

放大内镜在胃部疾病诊断中的应用

任建林, 张靖, 卢雅丕

任建林, 卢雅丕, 厦门大学附属中山医院消化内科 厦门大学消化疾病研究所 厦门市消化疾病诊治中心 福建省厦门市 361004

张靖, 厦门大学附属中山医院消化内科 厦门大学消化疾病研究所 厦门大学附属中山医院博士后工作站 福建省厦门市 361004

任建林, 西安交通大学医学博士, 哈佛大学麻省总医院访问医师、教授、主任医师、博士研究生导师, 厦门大学消化疾病研究所常务副所长, 厦门市消化疾病诊治中心常务副主任, 厦门大学附属中山医院消化内科主任, 主要从事胃肠黏膜病变和胃肠道肿瘤的基础与临床研究。

通讯作者: 任建林, 361004, 福建省厦门市湖滨南路201号, 厦门大学消化疾病研究所、厦门大学附属中山医院消化内科。

jianlin.ren@xmzsh.com

电话: 0592-2292017

收稿日期: 2007-09-12 修回日期: 2007-10-20

Application of magnifying endoscopy in diagnosis of gastric diseases

Jian-Lin Ren, Jing Zhang, Ya-Pi Lu

Ren JL, Lu YP, Department of Gastroenterology, Zhongshan Hospital Xiamen University, Gastroenterology Institute of Xiamen University, Gastroenterology Center of Xiamen, Xiamen 361004, Fujian Province, China
Zhang J, Department of Gastroenterology, Zhongshan Hospital Xiamen University, Gastroenterology Institute of Xiamen University, Postdoctoral Workstation of Zhongshan Hospital Xiamen University, Xiamen 361004, Fujian Province, China

Correspondence to: Jian-Lin Ren, Department of Gastroenterology, Zhongshan Hospital Xiamen University, Gastroenterology Institute of Xiamen University, Xiamen 361004, Fujian Province, China. jianlin.ren@xmzsh.com
Received: 2007-09-12 Revised: 2007-10-20

Abstract

Micro-structure of gastrointestinal mucosa can be showed clearly by magnifying endoscopy. Magnifying endoscopy has unique advantage in diagnosis of gastrointestinal diseases, especially in gastric cancer and precancerous lesions. Some diseases, such as *H pylori*-related gastritis, early gastric cancer, peptic ulcer, chronic atrophic gastritis and intestinal metaplasia in larger lesions, have characteristic performance under magnifying endoscopy. Magnifying endoscopic observation may improve the early diagnosis rate of these diseases.

Key Words: Magnifying endoscopy; Gastric diseases

Ren JL, Zhang J, Lu YP. Application of magnifying

endoscopy in diagnosis of gastric diseases. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2007; 15(30): 3155-3158

摘要

放大内镜在消化道疾病尤其胃癌及癌前病变的诊断方面有着独特优势,并能指导活检,避免不必要的活检创伤,有着普通内镜所不能比拟的优势。本文对近年来放大内镜在胃部疾患的应用进展作一综述,同时结合临床操作体会,总结放大内镜的操作要领。

关键词: 放大内镜; 胃部疾病

任建林, 张靖, 卢雅丕. 放大内镜在胃部疾病诊断中的应用. 世界华人消化杂志 2007;15(30):3155-3158

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/3155.asp>

0 引言

内镜医生试图去观察胃小凹的形态而促成放大内镜的出现。1967年日本生产了这种特殊类型的纤维内镜-放大内镜。但是由于性能上的限制,未能在临床上得到广泛的应用。随着现代科技的发展,放大内镜已经逐步实现了电子化、数字化、可变焦、高清晰及良好的可操作性,逐步在临床上得到应用。目前的电子内镜对绝大部分的胃部疾病都能做出正确的诊断,但是对一些微细的病变,仍不易察觉,容易造成漏诊。而放大内镜的出现,则弥补了常规内镜的这一缺憾。放大内镜作为一种诊断性内镜,现在临床上应用的较好。放大内镜的放大倍数可达80倍左右,其放大倍数介于肉眼和显微镜之间,与实体显微镜所见相当,可以清晰显示胃肠黏膜的腺管开口和微血管等微细结构的变化,提高病变的早期诊断率。

1 放大内镜在胃部疾病中的应用

1.1 正常胃黏膜 放大内镜观察胃部的对象主要是胃小凹和黏膜的小血管。胃黏膜表面微细形态的基本单位为胃小凹,小凹为腺体的开口。无数的胃小凹组成胃小区,小区与小区之间由胃小沟(又叫区间沟)分隔。目前关于胃小凹的分型方法较

背景资料

随着放大内镜实现电子化、数字化、可变焦、高清晰及良好的可操作性,其在临床上得到逐步应用,可观察胃肠黏膜的细微结构变化,尤其在胃癌和胃前疾病的消化道疾病诊断方面有独特的优势。

相关报道

Sakaki *et al*以红色部分和白色部分描述放大内镜下黏膜的形态; Yagi *et al*根据放大内镜下集合静脉的可见与否、真毛细血管、胃小凹和胃小沟的形态将黏膜分为Z-0型、Z-1型、Z-2型、Z-3型。于永征 *et al*总结放大内镜下 *H pylori*相关性胃炎的特点。

多, 还没有明确、统一的标准。Sakaki *et al*^[1]以红色部分和白色部分描述放大内镜下黏膜的形态, 红色部分为向外凸出的, 而白色部分为内凹的, 并将不同形态的小凹开口分为5种不同的类型: A型为点状, B型为短小棒状, C型为树枝、条纹状, D型为斑片状或网络状, E型为绒毛状。且认为胃腺的开口和分布决定不同部位小凹的特点。胃底腺分布于胃底和胃体, 幽门腺分布于幽门管部宽约4-5 cm的区域。胃小凹处胃底腺多为单支管状腺体, 其颈部短而细。幽门腺分支较多而弯曲, 且常为3-5条幽门腺共同开口于一个小凹, 因此幽门部小凹常呈条纹状而胃体部小凹呈点状。金宣真 *et al*则将胃窦部小凹分为F1型: 原点状; F2型: 线网状; F3型: 颗粒状; F4型: 绒毛状四型。

来自胃黏膜下层的细小动脉贯穿胃黏膜肌层, 在胃黏膜内上行形成毛细静脉网, 其分支直达黏膜表层, 在表层的被覆上皮下行移至表层毛细静脉丛。毛细静脉丛环绕胃小凹的颈部并且彼此汇合形成下行性黏膜肌层, 注入黏膜下层的静脉丛。胃体部黏膜的集合小静脉分布非常均匀、规则, 当用普通内镜观察时, 表现为无数均匀一致的小红点遍布胃体部; 当改用放大内镜观察时, 此类无数的小红点实际上是集合小静脉, 呈海星状(regular arrangement of collecting venules, RAC)。

1.2 *H pylori*相关性胃炎 大量临床和基础研究表明, *H pylori*感染是慢性胃炎发生的主要致病因素之一。放大内镜诊断*H pylori*感染是目前放大内镜研究较多的一个方向, 主要根据小凹和黏膜微血管的形态变化来判断有无*H pylori*感染。金宣真按其分类方法认为, 除F1型为正常黏膜外, 其余3型均有*H pylori*感染, F2、F3型根除*H pylori*感染后能转为F1型。Yagi *et al*^[2]根据放大内镜下集合静脉的可见与否、真毛细血管、胃小凹和胃小沟的形态将黏膜分为: Z-0型, 可见到集合静脉和真毛细血管, 胃小凹呈针孔样外观; Z-1型, 只有真毛细血管而无集合静脉; Z-2型, 有白色的胃小凹和小沟, 而没有集合静脉和真毛细血管; Z-3型, 小凹开口广泛增大, 周围发红。并认为Z-0为无*H pylori*感染, 后三种情况均有不同程度的*H pylori*感染。陈磊 *et al*^[3]观察慢性胃炎患者140例的胃黏膜变化及*H pylori*感染情况, 将胃体下部集合静脉形态分为规则型(R型), 不规则型(I型)和消失型(D型)。认为R型未感染*H pylori*, 其余两型均有不同程度的*H pylori*感染。范玉林 *et al*^[4]观察根除*H pylori*后胃体放大内镜的检查结果, 认为*H pylori*根除后的主要表现为: (1)集合静脉由消失变为可见, 或

不规则型转为规则型; (2)小凹肿胀减轻, 结构模糊变为清晰; (3)小凹及区间沟变白转为正常; (4)胃窦部小凹开口扩张、排列紊乱减轻, 尤其以糜烂灶旁为明显; (5)小凹开口发红消失。上述5项中1项或1项以上作为*H pylori*根除的指标。

*H pylori*相关性胃炎在放大内镜下多表现为集合静脉减少或消失, 在炎症比较重的*H pylori*相关性胃炎的胃黏膜, 真毛细血管网甚至可以消失, 但是具体机制目前尚不清楚。Yagi *et al*观察到放大内镜下*H pylori*相关胃炎的胃底腺区有以下特点: (1)黏膜出现红斑及肿胀, (2)胃体部泌酸腺体开口由针尖状变为白色, (3)正常的蜂窝状毛细血管网消失, (4)集合静脉像消失。于永征 *et al*^[5]观察*H pylori*相关性胃炎的表现时发现其特点为: 胃小凹不均匀发红, 小凹变粗、变宽, 集合静脉模糊、混乱或消失, 如伴有萎缩者可见小凹分布稀疏, 色泽浅淡, 开口扩张, 胃小沟鲜明。

1.3 早期胃癌(Early Gastric Cancer, EGC) 放大内镜用于早期胃癌的目的主要是判断病变的良恶性, 区分其组织学类型以及判断恶性病变的浸润深度和广度, 有利于胃癌的早期诊断和治疗。条纹状、网络状的小凹及肿瘤血管的出现和集合静脉、真毛细血管网的消失为放大内镜下EGC比较有特征性的改变。但是由于黏膜的癌变一般均在有炎症浸润和*H pylori*感染的基础上发生的, 炎症本身和*H pylori*感染对胃黏膜的细微形态有一定的影响, 所以要判断出癌变的部位及界限是比较困难的。

Yao *et al*^[6]认为, 内镜下的早期胃癌颜色变化与血管密度和结构的变化有关, 强调放大内镜观察微血管对早期胃癌诊断的重要性, 并认为放大内镜下的微血管变化可能有助于判断胃黏膜内癌的分化程度。在放大内镜下, 分化型的癌变区界限清楚, 癌变区上皮毛细血管和集合静脉消失, 并出现大小、外形和分布不规则的肿瘤微血管, 黏膜一般颜色较红; 而在未分化型中, 癌细胞向黏膜深层侵袭而不破坏表层上皮, 黏膜颜色多呈白色。Yagi *et al*^[7]采用放大内镜对胃癌及腺瘤的患者病灶45例缓慢滴注15 mL/L的醋酸, 观察黏膜的变化, 发现从黏膜变白到恢复正常黏膜色的时间有利于早期胃癌的诊断。在低度恶性的腺瘤上其恢复时间为94 s, 高度恶性的为24.3 s, 非侵袭癌为20.1 s, 侵入性黏膜内癌为3.5 s, 黏膜下癌或远处转移的仅有2.5 s; 而在无新生物周围黏膜的恢复时间平均为90 s。并且该方法简单易行, 对于胃癌的早期诊断有很大的帮助。Sakaki利用小凹5型分类法

认为在小凹未被破坏、消失的情况下, 乳头状的EGC常为红色病灶及不规则的C型小凹; 高分化腺癌的特征为细条纹状, 背景萎缩的胃黏膜呈C型, 粗糙; 中分化管状腺癌的小凹与周围相似, 不易鉴别. 而印戒细胞癌和低分化腺癌不形成明显的腺管状外观, 其主要部位一般呈糜烂性改变, 小凹消失, 周围可出现各种形态的D型. E型则是肠上皮化生的特征性改变. 但这些仅仅在小凹形态上对EGC进行区分, 并没有涉及到微小血管的变化. Tajiri *et al*^[8]在早期胃癌的观察中发现, (1)隆起性病变中, 早期管状腺癌为不规则的黏膜类型, 可见不规则和相对粗短状的毛细血管. 早期乳头状腺癌为不规则样凸起, 粗糙的黏膜类型, 有长弯曲状的变化; (2)几乎所有凹陷性早期胃癌均有不规则的管状结构及异常的毛细血管, 呈网状或螺旋状改变. 并且在早期胃癌的诊断中, 普通内镜的总诊断正确率为66.7%, 放大内镜为91.7% ($P<0.01$), 说明放大内镜对微小病变的诊断准确率优于普通胃镜. Tobita *et al*^[9]根据黏膜表面的微细结构的差别将其分为: (1)圆点状, (2)条纹状, (3)棒状, (4)无定形. 并在此基础上将凹陷性胃部疾患分为4种, 便于区分早期胃癌和溃疡: (1)不规则突出型(dIP): 表现为不规则性隆起, 但仅出现在胃癌中; (2)正常乳头状(dN): 具有与非病变区相类似的圆点状或棒状构造, 出现在良性糜烂及胃癌中; (3)假乳头型(dP): 具有比非病变区粗大的圆点状、条纹状或棒状结构, 出现在开放性溃疡及胃癌中; (4)不定形型(dA): 外观平坦, 其中可见微血管, 均会出现在所有的凹陷性疾患中. dIP、dN、dP更多见于低分化腺癌, 而dA几乎见于所有的分化型癌及未分化型癌. dA为该结构中可见到的特征性微血管: (1)vS: 沙粒状; (2)vF: 栅栏状; (3)vRN: 圆网状; (4)vFN: 椭圆形网状; (5)vB: 血管伴有不规则口径的分支; (6)vC: 血管呈螺旋状, 口径不规则. vS与vF仅在良性病变中出现, vS出现在良性糜烂中, vF出现在溃疡瘢痕中; vRN、vFN、vB、vC均出现在癌中, 其中vRN及vFN多见于分化型癌, 而vB和vC多见于未分化型癌, 特别是vFN仅见于分化型癌, vC仅见于未分化型癌. 上述关于胃部疾患表面的微细构造及微血管的形态特征分类有助于临床胃镜检查时区分鉴别良恶性病变, 及时发现EMR切除后的复发病变. 有资料表明, 放大内镜较普通内镜对小胃癌具有更高的检出率, 放大内镜作为诊断方法的敏感性为96.0%, 特异性为95.5%, 而且放大内镜所观察到的精细

黏膜结构和微血管特征与组织病理学诊断具有很高的相关性, 有助于早期胃癌的诊断.

1.4 消化性溃疡 放大内镜可以用于判断溃疡的愈合质量及指导抗复发治疗. 在糜烂、溃疡发生的急性期, 病灶中央部位由于黏膜的破坏, 放大内镜下看不到小凹和微小血管, 镜下只见到炎性渗出和坏死物构成的苔样覆盖物. Sakaki *et al*根据放大观察和病理学的比较将放大内镜下胃溃疡分为: 白苔覆盖的再生期和瘢痕期. 再生期又分为: R0(无再生黏膜)、R1(有再生的细小黏膜结构)和R2(粗大的再生黏膜结构)型; 瘢痕期分为三型: Sa: 中央有凹陷而无再生黏膜; Sb: 中央出现再生黏膜; Sc: 瘢痕与周围黏膜的微细结构相似. Takemoto *et al*^[10]运用放大内镜观察胃和十二指肠溃疡的愈合过程, 发现足够的黏膜再生在Sa型患者占26.7%, Sb型占79.2%, Sc型占100%. 随后又研究胃溃疡80例和十二指肠球部溃疡56例的内镜下瘢痕外观和复发的关系, 发现完成溃疡瘢痕从Sa型到Sb型, 再到Sc型这一愈合过程的患者很少复发. 相反, Sa型瘢痕的患者复发率很高, 胃溃疡为88.8%, 十二指肠溃疡为80%. Hoshihara *et al*^[11]研究发现, 在放大内镜下, 溃疡的愈合过程中边缘最初出现膜状的再生黏膜, 继而再生黏膜形成纺锤状和木栅状外观, 逐渐演变成鹅卵石状, 最后修复成几乎正常的黏膜外观, 对临床的治疗有很好的指导作用.

1.5 萎缩性胃炎和肠化生 目前诊断慢性萎缩性胃炎(chronic atrophic gastritis, CAG)主要采用电子胃镜加黏膜活检的方法, 但因为普通胃镜受到图像清晰度以及放大倍数的限制, 很难发现萎缩病变较轻的病例. 范玉林 *et al*^[12]观察了120例的病例并结合病理结果, 发现CAG的特点表现为: 点状、线状小凹稀疏消失区或大面积出现小凹消失后形成片状、条带状瘢痕样改变, 并通过统计学分析, 放大内镜和普通内镜对CAG诊断的敏感度分别为89.3%和42.9% ($P<0.05$), 特异度分别为89.2%和82.8% ($P>0.05$), 准确度分别为89.2%和64.2% ($P<0.05$). 郑京华 *et al*^[13]的研究显示, 利用放大内镜结合黏膜染色对胃小区形态的观察诊断慢性萎缩性胃炎符合率达96.7%, 与普通内镜有显著性差异. 上述研究表明, 放大内镜在诊断CAG的敏感性和准确性方面较普通内镜有很大的优势. 胃黏膜肠化是CAG常见的伴随病变, 具有癌变的趋向. 普通内镜下可有淡黄色结节状、瓷白色小结节状、鱼鳞状以及弥漫性颗粒状等特征性改变, 但其普通内镜的检出率很低^[14]. 陈磊 *et al*将胃黏

应用要点
本文详尽的叙述了放大内镜在胃部疾病诊断中的应用, 有助于胃部疾病的诊治.

同行评价
本文内容全面, 详尽, 条理清晰, 对临床工作有指导作用.

膜的小凹形态分为点状(A型)、短棒状(B型)、树枝状(C型)、板块型(D型)和绒毛型(E型)五种形态. 放大内镜对这五种形态病理诊断的胃黏膜肠化生的图像显示, 肠化的小凹形态主要有C、D、E三种形态, 尤其以E型具有很高的特征性. 周雅丽 *et al*^[15]报道, 利用放大内镜诊断轻、中、重度肠上皮化生的准确率分别为47.5%、78.5%和75.4%, 明显高于普通内镜, 说明放大内镜对胃黏膜肠化有较大的可视性诊断和指导活检的价值.

2 放大内镜的操作要点

目前放大内镜的使用主要集中在我国较大医院使用, 但各单位检查方法也不尽相同. 笔者参考国外尤其是日本同行在放大内镜方面的做法以及结合本人的经验, 将其检查法的注意要点总结如下.

2.1 常规准备 进行放大内镜检查前, 应全面了解患者的全身情况, 在患者身体条件允许的情况下(进行签字), 向患者说明检查的目的, 消除患者的心里障碍, 取得患者的积极配合. 对于内镜检查反应强烈的患者, 可以考虑麻醉状态下进行检查.

2.2 清除黏膜表面泡沫及黏液 由于消化道黏膜表面常有泡沫及黏液黏附, 使放大内镜观察不清, 因此在放大内镜检查前应当清除黏膜表面的泡沫及黏液. 具体的方法: 用注射器吸取预先准备好的温洗净液(37℃左右)30-50 mL并加入少量的去泡剂, 通过活检孔注入, 注入时应当冲洗病变的周围, 使清洁液流入病变部位. 对于必须直接清洗的病变部位应当尽量减少注入时的压力, 对于难于去除的黏液, 使用加入蛋白酶的洗净液.

2.3 放大内镜操作要领 胃部解剖学的特点决定其受呼吸、大动脉搏动、蠕动以及黏液的影响. 八尾建史建议观察分化型癌的不规则血管, 必须使用最大的放大倍率, 同时应当注意观察前必须充分去除黏液及泡沫, 轻轻接触预观察的部位. 观察胃的腺口开口特征时必须使用透明帽, 通过方向调节、旋转内镜, 适当吸引或送气使前方的透明帽与黏膜密切接触, 再以最大放大倍率来观察. 观察胃角以及小弯时应当将胃内多余的气体吸去. 由于透明帽接触黏膜, 应注意血管丰富、扩张的部位, 避免引起大出血.

3 结论

随着研究的不断发展和深入, 放大内镜在指导活检, 避免不必要的活检创伤, 甚至直接诊断以往普通内镜不能诊断, 而必须依赖病理检查的某些病变方面发挥重要的作用. 但是目前放大

内镜也存在一些问题, 如胃的一些生理学特点妨碍了放大内镜的观察, 没有统一的标准, 放大的倍数和清晰度等. 但随着科技的发展, 正在逐步克服上述困难. 一些抑制胃肠蠕动的药物使用以及麻醉胃镜的开展更利于放大内镜的观察, 放大内镜下各种疾病的诊断标准正在逐步得到统一. 随着放大内镜的广泛使用, 胃部疾病的诊治必将大大提高.

4 参考文献

- 1 Sakaki N, Iida Y, Okazaki Y, Kawamura S, Takemoto T. Magnifying endoscopic observation of the gastric mucosa, particularly in patients with atrophic gastritis. *Endoscopy* 1978; 10: 269-274
- 2 Yagi K, Nakamura A, Sekine A. Comparison between magnifying endoscopy and histological, culture and urease test findings from the gastric mucosa of the corpus. *Endoscopy* 2002; 34: 376-381
- 3 陈磊, 杨建民, 李向红, 余欣, 房殿春. 放大内镜下胃病患者的胃黏膜微细结构改变及其临床病理意义. *中华消化内镜杂志* 2003; 20: 83-87
- 4 范玉林, 杨建民, 郭德玉, 房殿春, 李向红, 吴静. 放大内镜观察幽门螺杆菌根除后胃黏膜微细形态的变化. *中华消化内镜杂志* 2004; 21: 258-260
- 5 于永征, 王青虹, 于中麟. 高清晰放大胃镜对幽门螺杆菌相关性胃炎胃黏膜表现的临床研究. *中华消化内镜杂志* 2002; 19: 274-277
- 6 Yao K, Oishi T, Matsui T, Yao T, Iwashita A. Novel magnified endoscopic findings of microvascular architecture in intramucosal gastric cancer. *Gastrointest Endosc* 2002; 56: 279-284
- 7 Yagi K, Aruga Y, Nakamura A, Sekine A, Umezu H. The study of dynamic chemical magnifying endoscopy in gastric neoplasia. *Gastrointest Endosc* 2005; 62: 963-969
- 8 Tajiri H, Doi T, Endo H, Nishina T, Terao T, Hyodo I, Matsuda K, Yagi K. Routine endoscopy using a magnifying endoscope for gastric cancer diagnosis. *Endoscopy* 2002; 34: 772-777
- 9 Tobita K. Study on minute surface structure of the depressed-type early gastric cancer with magnifying endoscopy. *Dig Endosc* 2001; 13: 121-126
- 10 Takemoto T, Sasaki N, Tada M, Yanai H, Okita K. Evaluation of peptic ulcer healing with a highly magnifying endoscope: potential prognostic and therapeutic implications. *J Clin Gastroenterol* 1991; 13 Suppl 1: S125-S128
- 11 Hoshihara Y, Hashimoto M, Yamamoto T, Tanaka T, Iguchi D, Kimura T, Sugawara K, Fukuchi S, Takemoto T. Mucosal regeneration of gastric ulcer confirmed by electronic endoscopy. *J Clin Gastroenterol* 1995; 20 Suppl 1: S10-S16
- 12 范玉林, 杨建民, 刘海峰, 郭德玉, 李向红, 顾莎. 放大内镜对萎缩性胃炎诊断价值的前瞻性研究. *中国内镜杂志* 2004; 10: 41-44
- 13 郑京华, 魏虹, 杨海燕, 任珏, 时平. 胃黏膜萎缩及伴肠化的可视性诊断. *潍坊医学院学报* 2001; 23: 116
- 14 Guelrud M, Herrera I, Essensfeld H, Castro J, Antonioli DA. Intestinal metaplasia of the gastric cardia: A prospective study with enhanced magnification endoscopy. *Am J Gastroenterol* 2002; 97: 584-589
- 15 周雅丽, 李建辉, 林三仁, 金珠, 丁士刚, 黄雪彪, 夏志伟. 胃黏膜肠上皮化生的内镜分析. *中华消化内镜杂志* 2001; 18: 84-86

中药胃肠舒对胃肠平滑肌细胞ATP生成的影响

宋晓冬, 刘孟安, 孙丰润, 刘颖, 张丽霞, 牛新华, 闫苗苗, 王晓江

宋晓冬, 张丽霞, 牛新华, 闫苗苗, 王晓江, 滨州医学院基础学院 山东省滨州市 256603

刘孟安, 孙丰润, 刘颖, 滨州医学院临床学院 山东省滨州市 256603

宋晓冬, 复旦大学硕士, 副教授, 主要从事中药机制研究.

国家自然科学基金资助项目, No. 30672680

通讯作者: 宋晓冬, 256603, 山东省滨州市, 滨州医学院基础学院. songxd71@yahoo.com.cn

电话: 0535-6913151

收稿日期: 2007-05-29 修回日期: 2007-09-29

Effect of traditional Chinese medicine Weichangshu on ATP in gastrointestinal smooth muscle cells

Xiao-Dong Song, Meng-An Liu, Feng-Run Sun, Ying Liu, Li-Xia Zhang, Xin-Hua Niu, Miao-Miao Yan, Xiao-Jiang Wang

Xiao-Dong Song, Li-Xia Zhang, Xin-Hua Niu, Miao-Miao Yan, Xiao-Jiang Wang, the Basic School of Binzhou Medical College, Binzhou 256603, Shandong Province, China
Meng-An Liu, Feng-Run Sun, Ying Liu, Clinical School of Binzhou Medical College, Binzhou 256603, Shandong Province, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30672680

Correspondence to: Xiao-Dong Song, Department of Biology, Binzhou Medical College, Binzhou 256603, Shandong Province, China. songxd71@yahoo.com.cn

Received: 2007-05-29 Revised: 2007-09-29

Abstract

AIM: To study the effect of Weichangshu on the kinetic energy of gastrointestinal smooth muscle cells.

METHODS: Gastrointestinal smooth muscle cells were divided into five groups: control, cultured in normal medium; cisapride, cultured in normal medium with 0.51 g/L cisapride; Weichangshu, cultured in normal medium with 25 g/L Weichangshu; Weichangshu, cultured in normal medium with 50 g/L Weichangshu; and Weichangshu, cultured in normal medium with 75 g/L Weichangshu. Celltiter-Glo was used to detect ATP. The relative changes in mitochondrial potential were tested with the rhodamine fluorescence (R-123) technique.

RESULTS: After exposure to Weichangshu for 24 hours, the change in ATP content was more significant ($P < 0.05$) and the intensity of R-123 fluorescence in gastrointestinal smooth muscle cells was significantly increased compared with those in the control and cisapride groups. As the Weichangshu concentration increased, so did the content of ATP and mitochondrial potential.

CONCLUSION: Weichangshu may change the kinetic energy of gastrointestinal smooth muscle cells, leading to an improvement in gastrointestinal motility.

Key Words: Traditional Chinese medicine; Weichangshu; ATP; Mitochondrial potential; Celltiter-GloTM method; Rhodamine fluorescence technique

Song XD, Liu MA, Sun FR, Liu Y, Zhang LX, Niu XH, Yan MM, Wang XJ. Effect of traditional Chinese medicine Weichangshu on ATP in gastrointestinal smooth muscle cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007; 15(30): 3159-3162

摘要

目的: 研究胃肠舒对胃肠平滑肌细胞动能的影响.

方法: 胃肠平滑肌细胞离体培养, 分为5组: 空白对照组、西沙必利组(0.51 g/L)、胃肠舒组(25 g/L)、胃肠舒组(50 g/L)、胃肠舒组(75 g/L), 采用Celltiter-GloTM法和Rhodamine fluorescence法分别检测胃肠舒对胃肠平滑肌细胞ATP和线粒体跨膜电位的的影响.

结果: 胃肠舒作用24 h后与对照组和西沙必利组相比能显著增高平滑肌细胞ATP的含量. 随着胃肠舒用药浓度的增加改变ATP的含量也加大($P < 0.05$). 流式细胞仪结果表明, 胃肠舒明显加大了胃肠平滑肌细胞的线粒体跨膜电位, 并且随着胃肠舒用药浓度的增加, 跨膜电位的增加也越大.

结论: 胃肠舒可能通过改变胃肠平滑肌细胞的动能促进胃肠运动.

背景资料

胃肠运动障碍型疾病是临床多发病, 其主要病理生理基础为胃排空延迟及小肠传输功能障碍. 现临床最常用的促胃肠动力药促进胃肠蠕动虽然有较好疗效, 但其副作用如药理作用受限、催乳素增加、焦虑、激动、运动性不安、共济失调、腹泻和腹痛等不可忽视. 目前胃肠运动障碍型疾病由于发病机制尚不清楚, 其药物的研发受到限制, 因此研究该类疾病的调控机制, 为开发新药提供科学的数据是非常重要的.

创新盘点

本文的前期预实验结果显示胃肠运动障碍型疾病模型鼠与正常鼠比较其平滑肌细胞跨膜电位和ATP有明显的变化, Ach的表达也相应发生变化, 在大量前期预实验的结果上推测 Ca^{2+} 信号传导途径在其中可能起到很重要的调控作用, 而对于 Ca^{2+} 信号传导途径在胃肠运动障碍型疾病中的作用及其调控国内外尚未见相关报道, 本项目的完成将填补胃肠运动障碍型疾病中 Ca^{2+} 信号传导途径的调控作用的研究空白。

关键词: 中药; 胃肠舒; ATP; 线粒体跨膜电位; Celltiter-Glo™法; Rhodamine fluorescence法

宋晓冬, 刘孟安, 孙丰润, 刘颖, 张丽霞, 牛新华, 闫苗苗, 王晓江. 中药胃肠舒对胃肠平滑肌细胞ATP生成的影响. 世界华人消化杂志 2007;15(30):3159-3162

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/3159.asp>

0 引言

胃肠运动障碍型疾病是临床常见病, 据国内统计约占胃肠专科门诊患者1/3以上, 西方国家患病率高达20%-40%. 现临床最常用的促胃肠动力药有胃复安、吗丁啉、西沙必利等化学药. 化学药促进胃肠蠕动虽然有较好疗效, 但其副作用如药理作用受限、催乳素增加、焦虑、激动、运动性不安、共济失调、腹泻、腹痛等不可忽视^[1-2], 且易于复发. 而中药制剂具有治疗与调理双层作用, 受到广大胃病患者的欢迎. 但目前国内外有关中药胃肠动力药的研究少见报道, 因此开发中药治疗该类疾病具有重要意义^[3]. 纯中药制剂胃肠舒是根据《伤寒论》大承气汤、小承气汤、调胃承气汤三方化裁, 取大黄、枳壳、甘草组方, 经临床反复药物筛选研制而成, 具有完全知识产权. 预实验^[4-7]显示, 胃肠舒对胃轻瘫综合征的疗效优于吗丁啉, 对小鼠子宫切除术后肠道推进作用优于西沙必利, 能显著加快小鼠胃肠推进运动, 兴奋兔离体肠平滑肌, 并且无明显副作用, 比单味中药更切合临床实际, 比汤剂更方便. 因此我们在离体胃肠平滑肌细胞模型上进一步探讨胃肠舒的促胃肠动力的作用及其机制.

