医院承办的中华医学会第五届消化内镜学分会青年委员会成立大会暨第三届学术研讨会将于2007-11-02/04在江西南昌举行。届时将邀请美国、香港等国家和地区的国际著名消化内镜专家及国内知名消化内镜专家莅临大会。

### 1 会议内容

中华医学会第五届消化内镜学分会青年委员会成立大会; 青年内镜医师培训讲座; 消化内镜新进展讲座; 青年委员专题讲座。

### 2 联系方式

徐萍, 330006, 江西省南昌市永外正街17号, 南昌大学第一附属医院消化科。电话: 0791-8692506或0791-8692540, E-mail: yfyxp@yahoo.com.cn。

# 超声对无水乙醇治疗肝细胞癌早期疗效的评价

侯秀娟, 王洪波, 王虹, 王晓蕾, 刘爱武

侯秀娟, 王洪波, 王虹, 王晓蕾, 刘爱武, 哈尔滨医科大学附属第二医院超声科 黑龙江省哈尔滨市 150086  
通讯作者: 刘爱武, 150086, 黑龙江省哈尔滨市南岗区学府路 246号, 哈尔滨医科大学附属第二医院超声科.  
houxiujuan@126.com  
电话: 0451-86605925  
收稿日期: 2007-07-19 修回日期: 2007-08-20

## Assessment of early-term effects of percutaneous ethanol injection by ultrasonography examination of hepatocellular carcinoma

Xiu-Juan Hou, Hong-Bo Wang, Hong Wang, Xiao-Lei Wang, Ai-Wu Liu

Xiu-Juan Hou, Hong-Bo Wang, Hong Wang, Xiao-Lei Wang, Ai-Wu Liu, Department of Ultrasound, the Second Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150086, Heilongjiang Province, China  
Correspondence to: Dr. Ai-Wu Liu, Department of Ultrasound, the Second Affiliated Hospital of Harbin Medical University, 246 Xuefu Road, Nangang District, Harbin 150086, Heilongjiang Province, China. houxiujuan@126.com  
Received: 2007-07-19 Revised: 2007-08-20

### Abstract

**AIM:** To determine the clinical value of evaluating the early-term therapeutic effects of percutaneous ethanol injection (PEI) for hepatocellular carcinoma (HCC) by two-dimensional (2D) and color Doppler ultrasonography.

**METHODS:** One hundred and thirty-seven patients with HCC (156 foci, 1.4–5.0 cm in diameter) received PEI. One week after the period of treatment, significant changes on 2D ultrasonography, and the disappearance or exact blood flow signals on color doppler flow imaging (CDFI) and color doppler energy (CDE) were observed. Heavy needle histological biopsies were also performed for pathological diagnosis.

**RESULTS:** Compared to the gold standard of pathological results, the sensitivity for evaluating foci of complete necrosis on 2D ultrasonography, CDFI and CDE were 33.3%, 50.0%, and

77.8%, respectively; accuracy was 71.2%, 78.8%, and 90.4%, respectively; while kappa values were 0.278 ( $P < 0.05$ ), 0.486 ( $P < 0.01$ ) and 0.779 ( $P < 0.01$ ), respectively.

**CONCLUSION:** Dynamic monitoring of PEI is important for 2D ultrasonography, CDFI and CDE. CDFI and CDE show promise for evaluating the early-term therapeutic effects of PEI. CDE sensitively demonstrate residual blood flow signals in peritumoral and intratumoral regions after PEI, and thus have clinical value for selecting therapeutic opportunities and target areas for improving the therapeutic effects of PEI.

**Key Words:** Two-dimensional and color doppler ultrasonography; Percutaneous ethanol; Interventional therapy; Hepatocellular carcinoma; Early-term therapeutic effect

Hou XJ, Wang HB, Wang H, Wang XL, Liu AW. Assessment of early-term effects of percutaneous ethanol injection by ultrasonography examination of hepatocellular carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007; 15(24): 2643-2647

### 摘要

**目的:** 探讨二维及彩色多普勒超声评价无水乙醇治疗肝细胞癌早期疗效的临床应用价值。

**方法:** 经皮无水乙醇瘤内注射(PEI)治疗137例肝细胞癌患者(156个肿块, 肿块直径1.4-5.0 cm), 于PEI疗程结束后1 wk, 采用二维声像图(2D)、彩色多普勒血流显像(CDFI)、彩色多普勒能量图(CDE)检查技术, 以2D的特定改变、CDFI及CDE血流信号显示的有无作为评价PEI早期疗效的观察指标, 并行组织学活检病理检查。

**结果:** 以病理检查结果为金标准, 2D, CDFI, CDE评价PEI治疗后肿瘤的灭活情况, 其敏感性分别为: 33.3%, 50.0%, 77.8%, 准确性分别为: 71.2%, 78.8%, 90.4%, Kappa值分别为: 0.278( $P < 0.05$ ), 0.486( $P < 0.01$ ), 0.779( $P < 0.01$ )。

### ■背景资料

经皮无水乙醇瘤内注射(PEI)广泛适用于治疗小肝癌、不能手术切除以及复发的肝癌, 其治疗目的是使肿瘤原位发生完全性坏死。如何及早发现PEI治疗后肿瘤是否完全灭活直接影响PEI的疗效。彩色多普勒超声在实时引导介入治疗及疗效评价方面具有独特的优势。

## ■ 研发前沿

对肝癌介入治疗疗效评估方面,实时超声造影已经成为新的研究热点,但超声造影评价标准尚未统一。

**结论:** 2D, CDFI, CDE动态监控PEI治疗过程对指导治疗意义重大, CDFI, CDE评价PEI早期疗效结果客观可靠, CDE可以敏感而直观的显示PEI治疗后肿瘤周边及内部残存的血流信号, 对指导PEI治疗时机及靶目标的选择以提高疗效具有重要的临床应用价值。

**关键词:** 二维及彩色多普勒超声; 无水乙醇; 介入治疗; 肝细胞癌; 早期疗效

侯秀娟, 王洪波, 王虹, 王晓蕾, 刘爱武. 超声对无水乙醇治疗肝细胞癌早期疗效的评价. 世界华人消化杂志 2007;15(24):2643-2647

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/2643.asp>

## 0 引言

肝细胞癌是世界范围内最常见的恶性肿瘤之一, 其发病率和死亡率均居恶性肿瘤的前列。PEI治疗肝细胞癌是开展最早、应用最普遍的微创介入治疗方法。如何及早发现PEI治疗后肿瘤是否完全灭活直接影响PEI的疗效。本文回顾分析137例肝细胞癌患者共156个肿块治疗前后二维及彩色多普勒超声变化特点, 探讨超声评价PEI治疗肝细胞癌早期疗效的可行性及实用性。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 我院2002-12/2006-12资料完整的肝细胞癌患者137例, 共156个肿块, 均经病理检查确诊。男114例, 女23例, 年龄19-76(平均47.5)岁。肿块直径1.4-5.0 cm, 并且每个肿块均检测CDFI及CDE血流信号。

**1.2 方法** 使用西门子Sonoline Elegra及西门子Sonoline Antares彩色多普勒超声诊断仪(探头频率3.5-4.2 MHz), 2D观察PEI治疗前后肿块大小、边界、内部回声, 启动CDFI、CDE观察肿块内部及周边血流分布情况, 并对血流分布进行分级: 0级: 未见血流, 肿块周边及肿块内未见血流信号; I级: 少量血流, 肿块周边或肿块内可见1-2个短棒状血流信号; II级: 中量血流, 肿块周边有3-4个短棒状血流信号, 肿块内有1-2个长条状血流信号; III级: 多量血流, 肿块周边大部分被血流信号包绕, 肿块内有2个以上长条状血流信号。在超声实时监视引导下用21G PTC针采用由深及浅的多点旋转注射技术对肿块进行PEI治疗, 估计无水乙醇用量: 注射量(mL) = 肿块直径(cm)+1.5, 并根据注射时无水乙醇在肿块内的弥散程度及弥散范围(覆盖肿瘤周边约10

mm范围)作适当调整; 疗程按肿块直径(cm)+1计算, 每周注射2-3次。于PEI疗程结束后1 wk, 完成上述检查后, 在超声引导下用16G自动活检枪对肿块行病理组织学活检。

**统计学处理** SAS6.12统计软件包进行分析, 配对资料 $\chi^2$ 检验,  $P < 0.05$ 有统计学意义。

## 2 结果

本组156个肿块, 治疗前多数肿块表现为边界模糊或周边回声减低低回声肿块, 少数表现为等回声、高回声及高低不均匀的混合性回声。PEI疗程结束后1 wk 2D表现见表1: 大部分肿块内部以高回声型为主(62.8%), 小部分肿块为混合性回声型或低回声型; 大部分肿块边界失去原有边界回声, 表现为高回声环或低回声环。

156个肿块PEI治疗前及疗程结束后CDFI及CDE血流显示情况见表2: PEI疗程结束后大部分肿块血流信号消失, 小部分肿块能检出血流信号, 但较治疗前明显减少。

利用2D评价PEI疗程结束后1 wk肿块完全灭活的标准是: (1) 肿块大小: 肿块较治疗前缩小; (2) 肿块回声: 无治疗前肿块回声表现, 呈弥漫性高回声或强回声光团; (3) 肿块边界: 失去治疗前肿块边界回声, 代之以高回声或低回声环围绕。PEI疗程结束后1 wk观察肿块变化具备上述3条标准者则视为肿块完全灭活, 记为2D(-), 否则视为肿块未完全灭活, 记为(+). 利用CDFI评价PEI疗程结束后1 wk肿块完全灭活的标准是: 肿块内部及周边均未检出血流信号视为肿块完全灭活, 记为CDFI(-), 检出血流信号则视为肿块未完全灭活, 记为CDFI(+); 同时对肿块行CDE检查, CDE(-)及CDE(+)判断方法同CDFI。上述2D, CDFI, CDE检测结束后, 经皮经肝对肿块行组织学活检病理检查, 检查结果有癌细胞残存者记为(+), 未见癌细胞残存者记为(-)。上述检查结果见表3。

以病理结果作为判断标准, 用2D, CDFI, CDE评价PEI治疗后肿块是否灭活的敏感性、特异性、准确性、阳性预测值, 阴性预测值及Kappa值见表4。

## 3 讨论

无水乙醇能够引起肿瘤组织细胞发生凝固性坏死, 同时肿瘤血管闭塞, 血供中断导致肿瘤缺血性坏死。多次反复注射无水乙醇使这种坏死作用累积, 使治癌作用趋于完全<sup>[1-4]</sup>。完全灭活的



表 1 PEI疗程结束后肿块二维声像图表现

肿块大小(n)	边界表现			内部回声			
	模糊	低回声环	高回声环	低回声	等回声	高回声	混合回声
缩小(38)	3	3	32	2	0	31	5
无变化(77)	10	29	38	3	0	52	22
增大(41)	8	28	5	5	0	12	24

表 2 PEI治疗前及疗程结束后肿块CDFI及CDE血流显示情况

治疗前血流分级	n	CDFI				n	CDE			
		治疗后血流分级					治疗后血流分级			
		0	I	II	III		0	I	II	III
I	66	66	0	0	0	33	33	0	0	0
II	57	36	21	0	0	69	45	24	0	0
III	33	18	9	6	0	54	30	15	9	0
合计	156	120	30	6	0	156	108	39	9	0

表 3 PEI疗程结束后2D, CDFI, CDE及病理检查结果

病理	2D			CDFI			CDE		
	+	-	合计	+	-	合计	+	-	合计
+	18	36	54	27	27	54	42	12	54
-	10	92	102	6	96	102	3	99	102
合计	28	128	156	33	123	156	45	111	156

肿块由于纤维组织增生逐渐表现为弥漫性高回声; 而未被完全灭活的肿块则表现为高低回声不均匀或仍残存治疗前肿块的回声特点. 但是治疗后因有炎性渗出、炎细胞浸润以及组织坏死, 肿块可表现为高低回声不均匀, 肿块的周边回声也因炎症渗出及散在出血而表现为低回声环. 肿块的大小因炎症渗出、浸润以及肿块的扩大治疗均可造成肿块较治疗前增大或无明显变化, 从而造成2D评价结果出现假阳性; 又因为肿块灭活时二维声像图表现不尽一致<sup>[5]</sup>, 加之肿块的二维声像图表现只是凭观察者对图像的观察判断, 主观影响因素比较大, 因此早期评判缺乏客观指标, 存在较大的误差. 所以综合以上分析, 2D评价PEI疗效效果很差, 其Kappa值仅为0.278( $P<0.05$ ). 2D评价PEI疗效时仅有特异性比较高(90.4%), 因为PEI治疗后肿块在短期内缩小或显示不清, 表明疗效显著, 肿块基本上达到完全灭活, 但是肿块直径的缩小, 一般在治疗后2-3 mo左右才能发生明显的变化, 因为肿瘤组织的坏死吸收需要一定的时间<sup>[5]</sup>. 因此2D不适宜作为评价PEI早期疗效的指标, 以免延误最佳治疗时

表 4 2D, CDFI, CDE评价PEI治疗后肿瘤灭活结果

评价方法	敏感性(%)	特异性(%)	准确性(%)	阳性预测值(%)	阴性预测值(%)	Kappa值
2D	33.3	91.2	71.2	66.7	72.1	0.278 <sup>a</sup>
CDFI	50.0	94.1	78.8	81.8	78.0	0.486 <sup>b</sup>
CDE	77.8	97.1	90.4	93.3	89.2	0.779 <sup>b</sup>

<sup>a</sup> $P<0.05$ , <sup>b</sup> $P<0.01$ .

机, 或者徒劳地增加治疗次数, 给患者造成不必要的痛苦及经济负担. 但是2D可以实时监控PEI治疗过程及随诊PEI的远期疗效.

大量的实验和临床研究表明, 90%以上的肝细胞性肝癌为多供血肿瘤, 肝癌的滋养血管主要为动脉, 少数为门静脉<sup>[6-7]</sup>. 肝癌的血供特点是应用CDFI及CDE进行肝癌诊断、治疗监控及疗效评估的基础. 本组156个肿块, 治疗前肿块血流显示II-III级分布CDE的检出率为78.8%(123/156), CDFI的检出率为57.6%(90/156), 因较小或早期肝癌以动脉供血为主并

#### ■创新盘点

本文比较系统、全面地研究了二维、彩色多普勒血流显像、彩色多普勒能量图在评价PEI早期疗效方面的优缺点, 并与病理组织学对比, 及早发现了未被灭活的肿瘤组织, 同时避免了对已灭活的肿瘤组织进行过度治疗, 提高了PEI的疗效.

#### ■应用要点

二维及彩色多普勒超声检查可重复性好, 能够动态实时监控PEI治疗的全过程, 为肝癌治疗提供准确的定位和血流信息, 评价早期疗效结果可靠, 是PEI治疗肝癌首选、实用、可靠的影像监控及评价手段.

## ■名词解释

PEI即经皮无水乙醇瘤内注射:是指在临床确诊为肝癌的前提下,利用超声装置显示肿瘤,并在其引导下将穿刺针经皮肤经肝直接插向肿瘤部位注射无水乙醇的技术。

伴门静脉供血,肿块内动脉血管较少且分支细小,血流阻力大,血流速度低,CDFI对血流的检查受到局限<sup>[8-9]</sup>。CDE信噪比及空间分辨率等均明显优于CDFI,对肝癌内的低速血流显示良好,不仅能较准确地显示肝癌的动脉供血,同时可显示门静脉供血,即CDE能全面而准确地评价肝癌的血供<sup>[10-11]</sup>。文献报道CDE血流检出的敏感性是CDFI的2-3倍<sup>[12-14]</sup>,本组CDE及CDFI检查结果没有如此显著,其原因主要是本研究在搜集研究对象时将肿块内未显示CDFI血流信号者全部排除,另外随着超声仪器性能的改善,CDFI的分辨率也随之提高。

经PEI治疗后,无水乙醇造成肿瘤内及周边血管变性,血管内皮细胞破坏,血栓形成,血管扭曲变细及血管闭塞。随着无水乙醇对肿块内及周边血管的不断破坏,肿块内及周边血流逐渐减少直至消失,这既是CDFI及CDE评价PEI疗效的病理组织学基础,也是肿瘤组织灭活的一个原因。

由表3及表4可知,三者评价PEI疗效,准确性最高的是CDE: 90.4%,其次是CDFI: 78.8%和2D: 71.2%,敏感性最高的是CDE 77.8%,其次是CDFI 50%, 2D 33.3%;而在特异性方面CDE较CDFI和2D略高,分别是97.1%, 93.3%和90.4%。经配对资料 $\chi^2$ 检验,三者Kappa值分别为: CDE: 0.779( $P<0.01$ ),表示与活检病理结果一致性好; CDFI: 0.486( $P<0.01$ ),表示与活检病理结果一致性较好; 2D: 0.278( $P<0.05$ ),表示与活检病理结果一致性差。肿块内及周边的血流显示相对于2D声像图改变比较客观和敏感,受主观因素影响较小,因此对PEI疗效的评价,CDFI及CDE的准确性、敏感性均较2D高,与文献报道接近<sup>[15-16]</sup>。又由于CDE对低速血流的检出率以及空间分辨率等较CDFI高,因此CDE对血流的检出率明显高于CDFI,评价PEI疗效的敏感性CDE高于CDFI,与文献报道一致<sup>[17-18]</sup>。CDFI不易显示低速血流而低估了肿块的血流,因此CDFI的假阴性率较CDE高,分别为50%和22.2%。CDFI和CDE各有6例和3例假阳性,是因为有3例肿块位于肝左叶后上段距离心脏较近,血流显示受心脏搏动影响,还有3例假阳性可能是色彩闪烁和倒错引起。

从以上的综合分析可知,对PEI疗效的评价,CDE最敏感、准确和特异,其次是CDFI,其特异性较高,但是准确性和敏感性较低,最差的是2D,但是在实时监控无水乙醇弥散程度方面是2D所

特有的。因此利用2D实时监控无水酒精的注射过程及穿刺活检,利用CDE及CDFI监控评价PEI早期疗效以显示肿块是否灭活及灭活的程度,不仅客观、准确,而且简单、方便、易行,对指导PEI的治疗时机及靶目标的选择意义重大。

## 4 参考文献

- 1 Lee MJ, Mueller PR, Dawson SL, Gazelle SG, Hahn PF, Goldberg MA, Boland GW. Percutaneous ethanol injection for the treatment of hepatic tumors: indications, mechanism of action, technique, and efficacy. *AJR* 1995; 164: 215-220
- 2 Lin LW, Lin XY, He YM, Gao SD, Xue ES, Lin XD, Yu LY. Experimental and clinical assessment of percutaneous hepatic quantified ethanol injection in treatment of hepatic carcinoma. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 3112-3117
- 3 Luo BM, Wen YL, Yang HY, Zhi H, Xiao XY, Ou B, Pan JS, Ma JH. Percutaneous ethanol injection, radiofrequency and their combination in treatment of hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 6277-6280
- 4 林礼务, 何以枚, 高上达, 叶真, 薛恩生, 林晓东, 俞丽云, 林学英. 超声介入无水酒精量化治疗肝癌的临床评价. *中国超声医学杂志* 2003; 19: 49-52
- 5 杨龙, 林礼务, 薛恩生, 何以枚, 高上达, 林晓东, 俞丽云. 超声造影对乙醇消融量化治疗肝癌疗效评判与随访价值. *中国医学影像技术* 2006; 22: 1219-1222
- 6 罗福成. 肝癌血供的彩色多普勒超声检查研究进展. *实用肝脏病杂志* 2005; 8: 372-375
- 7 王知力, 唐杰, 李俊来, 罗渝昆, 安力春, 程志刚, 鲁通, 邵秋杰, 董宝玮. 肝细胞肝癌超声造影与血管生成的关系. *中国医学影像学杂志* 2007; 15: 107-109
- 8 王燕, 王文平, 丁红, 黄备建, 毛枫, 徐智章. 多普勒阻力指数在小肝癌定性诊断中的价值. *中国医学影像技术* 2003; 19: 63-66
- 9 曹兵生, 梁萍. 多普勒超声在肝癌诊断中的应用进展. *中华超声影像学杂志* 2000; 9: 125-127
- 10 Imamura M, Shiratori Y, Shiina S, Sato S, Obi S, Okudaira T, Teratani T, Kato N, Akahane M, Ohtomo K, Minami M, Omata M. Power Doppler sonography for hepatocellular carcinoma: factors affecting the power Doppler signals of the tumors. *Liver* 1998; 18: 427-433
- 11 李治安. 临床超声影像学. 第1版. 北京: 人民卫生出版社, 2003: 49-53
- 12 赵丽雅, 阎吉正, 舒博学. 彩色多普勒能量图检测肝血池的临床应用. *中华超声影像学杂志* 2000; 9: 77-79
- 13 Sumi S, Yamashita Y, Mitsuzaki K, Yamamoto H, Urata J, Nishiharu T, Takahashi M. Power Doppler sonography assessment of tumor recurrence after chemoembolization therapy for hepatocellular carcinoma. *AJR Am J Roentgenol* 1999; 172: 67-71
- 14 曾燕容. 肝癌血供的多普勒超声研究进展. *中国医学影像技术* 2002; 18: 1081-1083
- 15 Koito K, Namieno T, Ichimura T, Hirokawa N, Syonai T, Hareyama M, Katsuramaki T, Hirata K, Nishi M. Power doppler sonography: evaluation of hepatocellular carcinoma after treatment with transarterial embolization or percutaneous ethanol injection therapy. *AJR* 2000; 174: 337-341
- 16 林学英, 林礼务. 经皮超声介入无水酒精治疗肝癌及其疗效评估方法的进展. *临床超声医学杂志* 2003; 5: 290-291

- 17 Castroagudin JF, Delgado M, Martinez SM, Abdulkader I, Bustamante M, Martinez J, Segade FR, Conde R, Varo E. Doppler ultrasonography for the assessment of tumor necrosis after percutaneous ethanol injection prior to liver transplantation as adjuvant therapy of hepatocellular carcinoma. *Transplant Proc* 2005; 37: 1493-1495
- 18 Sato S, Shiratori Y, Imamura M, Teratani T, Obi S, Koike Y, Imai Y, Yoshida H, Shiina S, Omata M. Power Doppler signals after percutaneous ethanol injection therapy for hepatocellular carcinoma predict local recurrence of tumors: a prospective study using 199 consecutive patients. *J Hepatol* 2001; 35: 225-234

编辑 程剑侠 电编 张敏

#### ■同行评价

本文评价了超声对无水乙醇治疗肝细胞癌的早期疗效, 选题较好, 紧紧结合临床, 样本量较大, 数据统计可靠, 结论可信, 对临床具有很好的指导意义, 是一篇很好的文章。

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2007年版权归世界华人消化杂志

## • 消息 •

### 《肿瘤冷冻治疗学》出版

由徐克成教授和牛立志博士主编的《肿瘤冷冻治疗学》近日由上海科技教育出版社出版. 全书50万字, 彩色印刷, 图文并茂.

冷冻疗法是一种既古老又现代的微创消融技术. 20世纪80年代后, 随着影像技术的进步和新的冷冻设备的诞生, 现代冷冻治疗逐步建立起来. 以氩氦冷冻技术为代表的现代冷冻疗法, 从最初应用于治疗前列腺癌, 已发展到治疗各种实质性肿瘤, 包括肝癌、胰腺癌、肺癌、肾癌、前列腺癌、乳腺癌、妇科肿瘤和各种软组织肿瘤等. 本书系统详细介绍了冷冻治疗各种肿瘤的方法、适应证、疗效、不良反应, 对冷冻疗法的机制、冷冻与免疫及化疗的关系、冷冻治疗肿瘤的有效性和安全性等, 均作了详细阐述; 不仅综述了大量文献, 而且介绍了作者自己临床应用冷冻治疗的经验, 列举了大量典型病例. 中华医学会会长、中国工程院院士钟南山为本书作序, 评价本书“为我国第一本肿瘤冷冻治疗专著, ……反映了当代肿瘤冷冻治疗最新成果, 对临床研究和实践具有指导价值.” 国际冷冻外科学会主席Franco Lugini博士认为本书“总结3000余例肿瘤治疗的经验, ……这些手术大多数是经皮完成, 这一点非常重要. 他们提供了充实的材料和详细的评估, ……为世界临床冷冻治疗的应用作出了杰出贡献.” 著名消化病专家、上海交通大学仁济医院终身教授萧树东对本书中与他“专业相关的内容有着浓厚的兴趣. ……冷冻不仅如同手术切除一样, 能消除肿瘤本身, 而且能发挥全身性免疫促进或免疫清除作用, 而这些是手术所不可能达到的.” 亚太消化内镜学会会长曹世植教授认为本书使他“深深体会到作为一个成功的医生, 认真的态度和高超的技艺是有效治疗的关键.” 周殿元教授、孟宪镛教授和张静仁教授也对本书作了高度评价 (徐克成).

## 重型乙型肝炎患者血清IP-10的动态观察及临床意义

罗亚文, 罗军敏, 林世德, 易学东

### ■背景资料

目前SHB的发病机制仍不完全清楚,许多学者探索其免疫发病机制,从免疫学防治角度寻找切入点。已有的研究表明,细胞免疫异常可能是SHB免疫发病机制的重要原因。本文初步探讨了趋化性细胞因子IP-10在SHB免疫发病机制及病情发展转归中的作用及意义。

罗亚文, 林世德, 贵州遵义医学院附属医院感染科 贵州省遵义市 563003

罗军敏, 贵州遵义医学院免疫学教研室 贵州省遵义市 563003

易学东, 贵州遵义医学院药剂科 贵州省遵义市 563003

通讯作者: 罗亚文, 563003, 贵州省遵义市, 贵州遵义医学院附属医院感染科。luoyw719@163.com

收稿日期: 2007-06-11 修回日期: 2007-08-17

### Clinical significance of serum interferon-inducible protein-10 and serial changes in patients with severe hepatitis B

Ya-Wen Luo, Jun-Min Luo, Shi-De Lin, Xue-Dong Yi

Ya-Wen Luo, Shi-De Lin, Department of Infectious Diseases, the Affiliated Hospital of Zunyi Medical College, Zunyi 563003, Guizhou Province, China

Jun-Min Luo, Department of Immunology, Zunyi Medical College, Zunyi 563003, Guizhou Province, China

Xue-Dong Yi, Pharmaceutical Preparation Section, Zunyi Medical College, Zunyi 563003, Guizhou Province, China

Correspondence to: Ya-Wen Luo, Department of Infectious Diseases, the Affiliated Hospital of Zunyi Medical College, Zunyi 563003, Guizhou Province, China. luoyw719@163.com

Received: 2007-06-11 Revised: 2007-08-17

### Abstract

**AIM:** To investigate serum levels of interferon-inducible protein-10 (IP-10) and the serial changes in hepatic injury and disease progression in patients with severe hepatitis B (SHB) after plasma exchange (PE).