1 材料和方法

1.1 材料 胃肠舒由滨州医学院附属医院制剂室提供, 西沙必利浙江京新药业股份有限公司生产, 标准SD大白鼠由烟台绿叶实验动物中心提供, DMEM培养基购自GiBco公司, 胎牛血清购自杭州四季青生物工程材料公司, Rhodamine123购自Sigma公司, CellTiter-Glo™试剂盒购自Promega公司, Labsystems Multiskan MS酶标仪和HERA CO₂培养箱及CK×41倒置显微镜购自Olympus, EPICS XL流式细胞仪购自美国贝克曼库尔特公司, IX71荧光倒置显微镜购自日本奥雷帕斯公司.

选择标准SD大白鼠, 体质量为180-200 g, 雌雄各半, 乙醚麻醉, 剖腹后迅速剪取胃体、空肠组织, PBS清洗后剪碎, 去除上清液, 重复清洗

2-3次. 将盛有组织碎片的容器置于冰上, 去除残留的上清液, 加入2.5 g/L胰蛋白酶, 在4℃孵育6-18 h. 移弃组织碎片中的胰蛋白酶, 在37℃孵育包含残留胰蛋白酶的组织碎片20-30 min. 待小块组织完全消化溶解后, 过200目网, 1000 r/min离心7 min. 弃上清液, 向细胞沉淀中加入新鲜配制的200 mL/L胎牛血清DMEM培养液, 轻轻吹打, 后按每瓶(25 mL) 3×10^4 活细胞接种在培养瓶里, 放入37℃孵箱里静置培养待测, CK×41倒置相差显微镜观察. 将处理好的盖玻片, 放入6孔板使之与孔底贴和紧密, 进行细胞培养. 细胞生长5 d后吸去培养液, 先用PBS洗涤已贴壁盖玻片2-3次. 950 mL/L乙醇室温固定20 min, PBS洗2-3次. 1 mL/L TritonX-100室温孵育20-30 min增强细胞通透性. 正常羊血清于37℃封闭20 min. 滴加一抗兔抗鼠 α -actin mAb(1:200, 购自Sigma公司)室温过夜, 滴加二抗羊抗兔FITC-IgG(1:100), 37℃孵育2 h, 倒置荧光显微镜(波长500 nm)观察.

1.2 方法 实验分为5组, 分别为空白对照组、胃肠舒小剂量组 I 组(25 g/L)、胃肠舒中剂量组 II 组(50 g/L)、胃肠舒大剂量组 III 组(75 g/L)、西沙必利组(0.51 g/L). 每组6个复孔, 各组药物作用24 h, Celltiter-Glo™试剂盒A液和B液混合, 室温下静置1 h. 向96孔板的各孔细胞中每孔加入100 μL Celltiter-Glo™混合液, 5 min后酶标仪波长562 nm检测胃肠平滑肌细胞ATP含量. 另将待测胃肠平滑肌细胞离心1000 r/min收集, PBS清洗2次, 加入1 mL的终浓度为1 mg/L的Rhodamine123, 放入37℃孵箱里静置培养45 min. PBS清洗2次, 倾去原有液体, 250 μL PBS重悬, 缓慢加入-20℃乙醇750 μL , 流式细胞仪激发波长488 nm、发射波长525 nm检测胃肠平滑肌细胞线粒体跨膜电位.

统计学处理 组间比较用方差检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义.

2 结果

倒置显微镜下观察可见细胞形状椭圆形, 束状排列, 密集与稀疏处相互交错呈“峰谷”状. 峰处为多层细胞, 谷处为单层或双层细胞, 培养4 d后细胞铺满培养瓶瓶底. 为确定胃肠平滑肌细胞离体分离培养成功, 用兔抗鼠 α -actin mAb进行鉴定, 细胞经漂洗后置于荧光显微镜下观察. 负载了FITC的细胞经500 nm的波长激发下产生荧光, 可见95%以上的细胞显示阳性荧光标记,

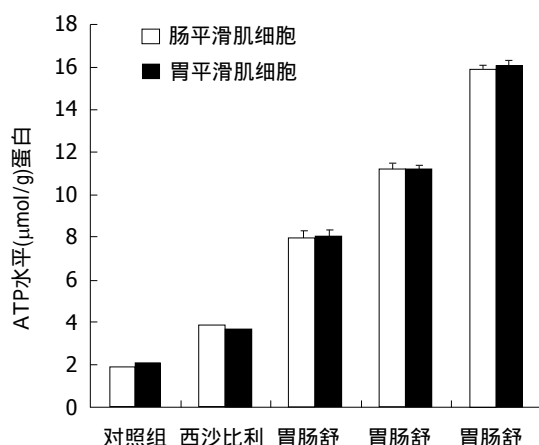


图1 胃肠舒片对胃肠平滑肌细胞ATP的影响.

应用要点
本文拟以乙酰胆碱和一氧化氮为主要研究出发点, 建立胃肠功能障碍动物实验模型和细胞实验模型, 深入研究胃肠舒片的作用及其作用机制, 为胃肠舒片的推广应用奠定坚实的实验理论基础, 提供科学的实验数据.

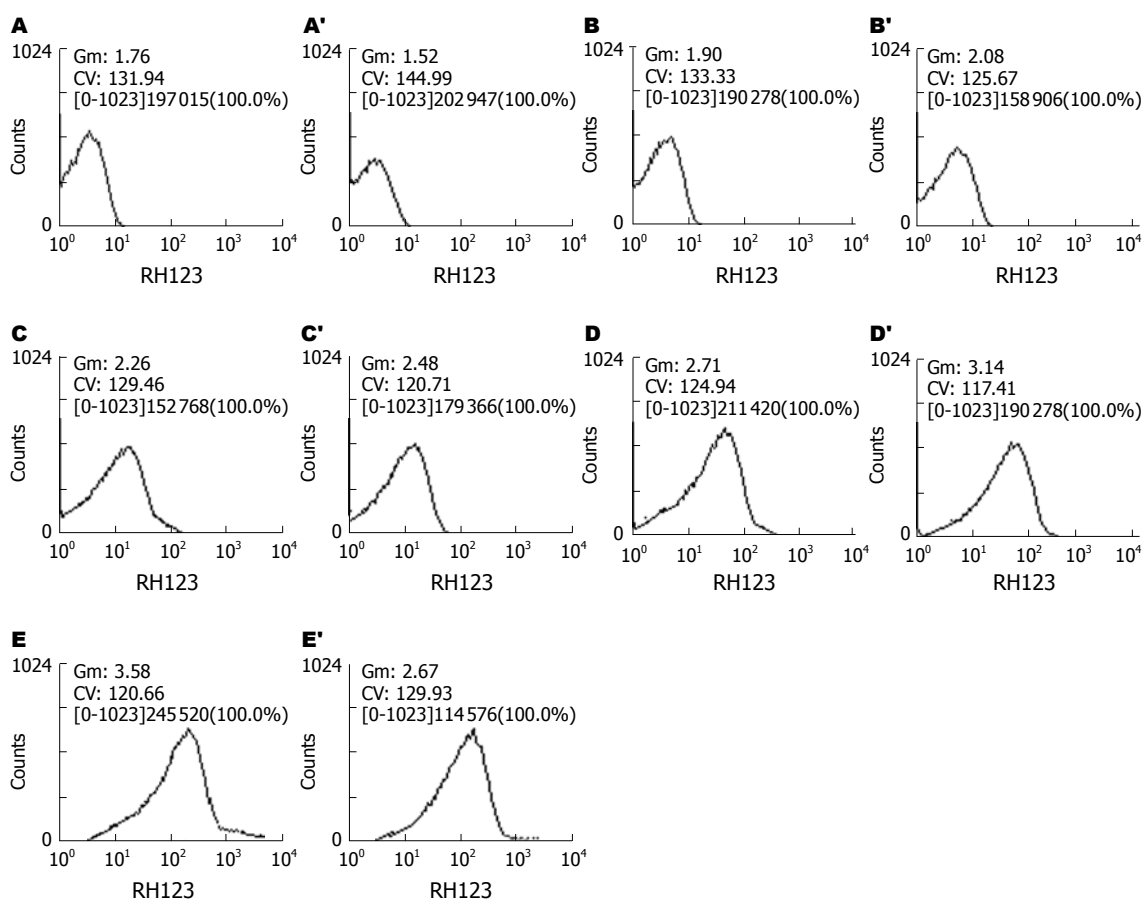


图2 胃肠舒片对胃肠平滑肌细胞线粒体跨膜电位的影响. A: 胃空白对照组; A': 肠空白对照组; B: 胃西沙比利组; B': 肠西沙比利组; C: 胃胃肠舒组; C': 肠胃肠舒组; D: 胃胃肠舒组; D': 肠胃肠舒组; E: 胃胃肠舒组; E': 肠胃肠舒组.

说明离体培养的平滑肌细胞成功.

2.1 胃肠舒对胃肠平滑肌细胞ATP的影响 胃肠舒片作用24 h后能显著增高平滑肌细胞ATP的含量. 随着胃肠舒用药浓度的增加改变ATP的含量也加大, ATP的改变量与正常对照组和西沙比利组进行t检验($P < 0.05$)(图1).

2.2 胃肠舒片对胃肠平滑肌细胞线粒体跨膜电位的影响 胃肠舒组细胞荧光分析图与对照组相比右移, 表示线粒体跨膜电位上升. 胃肠舒实

验组明显比空白对照组增大线粒体的跨膜电位, 比西沙比利组改变线粒体跨膜电位的幅度也大, 并且随着胃肠舒用药浓度的增加, 胃肠平滑肌细胞线粒体跨膜电位随之增加(图2).

3 讨论

从中医学观点看, 胃肠运动障碍型疾病多由于脾胃功能失调, 升降失司, 气机不畅所致. 治疗重在调理脾胃功能, 协调升降, 舒畅气机. 本研

同行评价
本文采用的方法较先进,具有一定的创新性,对临床具有一定的应用价值。

究的对象胃肠舒片方中大黄通胃肠腑气,泻胃肠积滞为君药;枳实行气消胀,破积除满为臣药;甘草健脾益气,甘缓和中,调和诸药,防大黄攻下伤正为佐使。故诸药相互配伍,具有调和脾胃升降,疏通胃肠气机的功效,使肠胃升降功能得以恢复而达到治疗目的。从现代医学观点看,胃肠运动障碍型疾病多由胃肠运动功能失调,能量供应不足导致胃排空时间延长所致。线粒体是真核细胞能量转换的主要场所,是细胞生成ATP的主要地点^[8]。线粒体基质的三羧酸循环酶系通过底物脱氢氧化生成NADH, NADH通过线粒体内膜呼吸链氧化。与此同时,导致跨膜质子移位形成跨膜质子梯度和/或跨膜电位。线粒体内膜上的ATP合成酶利用跨膜电位合成ATP。合成的ATP,通过线粒体内膜ADP/ATP载体与细胞质中ADP交换进入细胞质,参与细胞的各种需能过程^[9-12]。因此线粒体跨膜电位和ATP的变化直接影响细胞的动能,继而会影响相应组织的运动能力。通常线粒体跨膜电位和ATP水平的升高表明线粒体功能增强,能量供应充足,动能增加,细胞/组织运动能力加强。本实验流式细胞仪检测结果显示,中药胃肠舒实验组与空白对照组和西沙必利组相比,其荧光分析折线图明显右移,线粒体跨膜电位大大增加,与此同时,其ATP的含量也明显增加,并且线粒体跨膜电位和ATP增加的幅度与胃肠舒的用药浓度成正比关系。当然,胃肠道神经系统对胃肠运动功能的调节支配较为复杂,目前已知胃肠道神经系统中最主要的兴奋性神经递质是乙酰胆碱(acetylcholine, ACh)^[13-16],最主要的抑制性神经递质是一氧化氮(NO)。有研究表明,ACh和NO之间在调节胃肠动能时存在着精细的平衡^[17-18],当失去平衡尤其是NO增加而ACh减少时,能引起线粒体跨膜电位和ATP的变化,导致胃肠运动功能障碍。本实验中胃肠舒对这两类神经递质是否有影响以及如何影响将在进一步的实验中确认。本项目对于阐释中药促进胃肠动力的作用机制提供了科学的实验数据,为开发胃肠动力中药新药开辟了新的思路,奠定了坚实的实验理论基础,意义重大。

4 参考文献

- 1 王君耀. 吗丁啉的特殊不良反应. 现代应用药学 1994; 11: 47
- 2 颜海明. 西沙必利的严重不良反应值得注意. 药物流

- 行病学杂志 2001; 10: 144
- 3 岳茂兴. 胃肠道功能障碍及衰竭的诊断和治疗. 世界华人消化杂志 2002; 10: 3-6
- 4 刘孟安, 赵铭山, 孙丰润, 姜学连, 张树平. 胃肠舒治疗胃轻瘫综合征的临床研究. 滨州医学院学报 2004; 27: 269
- 5 姜秀清, 吕耀凤, 刘孟安, 孙丰润, 张金凤. 胃肠舒对妇科手术后胃肠功能恢复的疗效观察. 滨州医学院学报 2000; 23: 246-247
- 6 刘在贵, 姜秀清, 吕耀凤, 陈秀霞, 孙怡华. 胃肠舒对小鼠子宫切除术后肠麻痹的影响. 滨州医学院学报 2001; 24: 429
- 7 张树平, 刘孟安, 孙丰润, 刘忠华, 李金莲, 邵翠杰. 胃肠舒对小鼠家兔肠道平滑肌作用. 滨州医学院学报 1998; 21: 424
- 8 Huang M, Camara AK, Stowe DF, Qi F, Beard DA. Mitochondrial inner membrane electrophysiology assessed by rhodamine-123 transport and fluorescence. *Ann Biomed Eng* 2007; 35: 1276-1285
- 9 von Kleist-Retzow JC, Hornig-Do HT, Schauen M, Eckertz S, Dinh TA, Stassen F, Lottmann N, Bust M, Galunska B, Wielckens K, Hein W, Beuth J, Braun JM, Fischer JH, Ganitkevich VY, Maniura-Weber K, Wiesner RJ. Impaired mitochondrial Ca²⁺ homeostasis in respiratory chain-deficient cells but efficient compensation of energetic disadvantage by enhanced anaerobic glycolysis due to low ATP steady state levels. *Exp Cell Res* 2007; 313: 3076-3089
- 10 Mironova GD, Kachaeva EV, Kopylov AT. Mitochondrial ATP-dependent potassium channel. 1. The structure of the channel, the mechanisms of its functioning and regulation. *Vestn Ross Akad Med Nauk* 2007; : 34-43
- 11 Liang H, Van Remmen H, Frohlich V, Lechleiter J, Richardson A, Ran Q. Gpx4 protects mitochondrial ATP generation against oxidative damage. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; 356: 893-898
- 12 Comelli M, Metelli G, Mavelli I. Downmodulation of mitochondrial F0F1 ATP synthase by diazoxide in cardiac myoblasts: a dual effect of the drug. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2007; 292: H820-H829
- 13 Phillis JW. Acetylcholine release from the central nervous system: a 50-year retrospective. *Crit Rev Neurobiol* 2005; 17: 161-217
- 14 Alcayaga C, Varas R, Valdes V, Cerpa V, Arroyo J, Iturriaga R, Alcayaga J. ATP- and ACh-induced responses in isolated cat petrosal ganglion neurons. *Brain Res* 2007; 1131: 60-67
- 15 Reyes EP, Alcayaga J, Zapata P. Are there interactions between acetylcholine- and ATP-induced responses at the level of a visceral sensory ganglion? *Brain Res* 2006; 1107: 97-103
- 16 韩勇, 赵正源, 王云杰, 徐晖. 食管下括约肌与体部形态及乙酰胆碱对其功能影响的比较. 世界华人消化杂志 2005; 13: 10-14
- 17 Clementi E, Nisoli E. Nitric oxide and mitochondrial biogenesis: a key to long-term regulation of cellular metabolism. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 2005; 142: 102-110
- 18 谢勇, 周小江, 吕农华, 黄德强, 陈江, 黄缘, 王崇文, 祝金泉, 张昆和. 内源性一氧化氮在反流性食管炎粘膜炎症损伤中的作用. 世界华人消化杂志 2001; 9: 1213-1214

编辑 何燕 电编 李军亮

大鼠肝硬化形成过程中肝组织TGF- β 1, Smad3, Smad7水平动态的变化

俞蕾敏, 吕宾, 李善高, 斯淑英

俞蕾敏, 吕宾, 李善高, 斯淑英, 浙江中医药大学附属第一医院消化科 浙江省杭州市 310006
俞蕾敏, 浙江中医药大学中西医结合临床消化专业硕士.
浙江省中医药管理局资助项目, No. 2005C147
通讯作者: 吕宾, 310006, 浙江省杭州市, 浙江中医药大学附属第一医院消化科. lvbin@medmail.com.cn
电话: 0571-87032028
收稿日期: 2007-07-12 修回日期: 2007-10-06

Expression of transforming growth factor- β 1, Smad3 and Smad7 in experimental liver cirrhosis in rats

Lei-Min Yu, Bin Lv, Shan-Gao Li, Shu Ying Si

Lei-Min Yu, Bin Lv, Shan-Gao Li, Shu Ying Si, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310006, Zhejiang Province, China
Supported by: Zhejiang Management Board of Traditional Chinese Medicine, No. 2005C147
Correspondence to: Bin Lv, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310006, Zhejiang Province, China. lvbin@medmail.com.cn
Received: 2007-07-12 Revised: 2007-10-06

Abstract

AIM: To observe changes in transforming growth factor (TGF)- β 1, Smad3 and Smad7 during liver fibrosis, and to study their role hepatic tissue during the formation of experimental liver cirrhosis in rats.

METHODS: Male rats were divided into control group and model group. Control: Six male rats were killed at the beginning of the experiment as the week 0 group. Model: The surplus rats was injected subcutaneously 600 mL/L CCl₄ in oil two times per week at the dosage of 3 mL/kg body weight. The rats were sacrificed after 3, 6, 9 and 12 wk. Expression of mRNA for TGF- β 1 and TGF- β receptor (TGF- β R) in rat liver was detected by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR), and Smad3 and Smad7 were determined by Western blotting. Meanwhile, the level of TGF- β 1 was measured

by immunocytochemistry.

RESULTS: TGF- β 1 mRNA, TGF- β R mRNA and Smad3 at 3, 6, 9 and 12 wk were expressed in low amounts in the normal liver tissue, and were increased after CCl₄ treatment, while Smad7 at the same point was decreased (TGF- β 1, 0.19 ± 0.12 , 0.29 ± 1.02 , 0.89 ± 0.23 , 0.98 ± 0.77 , 1.7 ± 1.00 ; TGF- β R, 0.30 ± 0.22 , 0.49 ± 0.16 , 1.02 ± 0.33 , 1.51 ± 0.72 , 2.14 ± 1.02 ; Smad3, 0.44 ± 0.24 , 0.84 ± 0.69 , 1.10 ± 0.16 , 1.40 ± 0.12 , 1.75 ± 1.05 ; Smad7, 1.35 ± 0.12 , 1.09 ± 0.78 , 1.14 ± 0.31 , 1.11 ± 0.91 , 0.74 ± 1.21). TGF- β 1 was expressed at a low level in the portal vein of the normal liver. It was up-regulated in rats after CCl₄ treatment ($P < 0.01$).

CONCLUSION: During hepatic fibrosis induced by CCl₄ in rats, expression of TGF- β 1, TGF- β R and Smad3 was increased, while Smad7 was decreased. The mechanism may be that TGF- β 1 causes liver fibrosis by increasing Smad3 and decreasing Smad7.

Key Words: Hepatic fibrosis; Transforming growth factor- β 1; Smad3; Smad7; Reverse transcription-Polymerase chain reaction; Western blotting

Yu LM, Lv B, Li SG, Si SY. Expression of transforming growth factor- β 1, Smad3 and Smad7 in experimental liver cirrhosis in rats. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007; 15(30): 3163-3167

摘要

目的: 观察实验性大鼠肝硬化形成过程中, 肝组织TGF- β 1, Smad3, Smad7水平的动态变化, 研究三者肝硬化发生过程中的作用及机制。

方法: 以SD大鼠为实验对象, 于实验开始时处死6只大鼠作为wk 0正常对照组, 剩余大鼠, 600 mL/L四氯化碳3 mL/kg, sc, 2次/wk, 复制肝硬化动物模型。于wk 3, 6, 9, 12各处死一批大鼠, 用RT-PCR检测动物肝组织中TGF- β 1, TGF- β R的mRNA表达水平, Western blot检测肝组织中Smad3, Smad7蛋白水平, 免疫组织化学方法检测动物肝组织

背景资料
肝纤维化是诸多慢性肝病向肝硬化发展的必经病理阶段, 阻止和逆转肝纤维化, 是防止肝硬化发生, 改善肝脏疾病预后的关键。近年来发现, TGF- β 1是肝纤维化最重要的始动因子之一, 具有活化肝星状细胞, 促进胶原蛋白基因表达, 增加细胞外基质合成与沉积, 抑制ECM降解等作用, 其通过TGF-Smad信号转导通路发挥作用。

相关报道

Heldin *et al*报道, TGF- β 1在细胞外基质降解失常为肝纤维化疾病的形成过程中主要致病机制。李蕾 *et al*证实, TGF- β 1可导致HSC骨架改变, 增加细胞迁移。Derynck *et al*及Calabrese *et al*认为, Smads蛋白是目前所知唯一的型受体胞内底物, 介导TGF- β 1的胞内信号转导, 是TGF- β 家族信号从受体到核的胞内转导分子。

中TGF- β 1的表达和定位。

结果: 正常肝组织中有少量TGF- β 1, TGF- β R的mRNA表达。随着肝纤维化及肝硬化的形成, 模型组wk 0, 3, 6, 9, 12, TGF- β 1, TGF- β R和Smad3表达量分别逐渐递增(TGF- β 1: 0.19 ± 0.12 , 0.29 ± 1.02 , 0.89 ± 0.23 , 0.98 ± 0.77 , 1.7 ± 1.00 ; TGF- β R: 0.30 ± 0.22 , 0.49 ± 0.16 , 1.02 ± 0.33 , 1.51 ± 0.72 , 2.14 ± 1.02 ; Smad3: 0.44 ± 0.24 , 0.84 ± 0.69 , 1.10 ± 0.16 , 1.40 ± 0.12 , 1.75 ± 1.05), Smad7表达量呈逐渐减少(1.35 ± 0.12 , 1.09 ± 0.78 , 1.14 ± 0.31 , 1.11 ± 0.91 , 0.74 ± 1.21)。正常肝组织TGF- β 1可见少量表达, 主要在中央静脉周围肝细胞中。随着肝纤维化及肝硬化的形成, TGF- β 1表达增强($P < 0.01$)。

结论: 随着肝硬化的形成, 肝脏中TGF- β 1, TGF- β R和Smad3表达增加, Smad7表达下降。

关键词: 肝硬化; 转移生长因子- β 1; Smad3; Smad7
逆转录聚合酶链式反应; 免疫印迹

俞蕾敏, 吕宾, 李善高, 斯淑英. 大鼠肝硬化形成过程中肝组织TGF- β 1, Smad3, Smad7水平动态的变化. 世界华人消化杂志 2007;15(30):3163-3167

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/3163.asp>

0 引言

肝纤维化是诸多慢性肝病向肝硬化发展的必经病理阶段, 此期尚可逆转。阻止和逆转肝纤维化, 是防止肝硬化发生, 改善肝脏疾病预后的关键。但目前国内外对肝纤维化发生的机制仍然不十分清楚。研究表明, 转化生长因子TGF- β 1在肝纤维化发展过程中具有活化肝星状细胞(hepatic stellate cell, HSC), 促进胶原蛋白基因表达, 增加细胞外基质(extrocellular matrix, ECM)合成与沉积, 抑制ECM降解等作用, 是肝纤维化最重要的始动因子之一^[1], 其通过TGF-Smad信号转导通路发挥作用。我们以四氯化碳诱导肝纤维化大鼠为模型, 探讨TGF- β 1, Smad3蛋白, Smad7蛋白在肝纤维化过程中可能作用及机制。

1 材料和方法

1.1 材料 清洁级SD δ 大鼠46只, 体质量180-220 g, 购自中国科学院上海实验动物中心, 饲养于浙江中医药大学动物实验中心。四氯化碳分析纯, 由武汉化学试剂公司出品, 临用前用过滤后的中性菜籽油稀释, 配成600 mL/L的溶液。RT-

PCR和Western blot所用试剂: 羊抗大鼠Smad3, Smad7, TGF- β 1, TGF- β R II抗体, 均由美国Santa Cruza公司提供。TRIzol试剂、逆转录试剂盒购置于Invitrogen公司, PVDF膜购置于美国Milipore公司, 其余试剂购置于上海生物有限公司。免疫组化试剂: TGF- β 1一抗购自北京中杉金桥公司, 二抗由上海仪涛生物仪器有限公司提供。

1.2 方法 于实验开始时随机抽取6只作为wk 0正常对照组。剩余大鼠分为正常组和模型组, 模型组大鼠600 mL/L四氯化碳3 mL/kg, sc, 每周2次, 复制肝硬化动物模型; 正常组大鼠同等条件下饲养, 不做任何处理。于实验wk 3, 6, 9, 12分别随机抽取正常组2只, 模型组8只大鼠处死。实验结束时, 模型组除wk 12大鼠因肝功能衰竭死亡2只外(不计入数据统计), 余大鼠均存活。至wk 12, 存活大鼠经病检证实均形成肝硬化。处死前12 h禁食, 处死时均经戊巴比妥钠麻醉后(50 mg/kg)切开腹腔, 取肝组织部分置40 g/L甲醛中固定, 石蜡包埋, 连续3 μ m切片, 行免疫组化检测。部分于液氮中保存, 以备提取mRNA和蛋白质。

1.2.1 RT-PCR检测肝组织中TGF- β 1和TGF- β R 按照TRIzol试剂盒说明书提取肝脏组织总RNA, 再按RT-PCR试剂盒说明书逆转录得cDNA。合成的引物序列, 扩增条件及产物见表1。以 β -actin为内参照, PCR反应产物置15 g/L琼脂糖凝胶电泳检测。

1.2.2 Western blot检测肝组织中Smad3和Smad7的蛋白水平 取肝脏组织, 按照1: 2(m/V)加入组织提取液(mmol/L: EDTA 20, EGTA 10, PMSF 1, Urea 2, DTT和aprotinin 0.2 kg/L的TBS缓冲液, pH7.6), 冰浴超声匀浆, 15000 r/min 4℃离心5 min, 取上清液进行乙醇沉淀。Bradford法测定总蛋白量。每孔加样量为20 μ g蛋白, 然后进行SDS-PAGE(凝胶浓度为85 g/LT, 27 g/LC)分离, 电转移至PVDF膜, 取出膜放到T-TBS(含50 g/L脱脂奶粉)室温封闭2 h, 然后T-TBS漂洗, 加入Rabbit Anti-Hsp70/Hsc70 polyclonal Antibody (以1: 20000溶于T-TBS), 4℃孵育过夜。T-TBS漂洗, 再加入anti-Rabbit IgG(Fc) alkaline phosphatase conjugate(以1: 5000溶于T-TBS), 室温2 h, 最后加入显色底物NBT/BCIP, 室温暗处显色, TE缓冲液终止反应。

1.2.3 免疫组化法检测肝组织中TGF- β 1的表达 采用二步法(EnVision系统), 基本工作程序为: 脱蜡, 水化组织片; 预处理组织切片, 酶修复或热修

表 1 引物序列, 扩增条件及产物

名称	序列	扩增长度
TGF-β1	正向引物: 5'-CACCATCCATGACATGAACC-3'	404 bp
	反向引物: 5'-TCATGTTGGACAACCTGCTCC-3'	
	扩增条件: 94℃, 30 s; 56℃, 30 s; 72℃, 30 s; 32 循环	
TGF-β RII	正向引物: 5'-GCTTAGACACGACAACATCC-3'	345 bp
	反向引物: 5'-CCAATGTCCAGGTAATCGCT-3'	
	扩增条件: 94℃, 30 s; 60℃, 30 s; 72℃, 30 s; 30 循环	

表 2 模型组大鼠TGF-β1和TGF-βRII mRNA, Smad3和Smad7蛋白表达变化(mean ± SD)

指标	wk 0	wk 3	wk 6	wk 9	wk 12
TGF-β	0.19 ± 0.12	0.29 ± 1.02 ^a	0.89 ± 0.23 ^b	0.98 ± 0.77 ^b	1.70 ± 1.00 ^b
TGF-β RII	0.30 ± 0.22	0.49 ± 0.16 ^a	1.02 ± 0.33 ^b	1.51 ± 0.72 ^b	2.14 ± 1.02 ^b
Smad3	0.44 ± 0.24	0.84 ± 0.69 ^b	1.10 ± 0.16 ^b	1.40 ± 0.12 ^b	1.75 ± 1.05 ^b
Smad7	1.35 ± 0.12	1.19 ± 0.78 ^a	1.14 ± 0.31 ^a	1.11 ± 0.91 ^a	0.74 ± 1.21 ^b

^a*P*<0.05, ^b*P*<0.01 vs wk 0.