**METHODS:** Forty patients with SHB and 20 with chronic hepatitis B (CHB) were enrolled. All SHB patients were treated by PE, and according to the response on day 5, they were then subdivided into two groups: remission and aggravated. Serum levels of IP-10 and tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) on admission, before PE, and on day 5 after PE were determined by ELISA.

**RESULTS:** On admission, the serum levels of IP-10 in patients with SHB and CHB were significantly higher than those in normal controls ( $683.56 \pm 174.63$  ng/L,  $216.13 \pm 102.92$  ng/L vs

$107.61 \pm 55.81$  ng/L,  $P < 0.01$ ). The IP-10 level in patients with SHB was significantly higher than that in patients with CHB ( $P < 0.01$ ). On admission, the serum level of IP-10 showed a significantly positive correlation with TNF- $\alpha$  ( $r = 0.366$ ;  $P < 0.05$ ) and a significantly negative correlation with PTA ( $r = -0.401$ ;  $P < 0.05$ ). The serum level of IP-10 did not have a significant correlation with total bilirubin (TB) ( $r = 0.223$ ;  $P > 0.05$ ). After PE, the serum level of IP-10 in patients with SHB decreased, but not significantly, when compared with that before PE. On day 5 after PE, the serum level of IP-10 in patients with SHB further decreased and was significantly lower when compared with that before PE ( $P < 0.01$ ,  $P < 0.05$ ); IP-10 level in the remission group was significantly lower than that in the aggravated group ( $P < 0.01$ ).

**CONCLUSION:** Serum level of IP-10 correlates with severity of hepatic injury, and the serial changes after PE reflect the progression of the disease in patients with SHB. Our results indicate that IP-10 is involved in the immunopathological mechanism that leads to the development and progression of SHB.

**Key Words:** Severe hepatitis B; Interferon-inducible protein-10; Plasma exchange

Luo YW, Luo JM, Lin SD, Yi XD. Clinical significance of serum interferon-inducible protein-10 and serial changes in patients with severe hepatitis B. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007; 15(24): 2648-2651

### 摘要

**目的:** 探讨干扰素诱导蛋白10(IP-10)与重型乙型肝炎(SHB)患者肝脏炎症程度及病情发展的关系。

**方法:** 采集SHB患者40例血浆置换(PE)开始、结束及PE后5 d血清,根据SHB患者PE后5 d病情转归情况分为好转组及恶化组;采集慢性乙型肝炎(CHB)患者及健康对照各20例血清;双抗体夹心ELISA法检测血清干扰素(IFN)诱导蛋白10(IP-10)、肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )水平。

常规检测SHB患者入院时、PE后5 d总胆红素(TB), 凝血酶原活动度(PTA)。

**结果:** 入院时SHB及CHB组血清IP-10均高于健康对照组( $683.56 \pm 174.63$ ,  $216.13 \pm 102.92$  vs  $107.61 \pm 55.81$ ,  $P < 0.01$ ), SHB组高于CHB组( $P < 0.01$ ); SHB患者血清IP-10与TNF- $\alpha$ 呈正相关( $r = 0.366$ ;  $P < 0.05$ ), 与PTA呈负相关( $r = -0.401$ ;  $P < 0.05$ ), 与TB相关性不明显( $r = 0.223$ ,  $P > 0.05$ )。PE后5 d SHB好转组及恶化组较入院时血清IP-10均明显下降( $P < 0.01$ ,  $P < 0.05$ ), 恶化组高于好转组( $P < 0.01$ )。

**结论:** 血清IP-10参与了SHB肝脏的免疫损伤; IP-10水平与肝脏炎症损害程度有关; 动态观察IP-10在SHB患者PE前后的变化, 能反映SHB患者病情发展及转归。

**关键词:** 重型乙型肝炎; 干扰素诱导蛋白10; 血浆置换

罗亚文, 罗军敏, 林世德, 易学东. 重型乙型肝炎患者血清IP-10的动态观察及临床意义. 世界华人消化杂志 2007;15(24):2648-2651

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/2648.asp>

## 0 引言

重型乙型肝炎(SHB)是由HBV感染导致的终末期肝病, 其发病凶险, 国内报道病死率在50%-80%左右<sup>[1]</sup>, 目前对SHB的发病机制尚未完全清楚, 已有的研究表明, 细胞免疫异常可能是SHB免疫发病机制的重要原因, 其中CTL介导的免疫应答异常可造成肝组织的大面积损伤, SHB呈现以CTL、单核细胞浸润为主的病理特征<sup>[2]</sup>, 故研究CTL如何趋化于特定的炎症部位, 对于揭示SHB的发生及发展有重要意义. 干扰素诱导蛋白10(IP-10)对表达其特异性受体CXCR3的T细胞和B细胞等有较强的趋化功能和活化作用<sup>[3]</sup>, 在炎症部位对淋巴细胞的募集中起重要作用, 故IP-10可能在SHB的免疫病理损伤中发挥重要作用. 我们初步探讨了IP-10在SHB免疫发病机制及病情发展转归中的作用及意义。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** SHB患者40例, 慢性乙型肝炎(CHB)患者20例, 男17例, 女3例, 年龄19-53(平均年龄)34.55岁. 诊断符合2000年全国病毒性肝炎和肝病学术会议修订的《病毒性肝炎防治方案》标准, SHB均为慢性重型肝炎患者, CHB均为

CHB轻-中度患者, 排除其他病毒感染及并发症等, 所有患者入院前及血浆置换(PE)治疗前均未使用过糖皮质激素类药物. 20例健康对照组为门诊体检健康者。

**1.2 方法** SHB患者均在内科综合治疗基础上加用PE治疗, PE后分为好转组20例, 恶化组20例. 分组标准: PE后5 d, 一般情况好转, TB下降30%及PTA上升15%以上者为好转, 反之为恶化(含病重自动出院及死亡病例). SHB两组患者入院时一般资料见表1. 采集SHB患者入院时、PE开始、PE结束及PE后5 d静脉血, 采集CHB患者及健康对照组静脉血, 分离血清-20℃保存备用. 双抗体夹心ELISA法检测所有标本IP-10及SHB患者入院时TNF- $\alpha$ 。

**统计学处理** 采用SPSS12.0软件进行统计分析, 研究数据按成组统计要求收集、整理、建立数据库, 结果用mean $\pm$ SD表示, 多样本均数比较采用方差分析; 两两比较用 $q$ 检验, 配对资料采用 $t$ 检验, 相关性分析采用Pearson相关分析。

## 2 结果

**2.1 SHB患者入院时一般资料** SHB好转组TB, HBV DNA低于恶化组, PTA高于恶化组, 提示恶化组病情较好转组重, 但两组间性别、年龄、TB、PTA、HBV DNA比较无统计学差异( $P > 0.05$ , 表1)。

**2.2 HB患者入院时血清IP-10水平及与TNF- $\alpha$ , TB, PTA之间的相关性分析** 入院时SHB及CHB组血清IP-10均高于健康对照组( $P < 0.01$ ), SHB组高于CHB组( $P < 0.01$ , 表2). 将SHB患者入院时血清IP-10分别与TNF- $\alpha$ , TB, PTA之间作两两相关性分析, 结果显示IP-10与TNF- $\alpha$ 呈正相关关系( $r = 0.366$ ;  $P < 0.05$ ), 与PTA呈负相关关系( $r = -0.401$ ;  $P < 0.05$ ), 与TB未见相关性( $r = 0.223$ ;  $P > 0.05$ )(表2)。

**2.3 SHB患者PE前后血清IP-10动态检测结果** 入院时、PE开始、PE结束时SHB好转组及恶化组血清IP-10水平变化均不明显( $P > 0.05$ ), PE后5 d SHB两组较入院时均下降显著( $P < 0.01$ ,  $P < 0.05$ ), 但PE后5 d SHB恶化组高于好转组( $P < 0.01$ )(图1)。

## 3 讨论

趋化性细胞因子是近年来引起广泛关注的一类小分子蛋白质. 趋化性细胞因子以受体-配体结合的形式发挥作用, 与炎症反应密切相关, IP-10是新近发现的属于CXC类的趋化因子, 主要由

### ■研发前沿

近年来的研究发现IP-10与多种疾病有关, 如SARS、结核、肿瘤、病毒性肝炎等, 但目前主要限于对炎症局部IP-10水平的检测。

### ■相关报道

目前国内外学者在IP-10与慢性病毒性肝炎及病毒性肝炎动物模型的研究发现, IP-10需与其特异性受体CXCR3结合才能发挥生物学作用; 表达CXCR3的CTL等T细胞可受IP-10的吸引, 迁移至受感染的肝组织, 导致大量肝细胞损伤。



### ■创新盘点

现有的SHB免疫机制及血浆置换的研究中,有多种细胞因子的研究,但对趋化因子尤其是IP-10在SHB的免疫发病机制及血浆置换前后的动态观察及意义还未见报道。

表 1 SHB患者入院时一般资料(mean ± SD)

分组	n	性别(男/女)	年龄(岁)	TB (μmol/L)	PTA (%)	HBV DNA (log)
好转组	20	18/2	33.95 ± 10.29	401.28 ± 112.69	0.31 ± 0.08	4.16 ± 0.71
恶化组	20	18/2	39.75 ± 10.42	445.57 ± 137.34	0.27 ± 0.06	4.75 ± 0.98

表 2 SHB患者入院时血清IP-10, TNF-α, TB, PTA水平(mean ± SD)

分组	n	IP-10 (ng/L)	TNF-α (ng/L)	TB (μmol/L)	PTA (%)
NC	20	107.61 ± 55.81 <sup>b</sup>	—	—	—
CHB	20	216.13 ± 102.92	—	—	—
SHB	40	683.56 ± 174.63 <sup>b</sup>	108.46 ± 41.37	426.295 ± 129.28	0.29 ± 0.07

<sup>b</sup>P<0.01 vs CHB组。

干扰素等诱导产生<sup>[4]</sup>,已有的研究表明,慢性丙型肝炎(CHC)、自身免疫性肝病、HBV感染动物模型炎症部位的肝细胞大量分泌IP-10,炎症部位的T细胞(主要是CTL)等表达相应受体分子CXCR3<sup>[5-7]</sup>,因此,IP-10及其受体的相互作用可能是炎症细胞向肝组织定向迁移造成大面积肝细胞坏死的重要因素。

为探讨IP-10在SHB发生、病情发展及转归中的作用,SHB时外周血液中IP-10水平的改变,我们采用ELISA法检测SHB患者血清IP-10水平,结果显示,入院时SHB及CHB组血清IP-10均高于健康对照组,提示IP-10参与了病毒性乙型肝炎时的免疫损伤;研究还发现,SHB患者组血清IP-10高于CHB组,说明肝脏炎症损害程度越重,血清IP-10水平越高,故血清IP-10水平在一定程度上可反映病毒性乙型肝炎患者的炎症损害程度。其原因可能是由于HBV感染刺激Th1细胞分泌IFN-γ,IFN-γ又可诱导肝细胞炎症局部IP-10表达增强,从而趋化表达其特定受体分子CXCR3的CTL等细胞迁移到受感染的肝组织,形成炎症性浸润及组织损伤,由于炎症部位肝细胞坏死,损伤可能致被动脱落进入血循环的IP-10增加,因此可通过检测血清IP-10浓度间接反映肝细胞炎症局部IP-10的表达情况。Kakimi *et al*<sup>[8]</sup>在HBV转基因小鼠模型中采用抗IP-10治疗炎症反应,可明显减少CTL炎症浸润及病变程度,从另一角度证实了此论点。

已有的研究证明血清TNF-α水平与肝细胞炎症和坏死程度密切相关<sup>[9-10]</sup>,TB及PTA是目前临床较为常用的反映肝脏炎症损害程度的重要指标,尤其是PTA在SHB患者病情及预后的判断

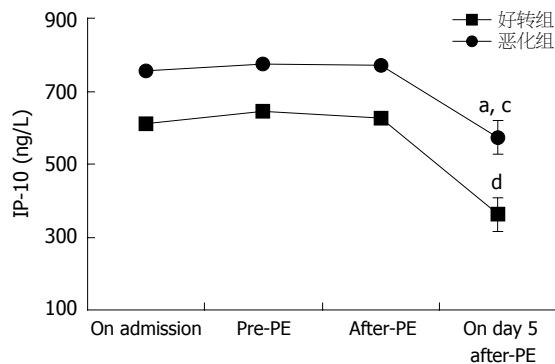


图 1 SHB患者PE前后血清IP-10的动态变化。<sup>a</sup>P<0.01 vs 好转组; <sup>b</sup>P<0.05, <sup>d</sup>P<0.01 vs 入院时。