复; 蒸馏水漂洗, 置于PBS中; 滴加30 mL/L H₂O₂ 阻断内源性过氧化物酶, 孵育10 min; 蒸馏水漂洗, 置于PBS中, 一抗孵育30 min, TPS漂洗10 min, EnVision TM孵育30 min, TBS漂洗10 min, 色源底物溶液DAB孵育, 光镜控制, 蒸馏水漂洗, 复染或封片. (1)阳性细胞≤5%为0分, 6%-25%为1分, 26%-50%为2分, 51%-75%为3分, >75%为4分; (2)阳性强度: 无色为0分, 淡黄色为1分, 黄色为2分, 棕黄色为3分. 将(1), (2)两者积分相乘, 0分为阴性(-), 1-4分为弱阳性(+), 5-8分为阳性(++), 9-12分为强阳性(+++).

统计学处理 计量资料采用mean±SD表示, 以SPSS11.0统计分析程序对计量资料进行单因素方差分析,*P*<0.05为差异有统计学意义.

2 结果

2.1 TGF-β1和TGF-β R mRNA的表达 随着肝纤维化及肝硬化的形成, wk 0, 3, 6, 9, 12表达量逐渐递增(表2, 图1A-B).

2.2 Smad3和Smad7蛋白水平 随着肝纤维化及肝硬化的形成, Smad3在wk 0, 3, 6, 9, 12表达量逐渐递增(*P*<0.01); Smad7在wk 0, 3, 6, 9, 12表达量呈逐渐减少(表2, 图2A-B).

2.3 TGF-β1免疫组化检测 TGF-β1在正常肝组织在中央静脉周围肝细胞中有少量表达. 随着肝纤维化及肝硬化的形成, 在模型大鼠肝脏的门管区纤维母细胞、血管内皮细胞、中央静脉周

创新盘点
目前国内外对肝纤维化发生的机制仍然不十分清楚. 本文结果表明, 在慢性肝损伤发生时, 各种始发的致病因子触发机体TGF-β1表达上调, 激活 TGF-Smad信号转导通路, 使Smad3蛋白的合成增加, 同时抑制Smad7蛋白的表达, 于是触发HSC活化, 转变成肌纤维样细胞和成纤维细胞, 使ECM成分在肝内异常沉积, 最终促进肝纤维化.

表 3 模型组大鼠肝组织中TGF-β1表达

t/wk	n	TGF-β1表达等级 ^b			
		-	+	++	+++
0	6	5	1	0	0
3	8	0	8	0	0
6	8	0	4	4	0
9	8	0	0	7	1
12	6	0	0	3	3

^b*P*<0.01表达逐渐增强.

围细胞、部分肝细胞及纤维间隔中表达逐渐增强, 差异有显著性(*P*<0.01, 表3, 图3A-B).

3 讨论

肝纤维化的发生是复杂的过程, 其本质是细胞外基质ECM成分在肝内的异常沉积. 活化的肝星状细胞HSC是肝纤维化细胞外基质的主要来源细胞. HSC由正常静止状态被激活, 转变成肌纤维样细胞(myofibrblast-like cell, MFBS)和成纤维细胞(fibroblast)是肝纤维化发生的中心环节. 转化生长因子β是目前公认最重要的致肝纤维化的细胞因子之一^[2], 其中TGF-β1是激活HSC的主要因子, 可促进活化后肌纤维母细胞过表达ECM, 并抑制其降解, 也有间接促ECM增殖作用. 在细胞外基质降解失常为主要致病机制的肝纤维化疾病的形成过程中, TGF-β1起关键

应用要点
本文目前还处于体外研究阶段, 但为TGF- β 1, Smad3, Smad7在肝纤维化发生机制中的作用提供了实验依据, 如能阻止此信号转导通路, 可成为防治肝纤维化的一种新手段.

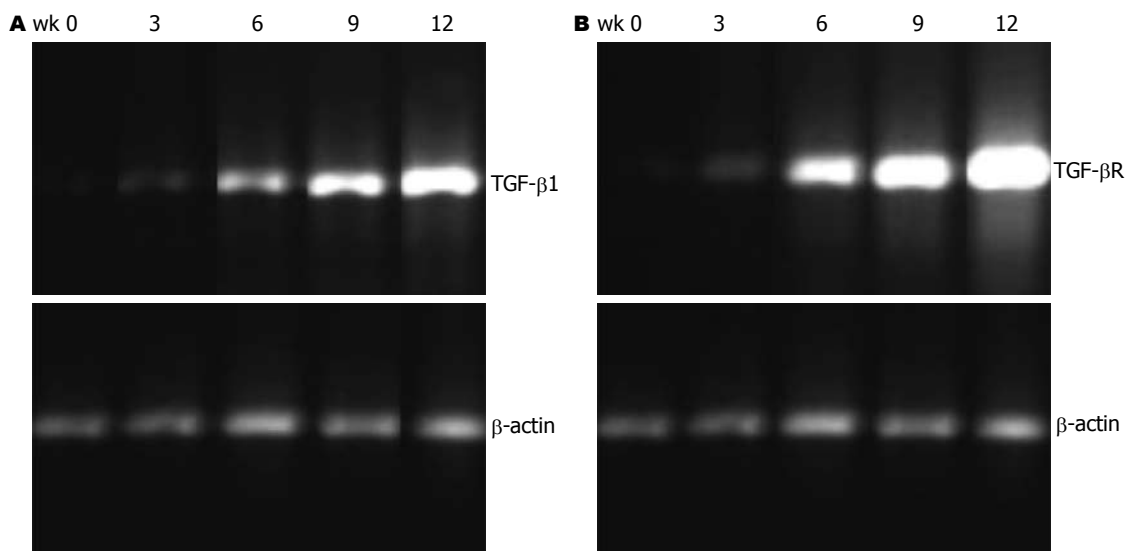


图1 模型组大鼠肝组织中TGF- β 1和TGF- β R II mRNA的表达. A: TGF- β 1 RNA; B: TGF- β R II mRNA.

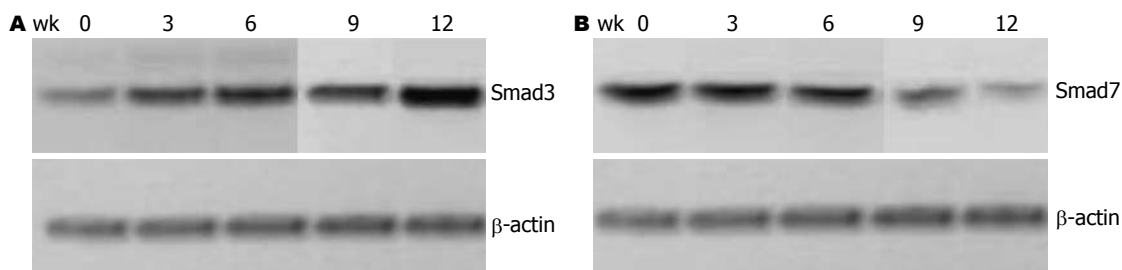


图2 模型组大鼠肝组织中Smad3和Smad7蛋白水平. A: Smad 3; B: Smad 7.

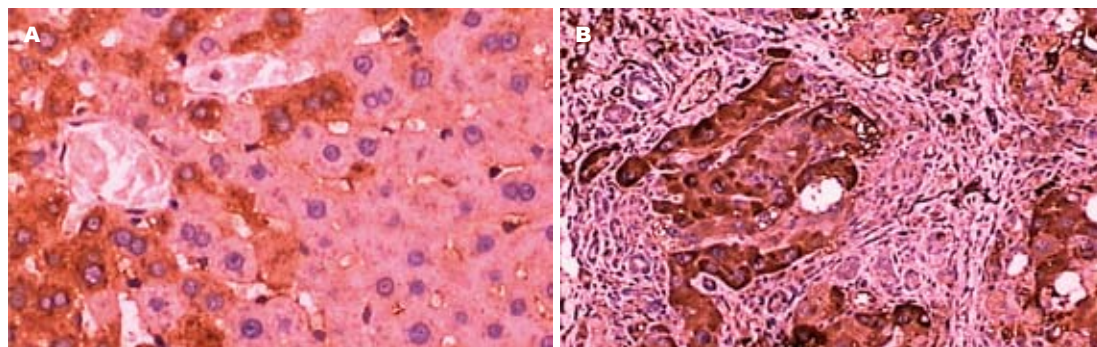


图3 免疫组化检测大鼠肝组织中TGF- β 1表达(SP × 200). A: 正常组; B: wk 12模型组.

作用^[3]. 李蕾 *et al*^[4]证实, TGF- β 1可导致HSC骨架改变, 增加细胞迁移. 我们的实验研究表明, 随着CCl₄诱导时间的延长及肝纤维化程度的加重, 肝组织中TGF- β 1 mRNA, TGF- β R II mRNA表达呈递增趋势. 免疫组化方法检测大鼠肝组织TGF- β 1表达, 也取得了表达增强的结果. 目前认为TGF- β 1在所有类型的细胞中均以无活性形式合成和分泌, 在体内通过二硫键结合后激活, 并与其效应细胞上的受体结合发挥作用^[5], 即活化后与细胞膜表面II型受体结合, 形成复

合物, 然后再与I型受体结合, 形成异四聚体结构, 并与TGF- β 1结合. II型受体自磷酸化, 进而磷酸化I型受体, 使之激活具有激酶活性. 激活Smads蛋白并形成复合物, 由此转入核内, 与各种转录因子结合, 调控基因转入. Smads蛋白是目前所知唯一的I型受体胞内底物, 介导TGF- β 1的胞内信号转导, 是TGF- β 家族信号从受体到核的细胞内转导分子^[6-7]. Smad3是膜受体激活的Smad(R-Smad), 可被活化的T β R I磷酸化^[8]. Smad7是TGF-Smad信号转导通路的抑制因

子, 是细胞中TbR I 型受体丝氨酸/苏氨酸激酶的拮抗蛋白^[9], 能牢固的与TbR I 型受体结合, 完全阻断TGF- β 的信号转导^[10]. 本实验证实, 随着肝纤维化程度的加重, 肝组织中Smad3蛋白的表达呈递增趋势, Smad7蛋白则表达下降.

由此推测, 在慢性肝损伤发生时, 各种始发的致病因子触发机体TGF- β 1表达上调, 激活TGF-Smad信号转导通路, 使Smad3蛋白的合成增加, 同时抑制Smad7蛋白的表达, 于是触发HSC活化, 转变成肌纤维样细胞和成纤维细胞, 使ECM成分在肝内异常沉积, 最终促进肝纤维化. Jiang *et al*^[11]将反义重组TbR I 和TbR II 质粒转入载体, 然后分别注射到肝纤维化大鼠体内, 结果显示两者都可减少体内TGF- β , 使肝内羟脯氨酸, I, III型胶原的含量较对照组减少, 减轻肝脏纤维化. 近年来报道一些中西药物如培哚普利^[12]、粉防己碱^[13]、红景天甙^[14]、金三莪术^[15]均可通过影响TGF-Smad信号转导通路, 达到抗纤维化目的. 因此, 阻止此信号转导通路, 将成为防治肝纤维化的一个新的手段.

4 参考文献

- 董玲, 孙剑勇, 杜施霖, 王吉耀. 基因芯片研究甘草酸对大鼠肝星状细胞转化生长因子- β 信号通路的影响. 中华消化杂志 2006; 26: 594-597
- Gressner AM, Weiskirchen R. Modern pathogenetic concepts of liver fibrosis suggest stellate cells and TGF- β as major players and therapeutic targets. *J Cell Mol Med* 2006; 10: 76-99
- Heldin CH, Miyazono K, ten Dijke P. TGF- β signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. *Nature* 1997; 390: 465-471
- 李蕾, 蒋伟, 王吉耀, 杨长青, 王逸青. 转化生长因子 β_1 对肝星状细胞迁移及细胞内Rho三磷酸鸟苷酶表达的影响. 中华消化杂志 2006; 28: 527-530
- Lu JP, Mao JQ, Li MS, Lu SL, Hu XQ, Zhu SN, Nomura S. In situ detection of TGF betas, TGF beta receptor II mRNA and telomerase activity in rat cholangiocarcinogenesis. *World J Gastroenterol* 2003; 9: 590-594
- Derynck R, Zhang YE. Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF- β family signalling. *Nature* 2003; 425: 577-584
- 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
- Dennler S, Goumans MJ, ten Dijke P. Transforming growth factor beta signal transduction. *J Leukoc Biol* 2002; 71: 731-740
- Tahashi Y, Matsuzaki K, Date M, Yoshida K, Furukawa F, Sugano Y, Matsushita M, Himeno Y, Inagaki Y, Inoue K. Differential regulation of TGF- β signal in hepatic stellate cells between acute and chronic rat liver injury. *Hepatology* 2002; 35: 49-61
- Mori Y, Chen SJ, Varga J. Expression and regulation of intracellular SMAD signaling in scleroderma skin fibroblasts. *Arthritis Rheum* 2003; 48: 1964-1978
- Jiang W, Yang CQ, Liu WB, Wang YQ, He BM, Wang JY. Blockage of transforming growth factor beta receptors prevents progression of pig serum-induced rat liver fibrosis. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 1634-1638
- 龚作炯, 宋仕玲, 阮鹏, 向龙奎, 张志荣. 血管紧张素转换酶抑制剂对肝纤维化大鼠TGF β , TGFR, Smad3, 7表达的影响. 世界华人消化杂志 2004; 12: 1132-1135
- 陈源文, 李定国, 吴建新, 陈颖伟, 陆汉明. 粉防己碱上调Smad7表达抑制大鼠肝星状细胞活化. 中国药理学通报 2005; 21: 563-567
- 吴晓玲, 曾维政, 蒋明德, 王丕龙, 邓桂英, 秦建平. 红景天甙对肝纤维化大鼠Smads基因表达的影响. 第四军医大学学报 2005; 26: 923-926
- 宋仕玲, 龚作炯, 张全荣. 金三莪术对肝纤维化大鼠TGF- β_1 及其I、II型受体mRNA与Smad3、Smad7表达的影响. 中医药学刊 2004; 22: 1044-1047

同行评价
本文设计严谨, 方法成熟, 分析有据, 层次清楚, 具有较好的可读性和参考性.

编辑 何燕 电编 马文华

保留半肝动脉血供的入肝血流阻断法对大鼠肝缺血再灌注损伤的影响

金山, 戴朝六, 贾昌俊, 许永庆, 彭志敏

背景资料
肝脏手术的主要问题是术中出血, 而如何控制术中出血成为肝切除手术成败的前提条件。合理的肝血流阻断方式对顺利完成手术, 减少术后肝衰发生有着举足轻重的作用。本文主要对保留半肝动脉血供的入肝血流阻断法进行研究, 为寻找操作简单安全, 肝细胞受损轻的肝血流阻断方式提供实验依据。

金山, 戴朝六, 贾昌俊, 许永庆, 彭志敏, 中国医科大学附属盛京医院肝胆外科 辽宁省沈阳市 110004
金山, 2005年中国医科大学附属盛京医院肝胆外科博士, 主要从事肝脏外科临床及基础研究。
美国中华医学基金会(CMB)资助项目, No. 06-837
通讯作者: 戴朝六, 110004, 辽宁省沈阳市和平区三好街36号, 中国医科大学附属盛京医院肝胆外科。daicl-sy@tom.com
电话: 024-83955232 传真: 024-83955092
收稿日期: 2007-06-04 修回日期: 2007-10-07

Effect of hepatic blood inflow occlusion without hemihepatic artery control during hepatic ischemia-reperfusion injury in rats

Shan Jin, Chao-Liu Dai, Chang-Jun Jia, Yong-Qing Xu, Zhi-Min Peng

Shan Jin, Chao-Liu Dai, Chang-Jun Jia, Yong-Qing Xu, Zhi-Min Peng, Department of Hepatobiliary Surgery, Shengjing Hospital, China Medical University, Shenyang 110004, Liaoning Province, China

Supported by: the China Medical Board of New York Inc., No. 06-837

Correspondence to: Prof Chao-Liu Dai, Department of Hepatobiliary Surgery, Shengjing Hospital, China Medical University, 36 Sanhao street, Heping District Shenyang 110004, Liaoning Province, China. daicl-sy@tom.com
Received: 2007-06-04 Revised: 2007-10-07

Abstract

AIM: To investigate the effect of hepatic blood inflow occlusion without hemihepatic artery control during hepatic ischemia-reperfusion injury in rats.

METHODS: Ninety-six Wistar rats were randomly divided into the Pringle group (group), hemihepatic vascular occlusion group (group) and hepatic blood inflow occlusion without hemihepatic artery control group (group). After 30 min of hepatic vascular occlusion with three methods, the liver blood flow was reperused. After reperfusion for 1, 2, 6 and 24 hours, we measured serum AST and ALT and liver tissue (superoxide dismutase) SOD, MDA, pathology and apoptosis.

RESULTS: After each period of reperfusion, ALT, AST, MDA and apoptosis rate were significantly lower in groups and than in group , but SOD activity was significantly higher. AST, ALT, MDA, SOD and apoptosis rate did not differ significantly between groups and .

CONCLUSION: Hepatic blood inflow occlusion without hemihepatic artery control can reduce hepatic ischemia-reperfusion injury, and the effect is similar to that of hemihepatic vascular occlusion.

Key Words: Hepatic blood inflow occlusion without hemihepatic artery control; Ischemia-reperfusion; Liver injury; Rats

Jin S, Dai CL, Jia CJ, Xu YQ, Peng ZM. Effect of hepatic blood inflow occlusion without hemihepatic artery control during hepatic ischemia-reperfusion injury in rats. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007; 15(30): 3168-3172

摘要

目的: 探讨保留半肝动脉血供的入肝血流阻断法对大鼠肝缺血再灌注损伤的影响。

方法: 将96只Wistar大鼠随机分为Pringle法组、半肝阻断组和保留半肝动脉血供的入肝血流阻断组。阻断肝血流30 min后, 去血管夹恢复血流, 分别于再灌注后1, 2, 6, 24 h, 抽血检测ALT和AST水平, 然后取肝组织用于检测肝脏超氧化物歧化酶(SOD)及丙二醛(MDA)含量、肝脏病理学及肝细胞凋亡。

结果: 与组比较组和组再灌注后各时间点, ALT, AST, 肝组织MDA含量及细胞凋亡率显著降低, 肝组织SOD活力明显升高。组肝功改变、肝组织MDA含量、SOD活力及肝细胞凋亡率与组之间无显著差异($P>0.05$)。

结论: 保留半肝动脉血供的入肝血流阻断法对肝脏缺血再灌注损伤轻, 效果好, 操作简单, 因而优于半肝血流阻断法。

关键词: 保留半肝动脉血供的入肝血流阻断法; 缺血再灌注; 肝脏损伤; 大鼠

金山, 戴朝六, 贾昌俊, 许永庆, 彭志敏. 保留半肝动脉血供的入肝血流阻断法对大鼠肝缺血再灌注损伤的影响. 世界华人消化杂志 2007;15(30):3168-3172
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/3168.asp>

0 引言

肝脏手术的主要问题是肝切除时出血. 如何减少出血成为手术成败的关键. 肝切除时减少出血的常见方法有: 术中降低中心静脉压^[1-4]; 切肝时应用超声吸引刀、热凝(微波固化等)^[5-6], 阻断入肝血流伴有或不伴有出肝血流的控制等. 其中, 有效控制入肝血流(伴有或不伴有出肝血流的控制)对保证相对无血的手术环境有非常重要的作用, 但各种入肝血流阻断方法均存在不同程度的缺血再灌注损伤, 影响肝脏功能. 随着肝脏缺血再灌注损伤机制的成熟, 各种预防及治疗措施日益增多^[7-16]. 2006年我院开始采用保留半肝动脉血供的入肝血流阻断法进行常温下切肝, 取得良好效果. 故此, 我们利用大鼠复制了保留半肝动脉血供的入肝血流阻断法、Pringle法及半肝阻断法动物模型, 进一步明确了保留半肝动脉血供的入肝血流阻断法在手术操作及减轻肝脏缺血再灌注损伤方面的优越性.

1 材料和方法

1.1 材料 健康Wistar大鼠96只, 体质量250-300 g, 由吉林大学实验动物中心提供. 自由饮水, 随意进食, 12 h照明, 充分适应环境. MDA, SOD及考马斯亮蓝蛋白检测试剂盒均购自南京建成生物工程研究所, 碘化丙啶(propidium)为美国Sigma公司产品.

1.2 方法 将大鼠随机分为3组, 分别为Pringle法I组($n=32$), 半肝阻断II组($n=32$), 保留半肝动脉血供的入肝血流阻断III组($n=32$). 每组又分为4个亚组, 分别为再灌注后1, 2, 6及24 h组, 每亚组为8只. 大鼠术前12 h禁食, 自由饮水, 用100 g/L水合氯醛350 mg/kg, ip麻醉后, 常规脱毛消毒, 上腹正中切口入腹, 切口长约1.5-2.0 cm, 离断肝周韧带, 解剖出拟阻断部位血管, 用无损伤血管夹阻断血流. Pringle法为解剖肝门, 完全阻断入肝血流. 解剖分离出支配左外叶、左内叶及中叶的头支, 进行阻断完成半肝阻断模型; 保留半肝动脉血供的入肝血流阻断法为解剖肝门

阻断门静脉, 同时阻断头支内肝动脉分支. 各组阻断血流30 min后松开血管夹, 恢复肝血流, 关腹. 各组再灌注后1, 2, 6及24 h, 分别下腔静脉采血3 mL, 然后取尾状叶用锡箔纸包裹后置于液氮保存, 用于检测肝脏超氧化物歧化酶(SOD)及丙二醛(MDA)含量测定. 再取乳头叶置于40 g/L甲醛溶液中, 切片后常规HE染色, 用于病理学检测. 另取0.2 g左右肝右叶, PBS漂洗3次, 用200目双层不锈钢筛轻轻研磨, 将所得单细胞悬液细胞数调至 1×10^{12} /L, 1000 r/min离心5 min, 去上清, PBS 5 mL洗2次, 去上清, 向沉淀中逐渐加入预冷700 mL/L乙醇并不断振摇使均匀, 固定肝细胞, 置4℃保存. 抽取血液静置20 min后, 2500 r/min离心10 min, 用微量移液器将上清液至预冷弹头中, 置-20℃冰箱中用于肝功检测. ALT和AST的测定采用全自动生化分析仪, 肝组织MDA和SOD含量测定按试剂盒说明书操作, SOD测定采用黄嘌呤氧化酶法, MDA测定采用硫代巴比妥酸法. 另将单细胞悬液用碘化丙啶(PI)染色, 用FACScan型流式细胞仪测定细胞凋亡, 用氩离子激光激发荧光, 激发光波长为488 nm, 并用Dikinson流式细胞仪分析软件进行分析, 实验数据用累积曲线分割法计算.

统计学处理 采用统计软件SPSS13.0进行方差分析, 结果采用mean±SD表示, $P<0.05$ 为差异有显著性.

2 结果

2.1 肝组织病理学改变 再灌注后1-3 h Pringle法组肝细胞索排列紊乱, 肝细胞明显肿胀, 肝窦间隙明显变窄或消失. 6 h时损伤进一步加重, 肝窦内出现淤积的红细胞和微血栓, 汇管区有中性粒细胞浸润. 24 h时肝小叶变形, 可见局灶性肝细胞坏死. 而保留半肝阻断组和半肝阻断组再灌注后1-3 h 肝细胞仅有轻度肿胀, 偶有脂肪变性. 6及24 h时肝细胞损伤比Pringle法明显轻, 而且肝细胞结构仍完整, 偶有点状坏死.

2.2 血清ALT和AST水平 Pringle法组再灌注后各时间点血清ALT和AST均高于半肝阻断组和保留半肝动脉血供的入肝血流阻断组($P<0.01$). 而保留半肝动脉血供的入肝血流阻断组和半肝阻断组之间血清ALT和AST水平无显著差异($P>0.05$)(表1).

2.3 肝组织SOD和MDA含量 与其他两组相比较, 再灌注后各时间点, Pringle法组肝组织MDA含量明显高, 而SOD活性明显降低($P<0.01$). 保留

研发前沿
如何减少术中出血是肝脏外科领域的研究难点, 其中阻断肝血流引起的缺血再灌注损伤成为研究热点, 而各种改良术式的应用日益受到人们的关注.

创新盘点
本文提出了保留半肝动脉血供的入肝血流阻断法, 并且在临床应用的基础上, 首次应用动物模型对该方法进行了研究.

表 1 大鼠再灌注后ALT, AST, MDA含量, SOD活性和肝细胞凋亡率的变化(mean \pm SD, $n = 8$)

分 组		再灌注时间			
		1 h	2 h	6 h	24 h
ALT(nkat/L)	组	5388.7 ± 453.4	10 117.5 ± 340.0	15876.3 ± 420.1	16562.9 ± 945.1
	组	4025.3 ± 475.0 ^b	6295.5 ± 491.7 ^b	11 990.9 ± 370.0 ^b	12 754.4 ± 773.4 ^b
	组	3900.3 ± 333.4 ^b	6923.9 ± 305.0 ^b	11 812.6 ± 328.4 ^b	12 557.7 ± 375.1 ^b
AST(nkat/L)	组	10 289.2 ± 356.7	20 168.3 ± 416.7	27 733.8 ± 568.4	6188.8 ± 411.7
	组	5663.8 ± 378.4 ^b	13 327.7 ± 313.4 ^b	17 644.7 ± 1380.1 ^b	3775.3 ± 358.4 ^b
	组	5810.5 ± 371.6 ^b	13 619.4 ± 336.7 ^b	18 589.8 ± 2023.5 ^b	3995.3 ± 258.4 ^b
MDA(μmol/g)	组	2.9 ± 0.4	4.4 ± 0.7	6.0 ± 0.5	3.0 ± 0.4
	组	1.3 ± 0.4 ^b	1.7 ± 0.4 ^b	2.3 ± 0.3 ^b	0.8 ± 0.4 ^b
	组	1.4 ± 0.5 ^b	2.1 ± 0.4 ^b	2.5 ± 0.5 ^b	1.0 ± 0.2 ^b
SOD(μkat/g)	组	220.8 ± 18.2	192.3 ± 12.7	136.7 ± 9.0	154.9 ± 7.8
	组	242.3 ± 10.4 ^b	220.9 ± 8.2 ^b	193.6 ± 11.6 ^b	217.2 ± 10.8 ^b
	组	234.9 ± 15.3 ^b	219.9 ± 8.5 ^b	191.5 ± 9.7 ^b	215.0 ± 11.0 ^b
肝细胞凋亡(%)	组	11.72 ± 1.08	24.59 ± 2.52	36.20 ± 3.53	23.21 ± 1.95
	组	7.75 ± 0.94 ^b	11.71 ± 0.77 ^b	19.16 ± 1.35 ^b	15.51 ± 1.58 ^b
	组	7.73 ± 0.96 ^b	12.02 ± 1.15 ^b	19.18 ± 1.61 ^b	15.42 ± 1.11 ^b

^b $P < 0.01$ vs 组.

半肝动脉血供的入肝血流阻断组肝组织MDA含量及SOD活性与半肝阻断组之间无显著差异($P > 0.05$, 表1).

2.4 肝细胞凋亡率 保留半肝动脉血供的入肝血流阻断组与半肝阻断组缺血再灌注后肝细胞凋亡率明显低于Pringle法组($P < 0.01$), 而两组之间肝细胞凋亡率无显著差异($P > 0.05$, 表1).

3 讨论

肝脏是人体对缺血和缺氧较为敏感的器官, 不能耐受长时间缺血及术中大量失血^[17], 而术中出血伴随的输血影响着肝切除手术效果及术后死亡率^[18-19]. 因此肝切除中选择适当的肝血流阻断方式是有必要的^[20-21], 但阻断血流必然带来肝脏热缺血再灌注损伤^[22]. Pringle法是一种应用最广泛的控制切肝时出血的措施, 特点是操作简便易行, 少时实用, 除肝门区肿瘤外, 几乎可用于各种类型的肝切除术^[23]. Man *et al*^[24]和Dixon *et al*^[25]比较了Pringle法和非血流阻断法切肝, 前者优于后者, 因为该法中止血效果较好, 但该法最大缺点是肝脏热缺血再灌注损伤明显, 我们的动物实验同样证明上述观点. Pringle法组肝功改变、肝脏MDA含量及肝细胞凋亡在再灌注各时间点均高于其他两组($P < 0.01$), 并且肝组织SOD活力各时间点均低于其他组($P < 0.01$). MDA是氧自由基与细胞膜以及具有膜结构的亚细胞器中多不饱和脂肪酸发生脂质过氧化反应的产物, 测定MDA不仅能反映氧自由基生成水平, 还

可以反映肝细胞受损程度. 而SOD对机体氧化及抗氧化平衡起着至关重要的作用, 它能够清除氧自由基. 因此肝组织MDA含量的升高, 同时SOD活力下降足以说明了缺血再灌注时氧自由基对机体的损伤程度, 即该血流阻断方法对肝脏的损伤程度. 另一方面, 随着缺血再灌注损伤机制的深入研究发现肝脏缺血再灌注时除细胞坏死之外, 还存在细胞凋亡, 并且是造成器官功能不全的重要因素^[8]. Pringle法组再灌注各时间点肝细胞凋亡明显高于其他两组($P < 0.01$).

1987年Makuuchi *et al*^[26]提出半肝血流阻断方法, 半肝阻断由于保留了对侧半肝的正常入肝血流, 为从容进行手术创造了条件, 术后肝功能损害轻, 有利于合并肝硬化的肝癌治疗^[27-30]. 我们发现, 半肝阻断组肝功受损、肝细胞凋亡及抵抗氧自由基方面均优于Pringle法组, 差异有显著性($P < 0.01$). 但Torzilli *et al*^[31]认为该法由于未血流阻断的半肝与阻断侧存在交通支, 有时肝断面出血可能非常严重. 另一方面, 该法手术操作要难于Pringle法, 要求术者对肝门解剖熟练, 否则易发生Glisson鞘内管道损伤、出血、胆瘘等^[32].

正常肝脏70%-75%的血液供应来自于门静脉, 而供氧40%-60%来自于动脉血. 根据门静脉与肝动脉间不同的血流量分布特点以及血氧含量的差异, 我们应用保留半肝动脉血供的入肝血流阻断法, 操作时显露出肝固有动脉, 向上游离出左、右肝动脉. 行右半肝阻断时, 导尿管绕过门静脉、胆总管及肝右动脉即可; 而左半肝

阻断时, 阻断门静脉、胆总管及肝左动脉即可。这样术中可以保留健侧半肝的动脉血供。有研究表明, 肝动脉有较高的压力梯度, 能充分灌流肝脏血管网络的每一个角落, 而门静脉不能为肝脏的所有部位供氧。当夹闭门静脉时, 肝脏的耗氧量保持在夹闭前水平, 表明肝动脉能单独提供肝脏足够的氧需求。在解剖学上, 人左右肝管汇合点最高, 门静脉分叉点稍低, 而肝固有动脉分叉点最低。因此, 手术中能够安全简单的解剖出肝固有动脉及左右分支, 并且能够一次性阻断门静脉、胆管及阻断侧动脉分支。由于大鼠肝门结构与人不同, 因此我们的实验中分别阻断了大鼠门静脉及头支肝动脉。我们在实验中发现, 肝功改变、肝细胞病理、抵抗氧自由基损伤及凋亡方面该法明显优于Pringle法, 而且与半肝阻断之间差异无显著性。

我们认为, 保留半肝动脉血供的入肝血流阻断法, 在肝缺血再灌注损伤方面能够达到半肝阻断的效果, 并且手术操作简单, 安全性优于半肝阻断法, 是一个值得推广的肝血流阻断方法。

4 参考文献

- 1 Wu CC, Yeh DC, Ho WM, Yu CL, Cheng SB, Liu TJ, P'eng FK. Occlusion of hepatic blood inflow for complex central liver resections in cirrhotic patients: a randomized comparison of hemihepatic and total hepatic occlusion techniques. *Arch Surg* 2002; 137: 1369-1376
- 2 Smyrniotis VE, Kostopanagiotou GG, Gamaletsos EL, Vassiliou JG, Voros DC, Fotopoulos AC, Contis JC. Total versus selective hepatic vascular exclusion in major liver resections. *Am J Surg* 2002; 183: 173-178
- 3 Chen XP, Zhang ZW, Zhang BX, Chen YF, Huang ZY, Zhang WG, He SQ, Qiu FZ. Modified technique of hepatic vascular exclusion: effect on blood loss during complex mesohepatectomy in hepatocellular carcinoma patients with cirrhosis. *Langenbecks Arch Surg* 2006; 391: 209-215
- 4 Smyrniotis V, Kostopanagiotou G, Theodoraki K, Tsantoulas D, Contis JC. The role of central venous pressure and type of vascular control in blood loss during major liver resections. *Am J Surg* 2004; 187: 398-402
- 5 Strasberg SM, Drebin JA, Linehan D. Use of a bipolar vessel-sealing device for parenchymal transection during liver surgery. *J Gastrointest Surg* 2002; 6: 569-574
- 6 Weber JC, Navarra G, Jiao LR, Nicholls JP, Jensen SL, Habib NA. New technique for liver resection using heat coagulative necrosis. *Ann Surg* 2002; 236: 560-563
- 7 Sarely Israelashvili M, Zippel DB, Koller M, Valeanu A, Scott D, Ayalon S, Ben Ari GY, Papa MZ. Use of portal balloon catheter occlusion of the portal triad in prevention of bleeding during liver resection. *J Surg Oncol* 2005; 89: 39-42
- 8 Jin S, Han XC, Zhang H, Han N. The protective effect of MG132 on post-ischemia reperfusion injury of rat livers by activation of nuclear factor kappa B. *Zhonghua Ganzangbing Zazhi* 2005; 13: 791-792
- 9 Balaa FK, Gambelin TC, Tsung A, Marsh JW, Geller DA. Right Hepatic Lobectomy Using the Staple Technique in 101 Patients. *J Gastrointest Surg* 2007; Epub ahead of print
- 10 Tang L, Tian F, Tao W, Cui J. Hepatocellular glycogen in alleviation of liver ischemia-reperfusion injury during partial hepatectomy. *World J Surg* 2007; 31: 2039-2043
- 11 Duenschede F, Erbes K, Riegler N, Ewald P, Kircher A, Westermann S, Schad A, Miesmer I, Albrecht-Schock S, Gockel I, Kiemer AK, Junginger T. Protective effects of ischemic preconditioning and application of lipoic acid prior to 90 min of hepatic ischemia in a rat model. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 3692-3698
- 12 Kobayashi K, Oshima K, Muraoka M, Akao T, Totsuka O, Shimizu H, Sato H, Tanaka K, Konno K, Matsumoto K, Takeyoshi I. Effect of atrial natriuretic peptide on ischemia-reperfusion injury in a porcine total hepatic vascular exclusion model. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 3487-3492
- 13 Tuncer MC, Ozturk H, Buyukbayram H, Ozturk H. Interaction of L-arginine-methyl ester and Sonic hedgehog in liver ischemia-reperfusion injury in the rats. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 3841-3846
- 14 Peng SL, Gu X, Dai CL, Huang Y, Zhao Y. Effects of Shenfu injection on prostacyclin, thromboxane A2 and activities of ATPases in rats exposed to hepatic ischemia-reperfusion injury. *Zhongxiyi Jiehe Xuebao* 2007; 5: 427-431
- 15 Wang D, Zhu JY, Leng XS. Preventive effect of shenfu injection on hepatic ischemia-reperfusion injury in rats. *Zhongguo Zhongxiyi Jiehe Zazhi* 2006; 26 Suppl: 61-63
- 16 韩喜春, 金山, 韩宁. 缺血再灌注损伤中乌司他丁对核因子- κ B活化的影响及对损伤的保护作用. *中华实验外科杂志* 2006; 23: 60-62
- 17 Hasegawa K, Takayama T, Orii R, Sano K, Sugawara Y, Imamura H, Kubota K, Makuuchi M. Effect of hypoventilation on bleeding during hepatic resection: a randomized controlled trial. *Arch Surg* 2002; 137: 311-315
- 18 Kooby DA, Stockman J, Ben-Porat L, Gonen M, Jarnagin WR, Dematteo RP, Tuorto S, Wuest D, Blumgart LH, Fong Y. Influence of transfusions on perioperative and long-term outcome in patients following hepatic resection for colorectal metastases. *Ann Surg* 2003; 237: 860-869; discussion 869-870
- 19 Wu CC, Kang SM, Ho WM, Tang JS, Yeh DC, Liu TJ, P'eng FK. Prediction and limitation of hepatic tumor resection without blood transfusion in cirrhotic patients. *Arch Surg* 1998; 133: 1007-1010
- 20 van Gulik TM, de Graaf W, Dinant S, Busch OR, Gouma DJ. Vascular occlusion techniques during liver resection. *Dig Surg* 2007; 24: 274-281
- 21 Dixon E, Vollmer CM Jr, Bathe OF, Sutherland F. Vascular occlusion to decrease blood loss during hepatic resection. *Am J Surg* 2005; 190: 75-86
- 22 金山, 韩喜春. 肝缺血再灌注损伤. *医学临床研究* 2005; 22: 397-400
- 23 Lesurtel M, Selzner M, Petrowsky H, McCormack L, Clavien PA. How should transection of the liver

应用要点
保留半肝动脉血供的入肝血流阻断法操作简单, 安全性高, 对肝细胞损伤轻, 临床应用前景较广泛。

同行评价
本文内容有一定的
学术水平, 实验
方法设计可靠, 结
果结论较可信, 对
临床有一定的参
考价值.

- be performed?: a prospective randomized study in 100 consecutive patients: comparing four different transection strategies. *Ann Surg* 2005; 242: 814-822, discussion 822-823
- 24 Man K, Lo CM, Liu CL, Zhang ZW, Lee TK, Ng IO, Fan ST, Wong J. Effects of the intermittent Pringle manoeuvre on hepatic gene expression and ultrastructure in a randomized clinical study. *Br J Surg* 2003; 90: 183-189
- 25 Dixon E, Vollmer CM Jr, Bathe OF, Sutherland F. Vascular occlusion to decrease blood loss during hepatic resection. *Am J Surg* 2005; 190: 75-86
- 26 Makuuchi M, Mori T, Gunven P, Yamazaki S, Hasegawa H. Safety of hemihepatic vascular occlusion during resection of the liver. *Surg Gynecol Obstet* 1987; 164: 155-158
- 27 Yang JM, Tong Y, Xie F, Xu F, Kan T, Shen WF, Wu MC. Study of bloodless hepatectomy under occlusion of total hemihepatic vessel. *Zhonghua Waike Zazhi* 2007; 45: 186-188
- 28 Yan LN, Chen XL, Li ZH, Li B, Lu SC, Wen TF, Zeng Y, Yiao HH, Yang JY, Wang WT, Xu MQ. Perioperative management of primary liver cancer. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 1970-1974
- 29 Moug SJ, Smith D, Leen E, Angerson WJ, Horgan PG. Selective continuous vascular occlusion and perioperative fluid restriction in partial hepatectomy. Outcomes in 101 consecutive patients. *Eur J Surg Oncol* 2007; 33: 1036-1041
- 30 李海民, 窦科峰, 何勇, 赵青川, 陈勇, 周景师. 不同肝血流阻断方法在肝癌肝切除术中应用的比较研究. *临床外科杂志* 2007; 15: 102-104
- 31 Torzilli G, Makuuchi M, Inoue K, Takayama T, Sakamoto Y, Sugawara Y, Kubota K, Zucchi A. No-mortality liver resection for hepatocellular carcinoma in cirrhotic and noncirrhotic patients: is there a way? A prospective analysis of our approach. *Arch Surg* 1999; 134: 984-992
- 32 Smyrniotis V, Farantos C, Kostopanagiotou G, Arkadopoulos N. Vascular control during hepatectomy: review of methods and results. *World J Surg* 2005; 29: 1384-1396

编辑 何燕 电编 马文华

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年从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\临床科学\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].

高迁移率族蛋白B1在重症急性胰腺炎肠屏障损害中的作用

栾正刚, 张成, 葛春林, 马晓春, 郭仁宣

栾正刚, 马晓春, 中国医科大学附属第一医院重症医学科 辽宁省沈阳市 110001

张成, 葛春林, 郭仁宣, 中国医科大学附属第一医院普外二科 辽宁省沈阳市 110001

栾正刚, 主治医师, 博士, 主要从事重症急性胰腺炎发病机制方面的研究.

通讯作者: 郭仁宣, 110001, 辽宁省沈阳市, 中国医科大学附属第一医院普外二科. zgl17698@sina.com

电话: 024-83283330

收稿日期: 2007-06-14 修回日期: 2007-10-08

Role of high mobility group box-1 protein in gut mucosal barrier dysfunction during severe acute pancreatitis in rats

Zheng-Gang Luan, Cheng Zhang, Chun-Lin Ge, Xiao-Chun Ma, Ren-Xuan Guo

Zheng-Gang Luan, Xiao-Chun Ma, Department of Intensive Care Unit, the First Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China
Cheng Zhang, Chun-Lin Ge, Ren-Xuan Guo, Department of General Surgery, the First Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China

Correspondence to: Dr. Ren-Xuan Guo, Department of General Surgery, the First Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China. zgl17698@sina.com

Received: 2007-06-14 Revised: 2007-10-08

Abstract

AIM: To investigate the role of high mobility group box-1 protein (HMGB1) in gut mucosal barrier dysfunction during severe acute pancreatitis (SAP) in mice, and the mechanisms involved.

METHODS: A rat model of SAP was established by retrograde injection of 50 g/L sodium taurocholate into the choledochopancreatic duct. Fifty-six healthy male Wistar rats were divided randomly into three groups: control, SAP (3, 6, 12, 24 and 48 hours subgroups), and pyrrolidine dithiocarbamate (PDTC). Plasma lipopolysaccharide (LPS) and blood diamine oxidase (DAO) levels were determined. The expression of HMGB1 mRNA in the intestinal mucosa was de-

tected by reverse-transcription polymerase chain reaction (RT-PCR), and the activity of HMGB1 was determined by Western blotting.

RESULTS: Compared with the normal control group, HMGB1 mRNA level markedly increased in intestinal mucosa 6 hours after SAP (0.41 ± 0.06 vs 0.26 ± 0.03 , $P < 0.01$), peaked at 24 hours (0.62 ± 0.06), and remained relatively high up to 48 hours. Meanwhile, HMGB1 mRNA expression was significantly inhibited by PDTC in the intestine 24 hours after SAP (0.35 ± 0.06 vs 0.62 ± 0.06 , $P < 0.01$). PDTC alleviated the blood level of endotoxin and DAO 24 hours after SAP (LPS, 0.433 ± 0.120 KEU/L vs 0.852 ± 0.232 KEU/L, $P < 0.01$; DAO, 0.65 ± 0.12 kU/L vs 1.36 ± 0.22 kU/L, $P < 0.01$).

CONCLUSION: The expression of HMGB1 mRNA increases in the intestine during SAP. PDTC markedly inhibits HMGB1 mRNA gene expression.

Key Words: Severe acute pancreatitis; Intestinal mucosal barrier function; Pyrrolidine dithiocarbamate; High mobility group box-1 protein; Reverse-transcription polymerase chain reaction; Western blotting

Luan ZG, Zhang C, Ge CL, Ma XC, Guo RX. Role of high mobility group box-1 protein in gut mucosal barrier dysfunction during severe acute pancreatitis in rats. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007; 15(30): 3173-3177

摘要

目的: 探讨高迁移率族蛋白B1在重症急性胰腺炎(SAP)肠屏障损害中的作用及其机制.

方法: 采用逆行胆胰管注射50 g/L牛磺胆酸钠制备SAP大鼠模型. 将56只Wistar大鼠随机分为正常对照组(Control组), SAP 3 h, 6 h, 12 h, 24 h, 48 h 5个亚组, 二巯代氨基甲酸吡咯烷处理组(PDTC组), 每组8只. PDTC组于建模后24 h取材. 测定血浆内毒素(LPS)、二胺氧化酶(DAO)水平, 用逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)方法检测肠组织高迁移率族蛋白B1(HMGB1) mRNA表达, 用Western blot法检

背景资料

SAP时肠黏膜屏障功能受到损害, 导致细菌和内毒素的移位, 从而引发肠源性感染和内毒素血症, 严重时可促使多器官功能衰竭发生. 最近研究表明, 高迁移率族蛋白B1相对于TNF- α 、IL-1 β 等早期炎症介质分泌延迟且持续时间较长, 是一种新的“晚期”炎症介质, 能给脓毒症带来更广的“治疗窗”.

研发前沿
HMGB1作为晚期炎症介质在SAP肠黏膜屏障功能损害中起重要作用,通过抑制HMGB1的表达可减轻组织的炎症反应,能有效维护肠黏膜屏障功能,为预防和治疗SAP继发肠黏膜屏障损害切实可行的干预目标。

测肠组织HMGB1水平.

结果:与对照组比较, SAP 6 h组大鼠肠组织HMGB1 mRNA表达显著增高(0.41 ± 0.06 vs 0.26 ± 0.03 , $P < 0.01$), 12 h呈现进一步升高趋势, 24 h达峰值(0.62 ± 0.06), 并持续至48 h. PDTC干预可显著降低肠组织HMGB1 mRNA表达(0.35 ± 0.06 vs 0.62 ± 0.06 , $P < 0.01$). PDTC组较SAP 24 h组肠组织HMGB1 mRNA表达, 血浆LPS和DAO显著下降(HMGB1 mRNA表达: 0.35 ± 0.06 vs 0.62 ± 0.06 , $P < 0.01$; LPS: 0.433 ± 0.120 KEU/L vs 0.852 ± 0.232 KEU/L, $P < 0.01$; DAO: 0.65 ± 0.12 kU/L vs 1.36 ± 0.22 kU/L, $P < 0.01$).

结论:SAP时, 肠组织内HMGB1表达上调; PDTC可以明显抑制SAP时肠组织内HMGB1表达.

关键词:重症急性胰腺炎; 肠黏膜屏障; 二硫代氨基甲酸吡咯烷; 高迁移率族蛋白B1; 逆转录-聚合酶链式反应; 免疫印迹

栾正刚, 张成, 葛春林, 马晓春, 郭仁宣. 高迁移率族蛋白B1在重症急性胰腺炎肠屏障损害中的作用. 世界华人消化杂志 2007;15(30):3173-3177

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/3173.asp>

0 引言

重症急性胰腺炎(severe acute pancreatitis, SAP)时肠黏膜受损伴发肠道细菌和内毒素移位是胰腺炎继发感染的根源, 严重时可导致多器官功能障碍^[1-4]. 近年研究发现, 高迁移率族蛋白B1(high mobility group box-1 protein, HMGB1)作为晚期炎症介质参与疾病的病理生理过程, 其表达增加与脏器功能损害密切相关^[5-9]. 我们观察SAP时肠黏膜内HMGB-1的动态变化, 探讨HMGB-1在SAP肠黏膜屏障损害中的作用.

1 材料和方法

1.1 材料 牛磺胆酸钠、二硫代氨基甲酸吡咯烷(PDTC)、DAO标准品由Sigma公司提供, 内毒素检测试剂盒购自湛江安度斯生物有限公司, RNA提取及PCR扩增试剂盒购自TaKaRa公司, PCR仪及电泳仪和凝胶扫描分析系统购自美国Kodak. 大鼠HMGB1序列(扩增片段为680 bp): 上游5'-ATGGGCAAAGGAGATCCTA-3', 下游5'-ATTTCATCATCATCTTCT-3'^[10]; 大鼠GAPDH序列(扩增片段为309 bp): 上游5'-TCCCTCAAGAT

TGTCAGCAA-3', 下游5'-AGATCCACAACGGA TACATT-3'^[10]. 羊抗HMGB1 mAb购自Santa Cruz公司, 辣根过氧化物酶标记的兔抗羊IgG购自深圳晶美公司, 健康成年♂ Wistar大鼠56只(体质量270-330 g), 购自中国医科大学实验动物学部.

1.2 方法 大鼠随机分为正常对照组(Control组, $n = 8$), SAP组($n = 40$), PDTC组($n = 8$), SAP组分为建模后3, 6, 12, 24, 48 h共5个亚组(每亚组8只). 大鼠术前12 h禁食, 不禁饮. 20 g/L戊巴比妥钠ip麻醉(1 mL/kg), 常规消毒后, 腹部正中切口入腹腔, 找到胆胰管, 于其出肝门端以动脉夹暂时阻断胆管, 从乳头处的十二指肠壁进针, 逆行刺入胆胰管内并固定, 于胆胰管入十二指肠端用小动脉夹暂时阻断胆胰管, 以0.1 mL/min速度匀速注入50 g/L牛磺胆酸钠(1.5 mL/kg), 注射完毕后10 min去除动脉夹, 逐层关腹. PDTC组于成模后即刻ip PDTC(100 mg/kg). 术后禁食, 自由饮水, sc生理盐水40 mL/(kg·6 h)行液体复苏. 正常对照组常规麻醉后取材, SAP组分别于模型成功后3, 6, 12, 24, 48 h取材, PDTC组于模型成功后24 h取材. 于上述时间点麻醉动物, 腹主动脉采血, 离心(3000 r/min, 15 min)分离血浆, 分装冻存于-80℃待测. 组织标本严格无菌采取, 组织置于经消毒的管, 液氮速冻, -70℃贮存备用. 血浆LPS水平测定采用动态浊度法鲎试剂检测LPS水平. 所用器具经灭菌、去热源处理. 血浆二胺氧化酶(DAO)水平测定^[11-12]按改良分光光度法测定.

1.2.1 RT-PCR方法检测肠组织HMGB1 mRNA表达 取小肠组织80 mg, 采用TaKaRa公司RNA提取试剂盒提取总RNA, 用紫外分光光度计测定 $A_{260} : A_{280}$ 比值, 该值稳定于1.8-2.0. 按试剂盒说明合成cDNA后取反转录产物, 加入PCR反应体系, 扩增目的基因. 以三磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH)作为内参对照, 扩增产物经15 g/L琼脂糖凝胶电泳检测, 凝胶用美国Kodak凝胶扫描分析系统测定积分光密度值, 通过目的基因与内参对照的积分光密度比值表示mRNA表达的相对含量.

1.2.2 Western blot法检测肠组织HMGB1水平 取肠组织约0.2 g, 4℃匀浆, 加入蛋白提取液, 12 000 r/min离心20 min, 取上清液, 以考马斯亮蓝法进行蛋白定量. 再将提取的蛋白等量加样, 经SDS-PAGE电泳分离样品(40 μg)后电转移至硝酸纤维膜上. 转膜后的硝酸纤维膜经漂

表 1 SAP大鼠LPS、DAO及HMGB1 mRNA、HMGB1的变化(mean ± SD)

分组	#/h	血浆		肠组织	
		LPS(kEU/L)	DAO(kU/L)	HMGB1 mRNA	HMGB1
Control	-	0.106 ± 0.008	0.32 ± 0.02	0.26 ± 0.03	26.3 ± 4.3
SAP	3	0.121 ± 0.103	0.35 ± 0.03	0.32 ± 0.05	30.5 ± 5.2
	6 ^b	0.447 ± 0.153	0.68 ± 0.14	0.41 ± 0.06	68.4 ± 7.4
	12 ^b	0.614 ± 0.204	0.94 ± 0.17	0.56 ± 0.12	84.1 ± 12.6
	24 ^b	0.852 ± 0.232	1.36 ± 0.22	0.62 ± 0.06	132.6 ± 32.5
	48 ^b	0.627 ± 0.145	0.88 ± 0.16	0.54 ± 0.05	107.6 ± 26.4
PDTC	24 ^{bd}	0.433 ± 0.120	0.65 ± 0.12	0.35 ± 0.06	70.2 ± 9.3

^b $P < 0.01$ vs Control; ^d $P < 0.01$ vs SAP 24h.

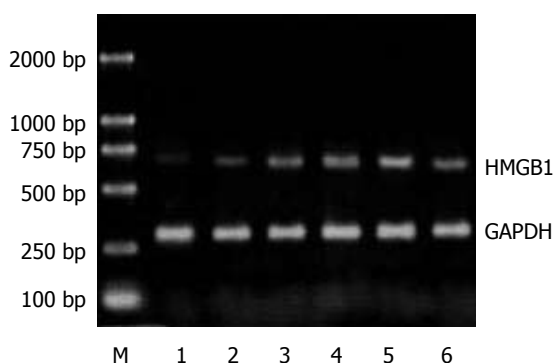


图 1 SAP大鼠肠组织HMGB1 mRNA的表达. M: Marker; 1: 对照组; 2-6: SAP 3, 6, 12, 24, 48 h组.

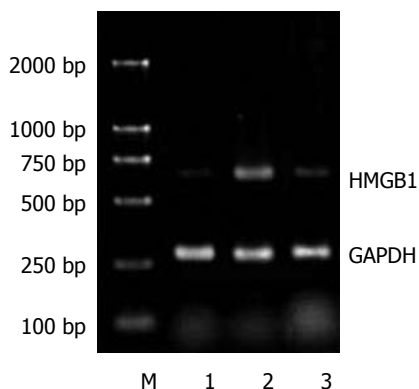


图 2 SAP大鼠肠组织HMGB1 mRNA的表达. M: Marker; 1: 对照组; 2: SAP 24 h组; 3: PDTC.

洗后用50 g/L脱脂奶粉阻断非特异性结合, 然后加入一抗(羊抗HMGB1mAb, Santa Cruz, 浓度1:400)4℃孵育过夜, 加入标记二抗(辣根过氧化物酶标记的兔抗羊IgG, 深圳晶美, 浓度1:1000)37℃孵育1 h, ECL浸膜显色. 在图像分析仪上对胶片进行扫描, 测定各条带的吸光度值.

统计学处理 所有数据均以mean ± SD表示, 采用单因素方差分析, 经SPSS11.0统计分析软件对数据进行处理.

应用要点

本文研究结果表明, HMGB1在SAP肠组织中表达较晚, 持续时间较长, 说明HMGB1在SAP肠黏膜损害中起重要作用. 应用PDTC可下调HMGB1表达水平, 能够减轻肠黏膜屏障损害, 为SAP肠黏膜屏障损害的防治提供新的思路.

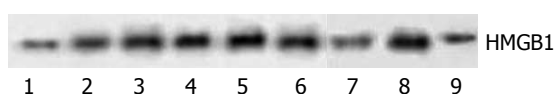


图 3 SAP大鼠肠组织HMGB1的表达. 1: 对照组; 2-6: SAP 3, 6, 12, 24, 48 h组; 7: 对照组; 8: SAP 24 h组; 9: PDTC组.

2 结果

2.1 血浆LPS含量和DAO水平变化 与正常对照组相比, SAP组发病后6 h, 大鼠血浆中LPS含量上升, 24 h达峰值, 48 h仍显著高于正常对照组($P < 0.01$). PDTC干预后, 大鼠血浆LPS含量显著降低($P < 0.01$, 表1). 在SAP组3 h时血浆DAO水平较正常对照组无明显变化, 在SAP建模后6 h时血浆DAO水平明显上升, 24 h达峰, 48 h仍显著高于对照组($P < 0.01$). PDTC组较SAP 24 h组血浆DAO水平明显下降($P < 0.01$, 表1).

2.2 肠组织HMGB1 mRNA和HMGB1的变化 正常对照组大鼠肠组织中HMGB1 mRNA表达微弱. SAP建模后6 h, 大鼠肠组织中HMGB1 mRNA转录水平较正常对照组增高, 12 h显著升高, 24 h达峰值并持续至48 h($P < 0.01$, 表1, 图1). 应用PDTC干预后, PDTC组大鼠肠组织中HMGB1 mRNA转录水平显著低于SAP 24 h组($P < 0.01$, 表1, 图2). 正常情况下大鼠肠组织中有少量的HMGB1表达. SAP模型制成6 h后, 大鼠肠组织中HMGB1表达开始增高, 较对照组差异显著($P < 0.01$); 12 h呈现进一步升高趋势, 24 h达峰值, 至48 h仍维持在较高水平($P < 0.01$). 给予PDTC处理后, 与SAP 24 h组相比, PDTC组大鼠肠组织中HMGB1表达明显下降($P < 0.01$, 表1, 图3).