中具有重要价值。相关性分析发现SHB患者入院时血清IP-10与TNF-α呈正相关,与PTA呈显著负相关,进一步提示血清IP-10与TNF-α,PTA一起反映了SHB患者的炎症损害程度。但我们未发现血清IP-10与TB有相关性。已有的研究表明病毒性乙型肝炎患者体内IP-10主要由肝细胞产生,而肝外器官很少有分泌<sup>[2]</sup>,与所有脏器受侵袭时广泛产生的TNF-α等炎性细胞因子相比,IP-10有可能成为反映肝脏炎症损伤特异性好而且灵敏的指标。

由于SHB患者病情危重,影响其转归的因素复杂,故临床上动态观察某一因素在SHB疾病发展过程中的作用较困难,既往亦鲜见SHB动态研究的报道,我们利用PE可快速影响血浆中细胞因子这一特点<sup>[11-15]</sup>,对所有SHB患者进行PE治疗,在较短时间内动态观察血清IP-10在PE前后的变化,发现PE结束时SHB两组血清IP-10水平较PE前无明显下降,其原因可能是在PE治疗过程中血浆中部分IP-10虽可随废弃的血浆被

### ■应用要点

本研究应用简便的双抗体夹心ELISA方法检测SHB患者血清动态IP-10水平,发现血清IP-10水平与肝脏炎症损害程度有关,能反映SHB患者病情发展及转归。

迅速清除, 但体液中IP-10浓度的平衡被打破, 炎症局部的IP-10又迅速渗入到血浆所致; 研究还发现, PE后5 d SHB两组血清IP-10较入院时均有所下降, 尤以好转组下降更为显著, 提示PE可影响血清IP-10水平且与SHB的病情发展及转归有关, 其原因可能是PE治疗可迅速清除血浆中的TNF- $\alpha$ 等炎性细胞因子<sup>[12]</sup>, 从而减轻了炎性细胞与IP-10间的级联反应, 同时炎症局部的IP-10由于不断释放到血浆中被清除, 耗竭了炎症局部的IP-10, 进一步使血清IP-10水平逐渐下降, 故对炎症细胞尤其是CTL的趋化及功能活化能力减弱, 减少了CTL等在肝脏炎症部位的浸润, 有利于肝脏组织的修复, 因此, 血清IP-10水平可反映肝组织的损伤与修复。

总之, 我们的研究表明血清IP-10水平与肝脏炎症损害程度有关, 即肝脏炎症损害越重, 血清IP-10水平越高; 动态观察IP-10在SHB患者PE前后的变化, IP-10能反映SHB患者病情发展及转归。提示IP-10参与了SHB肝脏的免疫损伤。

#### 4 参考文献

- 1 You J, Zhuang L, Tang BZ, Yang WB, Ding SY, Li W, Wu RX, Zhang HL, Zhang YM, Yan SM, Zhang L. A randomized controlled clinical trial on the treatment of Thymosin  $\alpha$ 1 versus interferon-alpha in patients with hepatitis B. *World J Gastroenterol* 2001; 7: 411-414
- 2 Tang JT, Fang JY, Gu WQ, Li EL. T cell immune response is correlated with fibrosis and inflammatory activity in hepatitis B cirrhotics. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 3015-3019
- 3 史丽云, 张立煌, 李明伟. 慢性乙型肝炎患者外周血淋巴细胞上CXCR3表达的初步观察. *细胞与分子免疫学杂志* 2003; 19: 380-382
- 4 Liu MT, Chen BP, Oertel P, Buchmeier MJ, Armstrong D, Hamilton TA, Lane TE. The T cell chemoattractant IFN-inducible protein 10 is essential in host defense against viral-induced neurologic disease. *J Immunol* 2000; 165: 2327-2330
- 5 Narumi S, Tominaga Y, Tamaru M, Shimai S, Okumura H, Nishioji K, Itoh Y, Okanoue T. Expression of IFN-inducible protein-10 in chronic hepatitis. *J Immunol* 1997; 158: 5536-5544
- 6 Nagayama K, Enomoto N, Miyasaka Y, Kurosaki M, Chen CH, Sakamoto N, Nakagawa M, Sato C, Tazawa J, Ikeda T, Izumi N, Watanabe M. Overexpression of interferon gamma-inducible protein 10 in the liver of patients with type I autoimmune hepatitis identified by suppression subtractive hybridization. *Am J Gastroenterol* 2001; 96: 2211-2217
- 7 Ng PC, Lam CW, Li AM, Wong CK, Leung TF, Cheng FW, Hon KL, Chan IH, Wong E, Fok TF. Chemokine response in children with SARS. *Arch Dis Child* 2005; 90: 422-423
- 8 Kakimi K, Lane TE, Chisari FV, Guidotti LG. Cutting edge: Inhibition of hepatitis B virus replication by activated NK T cells does not require inflammatory cell recruitment to the liver. *J Immunol* 2001; 167: 6701-6705
- 9 Streetz K, Leifeld L, Grundmann D, Ramakers J, Eckert K, Spengler U, Brenner D, Manns M, Trautwein C. Tumor necrosis factor alpha in the pathogenesis of human and murine fulminant hepatic failure. *Gastroenterology* 2000; 119: 446-460
- 10 陈瑞烈, 王文锋, 周震, 刘敏. 重型乙型肝炎血清IL-1、IL-6和TNF- $\alpha$ 水平的变化研究. *临床肝胆病杂志* 2005; 21: 273-274
- 11 隋云华, 许家璋, 高蕾, 韩振红, 何长伦. 1260例重型肝炎治疗研究. *南京部队医药* 2002; 4: 1-3
- 12 甘建和, 赵卫峰, 徐杰, 罗二平, 江敏华, 吴旭东, 施敏, 庞中强. 血浆置换治疗慢性重型肝炎的疗效评估及影响因素分析. *透析与人工器官* 2004; 15: 26-30
- 13 单晶, 王力, 金瑞, 刘青, 韩大康, 段钟平. 人工肝支持系统对慢性重型肝炎临床治疗的探讨. *中国医刊* 2003; 38: 31-32
- 14 De Silvestro G, Marson P, Brandolese R, Pittoni G, Ongaro G. A single institution's experience (1982-1999) with plasma-exchange therapy in patients with fulminant hepatic failure. *Int J Artif Organs* 2000; 23: 454-461
- 15 Du WB, Li LJ, Huang JR, Yang Q, Liu XL, Li J, Chen YM, Cao HC, Xu W, Fu SZ, Chen YG. Effects of artificial liver support system on patients with acute or chronic liver failure. *Transplant Proc* 2005; 37: 4359-4364

#### ■同行评价

本文动态观察了重型乙型肝炎患者血清中IP-10的表达, 结果表明IP-10水平与肝脏炎症损害程度有关, 提示IP-10有可能成为反映肝脏炎症损伤特异性好而又灵敏的指标, 有一定的临床价值。

编辑 程剑侠 电编 张敏

# ER $\beta$ 和VEGF在大肠癌中的表达及临床意义

李建文, 陶凯雄, 蔡开琳

## ■背景资料

雌激素可能影响大肠癌的发生, 但机制尚不明确。近年来, 大肠黏膜细胞中也发现了ER $\beta$ 的表达, 为人们所关注。大量文献报道ER $\beta$ 在乳腺、子宫、卵巢、前列腺等雌激素靶器官肿瘤发生、发展中的作用, 而对大肠癌中ER $\beta$ 表达的研究并不多。本文检测ER $\beta$ 、VEGF在大肠癌中的表达, 探讨其在大肠癌发生、发展中的作用。

李建文, 陶凯雄, 蔡开琳, 华中科技大学同济医学院附属协和医院普通外科 湖北省武汉市 430022

国家自然科学基金资助项目, No. 30500488

通讯作者: 蔡开琳, 430022, 湖北省武汉市解放大道1277号, 华中科技大学同济医学院附属协和医院普通外科。

caikailin@yahoo.com.cn

电话: 027-85351619

收稿日期: 2007-03-22 修回日期: 2007-08-12

## Expression and clinical significance of estrogen receptor $\beta$ and vascular endothelial growth factor in colorectal carcinoma

Jian-Wen Li, Kai-Xiong Tao, Kai-Lin Cai

Jian-Wen Li, Kai-Xiong Tao, Kai-Lin Cai, Department of General Surgery, Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, Hubei Province, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30500488

Correspondence to: Kai-Lin Cai, Department of General Surgery, Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, 1277 Jiefang Avenue, Jiangnan District, Wuhan 430022, Hubei Province, China. caikailin@yahoo.com.cn

Received: 2007-03-22 Revised: 2007-08-12

## Abstract

**AIM:** To investigate the expression of estrogen receptor  $\beta$  (ER $\beta$ ) and vascular endothelial growth factor (VEGF) in colorectal cancer tissue, and to determine their relationship with histological type.

**METHODS:** Expression of ER $\beta$  and VEGF was detected using an immunohistochemistry SP method in 45 cases of colorectal cancer. Normal colorectal mucosa from 10 patients was used as a control. The relationship between colorectal cancer and the expression of ER $\beta$  and VEGF was investigated.

**RESULTS:** ER $\beta$  and VEGF expression was detected in 23 (51.11%) and 33 (73.33%) of the 45 cases, respectively. ER $\beta$  and VEGF expression was significantly correlated with the histological type ( $P = 0.024$ , and  $P = 0.005$ ), but there was

no correlation with disease stage ( $P = 0.289$ ,  $P = 0.173$ ). There was a significant difference on the VEGF expression between the group positive and negative for ER $\beta$  (56.52% vs 90.90%,  $P < 0.05$ ).

**CONCLUSION:** The positive expression of ER $\beta$  is closely correlated with the development of carcinogenesis and prognosis of colorectal carcinoma. Detection of both ER $\beta$  and VEGF appears to be a valuable tumor marker and prognostic factor for colorectal carcinoma.

**Key Words:** Colorectal cancer; Estrogen receptor  $\beta$ ; Vascular endothelial growth factor; Immunohistochemistry

Li JW, Tao KX, Cai KL. Expression and clinical significance of estrogen receptor  $\beta$  and vascular endothelial growth factor in colorectal carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007; 15(24): 2652-2656

## 摘要

**目的:** 探讨雌激素受体 $\beta$ (ER $\beta$ )、血管内皮生长因子(VEGF)在大肠癌组织中的表达以及与大肠癌分化程度之间的关系。

**方法:** 应用免疫组织化学SP法, 检测45例大肠癌中ER $\beta$ 、VEGF的表达, 并以10例正常大肠黏膜组织作对照, 分析大肠癌组织中ER $\beta$ 与VEGF的表达与大肠癌的关系。

**结果:** 45例大肠癌组织中, ER $\beta$ 阳性23例(51.11%), VEGF阳性33例(73.33%)。ER $\beta$ 和VEGF的表达与肿瘤的分化程度有关( $P = 0.024$ ,  $P = 0.005$ ), 而与肿瘤的临床分期无关( $P = 0.289$ ,  $P = 0.173$ )。ER $\beta$ 阳性组中, VEGF的表达明显低于ER $\beta$ 阴性组(56.52% vs 90.90%,  $P < 0.05$ )。

**结论:** ER $\beta$ 的阳性表达与大肠癌的发生、发展和预后密切相关, 可联合VEGF作为有价值的肿瘤标记和预后指标。

**关键词:** 大肠癌; 雌激素受体 $\beta$ ; 血管内皮生长因子; 免疫组化

李建文, 陶凯雄, 蔡开琳. ER $\beta$ 和VEGF在大肠癌中的表达及临床意义. 世界华人消化杂志 2007;15(24):2652-2656  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/2652.asp>

## 0 引言

1996年Mosselman *et al*<sup>[1]</sup>从人睾丸组织中克隆出一种新型雌激素受体, 并命名为雌激素受体 $\beta$ (ER $\beta$ ), 这是发现的第一种由不同基因编码的甾体类激素受体亚型, 立即引起学者们的广泛关注. Enmark *et al*<sup>[2]</sup>采用原位杂交方法发现ER $\beta$  mRNA在胃、十二指肠、结肠和直肠黏膜呈高表达, 另外, 在淋巴结、脾脏和小肠也大量表达. Campbell-Thompson *et al*<sup>[3]</sup>用免疫组化方法发现正常结肠表皮细胞、血管平滑肌细胞和血管内皮细胞、肠神经细胞等表达ER $\beta$ 蛋白. Takeyama *et al*<sup>[4]</sup>用半定量RT-PCR方法检测13, 20和38 wk胎儿消化道器官的ER $\alpha$ , ER $\beta$ 的分布, 发现肝脏、胃、结肠、小肠均有ER $\beta$  mRNA 的表达. 血管内皮生长因子是1989年初Ferrara<sup>[5]</sup>和Gospodarowiz *et al*分别在牛垂体滤泡星状细胞体外培养液中首先纯化出来的, 而后由Leung *et al*首先从牛垂体滤泡cDNA文库中用多克隆杂交系列分析克隆, 他是由某些肿瘤细胞分泌, 并与血管内皮上的受体结合, 可诱导肿瘤血管生成, 维持肿瘤的持续生长, 是重要的血管生成因子, 已经发现与肿瘤的预后有关. 大量文献报道ER $\beta$ 在乳腺、子宫、卵巢、前列腺肿瘤发生、发展中的作用<sup>[6-10]</sup>, VEGF在胃癌中的表达研究较多<sup>[11-12]</sup>, 而对大肠癌中ER $\beta$ , VEGF表达的研究并不多. 近年来由于经济发展, 人民生活水平的提高以及饮食结构的改变, 大肠癌的发病率一直呈上升趋势, 为人们所关注. 本实验采用免疫组化SP法检测ER $\beta$ , VEGF在大肠癌中的表达, 探讨其在大肠癌发生、发展中的作用.