3 讨论

重症急性胰腺炎(severe acute pancreatitis, SAP)发病凶险, 并发症多, 可在短时间内损伤多个脏

名词解释

HMGB1: 是一大类高度保守的蛋白质, 是细胞核内含量丰富的非组蛋白染色质蛋白, 分子量较低(30 kDa), 因其在聚丙烯酰胺凝胶电泳中迁移迅速而得名, 可参与DNA复制、细胞分化及基因表达等多种细胞生命活动。与TNF- α 和IL-1 β 等早期细胞因子相比, HMGB1出现较晚且持续时间更长, 可能成为脓毒症防治切实可行的干预目标。

器。近年来其救治成功率有所提高, 但病死率仍为12%-15%。有并发症者可高达50%, 而其中80%的死亡原因与SAP患者肠道屏障功能受继发感染有关^[13-15]。SAP时肠黏膜遭到破坏, 肠绒毛萎缩, 尖端坏死, 微绒毛脱落, 肠道屏障作用的削弱使肠道内细菌及其毒素易于穿透受损的黏膜上皮向肠外移位, 成为继发性感染的根源^[16-20]。HMGB1是细胞核内一种含量丰富的非组蛋白, 广泛地存在于真核细胞核中, 因在电泳时快速迁移而得名, 他与DNA复制、细胞增殖分化及基因转录等多种生命活动有关。研究发现, HMGB1可分泌到细胞外发挥致炎效应, 其产生明显晚于TNF- α , IL-1等早期炎性介质, 且持续时间较长, 与严重全身炎症反应综合征及多器官功能障碍等病理过程密切相关^[21-24]。阻断HMGB1的表达或抑制HMGB1的活性可明显减轻炎症反应和组织损伤^[25]。新近研究表明, 严重创伤或感染时, 组织HMGB1基因表达上调, HMGB1可介导肠屏障功能不全^[21,26-28]。

本研究结果显示, SAP时大鼠肠组织中HMGB1表达在建模后数小时内无明显变化, 于建模后6 h即上升, 24 h达峰值, 48 h仍高于正常, 提示HMGB1对肠组织有直接损伤作用, HMGB1可能参与SAP肠组织损伤的病理生理过程。PDTC能够选择性地抑制NF- κ B的活化^[29], 使用PDTC抑制NF- κ B通路后, SAP大鼠肠组织中HMGB1表达明显下调, 提示NF- κ B可能直接或间接参与HMGB1诱生的细胞信号转导过程^[30-32]。我们观察到, SAP大鼠肠组织HMGB1表达延迟并持续增高的同时, 血浆LPS、DAO等反映肠黏膜屏障功能的指标也不同程度的升高。SAP建模后6 h, 大鼠血浆中LPS含量与DAO水平明显上升, 24 h达峰值, 48 h仍显著高于正常对照组, 说明HMGB1作为晚期炎症介质可使肠黏膜损伤加重, 肠黏膜通透性持续增加。给予PDTC干预后, HMGB1表达下调, 同时SAP大鼠血浆LPS含量与DAO水平明显下降, 说明肠黏膜屏障功能得到明显改善, 其机制可能为SAP大鼠应用PDTC抑制NF- κ B活化后, 肠组织HMGB1表达受到抑制, HMGB1对肠组织的直接损伤作用减轻^[26]。HMGB1与TNF- α , IL-1等早期炎性介质可相互诱导^[33], NF- κ B活性受抑后TNF- α , IL-1, iNOS及黏附分子等早期炎性介质表达下调进而阻断HMGB1与早期炎性介质的相互诱导, 从而改善肠黏膜屏障功

能。肠道细菌移位是SAP并发感染的主要原因, HMGB1作为晚期炎症介质在SAP肠黏膜屏障功能损害中起重要作用^[34]。通过应用PDTC可下调HMGB1水平, 能有效维护肠黏膜屏障功能, 为预防和治疗SAP继发肠黏膜屏障损害提供新途径。

4 参考文献

- 1 Garside P, Millington O, Smith KM. The anatomy of mucosal immune responses. *Ann N Y Acad Sci* 2004; 1029: 9-15
- 2 Harari Y, Weisbrodt NW, Moody FG. Ileal mucosal response to bacterial toxin challenge. *J Trauma* 2000; 49: 306-313
- 3 Mifkovic A, Pindak D, Daniel I, Pechan J. Septic complications of acute pancreatitis. *Bratisl Lek Listy* 2006; 107: 296-313
- 4 Pearce CB, Zinkevich V, Beech I, Funjika V, Ruiz AG, Aladawi A, Duncan HD. Using the polymerase chain reaction coupled with denaturing gradient gel electrophoresis to investigate the association between bacterial translocation and systemic inflammatory response syndrome in predicted acute severe pancreatitis. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 7142-7147
- 5 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
- 6 Wang H, Yang H, Tracey KJ. Extracellular role of HMGB1 in inflammation and sepsis. *J Intern Med* 2004; 255: 320-331
- 7 Yang H, Wang H, Czura CJ, Tracey KJ. The cytokine activity of HMGB1. *J Leukoc Biol* 2005; 78: 1-8
- 8 Lutz W, Stetkiewicz J. High mobility group box 1 protein as a late-acting mediator of acute lung inflammation. *Int J Occup Med Environ Health* 2004; 17: 245-254
- 9 Chen G, Chen DZ, Li J, Czura CJ, Tracey KJ, Sama AE, Wang H. Pathogenic role of HMGB1 in SARS? *Med Hypotheses* 2004; 63: 691-695
- 10 Liu S, Adcock IM, Old RW, Barnes PJ, Evans TW. Lipopolysaccharide treatment in vivo induces widespread tissue expression of inducible nitric oxide synthase mRNA. *Biochem Biophys Res Commun* 1993; 196: 1208-1213
- 11 Kamei H, Hachisuka T, Nakao M, Takagi K. Quick recovery of serum diamine oxidase activity in patients undergoing total gastrectomy by oral enteral nutrition. *Am J Surg* 2005; 189: 38-43
- 12 Fu XB, Xing F, Yang YH, Sun TZ, Guo BC. Activation of phosphorylating-p38 mitogen-activated protein kinase and its relationship with localization of intestinal stem cells in rats after ischemia-reperfusion injury. *World J Gastroenterol* 2003; 9: 2036-2039
- 13 Besselink MG, van Santvoort HC, Witteman BJ, Gooszen HG. Management of severe acute pancreatitis: it's all about timing. *Curr Opin Crit Care* 2007; 13: 200-206
- 14 Marotta F, Geng TC, Wu CC, Barbi G. Bacterial

- translocation in the course of acute pancreatitis: beneficial role of nonabsorbable antibiotics and lactitol enemas. *Digestion* 1996; 57: 446-452
- 15 Butturini G, Salvia R, Bettini R, Falconi M, Pederzoli P, Bassi C. Infection prevention in necrotizing pancreatitis: an old challenge with new perspectives. *J Hosp Infect* 2001; 49: 4-8
- 16 Nettelbladt CG, Katouli M, Bark T, Svenberg T, Mollby R, Ljungqvist O. Evidence of bacterial translocation in fatal hemorrhagic pancreatitis. *J Trauma* 2000; 48: 314-315
- 17 Wu CT, Li ZL, Xiong DX. Relationship between enteric microecologic dysbiosis and bacterial translocation in acute necrotizing pancreatitis. *World J Gastroenterol* 1998; 4: 242-245
- 18 Cicalese L, Sahai A, Sileri P, Rastellini C, Subbotin V, Ford H, Lee K. Acute pancreatitis and bacterial translocation. *Dig Dis Sci* 2001; 46: 1127-1132
- 19 Clavel T, Haller D. Molecular interactions between bacteria, the epithelium, and the mucosal immune system in the intestinal tract: implications for chronic inflammation. *Curr Issues Intest Microbiol* 2007; 8: 25-43
- 20 van Minnen LP, Blom M, Timmerman HM, Visser MR, Gooszen HG, Akkermans LM. The use of animal models to study bacterial translocation during acute pancreatitis. *J Gastrointest Surg* 2007; 11: 682-689
- 21 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
- 22 Lin X, Yang H, Sakuragi T, Hu M, Mantell LL, Hayashi S, Al-Abed Y, Tracey KJ, Ulloa L, Miller EJ. Alpha-chemokine receptor blockade reduces high mobility group box 1 protein-induced lung inflammation and injury and improves survival in sepsis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2005; 289: L583-L590
- 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 Li W, Li J, Ashok M, Wu R, Chen D, Yang L, Yang H, Tracey KJ, Wang P, Sama AE, Wang H. A cardiovascular drug rescues mice from lethal sepsis by selectively attenuating a late-acting proinflammatory mediator, high mobility group box 1. *J Immunol* 2007; 178: 3856-3864
- 25 Silva E, Arcaroli J, He Q, Svetkauskaite D, Coldren C, Nick JA, Poch K, Park JS, Banerjee A, Abraham E. HMGB1 and LPS induce distinct patterns of gene expression and activation in neutrophils from patients with sepsis-induced acute lung injury. *Intensive Care Med* 2007; 33: 1829-1839
- 26 姚咏明, 刘辉. 对高迁移率族蛋白B1作用的新认识. *中国危重病急救医学* 2005; 17: 385-387
- 27 Fang WH, Yao YM, Shi ZG, Yu Y, Wu Y, Lu LR, Sheng ZY. The significance of changes in high mobility group-1 protein mRNA expression in rats after thermal injury. *Shock* 2002; 17: 329-333
- 28 Sappington PL, Yang R, Yang H, Tracey KJ, Delude RL, Fink MP. HMGB1 B box increases the permeability of Caco-2 enterocytic monolayers and impairs intestinal barrier function in mice. *Gastroenterology* 2002; 123: 790-802
- 29 栾正刚, 张成, 龙锦, 傅庆国, 郭仁宣. 二硫代氨基甲酸吡咯烷在重症胰腺炎肺损伤中的作用. *中国医科大学学报* 2004; 33: 304-306
- 30 Kokkola R, Andersson A, Mullins G, Ostberg T, Treutiger CJ, Arnold B, Nawroth P, Andersson U, Harris RA, Harris HE. RAGE is the major receptor for the proinflammatory activity of HMGB1 in rodent macrophages. *Scand J Immunol* 2005; 61: 1-9
- 31 Park JS, Svetkauskaite D, He Q, Kim JY, Strassheim D, Ishizaka A, Abraham E. Involvement of toll-like receptors 2 and 4 in cellular activation by high mobility group box 1 protein. *J Biol Chem* 2004; 279: 7370-7377
- 32 Park JS, Gamboni-Robertson F, He Q, Svetkauskaite D, Kim JY, Strassheim D, Sohn JW, Yamada S, Maruyama I, Banerjee A, Ishizaka A, Abraham E. High mobility group box 1 protein interacts with multiple Toll-like receptors. *Am J Physiol Cell Physiol* 2006; 290: C917-C924
- 33 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
- 34 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

同行评价
本文立意较为新颖, 实验目的明确, 紧扣SAP这一研究热点, 实验设计较为严密, 动物模型成熟, 统计方法选择合理, 有一定的可读性。

编辑 何燕 电编 李军亮

COX-2抑制剂联合survivin反义寡核苷酸抗胰腺癌BxPC-3细胞的效应

刘江伟, 张永久, 李开宗, 窦科峰, 许永华, 张东, 闫兵

背景资料
还氧化酶-2(COX-2)在各种肿瘤中高表达, 与促进肿瘤细胞的生长密切相关。COX-2选择性抑制剂celecoxib已被FDA批准用于家族性腺瘤性息肉的辅助治疗, 其在肿瘤的预防和治疗中的作用已引起学者的广泛关注。

刘江伟, 张永久, 张东, 闫兵, 中国人民解放军兰州军区乌鲁木齐总医院普外科 新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市 830000
李开宗, 窦科峰, 中国人民解放军第四军医大学西京医院肝胆外科 陕西省西安市 710032
许永华, 兰州军区乌鲁木齐总医院动物实验中心 新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市 830000
刘江伟, 博士, 副主任医师, 主要从事普外科临床与基础研究。
通讯作者: 刘江伟, 830000, 新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市友好北路41号, 兰州军区乌鲁木齐总医院普外科。
ljw273@sohu.com.
电话: 0991-4991759
收稿日期: 2007-05-28 修回日期: 2007-10-12

Antitumor effects of COX-2 inhibitor in combination with survivin antisense oligonucleotides on pancreatic cancer BxPC-3 cells

Jiang-Wei Liu, Yong-Jiu Zhang, Kai-Zong Li, Ke-Feng Dou, Yong-Hua Xu, Dong Zhang, Bing Yan

Jiang-Wei Liu, Yong-Jiu Zhang, Dong Zhang, Bing Yan, Department of general surgery, Urumqi General Hospital of Lanzhou Military Region of Chinese PLA, Urumqi 830000, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China
Kai-Zong Li, Ke-Feng Dou, Department of Hepatobiliary Surgery, Xijing Hospital, the Fourth Military Medical University of Chinese PLA, Xi'an 710032, Shaanxi Province, China
Yong-Hua Xu, Department of Animal Experimental Center, Urumqi General Hospital of Lanzhou Military Region of Chinese PLA, Urumqi 830000, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China
Correspondence to: Jiang-Wei Liu, Department of General Surgery, Urumqi General Hospital of Lanzhou Military Region of Chinese PLA, 41 Youhao North Road, Urumqi 830000, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China. ljw273@sohu.com
Received: 2007-05-28 Revised: 2007-10-12

Abstract

AIM: To investigate the effects of proliferation and apoptosis in pancreatic cancer cells treated by COX-2 inhibitor celecoxib in combination with survivin antisense oligonucleotides (ASODNs) and their possible mechanism of action.

METHODS: This study was carried out on the human pancreatic cancer BxPC-3 cell line. Cells

were divided into four groups: A (control), B (celecoxib 80 $\mu\text{mol/L}$), C (survivin ASODN 300 nmol/L), and D (80 $\mu\text{mol/L}$ celecoxib + 300 nmol/L survivin ASODN). Cell proliferation was detected with the MTT colorimetric assay, the apoptosis rate in cells was measured by flow cytometry, and caspase-3 activity was evaluated using a caspase-3 assay kit. Using (Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction) RT-PCR, we examined mRNA for Bcl-2, survivin and Mcl-1.

RESULTS: BxPC-3 cells were treated with celecoxib (80 $\mu\text{mol/L}$) and survivin ASODN (300 nmol/L) alone or in combination for 24 and 48 hours. Cell viability in group D was significantly lower than that in group B or C (24 hours, 41.0% \pm 0.4% *vs* 71.0% \pm 2.2% and 63.3% \pm 4.5%; 48 hours, 34.2% \pm 1.1% *vs* 61.6% \pm 1.7% and 55.0% \pm 3%; $P < 0.01$). After 24 hours, apoptosis measured by flow cytometry in group D was significantly higher than that in groups B or C (30.33% \pm 3.49% *vs* 11.93% \pm 1.17% and 22.07% \pm 0.93%; $P < 0.01$). The caspase-3 activity was significantly increased in group B, C and D compared with the control group (0.04867 \pm 0.0021, 0.02967 \pm 0.0021 and 0.08767 \pm 0.0042 *vs* 0.007 \pm 0.0001; $P < 0.01$). Caspase-3 activity in group D was significantly higher than that in groups B and C (0.08767 \pm 0.0042 *vs* 0.04867 \pm 0.0021, 0.02967 \pm 0.0021; $P < 0.01$). BxPC-3 cells were treated with celecoxib (100 $\mu\text{mol/L}$) for 24 hours. The grey ratio of mRNA amplified products for survivin/ β -actin and Mcl-1/ β -actin was significantly lower in the experimental groups than in the control group (0.68 \pm 0.05 *vs* 1.05 \pm 0.06; $P < 0.01$). However, Bcl-2/ β -actin in the experimental and control groups did not differ significantly (0.99 \pm 0.02 *vs* 1.07 \pm 0.06; $P > 0.05$).

CONCLUSION: The combination of celecoxib and survivin ASODNs induces apoptosis, inhibits proliferation and enhances caspase-3 activity. Celecoxib-induced apoptosis may be partly mediated through survivin and Mcl-1 and has no relation to Bcl-2.

Key Words: Pancreatic cancer; Cyclooxygenase-2; Celecoxib; Survivin; Antisense oligonucleotide; Caspase-3; BxPC-3 cells

Liu JW, Zhang YJ, Li KZ, Dou KF, Xu YH, Zhang D, Yan B. Antitumor effects of COX-2 inhibitor in combination with survivin antisense oligonucleotides on pancreatic cancer BxPC-3 cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007; 15(30): 3178-3183

摘要

目的: 探讨COX-2抑制剂和survivin 反义寡核苷酸联合应用对胰腺癌BxPC-3细胞的抗肿瘤效应及其可能机制。

方法: 应用胰腺癌BxPC-3细胞进行研究, 将BxPC-3细胞分为4组: A组(对照组), B组(Celecoxib 80 $\mu\text{mol/L}$)组, C组(300 nmol/L survivin ASODN), D组(80 $\mu\text{mol/L}$ celecoxib+300 nmol/L survivin ASODN)。采用MTT检测细胞增殖, 流式细胞仪检测细胞凋亡率, caspase-3试剂盒检测caspase-3活性, 并用RT-PCR检测Bcl-2、survivin 和Mcl-1的mRNA的变化。

结果: 将80 $\mu\text{mol/L}$ celecoxib 和300 nmol/L survivin反义寡核苷酸单独或联合作用于胰腺癌BxPC-3细胞24 h和48 h, D组细胞的存活率明显低于B, C组(24 h: 41.0% \pm 0.4% *vs* 71.0% \pm 2.2%, 63.3% \pm 4.5%; 48 h: 34.2% \pm 1.1% *vs* 61.6% \pm 1.7%, 55.0% \pm 3%; $P<0.01$)。作用24 h后, 流式细胞仪检测细胞凋亡率显示, D组细胞的凋亡率明显高于B, C组(30.33% \pm 3.49% *vs* 11.93% \pm 1.17%, 22.07% \pm 0.93%; $P<0.01$)。caspase-3活性在B, C, D组明显高于对照组(0.04867 \pm 0.0021, 0.02967 \pm 0.0021, 0.08767 \pm 0.0042 *vs* 0.007 \pm 0.0001; $P<0.01$)。D组细胞的caspase-3活性明显高于B, C组(0.08767 \pm 0.0042 *vs* 0.04867 \pm 0.0021, 0.02967 \pm 0.0021; $P<0.01$)。用100 $\mu\text{mol/L}$ 塞来昔布作用于胰腺癌BxPC-3细胞24 h后, survivin/ β -actin和Mcl-1/ β -actin的mRNA的比值明显低于对照组(0.68 \pm 0.05 *vs* 1.05 \pm 0.06, $P<0.01$)。而Bcl-2/ β -actin的mRNA的比值无明显变化(0.99 \pm 0.02 *vs* 1.07 \pm 0.06, $P>0.05$)。

结论: 联合应用COX-2抑制剂塞来昔布和survivin反义寡核苷酸可明显诱导胰腺癌细胞的凋亡, 抑制细胞增殖, 并能够明显提高caspase-3活性。COX-2抑制剂塞来昔布诱导细胞凋亡可能通过survivin和Mcl-1途径, 而非Bcl-2途径。

关键词: 胰腺癌; 环氧化酶-2; 塞来昔布; survivin;

反义寡核苷酸; Caspase-3; BxPC-3 细胞

刘江伟, 张永久, 李开宗, 窦科峰, 许永华, 张东, 闫兵. COX-2抑制剂联合survivin反义寡核苷酸抗胰腺癌BxPC-3细胞的效应. *世界华人消化杂志* 2007;15(30):3178-3183
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/3178.asp>

0 引言

环氧化酶-2(COX-2)和凋亡抑制因子survivin是目前肿瘤研究领域两个“热点”。我们先前的研究表明^[1-6], COX-2和survivin在胰腺癌组织中过表达, 而在相邻的正常组织中不表达, 这两种基因的过表达与胰腺癌细胞的增殖、血管生成和细胞凋亡的抑制有关, 而且在胰腺癌组织中COX-2的表达与survivin的表达密切相关。我们用COX-2抑制剂塞来昔布(celecoxib)或survivin反义寡核苷酸(ASODN)分别作用于胰腺癌BxPC-3细胞可抑制细胞增殖, 诱导细胞凋亡, 并增加胰腺癌细胞对化疗的敏感性。因此, 我们推测将COX-2抑制剂塞来昔布和survivin反义寡核苷酸联合应用可能发挥更大的抗肿瘤效应, 并且可以减少细胞毒作用, 可能是胰腺癌治疗的有效途径。我们还对其可能机制进行了探讨。

1 材料和方法

1.1 材料 survivin ASODN序列^[2,7]为5'-CCCA GCCTTCCAGCTCCTTG-3', 正义寡核苷酸(SODN)序列为: 5'-CAAGGAGCTGGAAGGC TGGG-3', 二者均经硫代磷酸化修饰(上海生工)celecoxib(Searle公司), 用1 kg/L二甲基亚砜(DMSO)溶解, 制成20 mol/L的储存液, -20℃保存。阳离子脂质转染剂(lipofectaminetm 2000)系Gibco公司产品, RNA提取液(TRIZol)购自Life Technologies公司, RT-PCR购自TaKaRa公司, 胰腺癌BxPC-3细胞系购自第四军医大学口腔生物细胞培养库, 以含100 mL/L的新生小牛血清(56℃, 灭活30 min)、100 kU/L青霉素、100 mg/L链霉素的RPMI1640培养基(Gibco公司), 在37℃, 50 mL/L CO₂饱和湿度条件下培养, 每2-3 d换液传代, 取对数期生长的细胞实验。MTT购自Sigma公司, Annexin V试剂盒购自Roche 公司, caspase-3比色检测试剂盒系Calbiochem 公司产品。

1.2 方法

1.2.1 Celecoxib联合survivin ASODN对细胞增殖的影响 实验分为4组: 对照组不加入celecoxib或survivin ASODN, celecoxib(作用浓度为80 $\mu\text{mol/L}$)

相关报道
胰腺癌组织中COX-2的表达与survivin的表达密切相关。作者先前的研究用COX-2抑制剂塞来昔布(celecoxib)或survivin反义寡核苷酸(ASODN)分别作用于胰腺癌BxPC-3细胞可抑制细胞增殖, 诱导细胞凋亡, 并增加胰腺癌细胞对化疗的敏感性。

应用要点
COX-2抑制剂和survivin反义寡核苷酸联合应用可在抑制细胞增殖和诱导细胞凋亡过程中起协同作用,从而发挥更大的抗肿瘤效应,并且可以减少细胞毒作用,可能是胰腺癌治疗的有效途径。

组, survivin ASODN(作用浓度300 nmol/L)组, 80 μ mol/L celecoxib+300 nmol/L survivin ASODN组。脂质体包被的survivin ASODN转染方法同前^[2], 实验在96孔板上进行。联合实验组中, 在survivin ASODN转染24 h时更换培养液后加入celecoxib, 然后开始作用24 h和48 h。用MTT法^[2,4]检测各组作用24 h和48 h时的吸光度值, 设3个复孔与空白对照组相比, 计算各组的相对存活率。

1.2.2 流式细胞术检测联合作用组细胞凋亡率 实验分组同上。细胞在50 mL培养瓶中进行培养, 脂质体包被的survivin ASODN转染方法同前^[2]。在联合实验组中, 在survivin ASODN转染24 h, 更换培养液后加入celecoxib。各组作用BxPC-3细胞24 h, 收集细胞, 用Annexin V试剂盒在流式细胞仪检测细胞凋亡率, 方法同前^[2]。取3次实验的结果, 计算其平均凋亡率。

1.2.3 测定联合作用时caspase-3活性 实验分组同上。各组作用BxPC-3细胞24 h, 收集细胞, 用PBS冲洗, 离心2次。参照文献^[1]的方法应用caspase-3活性试剂盒, 实验重复2次用酶标免疫测定仪测定波长405 nm下的吸光度值来反映caspase-3相对活性的吸光度。

1.2.4 检测celecoxib对细胞Bcl-2, Mcl-1和survivin mRNA的影响 分别用200 mL的培养瓶培养细胞至70%-80%铺满后, 根据加入的药物和浓度, 实验分对照组(未做处理)和100 μ mol/L celecoxib组。作用BxPC-3细胞24 h, 收获 5×10^6 细胞, 用RNA提取液(TRIZOL, Life Technologies公司)提取总RNA。取1 μ g总RNA, 按试剂盒的方法组成20 μ L反应体系。用于逆转录合成cDNA的反应条件: 30 $^{\circ}$ C, 10 min; 42 $^{\circ}$ C, 30 min; 99 $^{\circ}$ C, 5 min; 5 $^{\circ}$ C, 5 min。分别取逆转录产物2 μ L为模板, 在25 μ L PCR扩增反应体系按以下组成配制成PCR反应液: 各体系分别加入survivin的引物序列为5'-GTGAATTTTGGAACTGGACAG-3'(F)和5'-CCTTTCCTAAGACATTGCTAAG-3'(R), 243 bp; 内参 β -actin引物序列为5'-CTTC TACAATGAGCTGCGTG-3'(F)和5'-TCAT GAGGTAGTCAGTCAGG-3'(R), 309 bp; Mcl-1为5'-ATCTCTCGGTACCTTCGGGAGC-3'(F)和5'-CTTGATGCCACCTTCTAGGTCC-3'(R), 444 bp; Bcl-2为5'-GACTTCGCCGAGATGTCCAG-3'(F)和5'-TCACTTGTGGCTCAGATAGG-3'(R), 390 bp。将反应液放置PCR循环仪中循环扩增, 扩增条件: 94 $^{\circ}$ C预变性2 min, 94 $^{\circ}$ C变性30 s, 退火30 s(survivin为51 $^{\circ}$ C, β -actin

为59 $^{\circ}$ C, Mcl-1、Bcl-2均为61 $^{\circ}$ C), 72 $^{\circ}$ C延伸90 s, 32个循环后, 72 $^{\circ}$ C延伸5 min。经过变性后进入循环。PCR产物5 μ L在20 g/L琼脂糖上电泳(含0.5 mg/L溴化乙锭), 经凝胶图像分析仪分析结果, 将survivin, Bcl-2和Mcl-1 PCR产物的电泳值分别与 β -actin的比值做为各基因相对定量值, 来反映celecoxib作用后各个凋亡相关基因的变化。实验进行3次, 取未处理的BxPC-3细胞做对照。

统计学处理 采用SPSS11.0进行作图和统计分析, 均数比较用 t 检验。

2 结果

2.1 Celecoxib联合survivin ASODN对细胞增殖的影响 24 h时, 单独应用celecoxib的细胞相对存活率为71.0% \pm 2.2%, 单独应用survivin ASODN为63.3% \pm 4.5%, 二者联合为41.0% \pm 0.4%。48 h时, 单独应用celecoxib的细胞相对存活率为61.6% \pm 1.7%, 单独应用survivin ASODN为55.0% \pm 3%, 二者联合为: 34.2% \pm 1.1%。在24 h和48 h, 与单独应用组相比, 联合组能明显降低细胞的存活率, 差异均有显著性($P<0.01$)。

2.2 联合作用对细胞凋亡的影响 作用24 h, 4组细胞凋亡率分别为0.26% \pm 0.06%, 11.93% \pm 1.17%, 22.07% \pm 0.93%和30.33% \pm 3.49%。联合组凋亡率与单独组相比, 差异显著($P<0.01$, 图1)

2.3 联合作用时caspase-3的活性 各实验组作用24 h, 4组caspase-3相对活性(A), 分别为0.007 \pm 0.0001, 0.04867 \pm 0.0021, 0.02967 \pm 0.0021和0.08767 \pm 0.0042, 联合组caspase-3相对活性与单独组相比, 差异显著($P<0.01$, 图2)。

2.4 细胞Bcl-2、Mcl-1和survivin mRNA 100 μ mol/L celecoxib作用BxPC-3细胞24 h, survivin, Mcl-1的表达明显低于对照组, 而Bcl-2的表达与对照组相比无明显变化。 经凝胶图像分析仪分析结果显示, 实验组和对对照组survivin/ β -actin分别为0.57 \pm 0.04和0.88 \pm 0.03, 两者之间差异具有显著性($P<0.01$); Bcl-2/ β -actin分别为0.99 \pm 0.02和1.07 \pm 0.06两者之间无显著性差异($P>0.05$); Mcl-1/ β -actin分别为0.68 \pm 0.05和1.05 \pm 0.06, 两者之间差异具有显著性($P<0.01$)(图3)。

3 讨论

survivin是凋亡抑制蛋白家族的新成员, 可能成为肿瘤治疗的“理想靶点”^[8]。COX-2在各种肿瘤中高表达, 与促进肿瘤细胞的生长密切相关。COX-2选择性抑制剂celecoxib已被FDA批准用

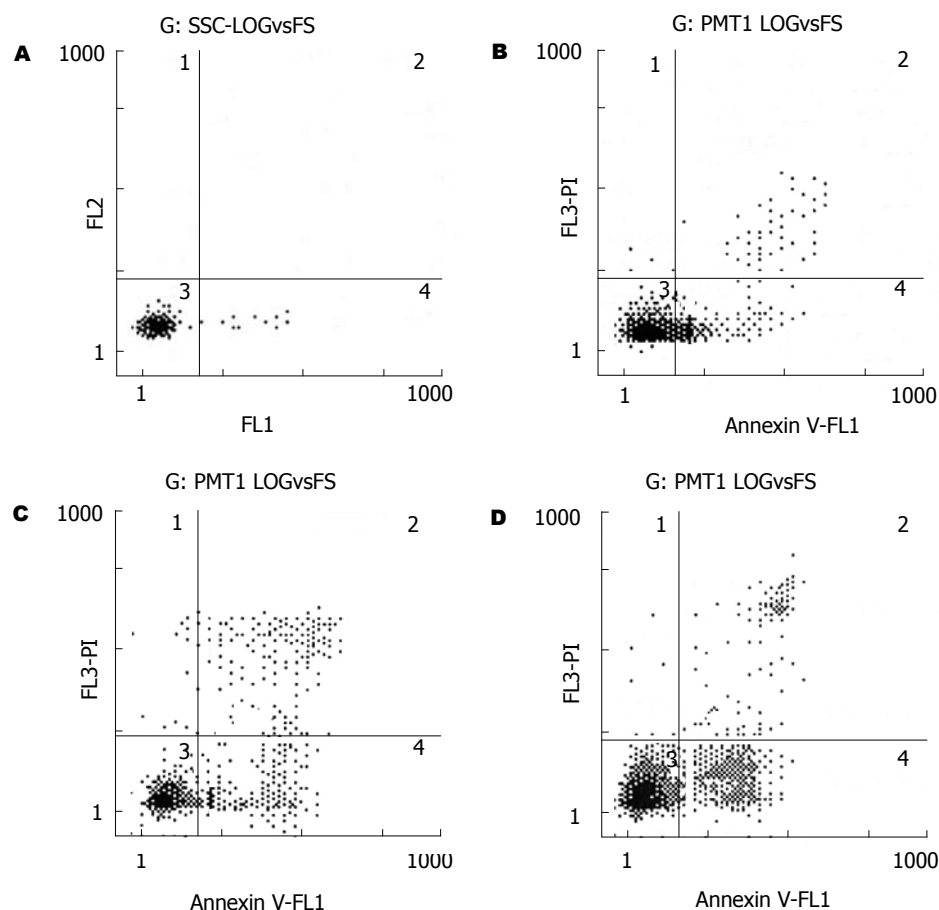


图 1 流式细胞术分析凋亡率. A: 对照组; B: celecoxib组; C: survivin ASODN; D: 联合组.

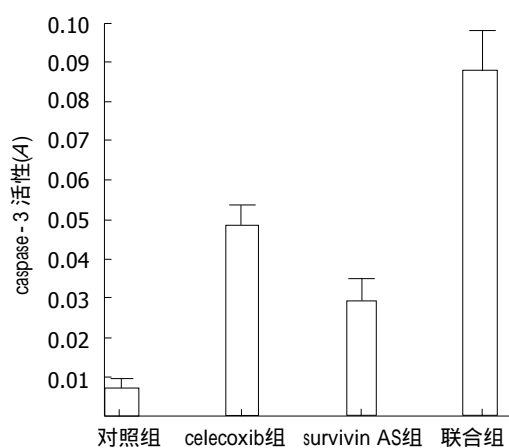


图 2 各实验组caspase-3的活性.

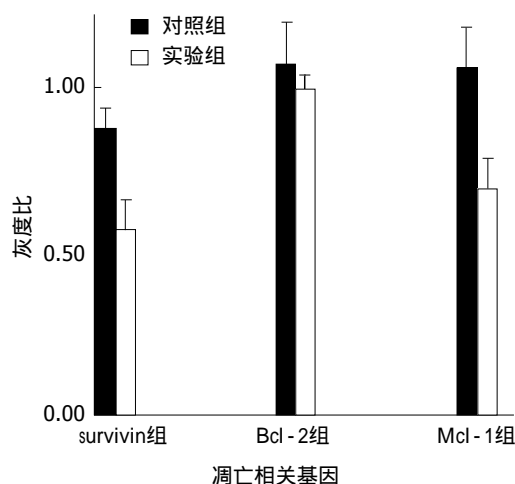


图 3 celecoxib作用BxPC-3细胞对survivin、Bcl-2和Mcl-1的影响.

于家族性腺瘤性息肉的辅助治疗, 其在肿瘤的预防和治疗中的作用已引起学者的广泛关注^[9]. 我们先前的研究发现, COX-2和survivin在胰腺癌组织中高表达, 而在相邻正常组织中不表达, 二者的高表达均与胰腺癌细胞增殖、血管生成、抗凋亡有关, 说明COX-2的表达和survivin密切相关^[1-6]. Krysan *et al*^[10]研究发现, COX-2 的

研发前沿
survivin是凋亡抑制蛋白家族的新成员, 是目前发现的最强的凋亡抑制因子, 因其在肿瘤组织表达具有特异性, 可能成为肿瘤治疗的“理想靶点”, 此二者为目前肿瘤研究领域的“热点”.