## 1 材料和方法

1.1 材料 2005-10/2006-06华中科技大学同济医学院附属协和医院胃肠外科住院手术45例大肠癌患者, 男28例, 女17例. 年龄23-79(平均51)岁. 直肠癌20例, 结肠癌25例. 组织学类型: 高分化腺癌6例, 中分化腺癌29例, 低分化腺癌10例; Dukes分期: A期7例, B期21例, C+D期17例. 所有病例术前均未接受放化疗, 且术后经病理证实. 另取10例正常大肠黏膜组织作为对照. 抗-VEGF抗体购自武汉博士德生物技术有限公司, 抗-ER $\beta$ 抗体购自美国SantaCruz公司.

1.2 方法 所有标本经石蜡包埋, 4  $\mu$ m厚切片. 经常规脱蜡、水化后, 30 mL/L过氧化氢甲醇溶液室温下封闭30 min, 山羊血清室温下孵育30 min, 抗原热修复, 分别加入一抗液、生物素标记的二抗及链霉素抗生物素蛋白-过氧化物溶液各15 min(37℃水浴下), 显色、复染、透明、封片. 每次免疫组化染色均设立阴性对照片, 严格控制反应条件. ER $\beta$ 阳性结果判定方法: 阳性细胞呈棕黄色, 并按切片中阳性细胞数占肿瘤细胞的比例分3个等级, +为20%-40%, ++为40%-60%, +++为60%以上. VEGF阳性结果判定方法: VEGF均以胞质或胞膜出现棕黄色颗粒为阳性细胞. 每例随机观察5个视野, 每个视野100个细胞, 计数500个细胞中染色阳性细胞数, <5%为阴性、6%-20%为弱阳性、21%-50%为中阳性、50%以上为强阳性.

统计学处理 数据处理采用SPSS10.0软件, 各构成比的比较应用 $\chi^2$ 检验或Fisher精确概率法进行分析.  $P<0.05$ 为结果有统计学意义.

## 2 结果

2.1 ER $\beta$ 在大肠癌组织中的表达 大肠癌组织中ER $\beta$ 的阳性率为51.11%(23/45), 镜下可见阳性反应物质主要表达于胞质或胞膜, 偶见胞核着色, 阳性颗粒粗细不等(图1). ER $\beta$ 表达与年龄、性别、肿块大小和临床分期无关( $P>0.05$ ), 与肿瘤分化程度关系明显( $P<0.05$ )(表1).

2.2 VEGF在大肠癌组织中的表达 VEGF的阳性率为73.33%(33/45)(表1), 镜下可见阳性反应物质主要表达于黏膜细胞的胞质, 间质细胞也有表达(图2).

2.3 ER $\beta$ 与VEGF的关系 ER $\beta$ 阳性组VEGF的表达56.52%, 明显低于阴性组的表达90.90%( $P<0.05$ )(表2).

## 3 讨论

大肠癌是消化道常见的恶性肿瘤之一, 每年全世界约有50万人发病, 在西方国家大肠癌死亡率仅次于肺癌和乳腺癌, 居恶性肿瘤死亡率第3位<sup>[13]</sup>. 据1990-1992年中国1/10人口死因抽样调查结果显示, 中国大肠癌的年死亡率为5.30/10万. 居恶性肿瘤死因第5位<sup>[14]</sup>. 在我国, 南方发病率高于北方. ER $\beta$ 基因位于14q22-24区, 为40 kb, ER $\beta$ 蛋白含530个氨基酸, 分子量为59.2 kDa, 为核受体超家族成员, 是一类配体调节的转录因子, 通过与不同

### ■研究前沿

目前对ER $\beta$ 在乳腺、生殖器官中的作用有较多研究. 在大肠癌发生中的作用研究较少. 但由于流行病学调查发现, 雌激素可明显影响大肠癌的发生, 其机制研究也成为近年来的热点.



**■创新盘点**  
本文应用不同病理类型的大肠黏膜标本,同时检测了ERβ和VEGF表达,发现大肠癌中ERβ表达与肿瘤分化程度负相关,与VEGF的表达可能也存在负相关关系。

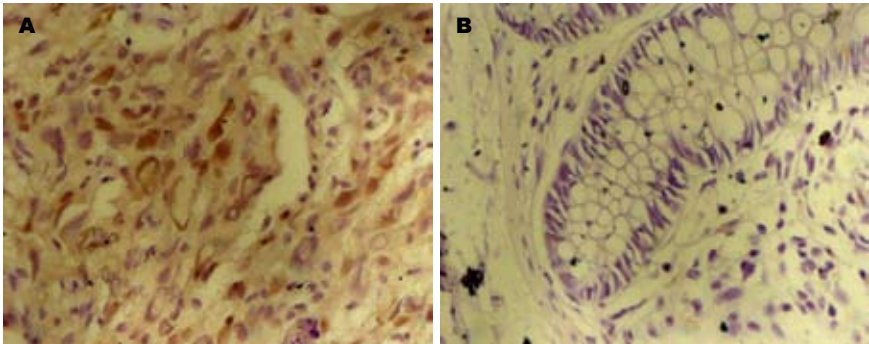


图 1 ERβ在大肠黏膜中的表达. A: ERβ阳性; B: ERβ阴性.

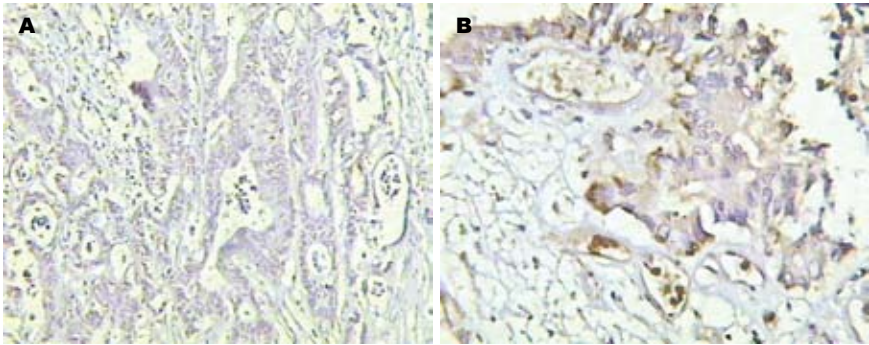


图 2 VEGF在大肠癌中的表达(SP × 200). A: 高分化大肠癌; B: 低分化大肠癌.

表 1 大肠癌ERβ和VEGF的表达与临床病理特征的关系

分组	n	ERβ表达		阳性率	P值	VEGF表达		阳性率	P值
		阳性数	阴性数			阳性数	阴性数		
性别									
男	28	15	13	53.57	0.454	20	8	71.43	0.745
女	17	8	9	47.06		13	4	76.47	
年龄									
≤52	12	5	7	41.67	0.514	10	2	83.33	0.466
≥52	33	15	18	54.55		23	10	69.70	
肿块大小									
<3 cm	9	5	4	55.56	0.637	7	2	77.78	0.829
3-5 cm	17	7	10	41.18		13	4	76.47	
>5 cm	19	11	8	57.89		13	6	68.42	
分化程度									
高分化	6	4	2	66.67		1	5	16.67	
中分化	29	18	11	62.07	0.024	23	6	79.31	0.005
低分化	10	1	9	10.00		9	1	90.00	
临床分期									
A	7	2	5	28.57		5	2	71.43	
B	21	10	11	47.62	0.289	18	3	85.71	0.173
C+D	17	11	6	64.71		10	7	58.82	

配体和反应元件结合,调节一系列靶基因转录,进而发挥生物学作用. ERβ基因能产生多种转录本,现已发现其几种异构体,如ERβ1, ERβ2, ERβ3, ERβ4, ERβ5等,但生理意义目前尚不清楚. Fiorelli *et al*<sup>[15]</sup>采用RT-PCR方法检测了HCT116, HCT8, DLD-1和Lovo等结肠腺癌细胞

株,发现均存在ERβ mRNA表达,其中高度保守的ERβ1在这4个细胞株中呈高表达,而ERβ2-ERβ5仅在HCT116和HCT8两个细胞株中表达,Western blot证实存在ERβ蛋白表达, Arai *et al*<sup>[16]</sup>对HT29, Colo320, Lovo, SW480和HCT116 5个结肠腺癌细胞株的研究发现,这些细胞株都存



表 2 大肠癌ERβ表达与VEGF的关系

VEGF的表达	ERβ的表达	
	阳性	阴性
阳性	13	20
阴性	10	2

$\chi^2 = 6.799, P = 0.009; r = 0.624, P = 0.008.$

在ERβ mRNA的表达. 本实验ERβ的阳性表达率为51.11%, 他的表达与肿瘤的分化程度有关( $P < 0.05$ ), 而与肿瘤的临床分期无关( $P > 0.05$ ). ERβ蛋白缺失可能与结肠肿瘤的发生有密切关系, 雌激素替代治疗对结肠的保护作用可能也通过ERβ介导.

肿瘤的生长、侵袭及转移过程受到多种因素的影响, 肿瘤血管生长对实体瘤的生长起重要作用, 是影响肿瘤生物行为和转移潜在的重要因素. VEGF是一种促血管形成的内皮细胞特异的生长因子, 已有大量证据表明他在肿瘤的发展、转移中起着重要的作用. VEGF是一种分子量为34-50 ku的糖蛋白, 他的一个重要作用是刺激血管内皮细胞增殖、迁移并形成新生的血管. 这些新血管是肿瘤组织生长的必备条件, 同时也是肿瘤转移的基础. 我们的实验中肿瘤高分化的6例, 其中VEGF阳性表达1例(16.67%), 中分化的29例, VEGF阳性表达23例(79.31%), 低分化的10例, VEGF阳性表达9例(90.00%), 三者之间差异显著( $P < 0.05$ ). VEGF蛋白表达与大肠癌分化程度有相关性, 即随着大肠癌分化程度降低, VEGF表达增强, 存在统计学意义( $P < 0.05$ ), 与Zheng *et al*<sup>[17]</sup>研究结果一致.

我们研究发现, ERβ阳性组VEGF的表达56.52%, 明显低于阴性组的表达90.90%( $P < 0.05$ ). 目前已有研究发现, 雌激素可能通过ERα或ERβ影响VEGF的表达<sup>[18-19]</sup>, 随着对ERβ作用机制的研究, 也许可以开发出特异地以ERβ为作用靶点的更有效更安全的抗癌药物, 这将打开新的治疗结肠肿瘤的策略之门.