表达限制survivin的泛化, 保护survivin免受降解, 说明COX-2依赖的survivin表达在非小细胞肺癌的抗凋亡过程起关键作用. 最近Barnes *et al*^[11]发现, survivin在乳腺原位导管腺癌(DCIS)中的高表达与COX-2的表达密切相关, 二者的高表达

与DCIS的复发密切相关. 根据这些研究及我们先前的研究, 我们推测以此基因为联合靶点的基因治疗可能是治疗胰腺癌的有效途径. 本实验在先前研究的基础上^[2,4], 联合应用80 $\mu\text{mol/L}$ celecoxib和300 nmol/L survivin反义寡核苷酸单独和联合应用作用于胰腺癌细胞24 h和48 h, 均能明显降低细胞的存活率, 差异具有显著性 ($P<0.01$). 我们应用Annexin V试剂盒在流式细胞仪检测细胞凋亡率发现, 二者联合作用24 h, 细胞的凋亡率为 $30.33\% \pm 3.49\%$, 明显高于单独应用celecoxib(凋亡率 $11.93\% \pm 1.17\%$)和survivin ASODN($22.07\% \pm 0.93\%$), 差异具有显著性 ($P<0.01$). 因而我们的研究表明, COX-2抑制剂和survivin反义寡核苷酸联合应用能够明显抑制细胞的增殖和诱导细胞凋亡.

目前研究认为, survivin主要通过直接作用于凋亡蛋白酶级联通路的终末效应因子caspase-3和caspase-7而发挥抗凋亡作用^[12]. caspase-3是凋亡级联通路上的一个关键酶, 可被caspase-8和caspase-9通过死亡受体(Fas/Fas配体系统)或线粒体信号系统激活, 因此所有的凋亡是通过激活caspase-3实现的^[13]. Zhang *et al*^[14]研究表明, celecoxib抑制细胞增生伴随着cyclin D1、cyclin E和p-Rb表达的下调, P16(INK4a)和P27(KIP)表达的上调以及G1-S细胞周期捕获, celecoxib的促凋亡效应由caspase-3的活性介导. 我们发现, celecoxib和survivin反义寡核苷酸作用于胰腺癌细胞后均可使caspase-3的活性明显增加, 二者联合应用caspase-3的活性明显高于二者单独应用, 差异具有显著性 ($P<0.01$). 因而我们认为, COX-2抑制剂和survivin反义寡核苷酸诱导胰腺癌细胞凋亡, 可能在一定程度上通过激活caspase-3的活性实现的. 二者联合应用时细胞凋亡率明显增加, 可能是其共同启动caspase-3的活性的结果.

COX-2发挥细胞保护作用的机制尚未阐明, 可能归因于促凋亡因子和抗凋亡因子表达失衡. Catalano *et al*^[15]研究发现, celecoxib以剂量和时间依从性方式诱导恶性间皮瘤细胞凋亡, 其过程包括Akt(又称蛋白激酶B)磷酸化减少, Bcl-2和survivin蛋白表达的缺失和caspase-3活性的增加. Wun *et al*^[16]研究揭示, celecoxib不影响B细胞淋巴瘤的Bcl-2、Bcl-xl和Bax的水平. 然而Akt, Mcl-1和磷酸化的SAP-激酶的水平降低. 在人类膀胱癌细胞, COX-2抑制细胞凋亡通过激活PI-3K/Akt途径并且可能通过增加Mcl-1的

表达来实现^[17]. Mcl-1是Bcl-2家族的抗凋亡成员, Mcl-1的过表达可保护肿瘤细胞免受药物诱导的细胞凋亡^[18]. 我们的研究发现, celecoxib作用于胰腺癌BxPC-3后, survivin和Mcl-1的表达明显降低, 而Bcl-2的表达无明显变化, 说明COX-2抑制剂诱导胰腺癌细胞凋亡的机制可能主要通过抑制survivin和Mcl-1来实现的.

总之, 我们的研究表明, COX-2抑制剂和survivin反义寡核苷酸联合应用可在抑制细胞增殖和诱导细胞凋亡过程中起协同作用, COX-2抑制剂诱导胰腺癌细胞凋亡的可能机制主要是通过抑制survivin和Mcl-1以及提高caspase-3的活性来实现的.

4 参考文献

- 1 刘江伟, 张永久, 皇甫清风, 李开宗, 张东, 雷涛. Survivin反义寡核苷酸对胰腺癌荷瘤裸鼠的治疗作用. 世界华人消化杂志 2006; 14: 2838-2843
- 2 刘江伟, 李开宗, 窦科峰, 苏明权, 于文彬, 张福琴. Survivin反义寡核苷酸诱导胰腺癌细胞凋亡并增加吉西他滨的化疗敏感性. 中华普通外科杂志 2004; 19: 401-403
- 3 刘江伟, 李开宗, 窦科峰, 马福成, 王映梅. 胰腺癌组织survivin和COX-2表达的相关性. 第四军医大学学报 2004; 25: 635-636
- 4 刘江伟, 李开宗, 窦科峰, 宋振顺, 苏明权, 于文彬. COX-2抑制剂联合顺铂对胰腺癌细胞增殖和凋亡的影响. 世界华人消化杂志 2004; 12: 1139-1143
- 5 刘江伟, 李开宗, 窦科峰. Survivin在胰腺癌组织中的表达及其血管内皮生长因子的相关性研究. 中华肝胆外科杂志 2003; 9: 486-488
- 6 刘江伟, 李开宗, 窦科峰. COX-2在胰腺癌组织中的表达及其与p53的相关性研究. 世界华人消化杂志 2003; 11: 229-232
- 7 Olie RA, Simoes-Wust AP, Baumann B, Leech SH, Fabbro D, Stahel RA, Zangemeister-Wittke U. A novel antisense oligonucleotide targeting survivin expression induces apoptosis and sensitizes lung cancer cells to chemotherapy. *Cancer Res* 2000; 60: 2805-2809
- 8 Dai DJ, Lu CD, Lai RY, Guo JM, Meng H, Chen WS, Gu J. Survivin antisense compound inhibits proliferation and promotes apoptosis in liver cancer cells. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 193-199
- 9 Maier TJ, Schilling K, Schmidt R, Geisslinger G, Grosch S. Cyclooxygenase-2(COX-2)-dependent and -independent anticarcinogenic effects of celecoxib in human colon carcinoma cells. *Biochem Pharmacol* 2004; 67: 1469-1478
- 10 Krysan K, Dalwadi H, Sharma S, Pold M, Dubinett S. Cyclooxygenase 2-dependent expression of survivin is critical for apoptosis resistance in non-small cell lung cancer. *Cancer Res* 2004; 64: 6359-6362
- 11 Barnes N, Haywood P, Flint P, Knox WF, Bundred NJ. Survivin expression in situ and invasive breast cancer relates to COX-2 expression and DCIS recurrence. *Br J Cancer* 2006; 94: 253-286
- 12 Shin S, Sung BJ, Cho YS, Kim HJ, Ha NC, Hwang JI, Chung CW, Jung YK, Oh BH. An anti-apoptotic protein human survivin is a direct inhibitor of

- 13 caspase-3 and -7. *Biochemistry* 2001; 40: 1117-1123
Janicke RU, Sprengart ML, Wati MR, Porter AG. Caspase-3 is required for DNA fragmentation and morphological changes associated with apoptosis. *J Biol Chem* 1998; 273: 9357-9360
- 14 Zhang GS, Liu DS, Dai CW, Li RJ. Antitumor effects of celecoxib on K562 leukemia cells are mediated by cell-cycle arrest, caspase-3 activation, and downregulation of Cox-2 expression and are synergistic with hydroxyurea or imatinib. *Am J Hematol* 2006; 81: 242-255
- 15 Catalano A, Graciotti L, Rinaldi L, Raffaelli G, Rodilossi S, Betta P, Gianni W, Amoroso S, Procopio A. Preclinical evaluation of the nonsteroidal anti-inflammatory agent celecoxib on malignant mesothelioma chemoprevention. *Int J Cancer* 2004; 109: 322-328
- 16 Wun T, McKnight H, Tuscano JM. Increased cyclooxygenase-2 (COX-2): a potential role in the pathogenesis of lymphoma. *Leuk Res* 2004; 28: 179-190
- 17 Choi EM, Kwak SJ, Kim YM, Ha KS, Kim JI, Lee SW, Han JA. COX-2 inhibits anoikis by activation of the PI-3K/Akt pathway in human bladder cancer cells. *Exp Mol Med* 2005; 37: 199-203
- 18 Okita H, Umezawa A, Fukuma M, Ando T, Urano F, Sano M, Nakata Y, Mori T, Hata J. Acute myeloid leukemia possessing jumping translocation is related to highly elevated levels of EAT/mcl-1, a Bcl-2 related gene with anti-apoptotic functions. *Leuk Res* 2000; 24: 73-7

同行评价
本文立意新颖, 课题设计合理, 严谨, 所用方法较先进, 实验结果可靠, 并且有一定的临床指导意义。

编辑 程剑侠 电编 李军亮

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。

在Fas诱导Bel-7402细胞凋亡中p38MAPK调节Bcl-2的表达

王玉, 孙黎光, 夏春辉, 叶丽平, 张莹

背景资料
p38MAPK信号通路
与Fas共同参与
对细胞凋亡的调
控, 是细胞内主要
的信号转导系统
之一。细胞运用这
一系统将胞外信
号传递给胞核, 参
与和影响细胞的
多种生理病理过
程, 但是其作用途
径还不太清楚。

王玉, 孙黎光, 叶丽平, 张莹, 中国医科大学基础医学院生物
化学与分子生物学教研室 辽宁省沈阳市 110001
王玉, 夏春辉, 齐齐哈尔医学院 黑龙江省齐齐哈尔市 161042
王玉, 副教授, 2005届中国医科大学博士生, 主要从事肝癌细胞
生物学研究。
辽宁省教育厅科研基金资助项目, No. 2004D173
黑龙江省普通高等学校骨干教师创新能力资助计划, No.
1054G070
通讯作者: 孙黎光, 110001, 辽宁省沈阳市, 中国医科大学生物
化学与分子生物学教研室. ydslg@163.com
电话: 024-23256666-5297
收稿日期: 2007-06-13 修回日期: 2007-10-07

p38 mitogen-activated protein kinase modulates Bcl-2 expression during FAS-induced apoptosis in Bel-7402 cells

Yu Wang, Li-Guang Sun, Chun-Hui Xia, Li-Ping Ye, Ying Zhang

Yu Wang, Li-Guang Sun, Li-Ping Ye, Ying Zhang, De-
partment of Biochemistry and Molecular Biology, China
Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China

Yu Wang, Chun-Hui Xia, Qiqihar Medical College, Qiqi-
har 161042, Heilongjiang Province, China

Supported by: the Scientific Research Foundation of the
Education Department in Liaoning Province, No. 10511129,
the Plan for the Core Teacher's Innovation Abilities of Com-
mon Colleges and Universities in Heilongjiang Province,
No. 1054G070

Correspondence to: Li-Guang Sun, Department of Bio-
chemistry and Molecular Biology, China Medical Univer-
sity, Shenyang 110001, Liaoning Province,
China. ydslg@163.com

Received: 2007-06-13 Revised: 2007-10-07

Abstract

AIM: To investigate whether p38 mitogen-activated protein kinase (p38MAPK) is involved in Fas- and actinomycin D (AD)-induced apoptosis in Bel-7402 cells, and the relationship between p38MAPK and Bcl-2 expression.

METHODS: We measured the viability of Bel-7402 cells by MTT assay, p38MAPK, p-p38MAPK and Bcl-2 expression by Western blotting and reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR), and the location of

p-p38MAPK in Bel-7402 cells after Fas and AD treatment by immunofluorescence.

RESULTS: Bel-7402 cell viability was significantly inhibited by Fas ($P < 0.01$). p38MAPK and p-p38MAPK increased significantly with increasing Fas ($P < 0.01$), leading to cell death as assessed by MTT after 24 hours of Fas and AD treatment. p-p38MAPK translocation into the nucleus was dependent on Fas stimulation. Bcl-2 expression decreased significantly and was prevented by SB203580 during Fas- and AD-induced apoptosis ($P < 0.01$).

CONCLUSION: p38MAPK is involved in Fas- and AD-induced apoptosis, and p38MAPK modulates Bcl-2 expression during this apoptosis pathway.

Key Words: p38 mitogen-activated protein kinase; p-p38 mitogen-activated protein kinase; Bcl-2; Apoptosis; Western blotting; Reverse transcription polymerase chain reaction

Wang Y, Sun LG, Xia CH, Ye LP, Zhang Y. p38 mitogen-activated protein kinase modulates Bcl-2 expression during FAS-induced apoptosis in Bel-7402 cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007; 15(30): 3184-3189

摘要

目的: 探讨p38MPAK是否参与Fas和AD诱导Bel-7402细胞的凋亡过程, 以及p38MPAK和bcl-2的关系, 进一步揭示p38MAPK的凋亡途径。

方法: 在Fas和AD作用24 h后, 用MTT法检测Bel-7402细胞的活力, 用Western-blot和RT-PCR法检测p38MAPK, p-p38MAPK和Bcl-2 expression, 用免疫荧光法对p-p38MAPK进行细胞定位。

结果: 随着Fas浓度的增加, Bel-7402细胞的活力明显抑制, p38MAPK和p-p38MAPK表达明显增高($P < 0.01$), 且p-p38MAPK由胞质易位到胞核。Bcl-2的表达明显降低($P < 0.01$), 并且这种

降低趋势被p38MAPK抑制剂SB203580所阻止。

结论: p38MAPK参与Fas诱导的凋亡途径, 以磷酸化形式激活后抑制Bcl-2的表达, 进而促进细胞凋亡。

关键词: p38MAPK; p-p38MAPK; Bcl-2; 凋亡; 免疫印迹; 逆转录聚合酶链式反应

王玉, 孙黎光, 夏春辉, 叶丽平, 张莹. 在Fas诱导Bel-7402细胞凋亡中p38MAPK调节Bcl-2的表达. 世界华人消化杂志 2007;15(30):3184-3189

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/3184.asp>

0 引言

已有研究表明, 在各种疾病如癌症、自身免疫、不规则的神经变性和生理细胞死亡中, 细胞凋亡起到重要作用, 并且许多因子都卷入死亡信号中。近年来发现一类新的MAPK(丝裂素活化的蛋白激酶)通路-p38MAPK信号通路, 他不仅在炎症、应激反应中具有重要作用, 还参与细胞的生存、分化和凋亡等过程。p38MAPK信号通路与TNF 共同参与对细胞凋亡的调控, 是细胞内主要的信号转导系统之一。细胞运用这一系统将胞外信号传递给细胞核, 参与和影响细胞的多种生理病理过程^[1-2]。Fas/FasL系统在凋亡的过程中起到关键作用。一些证据显示, 在肝细胞凋亡的调节中Fas是非常重要的, 在肝病如肝损伤, 肝炎, 肝硬化和肝癌等的发病机制上起到重要作用^[3-4]。在正常的鼠和人的肝中, Nomura *et al*发现Fas不断表达, 添加的anti-Fas抗体, 可导致鼠或人的肝细胞凋亡^[5]。Fas/FasL系统作为肿瘤治疗的一个潜在靶子^[6-7], 不仅对组织细胞的限制或肿瘤细胞的增殖, 而且对免疫反应的下游调节都是一个生理性关键^[8-9]。我们主要探讨Fas诱导Bel-7402细胞凋亡中p38MAPK的作用途径。

1 材料和方法

1.1 材料 MTT和胰酶均购自美国Sigma公司, DMEM培养基购自美国Gibco公司, 胎牛血清购自PAA。Fas, p38, p-p38, Bcl-2和 β -actin抗体和TITC标记的二抗购自美国Santa Cruz公司, p38MAPK抑制剂SB 203580和Actinomycin D(AD)购自CalBiochem。TRIzol购自Invitrogen公司。Bel-7402细胞购自中科院动物研究所。

1.2 方法

1.2.1 Fas和AD对细胞增殖的抑制作用 取对数生长期的Bel-7402细胞, 常规胰酶消化接种于96

孔板, 每孔 1×10^4 个细胞, 培养24 h后加入Fas和AD, Fas终浓度为0, 100, 300, 500 $\mu\text{g/L}$, AD终浓度为50 $\mu\text{g/L}$, 每个浓度设3个平行孔。培养24 h后加入5 g/L MTT 20 μL , 再培养4 h后, 各孔加150 μL DMSO, 酶标仪检测, 波长490 nm。细胞活力 = (实验组A值/对照组A值) $\times 100\%$ ^[10-11]。

1.2.2 p38, p-p38MAPK, Bcl-2的表达 Fas和AD作用Bel-7402细胞24 h后, 收集细胞提取总蛋白, 用Lorry法测定含量后, 取总蛋白30 μg , 经120 g/L SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离并转移至硝酸纤维素膜上。用含50 g/L奶粉的TBST室温封闭1 h, 分别加1:400稀释的兔抗人p38MAPK, p-p38MAPK与Bcl-2抗体, 室温孵育2 h; 用TBST漂洗10 min, 3次; 加1:5000稀释的过氧化物酶标记的二抗, 室温孵育1 h; 用TBST漂洗10 min, 2次, TBS漂洗1次, ECL发光^[12]。

1.2.3 p-p38的定位 常规培养Bel-7402细胞, 按 1×10^5 个/孔接种于放有盖玻片的6孔细胞培养板。24 h后用含不同剂量Fas: 0, 100, 300, 500 $\mu\text{g/L}$, AD: 50 $\mu\text{g/L}$ 和DMEM处理24 h。盖玻片丙酮固定, 然后抗p-p38MAPK的一抗室温孵育1 h, TRITC标记的二抗于常温避光孵育1 h后, PBS洗2次, 置Leica SP2激光共聚焦扫描显微镜下观察。

1.2.4 RT-PCR^[12]采用TaKaRa试剂盒(#AMV 3.0) PCR反应条件: 35 cycles, 变性30 s 94 $^{\circ}\text{C}$, 退火30 s 55 $^{\circ}\text{C}$, 延伸1 min 72 $^{\circ}\text{C}$, 另加延伸10 min 72 $^{\circ}\text{C}$ 。p38MAPK引物序列(5'-3')F-GCT CAG TAA CAG TCC GCC TAG A-, R-GAG CCA GTC CAA AAT CCA-, β -actin引物序列(5'-3')F-TCC TCC TGA GCG CAA GTA CTC T-, R- GCT CAG TAA CAG TCC GCC TAG A-。PCR产物进行15 g/L琼脂糖电泳, 用上海天能凝胶成像图像分析系统采集图像。

统计学处理 采用SPSS12.0统计软件进行统计分析。

2 结果

2.1 Fas和AD抑制细胞增殖 随着Fas抗体浓度的增加, 细胞的活力明显降低(97.5% \rightarrow 42.3%, $P < 0.01$), 当浓度达到500 $\mu\text{g/L}$ 时, 这种降低趋势缓解($P < 0.05$), 说明在AD存在的情况下, Fas诱导细胞凋亡(图1)。另外在倒置显微镜下, 根据生成Formazan紫蓝色结晶(松针状结构)的多少进行细胞活力的判断, 我们也能很好的观察到这种效果(图2)。

2.2 Fas和AD激活p38MAPK Fas和AD促进

相关报道
国外对此方面的研究采用基因敲除, 或转染方法, 具有一定的先进性, 准确性。

创新盘点
本文创新点在于利用p38MAPK特异性抑制剂SB203580研究p38MAPK对bcl-2的调节作用,为今后的工作做铺垫。

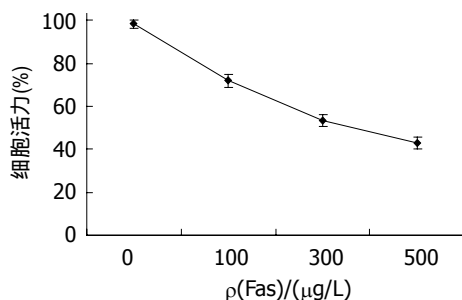


图1 Bel-7402细胞活力与Fas抗体含量的关系。

p38MAPK表达,并且通过磷酸化(Tyr-182)形式激活,促进p-p38MAPK表达,随着Fas浓度的增加, p38MAPK的表达显著增加(0.126→0.417, $P<0.01$), p-p38MAPK的表达也显著增加(0.304→0.592, $P<0.01$, 图3A-B). 而抑制剂SB203580能有效的抑制p38MAPK($P<0.01$)和p-p38MAPK的表达($P<0.01$, 图3A-B). SB203580可以从转录水平影响p38MAPK mRNA的表达,从而在蛋白水平表现变化(图3C).

2.3 Fas和AD诱导p-p38MAPK由胞质易位到细胞核 Fas和AD作用24 h后, p-p38MAPK在核内表达(TRITC标记的红色, 图4A). 当SB203580提前作用2 h后,再用Fas和AD作用24 h, p-p38MAPK在胞质表达较多(TRITC标记的红色, 图4B).

2.4 Fas和AD抑制Bcl-2的表达 随着Fas浓度的增加, Bcl-2的表达显著降低(0.525→0.214, $P<0.01$, 图5A). 而抑制剂SB203580作用后减缓Bcl-2的下降趋势, 100 μg/L浓度组与300 μg/L浓度组比较($P<0.05$), 300 μg/L浓度组与500 μg/L浓度组比较($P<0.05$, 图5B), 也就是说SB203580影响p38MAPK的表达从而影响Bcl-2的表达。

3 讨论

细胞凋亡已成为一种维持机体自身稳定所必须的生理性细胞死亡。机体内细胞在凋亡过程中, 严格受到基因调控, 因此有学者提出, 细胞恶性转化或癌细胞的产生均是由细胞增殖与细胞死亡调控功能失调所致。参与调节细胞凋亡的许多信号途径中, Fas/FasL是最重要的介导细胞凋亡系统^[13]。Fas/FasL的研究意义, 一个主要的方面就是与抗肿瘤治疗有关^[30]。已有报道, p38MAPK参与了此凋亡途径。MAPK的激活是通过Linker12磷酸化环状结构上的三肽基“T2X2Y”中邻近的酪氨酸(T)和苏氨酸(Y)的磷酸化来完成。p38MAPK具有这样的“T2G2Y”三肽序列, 且在Linker 12部位比RasPERK, JNKPSAPK少6个氨基酸, 提示

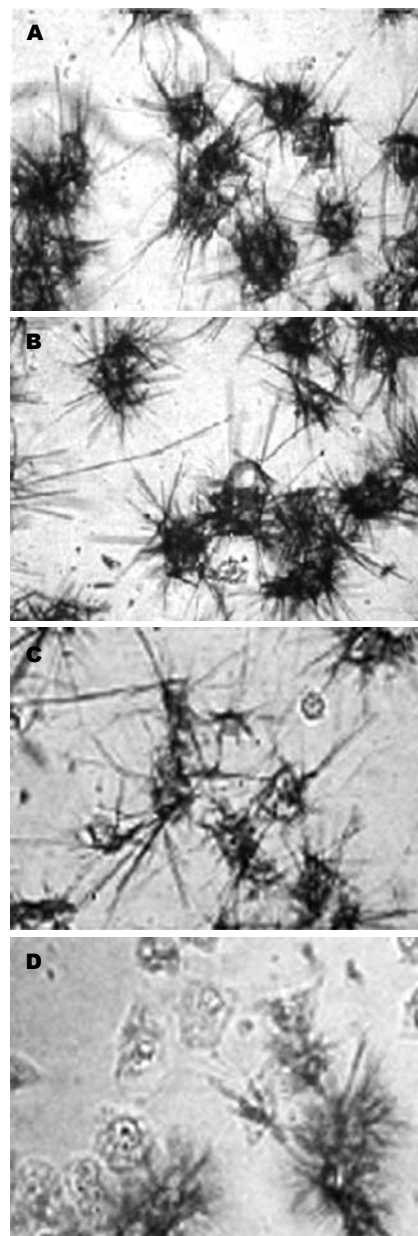
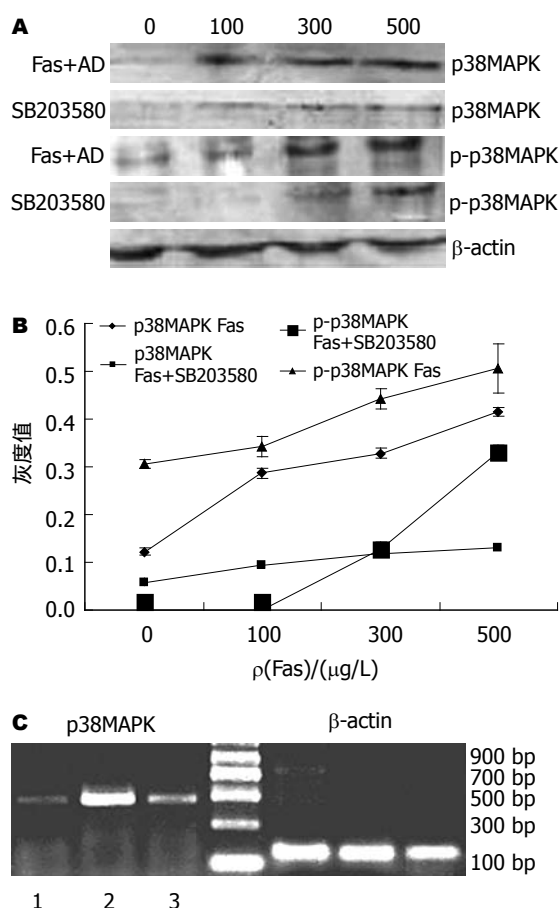


图2 Bel-7402细胞还原MTT生成Formazan紫蓝色结晶。A: 正常Bel-7402细胞; B: Fas终浓度为100 μg/L, AD终浓度为50 μg/L; C: Fas终浓度为300 μg/L, AD终浓度为50 μg/L; D: Fas终浓度为500 μg/L, AD终浓度为50 μg/L。

p38MAPK分子的磷酸化有别于其他3条通路^[14]。p38家族有p38α, p38β, p38γ和p38δ 4种亚型, 除了序列相似之外, 同源激酶之间有一定的差异。p38α和p38β几乎表达于所有组织, 而p38γ mRNA主要在骨骼肌表达, p38δ主要在肾和肺组织内表达^[15-18]。因此对4种亚型在细胞定位的研究将有助于了解p38信号通路主要参与应激条件下细胞炎症反应和细胞凋亡过程^[19-21]。根据文献报道和本研究证明, 只有在AD存在下, Fas诱导Bel-7402细胞的活力降低, 并且随Fas浓度的增加而显著降低(图1), 这种趋势在Fas浓度为



500 $\mu\text{g/L}$ 时减缓($P<0.05$), 这与细胞膜表面的Fas受体的饱和程度有关.

我们的研究也证实, p38MAPK通路的激活与外界的刺激有关. 在Fas和AD诱导的凋亡中, 随着Fas浓度的增加, p38MAPK及p-p38MAPK的表达显著增加(图3). 在正常的Bel-7402细胞中p38MAPK及p-p38MAPK的表达量很低, 在SB203580的作用下, p38MAPK及p-p38MAPK(Tyr-182)表达降低, 相应的Fas和AD诱导的凋亡也降低, 说明p38MAPK参与Fas诱导的凋亡途径. 另外从RT-PCR我们也看到, SB203580降低了p38MAPK mRNA的表达, 因而在蛋白水平得以体现与Nicholas Farley研究相一致^[13]. 再有, 通过激光共聚焦扫描显微镜, 我们观察到Fas和AD作用下p-p38MAPK主要定位在胞核, 而在SB203580作用下, p-p38MAPK主要定位在胞浆. 由此, 我们推断Fas和AD刺激p38MAPK磷酸化激活, 通过p-p38MAPK将信号带入细胞核从而引起细胞凋亡.

凋亡抗在抗癌药物作用中起到非常重要的

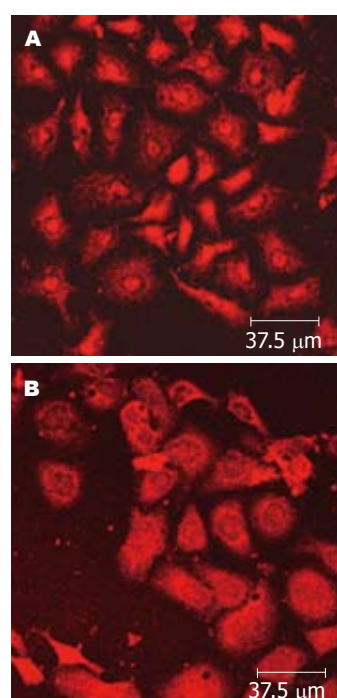
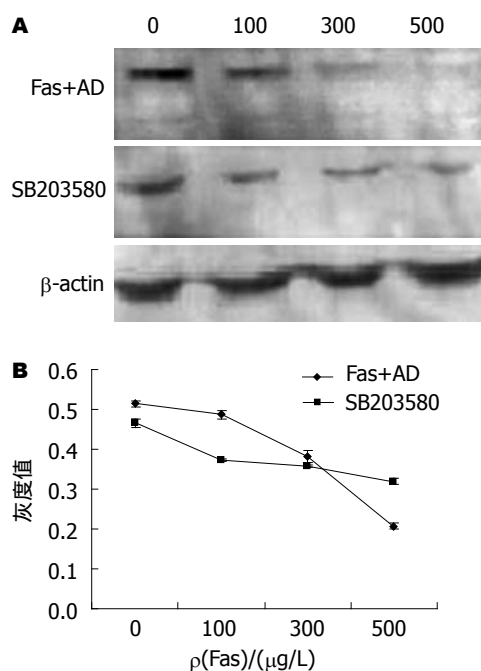


图 4 p-p38MAPK 在细胞内的定位. A: p-p38MAPK 在细胞核中表达; B: p-p38MAPK 在细胞质中表达.



作用,维持内环境的稳定,消除细胞的损伤^[23-24]。两个主要的途径死亡受体途径和线粒体途径已经被证实与药物诱导的凋亡有关,尤其, Bcl-2家族蛋白在调节线粒体凋亡途径中起到一个中心作用^[25-26]。Bcl-2家族蛋白的成员可以被分为两个亚家族成员:一个是抗凋亡蛋白如Bcl-2和Bcl-XL,另一个是促凋亡蛋白Bax, Bad和Bid。近来的研究表明,在凋亡中, Bcl-2或Bcl-XL的过度表达,能保护抵抗化学疗法诱导线粒体细

名词解释

1 MAPK: 有丝分裂原蛋白激酶。MAPK包括细胞外信号调节激酶(ERK), c-Jun NH2-端蛋白激酶(JNK)和P38蛋白激酶, ERK主要受生长因子激活,并且显示出与细胞增殖与分化相偶联。相反致炎因子(炎症前因子), 去除生长因子, 化学治疗药物和许多有毒的化合物通常刺激JNK和P38的激活。

2 Fas: 即Apo-1/CD95, 属于肿瘤坏死因子受体(TNFR)超家族。Fas与其配体(FasL)结合后可以导致细胞凋亡, 在维持机体自身稳定和保持内环境的平衡方面起重要作用。

胞色素C的释放, caspase的激活和DNA断裂^[27]。细胞质的促凋亡蛋白Bid能被激活的caspase-8分开和激活。截断的Bid转位到线粒体, 然后诱导C的释放。Bcl-2 是研究最早的抑制凋亡的基因^[28], 可以阻断细胞程序化死亡的公共信号传导通路^[29], 因此, 可以抑制或阻断多种细胞及细胞系的细胞程序化死亡过程, 但其作用机制还不清楚。我们的数据显示, Fas抗体浓度的升高与Bcl-2原癌基因的表达下降具有某些偶联的关系。当SB203580作用时, 我们发现Bcl-2表达下降的趋势缓解, 说明SB203580调节bcl-2的表达, 即p38MAPK参与对Bcl-2的调节。

我们的研究显示, 在AD存在下, Fas诱导Bel-7402细胞凋亡, 并且p38MAPK参与此过程。通过p38MAPK特异性抑制剂SB203580的作用, 证明p38MAPK对Bcl-2的调节作用, 但是以依赖线粒体途径还是依非线粒体途径还不清楚, 这是我们下一个将研究的目标。

4 参考文献

- MacCorkle RA, Tan TH. Mitogen-activated protein kinases in cell-cycle control. *Cell Biochem Biophys* 2005; 43: 451-461
- Bendotti C, Atzori C, Piva R, Tortarolo M, Strong MJ, DeBiasi S, Migheli A. Activated p38MAPK is a novel component of the intracellular inclusions found in human amyotrophic lateral sclerosis and mutant SOD1 transgenic mice. *J Neuropathol Exp Neurol* 2004; 63: 113-119
- Scholz M, Cinatl J. Fas/FasL interaction: a novel immune therapy approach with immobilized biologicals. *Med Res Rev* 2005; 25: 331-342
- Socolovsky M, Murrell M, Liu Y, Pop R, Porpiglia E, Levchenko A. Negative Autoregulation by FAS Mediates Robust Fetal Erythropoiesis. *PLoS Biol* 2007; 5: e252
- Nomura J, Matsumoto K, Iguchi-Ariga SM, Ariga H. Mitochondria-independent induction of Fas-mediated apoptosis by MSSP. *Oncol Rep* 2005; 14: 1305-1309
- Scholz M, Simon A, Berg M, Schuller AM, Hacibayramoglu M, Margraf S, Theisen A, Windolf J, Wimmer-Greinecker G, Moritz A. In vivo inhibition of neutrophil activity by a FAS (CD95) stimulating module: arterial in-line application in a porcine cardiac surgery model. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2004; 127: 1735-1742
- Wang XB, Zhao BF, Zhao Q, Piao JH, Liu J, Lin Q, Huang HL. A new recombinant single chain trispecific antibody recruits T lymphocytes to kill CEA (carcinoma embryonic antigen) positive tumor cells in vitro efficiently. *J Biochem (Tokyo)* 2004; 135: 555-565
- Scheel-Toellner D, Wang K, Craddock R, Webb PR, McGettrick HM, Assi LK, Parkes N, Clough LE, Gulbins E, Salmon M, Lord JM. Reactive oxygen species limit neutrophil life span by activating death receptor signaling. *Blood* 2004; 104: 2557-2564
- Pearl-Yafe M, Yolcu ES, Stein J, Kaplan O, Shirwan H, Yaniv I, Askenasy N. Expression of Fas and Fas-ligand in donor hematopoietic stem and progenitor cells is dissociated from the sensitivity to apoptosis. *Exp Hematol* 2007; 35: 1601-1612
- Hou DX, Fukuda M, Johnson JA, Miyamori K, Ushikai M, Fujii M. Fisetin induces transcription of NADPH:quinone oxidoreductase gene through an antioxidant responsive element-involved activation. *Int J Oncol* 2001; 18: 1175-1179
- Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 1983; 65: 55-63
- Hou DX, Ose T, Lin S, Harazoro K, Imamura I, Kubo M, Uto T, Terahara N, Yoshimoto M, Fujii M. Anthocyanidins induce apoptosis in human promyelocytic leukemia cells: structure-activity relationship and mechanisms involved. *Int J Oncol* 2003; 23: 705-712
- Saitou Y, Shiraki K, Yamanaka T, Miyashita K, Inoue T, Yamanaka Y, Yamaguchi Y, Enokimura N, Yamamoto N, Itou K, Sugimoto K, Nakano T. Augmentation of tumor necrosis factor family-induced apoptosis by E3330 in human hepatocellular carcinoma cell lines via inhibition of NF kappa B. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 6258-6261
- Jin Y, Yan EZ, Fan Y, Zong ZH, Qi ZM, Li Z. Sodium ferulate prevents amyloid-beta-induced neurotoxicity through suppression of p38 MAPK and upregulation of ERK-1/2 and Akt/protein kinase B in rat hippocampus. *Acta Pharmacol Sin* 2005; 26: 943-951
- Jiang Y, Chen C, Li Z, Guo W, Gegner JA, Lin S, Han J. Characterization of the structure and function of a new mitogen-activated protein kinase (p38beta). *J Biol Chem* 1996; 271: 17920-17926
- Jiang Y, Gram H, Zhao M, New L, Gu J, Feng L, Di Padova F, Ulevitch RJ, Han J. Characterization of the structure and function of the fourth member of p38 group mitogen-activated protein kinases, p38delta. *J Biol Chem* 1997; 272: 30122-30128
- Li Z, Jiang Y, Ulevitch RJ, Han J. The primary structure of p38 gamma: a new member of p38 group of MAP kinases. *Biochem Biophys Res Commun* 1996; 228: 334-340
- Cuenda A, Rousseau S. p38 MAP-kinases pathway regulation, function and role in human diseases. *Biochim Biophys Acta* 2007; 1773: 1358-1375
- Aouadi M, Binetruy B, Caron L, Le Marchand-Brustel Y, Bost F. Role of MAPKs in development and differentiation: lessons from knockout mice. *Biochimie* 2006; 88: 1091-1098
- Iyoda K, Sasaki Y, Horimoto M, Toyama T, Yakushijin T, Sakakibara M, Takehara T, Fujimoto J, Hori M, Wands JR, Hayashi N. Involvement of the p38 mitogen-activated protein kinase cascade in hepatocellular carcinoma. *Cancer* 2003; 97: 3017-3026
- Uddin S, Ah-Kang J, Ulaszek J, Mahmud D, Wickrema A. Differentiation stage-specific activation of p38 mitogen-activated protein kinase isoforms in primary human erythroid cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101: 147-152
- Farley N, Pedraza-Alva G, Serrano-Gomez D, Nagaleekar V, Aronshtam A, Krahl T, Thornton T, Rincon M. p38 mitogen-activated protein kinase mediates the Fas-induced mitochondrial death pathway in CD8+ T cells. *Mol Cell Biol* 2006; 26:

- 2118-2129
- 23 Wesche-Soldato DE, Swan RZ, Chung CS, Ayala A. The apoptotic pathway as a therapeutic target in sepsis. *Curr Drug Targets* 2007; 8: 493-500
- 24 Ayala A, Wesche-Soldato DE, Perl M, Lomas-Neira JL, Swan R, Chung CS. Blockade of apoptosis as a rational therapeutic strategy for the treatment of sepsis. *Novartis Found Symp* 2007; 280: 37-49; discussion 49-52, 160-164
- 25 Breckenridge DG, Germain M, Mathai JP, Nguyen M, Shore GC. Regulation of apoptosis by endoplasmic reticulum pathways. *Oncogene* 2003; 22: 8608-8618
- 26 Daniel PT, Schulze-Osthoff K, Belka C, Guner D. Guardians of cell death: the Bcl-2 family proteins. *Essays Biochem* 2003; 39: 73-88
- 27 Hasenjager A, Gillissen B, Muller A, Normand G, Hemmati PG, Schuler M, Dorken B, Daniel PT. Smac induces cytochrome c release and apoptosis independently from Bax/Bcl-x(L) in a strictly caspase-3-dependent manner in human carcinoma cells. *Oncogene* 2004; 23: 4523-4535
- 28 Dasmahapatra G, Almenara JA, Grant S. Flavopiridol and histone deacetylase inhibitors promote mitochondrial injury and cell death in human leukemia cells that overexpress Bcl-2. *Mol Pharmacol* 2006; 69: 288-298
- 29 Robertson JD, Orrenius S. Molecular mechanisms of apoptosis induced by cytotoxic chemicals. *Crit Rev Toxicol* 2000; 30: 609-627
- 30 Pearl-Yafe M, Yolcu ES, Stein J, Kaplan O, Yaniv I, Shirwan H, Askenasy N. Fas ligand enhances hematopoietic cell engraftment through abrogation of alloimmune responses and nonimmunogenic interactions. *Stem Cells* 2007; 25: 1448-1455

同行评价
本文研究的内容具有一定的前沿性, 研究角度也具有创新性.

编辑 何燕 电编 李军亮

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》报道消化疾病的评论及临床和基础研究, 包括消化肿瘤学、消化感染病学、消化内科学、消化外科学、消化内镜学、消化影像学、消化介入治疗学、消化中医药、中西医结合学、消化基础研究、消化病理学、消化循证医学等内容.

《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>.

胃癌组织中caspase 9的表达及其多态性变化

方长清, 刘树立, 娄毅, 李建华

背景资料
凋亡和肿瘤的发生发展有着密切的关系, 也是肿瘤耐药和产生化疗、放疗副作用的重要原因。caspase 9基因定位于1p36.3-p36.1, 其参与线粒体介导的凋亡途径。

方长清, 刘树立, 李建华, 中国医科大学病理教研室 辽宁省沈阳市 110001
娄毅, 中国医科大学医学遗传学教研室 辽宁省沈阳市 110001
方长清, 主管技师, 主要从事肿瘤的研究工作。
辽宁省科技基金资助, No. 2005225003-6
通讯作者: 李建华, 110001, 辽宁省沈阳市, 中国医科大学病理教研室, louyi_1963_1019@163.com
电话: 024-23256666
收稿日期: 2007-07-13 修回日期: 2007-09-27

Expression of the caspase 9 gene and its polymorphism distribution in gastric cancer

Chang-Qing Fang, Shu-Li Liu, Yi Lou, Jian-Hua Li

Chang-Qing Fang, Shu-Li Liu, Jian-Hua Li, Department of Pathology, China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China
Yi Lou, Department of Medical Genetics, China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China
Supported by: Science and Technology Fund of Liaoning Province, No. 2005225003-6
Correspondence to: Jian-Hua Li, Department of Pathology, China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China. louyi_1963_1019@163.com
Received: 2007-07-13 Revised: 2007-09-27

Abstract

AIM: To explore the expression of caspase 9 in gastric cancer, and single nucleotide polymorphism (SNP) distribution of caspase 9 in gastric cancer patients and healthy individuals.

METHODS: Western blotting was used to analyze the expression of caspase 9 in 70 gastric cancer patients and normal gastric tissues. We investigated the distribution of a caspase 9 gene SNP. We analyzed the genotype rs1052576 in 70 patients and 100 healthy individuals by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism. Statistical analysis was applied to analyze SNP genotype frequency and allele frequency in patients and the control group.

RESULTS: In comparison with normal gastric tissues, caspase 9 gene expression was obviously down-regulated in 51.4% (36/70) of gastric cancer tissues. rs1052576 was located in exon 5 of

the caspase 9 gene showed a significant difference between the two groups, and the G allele frequency in gastric cancer patients was higher than that in healthy controls (22.9% vs 13.0%, $P < 0.05$). AG genotype frequency in patients with lymph node metastasis was higher than that in patients with no lymph node metastasis ($P < 0.05$).

CONCLUSION: The caspase 9 gene is associated with gastric cancer oncogenesis. rs1052576 located in exon 5 of the caspase 9 gene is associated with gastric cancer. AG genotype is associated with lymph node metastasis.

Key Words: Gastric Cancer; Caspase 9; Single nucleotide polymorphism; Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism

Fang CQ, Liu SL, Lou Y, Li JH. Expression of the caspase 9 gene and its polymorphism distribution in gastric cancer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007; 15(30): 3190-3193

摘要

目的: 探讨胃癌中caspase 9基因的表达及其单核苷酸多态位点的分布。

方法: 应用Western-blot方法检测70例胃癌患者及对应癌旁正常组织中caspase 9的表达情况。应用限制性片段长度多态性技术结合测序, 分析70例胃癌患者及100例正常人caspase 9基因rs1052576位点基因型。应用列联表法统计分析患者组和对照组SNP位点基因型及等位基因频率。

结果: 51.4%(36/70)的胃癌组织caspase 9基因表达明显下调, 与癌旁正常组织相比差异有统计学意义($P < 0.05$)。位于caspase 9基因第5外显子的SNP位点rs1052576的基因型频率和等位基因频率在两组人群中的分布差异有统计学意义。患者组G等位基因频率明显高于对照组(22.9% vs 13.0%, $P < 0.05$), AG基因型频率在有淋巴结转移的患者中明显高于无淋巴结转移的患者($P < 0.05$)。

结论: caspase 9基因在胃癌中低表达,

rs1052576多态位点G等位基因和胃癌的发生相关, AG基因型和淋巴结转移有关。

关键词: 胃癌; Caspase 9; 单核苷酸多态; 限制性片段长度多态性技术

方长清, 刘树立, 姜毅, 李建华. 胃癌组织中caspase 9的表达及其多态性变化. 世界华人消化杂志 2007;15(30):3190-3193
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/3190.asp>

0 引言

胃癌是我国最常见的消化道肿瘤, 占恶性肿瘤死亡的第一位。胃癌的发生、发展是一个多因素、多基因作用的复杂过程。目前已经发现很多和胃癌发生相关的基因, 如*RAS*基因家族、*ERBB*基因家族、*MYC*基因家族、*p53*等^[1-2]。凋亡和肿瘤的发生发展有密切的关系, 也是肿瘤耐药和产生化疗、放疗副作用的重要原因。caspase 9基因定位于1p36.3-p36.1, 参与线粒体介导的凋亡途径^[3-4]。为探讨caspase 9基因与胃癌的分子遗传学联系, 我们研究caspase 9基因在胃癌中的表达, 进一步选择caspase 9基因内已知单核苷酸多态(SNP), 检测其在70例胃癌患者及100例正常人中的分布情况, 分析其与NSCLC遗传易感性的关系。

1 材料和方法

1.1 材料 选用中国医科大学附属第一医院普外科2000-2002年手术切除的胃腺癌组织70例, 标本的使用经伦理委员会批准并经患者本人知情同意。其中男47例, 女23例, 年龄29-64(平均45.2)岁。高分化9例, 中分化8例, 低分化53例, 淋巴结转移阴性24例, 阳性46例。对应远癌胃黏膜组织均取自胃癌行胃切除的近侧断端胃黏膜, 所有断端均距离癌组织5 cm以上, 组织学检查为基本正常胃黏膜。

1.2 方法

1.2.1 Western blot分析caspase 9表达 提取胃癌及正常胃组织的蛋白质后, 考马斯亮蓝法定量样品蛋白浓度, 把样品制成相同浓度, 加入样品缓冲液, 沸水煮5 min。100 g/L SDS-PAGE凝胶电泳后转至PVDF膜。取下PVDF膜TBS浸泡10 min, 封闭(50 g/L脱脂奶粉TBS 1 h), TBS洗5 min 2次, 然后加一抗(1:100), 4℃过夜, TBS洗5 min 2次, 加二抗2 h(1:2000), TBS洗5 min 2次。将PVDF膜浸入碱性磷酸酶显色液1-2 min, 蒸馏水冲洗, 观察结果。

1.2.2 SNPs的选取及引物设计 在[http://www.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP)

[ncbi.nlm.nih.gov/SNP](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP)数据库选择caspase 9基因内已知SNP位点。rs1052576位于caspase 9基因第5外显子。明确两侧基因组序列及SNP是否引起酶切位点改变。应用Primer3软件设计引物(Sangon公司合成)。rs1052576引物序列: CCTCCTGAGTAGCTGGGATT/AAGGGTGTGTTTGGACACAAG, 长度464 bp, 酶切后片段长度307 bp/157 bp(*Bst*U I)。应用常规饱和酚-氯仿法提取胃癌患者及正常人外周静脉血基因组DNA。

1.2.3 目的片段扩增和酶切鉴定 反应液总体积25 μL, 其中基因组DNA约40 ng, 10×反应缓冲液(MgCl₂ 15 mmol/L) 2.5 μL, dNTP(2.0 mmol/L) 2.0 μL, 上下游引物(20 μmol/L)各0.5 μL, Taq酶16.67 nkat。循环参数: rs1052576: 94℃变性8 min, 94℃ 50 s, 58℃ 50 s, 72℃ 50 s 35个循环, 72℃延伸5 min。所有PCR产物均经20 g/L琼脂糖凝胶电泳检测确认。*Bst*U I酶切鉴定rs1052576基因型, 等位基因为G时能被*Bst*U I酶识别。酶切反应体系20 μL, 其中PCR产物8 μL, *Bst*U I 83.35 nkat, 10×缓冲液2 μL。37℃水浴过夜, 15 g/L琼脂糖凝胶电泳鉴定基因型。

统计学处理 应用Arlequin软件(<http://anthropologie.unige.ch/arlequin/methods.html>)检测病例组与对照组中的Hardy-Weinberg平衡, 应用SPSS10.0软件统计分析患者组和对照组中基因型频率、等位基因频率以及caspase 9基因表达率是否存在差异。

2 结果

2.1 胃癌组织caspase 9基因表达 免疫印记结果表明, 正常胃黏膜组织中均有caspase 9的表达, 而51.4%(36/70)胃癌组织caspase 9表达明显下调(图1), 与癌旁正常组织相比差异有统计学意义。

2.2 rs1052576酶切鉴定和统计分析 经Arlequin软件分析, 对照组和患者组中2个SNP位点基因型频率及等位基因频率均符合Hardy-Weinberg平衡(图2)。患者组及正常对照组SNP位点基因型频率及等位基因频率有区别。rs1052576位点患者组G等位基因频率高于对照组($\chi^2 = 9.52$, $P < 0.01$)。患者组与对照组相比, 3种基因型分布频率存在差异($\chi^2 = 10.40$, $P < 0.01$), AA基因型频率降低, AG基因型频率增高($P < 0.01$, 表1)。进一步分析发现rs1052576基因型频率与患者淋巴结转移有关(表2)。

3 讨论

胃癌是我国最常见的消化道肿瘤, 全国平均年

创新盘点
本文应用免疫印记方法发现在70例胃癌中有36例出现caspase 9基因表达的明显下调。进一步分析rs1052576基因型频率在胃癌患者中的分布, 发现3种基因型的分布与胃癌患者的性别及分化程度无关, 与淋巴结转移相关。

相关报道

有研究表明,在胃癌、皮肤黑色素瘤和白血病中都发现了caspase 9基因转录和翻译水平的下调.非小细胞肺癌中caspase 9基因的单核苷酸多态位点rs1052576的等位基因频率和基因型频率的分布与正常人群存在差异.

表 1 胃癌患者rs1052576SNP位点基因型频率和等位基因频率(n, %)

分组	n	基因型频率			等位基因频率	
		GG	AG	AA	G	A
患者组	70	16 (22.9)	39 (55.7)	15 (21.4)	71 (52.1)	69 (47.9)
对照组	100	13 (13.0)	42 (42.0)	45 (45.0)	68 (34.0)	132 (66.0)

$P < 0.01$ vs 对照组.

表 2 rs1052576基因型频率和胃癌临床特征的关系

临床特征	rs1052576			χ^2	P
	GG	AG	AA		
男	10	28	9	0.89	0.64
女	6	11	6		
高分化	2	3	4	3.82	0.43
中分化	2	4	2		
低分化	12	32	9		
淋巴结转移					
(+)	12	29	5	8.88	0.01
(-)	4	10	10		

死亡率16/10万,高发区达60/10万.胃癌的发生、发展是一个多因素、多基因作用的复杂过程.对细胞凋亡的耐受是肿瘤细胞逃避化疗药物治疗和免疫介导破坏的一个潜在机制.对于大多数抗肿瘤药物,细胞凋亡始于细胞色素C/Apaf-1/caspase 9途径^[5-6].失去激活细胞凋亡途径可以导致细胞对多种化疗药物的耐受.在dATP和ATP的作用下,Apaf-1/细胞色素C复合物通过CARD-CARD结构域相互作用与caspase 9前体结合,从而激活caspase 9,即成熟caspase 9从凋亡小体中释放出来^[7-9].一旦与Apaf-1结合,caspase 9就会被细胞色素C和dATP激活,进一步激活caspase 3,从而引起细胞凋亡.caspase 3的激活依赖于caspase 9.

caspase 9基因定位于1p36.3-p36.1,编码的蛋白产物分子量约为46 kDa,广泛表达于人类的正常组织,如神经组织、肌肉组织、肝脏、脾脏、胃和肺等^[10].有研究表明,在胃癌、皮肤黑色素瘤和白血病中都发现caspase 9基因转录和翻译水平的下调^[11-12],目前国内尚未有该基因在胃癌中的表达研究.我们应用免疫印记方法发现在70例胃癌中有36例出现了caspase 9基因表达的明显下调,在癌旁正常对照胃黏膜组织

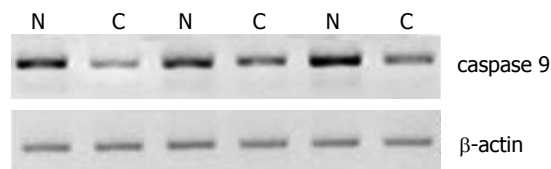


图 1 胃癌caspase 9的表达. N: 正常胃黏膜; C: 胃癌.

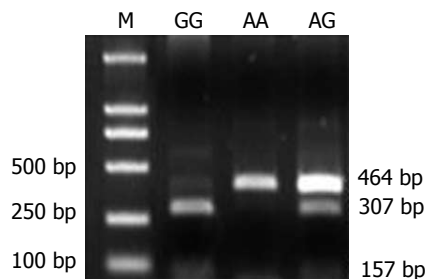


图 2 rs1052576 BstU I 酶切不同基因型.

却未发现明显改变,二者对比差异有统计学意义,提示凋亡基因caspase 9基因与胃癌的发生相关.另有研究表明,非小细胞肺癌中caspase 9基因的单核苷酸多态位点rs1052576的等位基因频率和基因型频率的分布与正常人群存在差异^[13].因此,我们进一步研究该单核苷酸多态在胃癌中的分布情况,利用PCR-RFLP方法对70例胃癌和100例正常人进行了rs1052576位点的基因型分析.结果发现,rs1052576位点患者组G等位基因频率高于对照组($\chi^2 = 9.52$, $P < 0.01$).患者组与对照组相比,3种基因型分布频率存在差异($\chi^2 = 10.40$, $P < 0.05$),AA基因型频率降低,AG基因型频率增高.进一步分析rs1052576基因型频率在胃癌患者中的分布,发现3种基因型的分布与胃癌患者的性别及分化程度无关,与淋巴结转移相关($\chi^2 = 8.88$, $P = 0.01$),提示rs1052576(Gln221Arg)位点位于caspase 9基因第5外显子,编码的氨基酸位于CASC结构域.rs1052576位点的G等位基因与胃癌的发生相关,可能是由于蛋白质空间结构的不同,影响其在线粒体介导的凋亡caspase 3的激活,进而阻碍正常的细胞凋亡过程,引起胃癌的发生.因此,在胃癌易感人群中筛查rs1052576位点的G等位基因有利于胃癌的早期诊断与预防.rs1052576位点AG基因型与淋巴结转移有关,可能作为判断患者病情的新指标.

胃癌的发生发展涉及到很多凋亡基因的异常.我们将进一步研究caspase 9在胃癌的作用机制,随着研究的深入可能为其早期临床基因诊断及患者预后的判断提供新的指标,为基因治

应用要点

在胃癌易感人群中筛查rs1052576位点的G等位基因有利于胃癌的早期诊断与预防.rs1052576位点AG基因型与淋巴结转移有关,可能作为判断患者病情的新指标.

疗提供新的靶点.

4 参考文献

- 1 Correa P, Schneider BG. Etiology of gastric cancer: what is new? *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005; 14: 1865-1868
- 2 Kountouras J, Zavos C, Chatzopoulos D. New concepts of molecular biology on gastric carcinogenesis. *Hepatogastroenterology* 2005; 52: 1305-1312
- 3 Soengas MS, Capodiceci P, Polsky D, Mora J, Esteller M, Opitz-Araya X, McCombie R, Herman JG, Gerald WL, Lazebnik YA, Cordon-Cardo C, Lowe SW. Inactivation of the apoptosis effector Apaf-1 in malignant melanoma. *Nature* 2001; 409: 207-211
- 4 Fu WN, Bertoni F, Kelsey SM, McElwaine SM, Cotter FE, Newland AC, Jia L. Role of DNA methylation in the suppression of Apaf-1 protein in human leukaemia. *Oncogene* 2003; 22: 451-455
- 5 Cecconi F, Alvarez-Bolado G, Meyer BI, Roth KA, Gruss P. Apaf1 (CED-4 homolog) regulates programmed cell death in mammalian development. *Cell* 1998; 94: 727-737
- 6 Fortin A, Cregan SP, MacLaurin JG, Kushwaha N, Hickman ES, Thompson CS, Hakim A, Albert PR, Cecconi F, Helin K, Park DS, Slack RS. APAF1 is a key transcriptional target for p53 in the regulation of neuronal cell death. *J Cell Biol* 2001; 155: 207-216
- 7 Robles AI, Bemmels NA, Foraker AB, Harris CC. APAF-1 is a transcriptional target of p53 in DNA damage-induced apoptosis. *Cancer Res* 2001; 61: 6660-6664
- 8 Ho AT, Li QH, Hakem R, Mak TW, Zacksenhaus E. Coupling of caspase-9 to Apaf1 in response to loss of pRb or cytotoxic drugs is cell-type-specific. *EMBO J* 2004; 23: 460-472
- 9 Zou H, Henzel WJ, Liu X, Lutschg A, Wang X. Apaf-1, a human protein homologous to *C. elegans* CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3. *Cell* 1997; 90: 405-413
- 10 Lemaire C, Godefroy N, Costina-Parvu I, Rincheval V, Renaud F, Trotot P, Bouleau S, Mignotte B, Vayssiere JL. Caspase-9 can antagonize p53-induced apoptosis by generating a p76(Rb) truncated form of Rb. *Oncogene* 2005; 24: 3297-3308
- 11 Frank O, Brors B, Fabarius A, Li L, Haak M, Merk S, Schwindel U, Zheng C, Muller MC, Gretz N, Hehlmann R, Hochhaus A, Seifarth W. Gene expression signature of primary imatinib-resistant chronic myeloid leukemia patients. *Leukemia* 2006; 20: 1400-1407
- 12 Kuwahara D, Tsutsumi K, Oyake D, Ohta T, Nishikawa H, Koizuka I. Inhibition of caspase-9 activity and Apaf-1 expression in cisplatin-resistant head and neck squamous cell carcinoma cells. *Auris Nasus Larynx* 2003; 30 Suppl: S85-88
- 13 Lou Y, Fang CQ, Li JH. A study on the expression of CASP9 gene and its polymorphism distribution in non-small cell lung cancer. *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi* 2007; 24: 59-62

同行评价
本文选题新颖, 分析有据, 数据可信, 有较好的学术价值.

编辑 程剑侠 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 •

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)

多层螺旋CT和血清肿瘤标志物对胃癌术前评估的价值

严超, 朱正纲, 燕敏, 陈克敏, 陈军, 刘炳亚, 尹浩然, 林言箴

背景资料
准确的胃癌术前评估是胃癌外科综合治疗方案实施的需要。在术前评估的基础上, 不同分期的胃癌患者可选择相应的治疗方案。随着多层螺旋CT(MSCT)扫描技术和检查方法的改进, 其对胃癌术前分期的准确率得到明显提高, 与此同时, 肿瘤标志物对胃癌的诊断、预后和复发类型的判断有一定的价值。有研究显示多种血清肿瘤标志物的表达水平与胃癌患者的临床分期密切相关。

严超, 朱正纲, 燕敏, 陈军, 刘炳亚, 尹浩然, 林言箴, 上海交通大学医学院附属瑞金医院普外科 上海消化外科研究所 上海市 200025

陈克敏, 上海交通大学医学院附属瑞金医院放射科 上海市 200025

严超, 临床医学博士, 主治医师, 主要从事胃癌外科综合治疗的基础与临床研究。

通讯作者: 朱正纲, 200025, 上海市, 上海交通大学医学院附属瑞金医院普外科、上海消化外科研究所。zgz1954@hotmail.com
电话: 021-64370045-666051

收稿日期: 2007-06-30 修回日期: 2007-09-29

Clinical significance of multi-slice spiral CT and serum tumor markers in the preoperative assessment of gastric carcinoma

Chao Yan, Zheng-Gang Zhu, Min Yan, Ke-Min Chen, Jun Chen, Bing-Ya Liu, Hao-Ran Yin, Yan-Zhen Lin

Chao Yan, Zheng-Gang Zhu, Min Yan, Jun Chen, Bing-Ya Liu, Hao-Ran Yin, Yan-Zhen Lin, Department of General Surgery, Ruijin Hospital, Medical College of Shanghai Jiaotong University, Shanghai Institute of Digestive Surgery, Shanghai 200025, China

Ke-Min Chen, Department of Radiology, Ruijin Hospital, Medical College of Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200025, China

Correspondence to: Zheng-Gang Zhu, Shanghai Institute of Digestive Surgery, Department of General Surgery, Ruijin Hospital, Medical College of Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200025, China. zgz1954@hotmail.com
Received: 2007-06-30 Revised: 2007-09-29

Abstract

AIM: To investigate the value of multi-slice spiral CT (MSCT) and serum tumor markers in the preoperative assessment of gastric carcinoma.