#### 4 参考文献

- Mosselman S, Polman J, Dijkema R. ER beta: identification and characterization of a novel human estrogen receptor. *FEBS Lett* 1996; 392: 49-53
- Enmark E, Pelto-Huikko M, Grandien K, Lagercrantz S, Lagercrantz J, Fried G, Nordenskjold M, Gustafsson JA. Human estrogen receptor beta-gene structure, chromosomal localization, and

- expression pattern. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82: 4258-4265
- Campbell-Thompson M, Lynch IJ, Bhardwaj B. Expression of estrogen receptor (ER) subtypes and ERbeta isoforms in colon cancer. *Cancer Res* 2001; 61: 632-640
- Takeyama J, Suzuki T, Inoue S, Kaneko C, Nagura H, Harada N, Sasano H. Expression and cellular localization of estrogen receptors alpha and beta in the human fetus. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86: 2258-2262
- Ferrara N. Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. *Endocr Rev* 2004; 25: 581-611
- Saji S, Omoto Y, Shimizu C, Warner M, Hayashi Y, Horiguchi S, Watanabe T, Hayashi S, Gustafsson JA, Toi M. Expression of estrogen receptor (ER) (beta)cx protein in ER(alpha)-positive breast cancer: specific correlation with progesterone receptor. *Cancer Res* 2002; 62: 4849-4853
- Ahr A, Karn T, Solbach C, Seiter T, Strebhardt K, Holtrich U, Kaufmann M. Identification of high risk breast-cancer patients by gene expression profiling. *Lancet* 2002; 359: 131-132
- Bardin A, Hoffmann P, Boulle N, Katsaros D, Vignon F, Pujol P, Lazennec G. Involvement of estrogen receptor beta in ovarian carcinogenesis. *Cancer Res* 2004; 64: 5861-5869
- Skrzypczak M, Bieche I, Szymczak S, Tozlu S, Lewandowski S, Girault I, Radwanska K, Szczylik C, Jakowicki JA, Lidereau R, Kaczmarek L. Evaluation of mRNA expression of estrogen receptor beta and its isoforms in human normal and neoplastic endometrium. *Int J Cancer* 2004; 110: 783-787
- Lai JS, Brown LG, True LD, Hawley SJ, Etzioni RB, Higano CS, Ho SM, Vessella RL, Corey E. Metastases of prostate cancer express estrogen receptor-beta. *Urology* 2004; 64: 814-820
- 徐文华, 葛银林, 徐宏伟, 王秀丽, 耿芳宋. VEGF基因表达抑制对胃腺癌细胞SGC-7901增殖的影响. *世界华人消化杂志* 2006; 14: 655-659
- Ma J, Zhang L, Ru GQ, Zhao ZS, Xu WJ. Upregulation of hypoxia inducible factor 1alpha mRNA is associated with elevated vascular endothelial growth factor expression and excessive angiogenesis and predicts a poor prognosis in gastric carcinoma. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 1680-1686
- Houlston RS. What we could do now: molecular pathology of colorectal cancer. *Mol Pathol* 2001; 54: 206-214
- 李连弟, 鲁凤珠, 张思维, 牧人, 孙秀娣, 皇甫小梅, 孙杰, 周有尚, 欧阳宁慧, 饶克勤, 陈育德, 孙爱明, 薛志福, 夏毅. 中国恶性肿瘤死亡率20年变化趋势和近期预测分析. *中华肿瘤杂志* 1997; 19: 3-9
- Fiorelli G, Picariello L, Martinetti V, Tonelli F, Brandi ML. Functional estrogen receptor beta in colon cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 261: 521-527
- Arai N, Strom A, Rafter JJ, Gustafsson JA. Estrogen receptor beta mRNA in colon cancer cells: growth effects of estrogen and genistein. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 270: 425-431
- Zheng S, Han MY, Xiao ZX, Peng JP, Dong Q. Clinical significance of vascular endothelial growth factor expression and neovascularization in

#### ■应用要点

本文发现大肠癌中, ERβ表达与VEGF的表达可能存在负相关关系, 为进一步研究ERβ对大肠癌发生过程的影响提供了基础.

### ■同行评价

本文采用免疫组化的方法检测了大肠癌中ER $\beta$ , VEGF的表达, 结果发现ER $\beta$ 的阳性表达与大肠癌的发生、发展有关。文章研究内容丰富, 图片清晰, 设计较合理, 为临床寻找新的治疗大肠癌的药物靶点提供了理论依据, 有一定的临床意义。

colorectal carcinoma. *World J Gastroenterol* 2003; 9: 1227-1230

- 18 Menendez D, Inga A, Snipe J, Krysiak O, Schonfelder G, Resnick MA. A single-nucleotide polymorphism in a half-binding site creates p53 and estrogen receptor control of vascular endothelial

growth factor receptor 1. *Mol Cell Biol* 2007; 27: 2590-2600

- 19 Hartman J, Lindberg K, Morani A, Inzunza J, Strom A, Gustafsson JA. Estrogen receptor beta inhibits angiogenesis and growth of T47D breast cancer xenografts. *Cancer Res* 2006; 66: 11207-11213

编辑 程剑侠 电编 张敏

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2007年版权归世界华人消化杂志

### • 消息 •

## 消化内镜诊疗技术研讨班通知(第一轮)

**本刊讯** 2007年国家继续医学教育项目“消化内镜诊疗技术研讨班”(项目编号2007-03-03-046)将于2007-11在青岛市举办, 由青岛大学医学院附属医院主办、世界华人消化杂志协办, 特邀国内外著名专家进行专题讲座和现场演示, 欢迎消化内镜工作者投稿参会, 优秀稿件可优先发表。回执或投稿请于2007-09月底前寄青岛大学医学院附属医院内镜诊治中心, 刘希双收, 邮编: 266003, E-mail: liuxishuangl@sina.com, 电话: 0532-82911525, 13864215672。

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2007年版权归世界华人消化杂志

### • 消息 •

## 世界华人消化杂志的同行评价

**本刊讯** 《世界华人消化杂志》对所有文章进行在线同行评价, 采用匿名方式。通常每篇文章邀请2-3位专家审阅, 至少2人通过方可录用, 否则退稿。每期最后一页致谢本期所有审稿人(含退稿)。文章等级评定: ○A级 ○B级 ○C级 ○D级 ○E级 ○不清楚。其中A和B属于很好, C和D不算太好, E是很差, 还有一部分是不清楚。

# CT引导下经皮穿刺胰腺病变的诊断价值

陈桂娥, 白林, 龙媛, 杨光, 党业天, 李立

陈桂娥, 白林, 龙媛, 杨光, 党业天, 贺州市中医医院放射科  
广西壮族自治区贺州市 542800

李立, 中山大学附属肿瘤医院 广东省广州市 510060  
通讯作者: 陈桂娥, 542800, 广西壮族自治区贺州市龙山路48号, 贺州市中医医院放射科. gech068@yahoo.com.cn  
电话: 0774-5139023

收稿日期: 2007-04-27 修回日期: 2007-08-11

## Diagnosis value of pathological changes in the pancreas under computed tomography guidance after skin puncture

Gui-E Chen, Lin Bai, Yuan Long, Guang Yang, Ye-Tian Dang, Li Li

Gui-E Chen, Lin Bai, Yuan Long, Guang Yang, Ye-Tian Dang, Department of Radiology, Hezhou Hospital of Traditional Chinese Medicine, Hezhou 542800, Guangxi Autonomous Region, China

Li Li, Cancer Hospital Affiliated to Zhongshan Medical University, Guangzhou 510060, Guangdong Province, China

Correspondence to: Gui-E Chen, Department of Radiology, Hezhou Hospital of Traditional Chinese Medicine, 48 Longshan Road, Hezhou 542800, Guangxi Autonomous Region, China. gech068@yahoo.com.cn

Received: 2007-04-27 Revised: 2007-08-11

## Abstract

**AIM:** To discuss the diagnosis value of pathological changes in the pancreas under computed tomography (CT) guidance after abdominal skin puncture.

**METHODS:** Thirty-three cases of pancreatic lesions revealed by ultrasound, CT or magnetic resonance imaging underwent CT-guided biopsy.

**RESULTS:** Of the 33 cases, 30 (92.1%) had positive pathological findings; 20 (66.7%) with pancreatic cancer, 4 (13.3%) with chronic pancreatitis, 2 (6.7%) with tuberculosis, 2 (6.7%) with aggressive stromal tumors, 1 (3.3%) with leiomyoma, and 1 (3.3%) with a somatostatin malignant tumor.

**CONCLUSION:** CT-guided biopsy of the pancreas is a safe, accurate and minimally invasive diagnostic imaging technique.

**Key Words:** Computed tomography; Pancreas disease; Biopsy

Chen GE, Bai L, Long Y, Yang G, Dang YT, Li L. Diagnosis value of pathological changes in the pancreas under computed tomography guidance after skin puncture. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007; 15(24): 2657-2659

## 摘要

**目的:** 探讨CT引导下经皮腹腔穿刺胰腺病变的诊断价值。

**方法:** 经由B超、CT或MRI等影像检查发现的33例胰腺病变进行CT引导下穿刺活检。

**结果:** 33例病例中, 30例取得阳性病理结果, 阳性率占92.1%; 其中胰腺癌20例, 占66.7%; 慢性胰腺炎4例, 占13.3%; 结核2例, 占6.7%; 恶性间质瘤2例, 占6.7%; 平滑肌瘤1例, 占3.3%; 恶性生长抑素瘤1例, 占3.3%。

**结论:** CT引导下胰腺穿刺活检术是一种安全、准确的微创影像学诊断技术。

**关键词:** CT引导; 胰腺疾病; 活检

陈桂娥, 白林, 龙媛, 杨光, 党业天, 李立. CT引导下经皮穿刺胰腺病变的诊断价值. 世界华人消化杂志 2007;15(24):2657-2659

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/2657.asp>

## 0 引言

胰腺由于其解剖位置关系, 常规影像学检查难以发现和明确其病变, 而B超、CT引导下胰腺穿刺活检提供了细胞学和组织学的诊断。B超向下穿刺活检在腹部疾病的诊断中应用较多<sup>[1-3]</sup>, 但超声由于组织反射对于腹腔深在结构影像鉴别困难, 且对于深而小的病灶或与血管关系密切的病变, 应用超声效果不满意<sup>[4]</sup>。CT由于分辨率高, 对比度好, 不但能清楚显示穿刺横断解剖结构, 增强扫描能准确显示病灶内部情况及周围重要脏器、血管结构, 而且还可以利用光标精确地测出皮肤与病变的距离, 设计出进针的

## ■背景资料

胰腺由于其解剖位置的关系常规影像学检查难以发现和明确其病变, 近年来采用CT导向活检具有安全可靠和成功率高的特点, 该技术为胰腺疾病的诊断和鉴别提供了一种重要的手段。

## ■研发前沿

CT导向下穿刺活检是1项重要的诊断技术, 目前在腹部疾病诊断方面报道较少, CT由于具有多维成像功能, 可清晰显示病灶与周围组织的解剖关系而被用作重要的导向工具。

## ■相关报道

CT引导下胰腺穿刺活检术是一种安全、准确率高的微创非血管性介入放射学诊断技术。

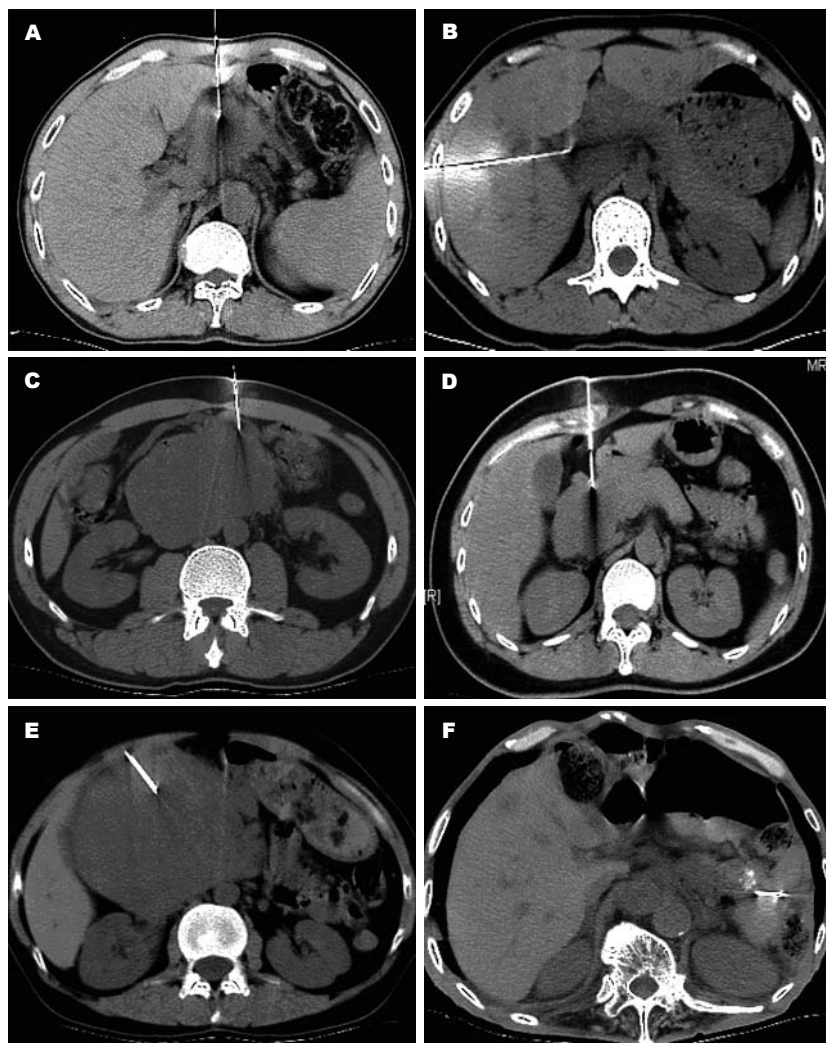


图 1 CT图片. A: 胰头癌; B: 胰头慢性炎症; C: 胰腺恶性间质瘤; D: 胰头平滑肌瘤; E: 胰腺恶性生长抑素瘤; F: 胰尾癌.

方向和角度、途径及进针深度等,避免损伤周围血管、神经等重要结构,同时还可确定针尖是否在病灶实质内,避开坏死、出血或囊变组织. CT导向活检安全可靠,成功率高,并发症相对较少,为诊断和鉴别诊断的重要手段<sup>[5]</sup>.

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 2005-04/2006-12笔者在广州中山医科大学附属肿瘤医院亲自手术的病例及回院后开展介入手术后所做的33例胰腺病变患者,男19例,女14例,年龄27-78(平均51)岁,穿刺前所有病例均经B超、CT及MRI等影像检查,明确胰腺内有病变,病灶最大约14.3 cm×19.5 cm,最小约2.3 cm×3.6 cm,位于胰头者22例,胰体者4例,胰尾者7例. GE9800CT机和西门子Somatong欢悦单排螺旋CT机;腹穿包1个,18-22 G Bard穿刺抽吸针.

**1.2 方法** 术前做血常规、出凝血时间、血小板计数、凝血酶原时间及血尿淀粉酶检查. 患者取仰卧位或者视手术需要采取特殊体位,常规行CT平扫,必要时行增强扫描后行穿刺点定位,

选择最佳穿刺层面,避开腹部大血管和相邻腹部脏器,以病变与皮肤最短距离为穿刺路径;常规消毒铺孔巾,用20 g/L利多卡因局麻生效后穿刺,再次行CT扫描见穿刺针达到病变理想部位后进行抽吸取样,令患者屏气,拔出抽吸针,术后复查CT未见并发症发生,让患者在放射科留观0.5 h,无异常嘱患者回病房或回家卧床休息,注意观察24 h;获取病例标本用750 mL/L酒精固定后送病理科行组织学检查.

## 2 结果

33例病例中获取标本48个,活检阳性30例占92.1%;阴性3例占3.3%. 33例病例中胰腺癌20例(图1A),占66.7%;慢性胰腺炎4例(图1B),占13.3%;结核2例,占6.7%;恶性间质瘤2例(图1C,图2A),占6.7%;平滑肌瘤1例(图1D,图2B),占3.3%;恶性生长抑素瘤1例(图1E),占3.3%;病变位于胰头者21例,胰体者3例,胰尾者6例(图1F,表1). 胰腺穿刺活检的并发症有出血、胰腺炎、胆汁性腹膜炎及针道种植转移. 本组病例术后

## ■创新盘点

CT导向活检在腹部疾病特别是胰腺病变穿刺活检报道较少,随着CT机日臻普及,在临床该项技术越来越普遍推广应用.



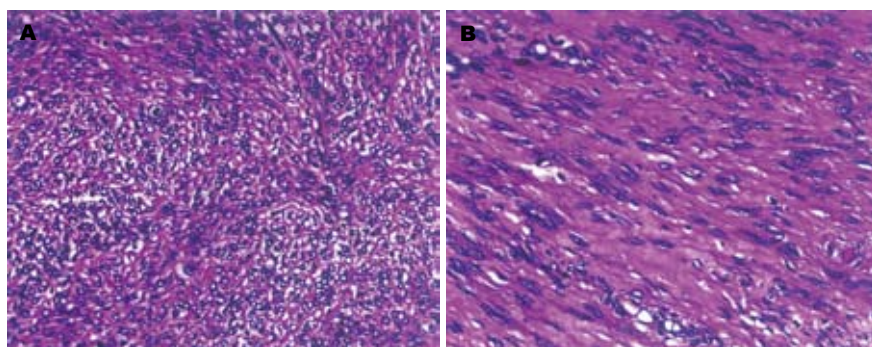


图 2 胰腺穿刺病理组织类型. A: 胰腺恶性肿瘤; B: 胰腺平滑肌瘤.

#### ■应用要点

对于临床及影像学疑为肿瘤或不排除肿瘤的病例以及恶性肿瘤治疗后或治疗过程中出现新的病灶而患者拒绝或无法手术的病例, 都可以采用穿刺活检. 穿刺活检可为临床提供一种安全准确的检查手段.

复查及24 h跟踪复查未发现并发症发生.

### 3 讨论

穿刺活检术是鉴别病变性质的1种安全而又准确的非血管性微创介入手术方法, 不仅能通过活检作出诊断, 而且能分出组织或细胞学类型, 其准确性甚高, 给临床诊断和治疗提供直接依据, 部分患者可避免不必要的探查术和改变原定治疗方案. CT由于有多维成像功能, 图像清晰, 可清楚显示病灶与周围组织血管的解剖关系而被用作导向工具<sup>[6]</sup>. 胰腺穿刺方法的选择: 术前必须认真仔细地阅读分析各种影像资料, 拟定出最佳穿刺活检方案是穿刺成功与否及减少并发症的可靠保证; 胰腺穿刺入路选择原则<sup>[7]</sup>: (1) 入路尽可能地接近病变最近部位; (2) 避开腹腔内脏和大血管; (3) 必要时可多点穿刺. 胰腺穿刺活检常见并发症有出血、胰腺炎、胆汁性腹膜炎和针道种植转移. 文献曾报道出血主要是选择路径不当, 有学者报道胰腺炎发生率为3%, 胰腺炎的发生与正常的胰腺组织受到过多穿刺有关<sup>[8]</sup>. 穿刺引起的肿瘤在针道种植或进入血液转移的发生率很罕见, 但仍有医生和患者为此担心, 理论上说有这种可能, 但国外学者统计了二千余例穿刺患者, 发现与穿刺有关的肿瘤扩散或种植发生率不足1%<sup>[9]</sup>, 因而不必过分担心活检时肿瘤播散的危险. 亦有学者认为在拔针前向针内注入0.5 mL局麻药, 可以减轻拔针疼痛, 也可以减少针道癌性种植和感染的机会<sup>[10]</sup>. 预防和减少并发症的发生, 首先要提高穿刺技术, 选择好穿刺点和进针途径; 掌握好进针深度和针尖移动范围, 避免损伤神经血管, 同时也减少穿刺次数; 活检针首先提倡用抽吸针, 切割针使用应严格挑选合适病例, 穿刺前CT增强应作为常规检查.

总之, CT引导下胰腺穿刺活检术是一种安

表 1 胰腺穿刺病理组织类型及病变部位

组织学分类	病变部位			合计
	胰头	胰体	胰尾	
胰腺癌	14	2	4	20
胰腺慢性炎症	2	1	1	4
胰腺结核	1	0	1	2
胰腺恶性间质瘤	2	0	0	2
胰腺平滑肌瘤	1	0	0	1
胰腺恶性生长抑素瘤	1	0	0	1

全、正确率高的微创非血管性介入放射学诊断技术, 能对病变提供组织学和细胞学诊断, 为临床医生选择治疗方案提供依据; 对明确的良性病变可避免不必要的手术; 活检的应用还可缩短就诊至诊断时间, 缩短住院周期, 进而减少诊疗费用, 具有广泛的临床应用价值.

### 4 参考文献

- 董宝玮, 梁萍, 于晓玲, 苏莉, 于德江, 张晶. 超声引导粗针与细针穿刺活检比较. 中华超声影像学杂志 2000; 9: 71-73
- 叶晓芬, 金震东, 李兆申. 超声内镜引导下胰腺穿刺活检的现状. 世界华人消化杂志 2001; 9: 333-335
- 孙思予, 王孟春, 孙素云. 内镜超声引导下细针穿刺对胰腺占位病变的诊断价值. 中华消化杂志 2002; 22: 29-30
- 叶更新, 曾旭文. CT引导下经皮胸腹穿刺活检术的临床应用. 广东药学院学报 2001; 17: 236-238
- 彭志远, 宋争放, 姚健, 施崇敏, 朱劲. CT导向经皮细针穿刺活检的临床应用. 泸州医学院学报 2002; 25: 248-249
- 陈星荣, 沈天真, 段承祥. 全身CT和MRI. 第1版, 上海: 上海医科大学出版社, 1995: 848
- 李非, 孙家邦, 王湘衡, 贾建国, 朱斌, 陈强. CT引导下细针穿刺诊断胰腺感染的路径选择. 中国实用外科杂志 1999; 19: 542
- 张雪哲, 卢延. CT/MRI介入放射学. 第1版, 北京: 科学出版社, 2001: 76
- 王文献, 岳恒志, 周国兴, 段建行, 范辉, 韩文杰. CT引导下经皮穿刺活检及介入治疗的临床应用. 中国临床医学影像杂志 2004; 15: 405-407
- 吴建安, 邱菊生, 李毅明, 于莉. CT引导下胸腹部穿刺活检及介入性治疗. 现代医用影像学 1998; 7: 131-132

#### ■同行评价

本文探讨了CT引导下经皮穿刺胰腺病变的诊断价值, 研究目的较明确, 条理分明, 在一定的程度上给临床提供了一些有意义的信息, 有一定的实用性.

编辑 何燕 电编 何基才



# 以消化道大出血为表现的异时性肺、十二指肠多原发癌1例

顾鸿莉, 吴晴

## ■背景资料

近年来多原发癌报道逐渐增多, 胃肠道是第2种癌最为好发的部位, 多在3 a内发生, 本文主要是撷取其中较罕见的1例以消化道大出血为表现的异时性肺、十二指肠多原发癌进行讨论。

顾鸿莉, 吴晴, 上海交通大学附属第一人民医院肿瘤科 上海市 200086

通讯作者: 吴晴, 200086, 上海市虹口区武进路85号, 上海交通大学附属第一人民医院肿瘤科. wuqing@csc.org.cn  
电话: 021-63240090-3171 传真: 021-63640073  
收稿日期: 2007-07-24 修回日期: 2007-08-20

## 摘要

肺癌合并十二指肠癌非常少见, 一点癌临床上更罕见, 极易误诊、漏诊, 术前完善相关检查、术中仔细探查和定期随访是防止多原发癌漏诊、误诊的关键, 确诊主要靠病理。本文撷取较罕见的一例以上消化道大出血为表现的异时性肺、十二指肠多原发癌进行分析和探讨。

**关键词:** 消化道大出血; 异时性; 肺、十二指肠多原发癌

顾鸿莉, 吴晴. 以消化道大出血为表现的异时性肺、十二指肠多原发癌1例. 世界华人消化杂志 2007;15(24):2660-2661  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/2660.asp>

## 0 引言

我院近5 a来收治多原发癌患者共103例, 均有术后病理明确诊断, 无误诊、漏诊, 疗效较好, 现撷取其中较罕见的1例以消化道大出血为表现的异时性肺、十二指肠多原发癌进行讨论。

## 1 病例报告

男, 62岁, 2003年拟行胆总管下段结石手术, 术前检查胸片示“左肺占位”, 胸部CT示“左肺上叶尖后段占位”, 考虑周围型肺癌可能, 邻近肋胸膜受累。2003-04-30全麻行胸腔镜下左上肺叶切除术+纵隔淋巴结清扫术, 术中见左上肺后段实质性肿块2.5 cm×2 cm, 质硬, 表面不光滑, 有胸膜凹陷征。肺门淋巴结3-5枚散在肿大, 质稍硬。主动脉窗内淋巴结散在肿大, 质软。肺裂发育良好, 无胸水。术后病理示“左上肺大细胞未分化癌, 1 cm×1 cm, 支气管切缘未见癌侵及。肺门淋巴结5枚、纵隔淋巴结5枚、主动脉旁淋巴结5枚均未见癌转移”。术后行辅助化疗, 后门诊

随访, 无瘤生存。2005-11因“头痛2 mo余”收治, 头部CT示“左侧颞顶枕叶异常强化结节伴大片水肿”, 考虑转移。2005-12-01全麻下行开颅肿瘤切除术, 术中见脑压高, 左枕极脑内肿瘤4 cm×3 cm×3 cm, 边界尚有, 血供一般, 内有坏死少量液化, 周围脑组织水肿明显, 术后病理示“左顶枕转移性癌”, 结合临床可符合来源于肺, 营养生长基因(AE1)(+), AE3(+), 细胞角蛋白-7(CK-7)(+), 甲状腺转录因子-1(TTF-1)(+), 小细胞肺癌(SCLL)(-)。术后出现呕血、黑便。2005-12-16行内镜逆行胰胆管造影, 术中见胃内陈旧性出血, 至十二指肠球部见大量新鲜出血, 予冰盐水冲洗, 术后仍有反复呕血, 后行血管造影栓塞止血。2006-01-06胃镜示“十二指肠球部巨大溃疡性病变”, 病理示“十二指肠球部坏死肉芽组织中见小片分化性腺癌细胞浸润”, 上皮膜抗原(EMA)(+), CK(+), Vim(-), 病理切片送至肿瘤医院会诊证实该诊断。2006-02-20全麻下行十二指肠球部+胃大部切除术(Billroth II), 术中见右中上腹明显黏连, 病灶位于十二指肠球部近幽门处, 约1.0 cm×1.2 cm, 呈溃疡性改变。胰腺、肝未及明显结节, 盆腔未及转移灶, 无明显腹水, 术后病理示“十二指肠球部黏膜慢性糜烂性炎伴局灶腺体轻度不典型增生, 胃窦、胃体黏膜慢性轻度萎缩性炎伴灶状肠化, 胃大弯淋巴结3个反应性增生。”术后行辅助化疗, 定期随访未见肿瘤复发或转移, 近日患者影像学检查再次发现脑、肝转移, 行肝动脉栓塞化疗, 目前病情稳定。

## 2 讨论

多原发癌诊断依据Warren和Gates制定的标准<sup>[1]</sup>: 即肿瘤必须是恶性的; 每一癌灶是独立起源: 必须排除转移可能性。第2癌与第1癌在6 mo内发生的称为同时癌; 6 mo以上发生的称为异时癌。该例符合肺、十二指肠异时性多原发癌, 两癌间隔时间为32 mo。

多原发癌由于其少见性、复杂性, 临床上极易漏诊、误诊, 究其原因有: (1)临床医生对多

## ■名词解释

多原发癌是人体不同或同一器官出现两个或两个以上独立的肿瘤病灶, 其病理类型相同或不同。诊断依据Warren和Gates制定的标准: 即肿瘤必须是恶性的; 每一癌灶是独立起源: 必须排除转移可能性。第2癌与第1癌在6 mo内发生的称为同时癌; 6 mo以上发生的称为异时癌。

原发癌认识不够,只满足于1处病灶的诊断,而忽视了其他病灶;(2)行第1癌切除术后出现症状,误以为是肿瘤转移或复发;(3)术前病理取材不当,技术因素致假阴性;(4)消化道肿瘤术前肠镜检查,肠道准备不足或肠道黏连;(5)多原发性胃癌多见于早期胃癌,病灶小,浸润表浅,尤其在已发现一处病灶的情况下更易被忽视,且内窥镜检查本身有一定的局限性;(6)术前检查不完善而遗漏重要病灶,且很有可能是第1癌,术中未仔细探查而遗漏同一系统或同一器官同时性癌.该例完善必要检查而避免了漏诊(左肺癌)、误诊(肺癌消化道转移,原发性脑肿瘤),也得益于临床医生对多原发癌的充分认识及病理诊断的帮助.术中仔细探查是防止同时癌漏诊的重要手段,约30%的多原发癌是在术中被发现,但

经过手术仍有42%的漏诊率<sup>[2]</sup>,定期随访可及时发现漏诊的同时性多原发癌和术后发生的异时性多原发癌.该例开颅术后以消化道大出血为首发表现,曾一度考虑术后应激性溃疡,及时行胃肠镜检查非常必要,尤其值得一提的是该例通过胃镜发现十二指肠球部巨大溃疡,活检病理证实“小片分化性腺癌细胞浸润”,术后病理未见肿瘤,故考虑一点癌,实属罕见.

### 3 参考文献

- 1 易胜中,张德超,王永岗,孙克林.肺癌和肺外器官恶性肿瘤组成的多原发癌281例临床分析.癌症 2006; 25: 731-735
- 2 Chen HS, Sheen-Chen SM. Synchronous and "early" metachronous colorectal adenocarcinoma: analysis of prognosis and current trends. Dis Colon Rectum 2000; 43: 1093-1099

编辑 何燕 电编 何基才

### ■同行评价

本文针对日渐增多的多原发癌的误诊漏诊原因进行分析,观点鲜明,重点突出,对临床实践有一定指导意义

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2007年版权归世界华人消化杂志

### • 消息 •

## 中国学术期刊综合引证报告(2006)

**本刊讯** 根据《中国学术期刊综合评价数据库(CAJCED)》2005年6182种统计刊源析出的214万条中国期刊引文数据库及CNKI“中国期刊网”中心网站2005-01/12全文下载记录(1.5亿篇次)的大样本数据统计分析得到:世界华人消化杂志[标准刊号: ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R; 类目名称: 医药科学\临床医学\呼吸及消化系统疾病(YK5.2.3)]总被引频次为2471, 影响因子为0.661, 5年影响因子为0.644, 即年指标为0.079, 他引总引比为0.73, 被引期刊数为491, 被引半衰期为4.6, 2005载文量为768, 基金论文比为0.44, Web即年下载率为0.6. [中国学术期刊(光盘版)电子杂志社; 中国科学文献计量评价研究中心].

# Dubin-Johnson综合征1例

王丽春, 陈立宇, 张永辉, 唐红

## ■背景资料

Dubin-Johnson综合征属临床上比较罕见的胆红素代谢疾病, 关于其遗传学发病机制的报道较多, 但临床病例报告较少. 遗传性胆红素代谢异常疾病的诊断与鉴别诊断已比较清楚, 基础研究也进入到基因突变阶段.

王丽春, 陈立宇, 张永辉, 唐红, 四川大学华西医院感染性疾病中心 四川省成都市 610041

通讯作者: 唐红, 610041, 四川省成都市国学巷37号, 四川大学华西医院感染性疾病中心. htang6198@hotmail.com

电话: 028-85422649 传真: 028-85423052

收稿日期: 2007-07-04 修回日期: 2007-08-17

## 摘要

Dubin-Johnson综合征是一种先天性非溶血性黄疸, 在临床中较罕见, 需与其他原因所导致的黄疸相鉴别. 本文报告了我院1例Dubin-Johnson综合征的诊治情况, 有助于加深对该病的认识.

**关键词:** Dubin-Johnson综合征

王丽春, 陈立宇, 张永辉, 唐红. Dubin-Johnson综合征1例. 世界华人消化杂志 2007;15(24):2662-2663

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/2662.asp>

## 0 引言

Dubin-Johnson综合征又称慢性特发性黄疸、黑肝-黄疸综合征等, 多于青少年或幼年发病, 男性较女性多见, 临床表现为无症状的长期轻-中度黄疸. 该病属于先天性非溶血性黄疸结合胆红素增高I型, 有明显家族背景, 可能为常染色体隐性遗传病, 是由于肝细胞的先天缺陷, 结合胆红素及其他有机阴离子向毛细胆管排泄障碍, 致使血清结合胆红素增高<sup>[1-2]</sup>. Dubin-Johnson综合征在临床中较罕见, 1954年首先由Dubin和Johnson报道, 我国于1958年首次报道该病. 我院传染科于2006年收治了1例确诊为Dubin-Johnson综合征的患者, 现报告如下.

## 1 病例报告

患者, 男, 22岁, 学生, 因“持续皮肤、巩膜黄染8 a”入院. 患者8 a前无明显诱因出现皮肤、巩膜轻度黄染, 伴小便黄呈浓茶色, 无恶心、呕吐、纳差, 无腹痛、腹胀, 无全身关节游走性疼痛及双下肢水肿, 肝功能检查示胆红素明显升高, 转氨酶正常, 乙肝病毒血清标志物检测HBsAb(+), 中药治疗1 mo黄疸无消退自行停药. 此后一直

胆红素异常(高于正常, 但 $<100 \mu\text{mol/L}$ ), 无自觉症状, 因黄疸持续不退, 为明确诊断入院. 患病以来体质量无明显变化, 出生时曾接种乙肝疫苗. 患者不饮酒, 全身各系统无慢性疾病史及长期服药史, 无特殊生活嗜好, 无放射性物质及毒物接触史, 家族中无相似症状者. 查体: 生命体征平稳, 皮肤、巩膜轻度黄染, 心肺(-), 腹软, 肝脾未扪及, 移浊(-), 双下肢无水肿. 辅助检查: 3大常规正常, 凝血酶原时间及凝血酶原活动度正常, 肝功能: 总胆红素 $71.7 \mu\text{mol/L}$ , 直接胆红素 $45.0 \mu\text{mol/L}$ , 间接胆红素 $26.7 \mu\text{mol/L}$ , 余均正常. B超及腹部CT无异常发现, 溶血试验(-), 免疫全套: IgG 2020 mg/L, IgA 4430 mg/L, 自身抗体和自免肝病抗体均(-), 病毒标志物: HBsAb(+), 甲、丙、丁、戊肝均阴性. 入院后行肝活检, 穿刺组织质韧, 外观为黑褐色. 病理活检结果: 肝小叶结构完整, 少量肝细胞水肿, 轻度水样变性, 未见点、灶状坏死, 部分肝细胞质内见粗大的黄褐色色素颗粒, 肝窦壁Kupffer细胞轻度增生, 汇管区无明显扩大. 肝细胞质内色素染色结果: 胆色素(+), 铁(-), 免疫组化: HBsAg(-), HBcAg(-). 病理诊断: Dubin-Johnson综合征. 结合临床表现, 黄疸原因明确诊断为Dubin-Johnson综合征.

## 2 讨论

本例患者为青年男性, 表现为黄疸持续性增高, 以直接胆红素增高为主, 不伴明显症状与体征, 通过完善系统检查后排除了病毒感染、药物、自身免疫疾病等引起的肝细胞黄疸、溶血性黄疸、肝内外梗阻性黄疸及肝内胆淤积性黄疸. 肝组织活检可见肝细胞质内黄褐色色素颗粒沉着, 结合病史、临床表现及辅助检查确诊为Dubin-Johnson综合征.

Dubin-Johnson综合征的主要诊断依据有: (1)一般无症状或症状轻微; (2)劳累、感染、手术等可使黄疸稍加重; (3)肝可肿大, 但脾不肿大; (4)血清胆红素一般不超过5倍正常值, 但可更高, 以结合胆红素升高为主; (5)尿胆红素阳性, 尿胆原也增加; (6)溴磺酞钠(BSP)排泄试验明显异常,

## ■创新盘点

本病例较罕见, 具报道价值, 同时具备肝组织活检结果, 诊断依据充分.

45 min时BSP滞留量多在10%以上, 60-100 min时滞留量更大(第2次上升), 这与结合型BSP返流入血有关. ICG最大运输量也有所下降, 但无第2次上升现象; (7)胆汁排泄正常; (8)口服胆囊造影, 胆囊常不显影, 如显影也很暗淡, 静脉胆囊造影多数也不显影; (9)肝外观呈绿黑色(黑色肝), 特别在腹腔镜手术时观察甚为清楚; (10)肝活检组织检查见肝细胞内有弥漫性的棕褐色色素颗粒, 多在肝小叶中央区的溶酶体内<sup>[3]</sup>.

本病需与以下3种疾病鉴别<sup>[4]</sup>: (1)Rotor综合征: Rotor综合征属于先天性非溶血性黄疸结合胆红素增高Ⅱ型<sup>[5-6]</sup>, 二者之间的鉴别依靠肝组织活检和口服胆囊造影<sup>[3]</sup>, Dubin-Johnson综合征肝活检示肝细胞内有色素颗粒沉着, 口服胆囊造影不显影或显影不良, 而Rotor综合征活检肝细胞正常, 无色素沉着, 口服胆囊造影显影良好<sup>[7]</sup>; (2)肝含铁血黄素沉着症: 是由于肝脏铁代谢障碍引起的肝脏病变, 以中老年多见, 有肝肿大伴肝硬化、糖尿病及皮肤色素沉着等3大临床表现, 肝细胞内的色素颗粒用含铁血黄素染色可鉴别; (3)良性家族性复发性胆汁淤滞: 是一种相对罕见的征候群, 为良性过程, 发病呈家族倾向, 特征为皮肤瘙痒与黄疸反复发作, 在发作期间血清碱性磷酸酶与胆酸浓度明显升高, 肝脏活检显示形态学特征是胆汁淤滞但无胆道阻

塞, 胆管造影显示胆道系统通畅.

本病预后良好, 无需特殊治疗<sup>[8]</sup>, 但是应注意避免受凉、疲劳、饮酒等诱发因素, 消除精神负担, 避免不必要的治疗.

### 3 参考文献

- 1 Mahtab MA, Karim MF, Rahman S, Adnan AB. Dubin-Johnson syndrome with systemic lupus erythematosus: a case report. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2006; 5: 617-619
- 2 Rastogi A, Krishnani N, Pandey R. Dubin-Johnson syndrome-a clinicopathologic study of twenty cases. *Indian J Pathol Microbiol* 2006; 49: 500-504
- 3 向理科, 罗子国, 李圆圆, 张远国. Dubin-Johnson综合征的病理学特征. *中华肝脏病杂志* 2000; 8: 45-47
- 4 Rossi F, Francese M, Iodice RM, Falcone E, Vetrella S, Punzo F, De Vita S, Perrotta S. Inherited disorders of bilirubin metabolism. *Minerva Pediatr* 2005; 57: 53-63
- 5 Jung MK, Bae MH, Kim DJ, Lee WS, Cho CM, Tak WY, Kweon YO. A case with Rotor syndrome in hyperbilirubinemic family. *Korean J Gastroenterol* 2007; 49: 251-255
- 6 Hrebicek M, Jirasek T, Hartmannova H, Noskova L, Stranecky V, Ivanek R, Kmoch S, Cebecauerova D, Vitek L, Mikulecky M, Subhanova I, Hozak P, Jirsa M. Rotor-type hyperbilirubinaemia has no defect in the canalicular bilirubin export pump. *Liver Int* 2007; 27: 485-491
- 7 耿为民, 陈玉亮, 王远新. 遗传性高结合胆红素血症2例报告. *医师进修杂志(内科版)* 2004; 27: 13
- 8 Cichoz-Lach H, Celinski K, Slomka M. Congenital nonhemolytic hyperbilirubinemias. *Ann Univ Mariae Curie Skłodowska [Med]* 2004; 59: 449-452

编辑 何燕 电编 张敏

### ■同行评价

本文通过介绍1例临床罕见的病Dubin-Johnson综合征, 旨在加深临床医生对该病的认识, 提高诊断率, 减少漏诊, 该个案诊断依据可靠, 内容较充实, 发表后具有医学再教育的作用.

### • 消息 •

## 世界华人消化杂志在线办公系统

本刊讯 自2005-12-15起, 世界华人消化杂志正式开通了在线办公系统(<http://www.wjgnet.com/wcjd/ch/index.aspx>), 所有办公流程一律可以在线进行, 包括投稿、审稿、编辑、审读, 以及作者、读者、编者之间的信息反馈交流. 凡在在线办公系统注册的用户, 将可获得世界华人消化杂志最新出版消息.