METHODS: MSCT was performed preoperatively in 220 patients with gastric carcinoma confirmed by biopsy, and the results were compared with surgical pathological findings. In addition, preoperative serum tumor marker levels of CA125, CA19-9, CA72-4, CEA and AFP were measured, and the correlation between tumor marker levels and clinicopathological parameters of gastric carcinoma was analyzed.

RESULTS: The overall accuracy of MSCT in

preoperative T staging of gastric carcinoma was 78.64%. The overall accuracy of MSCT in preoperative N staging of gastric carcinoma was 74.09%. The diagnostic sensitivity, specificity and accuracy of MSCT for determining distant metastases of gastric carcinoma were 65.63%, 99.47% and 94.55%, respectively. The diagnostic sensitivity of MSCT was 83.33% for hepatic metastasis, 33.33% for peritoneal metastasis, and 78.57% for distant lymph node metastasis. The overall accuracy of MSCT for determination of TNM stage of gastric carcinoma was 58.54%. The accuracy of MSCT in evaluating resectability of gastric carcinoma was 91.36%. Receiver operating characteristics analysis showed that the accuracy of serum CA125 for determination of depth of invasion, distant metastasis, peritoneal metastasis, and TNM stage of gastric carcinoma was relatively high. The accuracy of serum CA19-9 for determination of surgical resectability was relatively high. In addition, the accuracy of serum CA72-4 for determination of peritoneal and distant lymph node metastasis of gastric carcinoma was relatively high. The recommended cut-off value of serum CEA and AFP was 10 µg/L and 11 µg/L, respectively. The serum CEA level was closely related to gender, maximum diameter of gastric carcinoma, histological type, depth of invasion, distant metastasis, distant lymph node metastasis, and TNM stage. However, there was no significant correlation between serum AFP level and age, gender, tumor location, maximum tumor diameter, histological type, depth of invasion, lymph node, distant, hepatic, peritoneal and distant lymph node metastasis, TNM stage; and surgical resectability.

CONCLUSION: The clinical value of MSCT and serum CA125, CA19-9, CA72-4 and CEA in the preoperative assessment of gastric carcinoma is relatively high. However, serum AFP has limited value in the preoperative assessment of gastric carcinoma.

Key Words: Stomach neoplasms; Computed tomography; Multi-slice spiral CT; Tumor marker

Yan C, Zhu ZG, Yan M, Chen KM, Chen J, Liu BY, Yin HR, Lin YZ. Clinical significance of multi-slice spiral CT

and serum tumor markers in the preoperative assessment of gastric carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007; 15(30): 3194-3203

摘要

目的: 探讨多层螺旋CT(multi-slice spiral CT, MSCT)和血清肿瘤标志物对胃癌术前评估的价值。

方法: 对220例活检证实的胃癌患者术前行MSCT检查, 并将其结果与手术病理结果对照。同时, 术前检测该220例患者血清中肿瘤标志物CA125, CA19-9, CA72-4, CEA和AFP的水平, 并分析其与胃癌临床病理特征的关系。

结果: MSCT对胃癌T和N分期的判断准确率分别为78.64%和74.09%, 对胃癌远处转移判断的敏感度、特异度和准确率分别为65.63%, 99.47%和94.55%, 对胃癌肝脏、腹膜和远处淋巴结转移判断的敏感度及TNM分期和可切除性的判断准确率分别为83.33%, 33.33%和78.57%, 58.54%和91.36%。采用ROC分析评价时, 血清CA125对胃癌浸润深度、远处转移、腹膜转移和TNM分期判断的准确率均较高, 血清CA19-9对胃癌可切除性判断的准确率较高, 血清CA72-4对胃癌腹膜转移和远处淋巴结转移判断的准确率均较高。当10 $\mu\text{g/L}$ 和11 $\mu\text{g/L}$ 分别作为血清CEA和AFP的临界值时, 血清CEA水平与患者性别、胃癌最大径、组织学类型、浸润深度、远处转移、远处淋巴结转移和TNM分期密切相关, 但血清AFP水平与患者年龄、性别、肿瘤部位、肿瘤最大径、组织学类型、浸润深度、转移、TNM分期和可切除性均无关。

结论: 多层螺旋CT和血清肿瘤标志物CA125, CA19-9, CA72-4和CEA对胃癌术前评估具有较大的临床应用价值, 但血清AFP对胃癌术前评估的价值有限。

关键词: 胃肿瘤; 体层摄影术, 多层螺旋CT; 肿瘤标志物

严超, 朱正纲, 燕敏, 陈克敏, 陈军, 刘炳亚, 尹浩然, 林言箴. 多层螺旋CT和血清肿瘤标志物对胃癌术前评估的价值. *世界华人消化杂志* 2007;15(30):3194-3203
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/3194.asp>

0 引言

准确的胃癌术前评估是胃癌外科综合治疗方案实施的需要, 在术前评估的基础上, 不同分期的

胃癌患者可选择相应的治疗方案。随着多层螺旋CT(multi-slice spiral CT, MSCT)扫描技术和检查方法的改进, 其对胃癌术前分期的准确率得到明显提高^[1-7]。Yang *et al*^[7]的研究显示, MSCT对胃癌术前T和N分期的判断准确率分别达到88%和80%。与此同时, 肿瘤标志物对胃癌的诊断、预后和复发类型的判断有一定的价值。有研究显示, 多种血清肿瘤标志物的表达水平与胃癌患者的临床分期密切相关^[8-10]。因此, 本研究旨在探讨MSCT和多种血清肿瘤标志物(CA125, CA19-9, CA72-4, CEA和AFP)对胃癌术前评估的价值。

1 材料和方法

1.1 材料 选取2005-03/2007-05经胃镜活检证实的220例胃癌患者, 男143例, 女77例, 中位年龄55(22-87岁)。癌肿位于下1/3区143例, 中1/3区57例, 上1/3区20例, 分化型胃癌(中高分化腺癌)81例, 未分化型胃癌(低分化腺癌、印戒细胞癌、黏液腺癌)139例。所有患者均于术前2 wk内按照我们既往报道的方法^[11]行MSCT检查, 检查结果由2名放射科医师进行评定。同时, 术前2 wk内抽血, 送检验科测定胃癌患者的血清肿瘤标志物(CA125, CA19-9, CA72-4, CEA和AFP)水平。在220例胃癌患者中, 有193例接受根治或姑息性切除术, 16例行剖腹探查术, 11例行转流手术。对于仅行转流或探查术的病例, 其T₄分期参照探查结果, 伴远处转移者同时参与TNM分期(IV期)研究。对于姑息性切除的病例, 其明显肿大且可疑转移的淋巴结均尽可能予以切除, 术中对肝脏、腹膜和远处淋巴结等可疑转移灶均予活检。因此, 分别有220, 193, 220和205例患者参与胃癌术前T, N, M和TNM分期研究。

1.2 判断标准 胃癌分期采用TNM分期法(UICC第4版)。在MSCT图像上, 正常胃壁厚度一般在5 mm以下; 在增强扫描图像上可呈1-3层结构^[12], 胃癌则表现为胃壁增厚和(或)胃壁异常增强。MSCT判断胃癌浸润深度的标准参照文献^[12], 但对T₄期胃癌的诊断在胃癌与邻近脏器间的脂肪层消失的基础上, 需合并邻近脏器内CT值的改变。在MSCT图像上胃周淋巴结短径超过6 mm和胃周外淋巴结短径超过8 mm视为转移淋巴结^[13]。当MSCT发现第12组以上转移淋巴结、肝脏转移灶、腹水等, 均视为远处转移(M₁)。血清CA125, CA19-9, CA72-4, CEA和AFP的推荐临界值分别为35 kU/L, 37 kU/L,

研发前沿
胃癌术前分期采用的方法包括影像学及相关分子生物学检查方法。在影像学检查方法中MSCT对胃癌术前分期的价值越来越受到重视, 其是否能成为胃癌术前分期的首选方法则有待进一步开展其与其他影像学检查方法的对比研究, 以明确。分子生物学检查方法中最简单实用的无疑是对血清中胃癌转移相关指标的检测, 所以筛查血清中与胃癌进展程度密切相关的指标具有重要的临床意义。

相关报道

Chen *et al* 的研究显示,应用16排螺旋CT轴位图像对胃癌术前T和N分期判断的准确率分别为73%和71%,但结合分析多层重建(MPR)图像时可分别达89%和78%。Yang *et al* 的研究显示,通过综合分析64排螺旋CT轴位和MPR图像对胃癌术前T和N分期的判断准确率分别达到88%和80%。该两项研究充分说明,MSCT由于其扫描技术的进步,对胃癌术前分期的准确率得到明显提高,有望成为胃癌术前分期的首选方法。

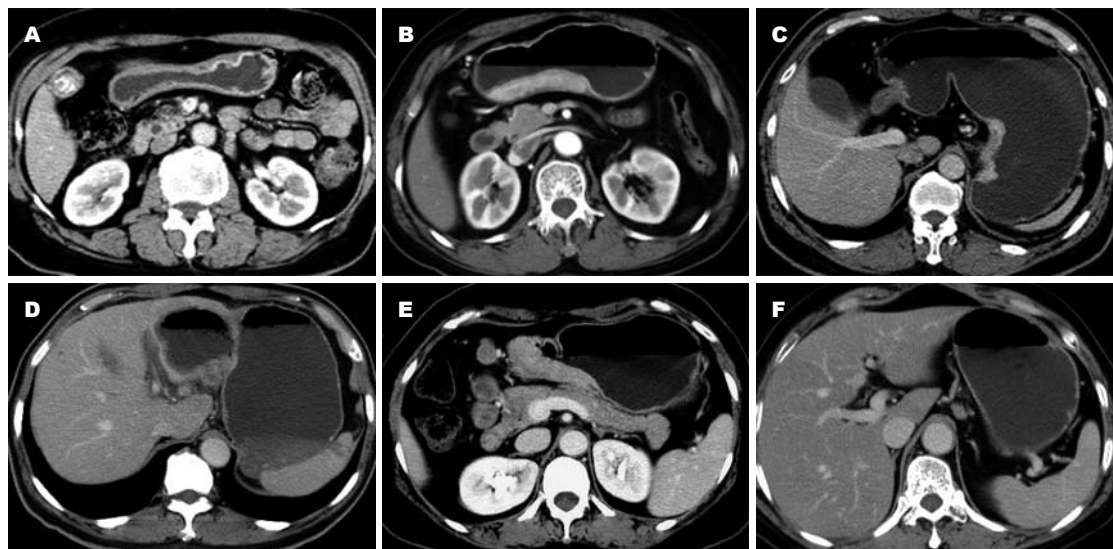


图1 胃癌MSCT增强扫描图例。A: T₁期胃癌,胃体下部近胃角小弯处可见一溃疡型病灶(箭头所指处),内层显著强化,中间低密度带正常;B: T₂期胃癌,胃角处可见一弥漫浸润型病灶(箭头所指处),浆膜面光滑;C: T₃期胃癌,胃体上部近贲门处可见一溃疡型病灶(箭头所指处),局部浆膜面不规则;D: T₄期胃癌,胃体部可见一溃疡型病灶(箭头所指处),浸润左肝;E: T₃N₁期胃癌,胃窦部可见一溃疡浸润型病灶(白色单箭头所指处),白色双箭头所指处为第4组转移淋巴结,黑色箭头所指处为第6组转移淋巴结;F: N₂期胃癌,胃左动脉旁可见一枚肿大的第7组转移淋巴结(箭头所指处)。

表1 220例胃癌患者MSCT与病理T分期的对照

病理分期	n	MSCT分期				
		T ₁	T ₂	T ₃	T ₄	准确率(%)
T ₁	47	37	5	5	0	78.72
T ₂	29	5	12	11	1	41.38
T ₃	96	2	5	81	8	84.38
T ₄	48	0	0	5	43	89.58

表2 193例胃癌患者MSCT与病理N分期的对照

病理分期	n	MSCT分期			
		N ₀	N ₁	N ₂	准确率(%)
N ₀	76	56	13	7	73.68
N ₁	60	15	41	4	68.33
N ₂	57	2	9	46	80.70

5.3 kU/L, 10 μg/L和11 μg/L, 当测量值超过临界值时判断为阳性。

统计学处理 应用SPSS11.0软件进行数据处理。计量资料用mean±SD表示,采用独立样本t检验或单向方差分析分析胃癌血清肿瘤标志物水平与其临床病理特征的关系。分析胃癌血清肿瘤标志物的阳性率与其临床病理特征的关系采用χ²检验和Fisher确切概率法。P<0.05表示有统计学意义。采用ROC分析评价胃癌血清肿瘤标志物对胃癌浸润深度、淋巴结转移、远处转移、肝脏转移、腹膜转移、远处淋巴结转移、TNM分期和可切除性术前判断的价值,以ROC曲线下面积(Az)评价其价值,当Az=0.5为完全无价值,Az在0.50-0.70之间为价值较低,在0.70-0.90之间具有中等价值,0.90以上具有较高的价值,Az=1为完善的诊断。

2 结果

2.1 多层螺旋CT对胃癌术前评估的价值

MSCT对早期和进展期胃癌的检出率分别为74.47%(35/47)和98.27%(170/173)。MSCT对胃癌T分期的判断准确率为78.64%(173/220),其中T₁为78.72%(37/49),T₂为41.38%(12/29),T₃为84.38%(81/96),T₄为89.58%(43/48)(图1A-E,表1)。MSCT对胃癌N分期的判断准确率为74.09%(143/193),其中N₀为73.68%(56/76),N₁为68.33%(41/60),N₂为80.70%(46/57)(图1E-F,表2)。MSCT判断胃癌淋巴结转移的敏感度、特异度和准确率分别为85.47%(100/117),73.68%(56/76)和80.83%(156/193)。MSCT对胃癌远处转移判断的敏感度、特异度和准确率分别为65.63%(21/32),99.47%(187/188)和94.55%(208/220)。MSCT对胃癌肝脏转移判断的敏感度、特异度和准确率分别为83.33%(5/6),100%(214/214)和99.55%(219/220)。MSCT对胃癌腹膜转移判断的敏感度、特异度和准确率分别为33.33%(6/18),99.50%(201/202)和94.09%(207/220)。MSCT对胃癌远处淋巴结转移判断的敏感度、特异度和准确

表 3 205例胃癌患者MSCT与病理TNM分期的对照

病理分期	n	MSCT分期					
		I a	I b	II	III a	III b	IV
a	39	27	8	3	0	1	0
b	20	7	6	5	2	0	0
	29	2	7	8	7	5	0
a	41	1	1	5	24	8	2
b	35	0	0	2	6	22	5
	41	0	0	0	3	5	33

率分别为78.57%(11/14), 99.51%(205/206)和98.18%(216/220). MSCT对胃癌TNM分期判断的准确率为58.54%(120/205), 其鉴别 I a-IIIa和IIIb-IV期胃癌的准确率为86.83%(178/205)(表3). MSCT对胃癌可切除性判断的敏感度、特异度和准确率为96.37%(186/193), 55.56%(15/27), 91.36%(201/220).

2.2 血清肿瘤标志物对胃癌术前评估的价值 血清CA125水平与胃癌最大径($P<0.01$)、组织学类型($P<0.05$)、浸润深度($P<0.001$)、淋巴结转移($P<0.01$)、远处转移($P<0.01$)、腹膜转移($P<0.05$)、TNM分期($P<0.01$)和可切除性($P<0.05$)密切相关, 但与患者年龄、性别、肿瘤部位、肝脏和远处淋巴结转移无关. 血清CA19-9水平与胃癌最大径($P<0.05$)、浸润深度($P<0.01$)和TNM分期($P<0.05$)密切相关, 但与患者年龄、性别、肿瘤部位、组织学类型、淋巴结转移、远处转移、肝脏转移、腹膜转移、远处淋巴结转移和可切除性无关. 血清CA72-4水平与胃癌最大径($P<0.01$)、浸润深度($P<0.01$)、淋巴结转移($P<0.05$)和TNM分期($P<0.05$)密切相关, 但与患者年龄、性别、肿瘤部位、组织学类型、远处转移、肝脏转移、腹膜转移、远处淋巴结转移和可切除性无关. 血清CEA和AFP水平与患者年龄、性别、肿瘤部位、肿瘤最大径、组织学类型、浸润深度、淋巴结转移、远处转移、肝脏转移、腹膜转移、远处淋巴结转移、TNM分期和可切除性均无关(表4). ROC分析显示, 血清CA125对胃癌浸润深度(浆膜浸润)、远处转移、腹膜转移和TNM分期(I a-IIIa/IIIb-IV)判断的准确率均较高(ROC曲线下面积[Az]分别为0.71, 0.76, 0.79和0.72), 血清CA19-9对胃癌可切除性判断的准确率较高(ROC曲线下面积[Az]为0.71), 血清CA72-4对胃癌腹膜转移和远处淋巴结转移判断的准确率均较高(ROC曲线下面积[Az]分别为0.73和0.76)(图2).

当35 kU/L, 37 kU/L, 5.3 kU/L, 10 μ g/L和11 μ g/L分别作为血清CA125, CA19-9, CA72-4, CEA和AFP的临界值时, 血清CA125水平与胃癌远处转移($P<0.01$)、腹膜转移($P<0.001$)和可切除性($P<0.01$)密切相关, 但与患者年龄、性别、肿瘤部位、肿瘤最大径、组织学类型、浸润深度、淋巴结转移、肝脏转移、远处淋巴结转移和TNM分期无关. 血清CA19-9水平与胃癌最大径($P<0.001$)、浸润深度($P<0.001$)、淋巴结转移($P<0.001$)、远处转移($P<0.01$)、腹膜转移($P<0.05$)、TNM分期($P<0.001$)和可切除性($P<0.001$)密切相关, 但与患者年龄、性别、肿瘤部位、组织学类型、肝脏转移和远处淋巴结转移无关. 血清CA72-4水平与胃癌最大径($P<0.001$)、浸润深度($P<0.001$)、淋巴结转移($P<0.01$)、远处转移($P<0.01$)、腹膜转移($P<0.01$)、远处淋巴结转移($P<0.05$)、TNM分期($P<0.001$)和可切除性($P<0.05$)密切相关, 但与患者年龄、性别、肿瘤部位、组织学类型和肝脏转移无关. 血清CEA水平与患者性别($P<0.05$)、胃癌最大径($P<0.05$)、组织学类型($P<0.05$)、浸润深度($P<0.05$)、远处转移($P<0.01$)、远处淋巴结转移($P<0.01$)和TNM分期($P<0.001$)密切相关, 但与患者年龄、肿瘤部位、淋巴结转移、肝脏转移、腹膜转移和可切除性均无关. 血清AFP水平与患者年龄、性别、肿瘤部位、肿瘤最大径、组织学类型、浸润深度、淋巴结转移、远处转移、肝脏转移、腹膜转移、远处淋巴结转移、TNM分期和可切除性均无关(表5).

3 讨论

胃癌术前分期是实施胃癌外科综合治疗方案的需要, 在胃癌术前评估的基础上, 不同分期可选择相应的治疗方案. 对于 I a和Ib期胃癌, 其手术效果非常好, 部分胃黏膜癌因其淋巴结转移率极低还可行局限性切除术(如EMR或LPG等). 对于 II 和IIIa 期胃癌, 其淋巴结转移可能性较大, 但该组病例行根治性手术的效果较好, 且多能实现R₀切除, 故其治疗以根治性手术为主. 对于 IIIb 和IV期胃癌, 单纯手术往往难以达到根治目的, 常存在肉眼或镜下残留灶, 所以多为姑息性切除且不能明显改善预后, 对于这部分病例有必要行新辅助化疗等术前治疗, 待肿瘤体积或转移灶得以适当控制后再考虑手术^[14-18]. 因此, 准确的术前分期对选择合理的胃癌治疗方案至

创新盘点
本文通过对大组病例研究充分肯定了MSCT在胃癌术前评估中的价值, 同时表明MSCT对胃癌腹膜转移判断的敏感度较低, 有待联合腹腔镜等检查方法以提高判断准确率. 本文详尽分析了胃癌各临床病理因素与多种血清肿瘤标志物的关系, 进一步明确了各肿瘤标志物的临床应用价值.

应用要点

MSCT对胃癌术前评估具有较大的临床应用价值,如联合检测血清肿瘤标志物CA125、CA19-9、CA72-4和CEA能进一步提高胃癌术前分期的准确率,但血清AFP对胃癌术前评估的价值有限。

表 4 胃癌患者血清肿瘤标志物水平与其临床病理特征的关系

临床病理因素	<i>n</i>	CA125 (kU/L)	<i>P</i> 值	CA19-9 (kU/L)	<i>P</i> 值	CA72-4 (kU/L)	<i>P</i> 值	CEA (μg/L)	<i>P</i> 值	AFP (μg/L)	<i>P</i> 值
年龄(岁)			0.531		0.301		0.382		0.162		0.813
< 61	125	15.52 ± 20.92		143.83 ± 574.82		12.92 ± 46.55		3.81 ± 8.69		4.49 ± 12.84	
61	95	17.34 ± 21.74		285.39 ± 1378.58		8.49 ± 18.64		34.82 ± 214.41		4.16 ± 4.84	
性别			0.521		0.314		0.332		0.281		0.583
女性	77	17.57 ± 24.35		323.96 ± 1536.60		14.81 ± 47.94		3.16 ± 9.68		3.84 ± 4.01	
男性	143	15.63 ± 19.43		140.88 ± 527.92		8.96 ± 29.79		24.76 ± 175.07		4.63 ± 12.28	
肿瘤部位			0.950		0.135		0.218		0.714		0.590
下1/3	143	16.10 ± 22.00		120.10 ± 510.79		8.89 ± 27.49		22.93 ± 174.85		4.82 ± 12.41	
中1/3	57	17.06 ± 22.58		433.31 ± 1776.18		18.24 ± 58.27		7.53 ± 22.25		3.76 ± 3.45	
上1/3	20	15.66 ± 8.93		160.91 ± 393.36		5.54 ± 6.27		3.83 ± 4.06		2.65 ± 1.15	
肿瘤最大径(cm)			0.004		0.018		0.001		0.875		0.118
< 5	121	12.44 ± 15.46		45.25 ± 264.56		3.00 ± 4.61		18.57 ± 177.92		3.28 ± 1.86	
5	99	21.03 ± 25.98		400.16 ± 1447.87		20.79 ± 53.70		15.53 ± 77.17		5.66 ± 1.96	
组织学类型			0.016		0.484		0.057		0.403		0.724
分化型	81	12.62 ± 9.40		142.67 ± 499.70		6.10 ± 10.18		6.72 ± 19.15		4.03 ± 5.38	
未分化型	139	18.46 ± 25.54		241.26 ± 1204.54		13.87 ± 45.92		23.3 ± 177.32		4.54 ± 12.14	
浸润深度			0.000		0.005		0.001		0.116		0.245
T _{1/2}	76	9.92 ± 7.37		14.16 ± 55.30		2.68 ± 4.54		2.16 ± 2.70		3.25 ± 2.03	
T _{3/4}	144	19.68 ± 20.09		305.66 ± 1229.71		15.40 ± 45.25		25.14 ± 174.53		4.93 ± 12.46	
淋巴结转移			0.006		0.088		0.013		0.097		0.287
N ₀	76	10.69 ± 8.57		67.99 ± 499.43		3.00 ± 5.83		2.06 ± 2.39		3.45 ± 3.24	
N _{1/2}	117	15.52 ± 13.52		295.88 ± 1294.13		12.31 ± 39.15		13.06 ± 71.09		5.19 ± 13.65	
远处转移			0.008		0.249		0.064		0.178		0.992
M ₀	188	13.09 ± 11.51		172.73 ± 990.04		7.39 ± 25.67		4.26 ± 12.79		4.35 ± 10.75	
M ₁	32	35.22 ± 44.25		394.31 ± 1078.53		32.23 ± 72.35		93.25 ± 365.25		4.33 ± 5.85	
肝脏转移			0.309		0.664		0.800		0.395		0.752
无	214	16.06 ± 21.21		209.89 ± 1017.46		10.90 ± 37.56		14.04 ± 134.30		4.39 ± 10.31	
有	6	25.03 ± 22.47		29.05 ± 28.44		14.80 ± 18.84		129.75 ± 304.25		3.05 ± 0.77	
腹膜转移			0.019		0.257		0.092		0.757		0.732
无	202	13.56 ± 11.89		173.54 ± 963.72		7.78 ± 25.21		18.08 ± 147.55		4.42 ± 10.60	
有	18	47.16 ± 55.20		557.54 ± 1362.98		47.24 ± 93.58		7.28 ± 16.60		3.56 ± 2.03	
远处淋巴结转移			0.523		0.425		0.096		0.191		0.675
无	206	16.07 ± 21.67		190.83 ± 1006.77		7.87 ± 25.06		4.48 ± 13.12		4.27 ± 10.29	
有	14	19.82 ± 14.84		412.84 ± 971.43		57.84 ± 104.08		204.43 ± 542.31		5.46 ± 8.58	

TNM分期				0.004		0.032		0.030		0.127		0.165
a-	a	129	12.22 ± 12.29		56.03 ± 387.87		5.34 ± 23.53		2.30 ± 2.73		3.42 ± 2.64	
b,		76	23.33 ± 30.93		462.35 ± 1598.14		19.01 ± 50.83		44.61 ± 239.25		6.16 ± 16.88	
可切除性				0.025		0.963		0.140		0.350		0.550
否		27	35.54 ± 47.90		196.54 ± 452.53		27.92 ± 64.83		77.76 ± 376.09		3.25 ± 1.65	
是		193	13.62 ± 12.03		206.14 ± 1059.12		8.64 ± 30.98		8.73 ± 55.54		4.50 ± 10.84	

表 5 胃癌患者血清肿瘤标志物水平与其临床病理特征的关系

临床病理因素	n	CA125 (kU/L)		P值	CA19-9 (kU/L)		P值	CA72-4 (kU/L)		P值	CEA (μg/L)		P值	AFP (μg/L)		P值
		-	+		-	+		-	+		-	+		-	+	
年龄(岁)				0.411			0.268			0.48			0.398			1.000
< 61	125	118	7		100	25		95	30		117	8		122	3	
61	95	87	8		70	25		76	19		86	9		92	3	
性别				0.674			0.399			0.285			0.037			1.000
女性	77	71	6		62	15		63	14		75	2		75	2	
男性	143	134	9		108	35		108	35		128	15		139	4	
肿瘤部位				0.327			0.923			0.681			0.624			0.582
下1/3	143	131	12		110	33		112	31		133	10		138	5	
中1/3	57	54	3		45	12		45	12		51	6		56	1	
上1/3	20	20	0		15	5		14	6		19	1		20	0	
肿瘤最大径(cm)				0.081			0.000			0			0.027			0.093
< 5	121	116	5		106	15		107	14		116	5		120	1	
5	99	89	10		64	35		64	35		87	12		94	5	
组织学类型				0.162			0.596			0.307			0.018			0.672
分化型	81	78	3		61	20		66	15		75	6		78	3	
未分化型	139	127	12		109	30		105	34		128	11		136	3	
浸润深度				0.073			0.000			0			0.040			0.667
T _{1/2}	76	74	2		72	4		71	5		74	2		75	1	
T _{3/4}	144	131	13		98	46		100	44		129	15		139	5	
淋巴结转移				0.487			0.000			0.002			0.067			1.000
N ₀	76	74	2		72	4		69	7		74	2		74	2	
N _{1/2}	117	110	7		86	31		85	32		106	11		113	4	
远处转移				0.002			0.002			0.002			0.005			1.000
M ₀	188	180	8		152	36		153	35		178	10		183	5	
M ₁	32	25	7		18	14		18	14		25	7		31	1	
肝脏转移				0.349			0.621			0.617			0.070			1.000
无	214	200	14		166	48		167	47		199	15		208	6	
有	6	5	1		4	2		4	2		4	2		6	0	
腹膜转移				0.000			0.036			0.001			0.636			1.000
无	202	193	9		160	42		163	39		187	15		196	6	
有	18	12	6		10	8		8	10		16	2		18	0	
远处淋巴结转移				1.000			0.093			0.017			0.002			0.329
无	206	192	14		162	44		164	42		194	12		201	5	
有	14	13	1		8	6		7	7		9	5		13	1	
TNM分期				0.107			0.000			0			0.000			0.197
a-	a	129	123	6		116	13		114	15		126	3		127	2
b,		76	68	8		48	28		47	29		64	12		72	4
可切除性				0.005			0.000			0.049			0.139			1.000
否		27	21	6		12	15		17	10		23	4		27	0
是		193	184	9		158	35		154	39		180	13		187	6

名词解释
 1 CA125: 糖链蛋白125是一种大分子多聚糖蛋白, 存在于上皮性卵巢癌组织和患者的血清中, 主要用于辅助诊断恶性浆液性卵巢癌和上皮性卵巢癌, 同时也是卵巢癌疗效观察的指标。
 2 CA19-9: 糖链蛋白19-9又称胃肠癌相关抗原, 在正常人的分泌物如唾液、精液、乳汁和消化液中存在, 目前认为检测血清CA19-9可作为胰腺癌和胆道癌等恶性肿瘤的辅助诊断指标, 对监测病情变化和复发有较大价值。
 3 CA72-4: 糖链蛋白72-4是胃肠道肿瘤和卵巢癌的标志物。
 4 CEA: 癌胚抗原最初发现于成人结肠癌组织中, 是一种结构复杂的可溶性糖蛋白, 胚胎期主要存在于胎儿的胃肠道、胰腺和肝脏, 出生后明显降低, CEA是一种广谱肿瘤标志物, 在恶性肿瘤的鉴别诊断、病情监测和疗效评价等方面有重要价值。
 5 AFP: 甲胎蛋白是胎儿发育早期, 由肝脏和卵黄囊合成的一种血清糖蛋白, 胎儿出生后不久即逐渐消失, 1964年Tatarinov报道肝癌患者血清中AFP升高, 目前检测血清中AFP是临床上诊断肝癌的重要指标。

关重要。

CT常作为判断胃癌远处转移(M分期)的方法, 其对胃癌术前T、N分期的临床应用价值长

期以来存在较大的争议。但是, 目前由于多层螺旋CT扫描技术的发展和检查方法的改进, 明显提高了CT对胃癌术前T、N分期的准确率。因

同行评价
本文研究设计合理, 方法得当, 其结果对临床工作有一定指导意义.

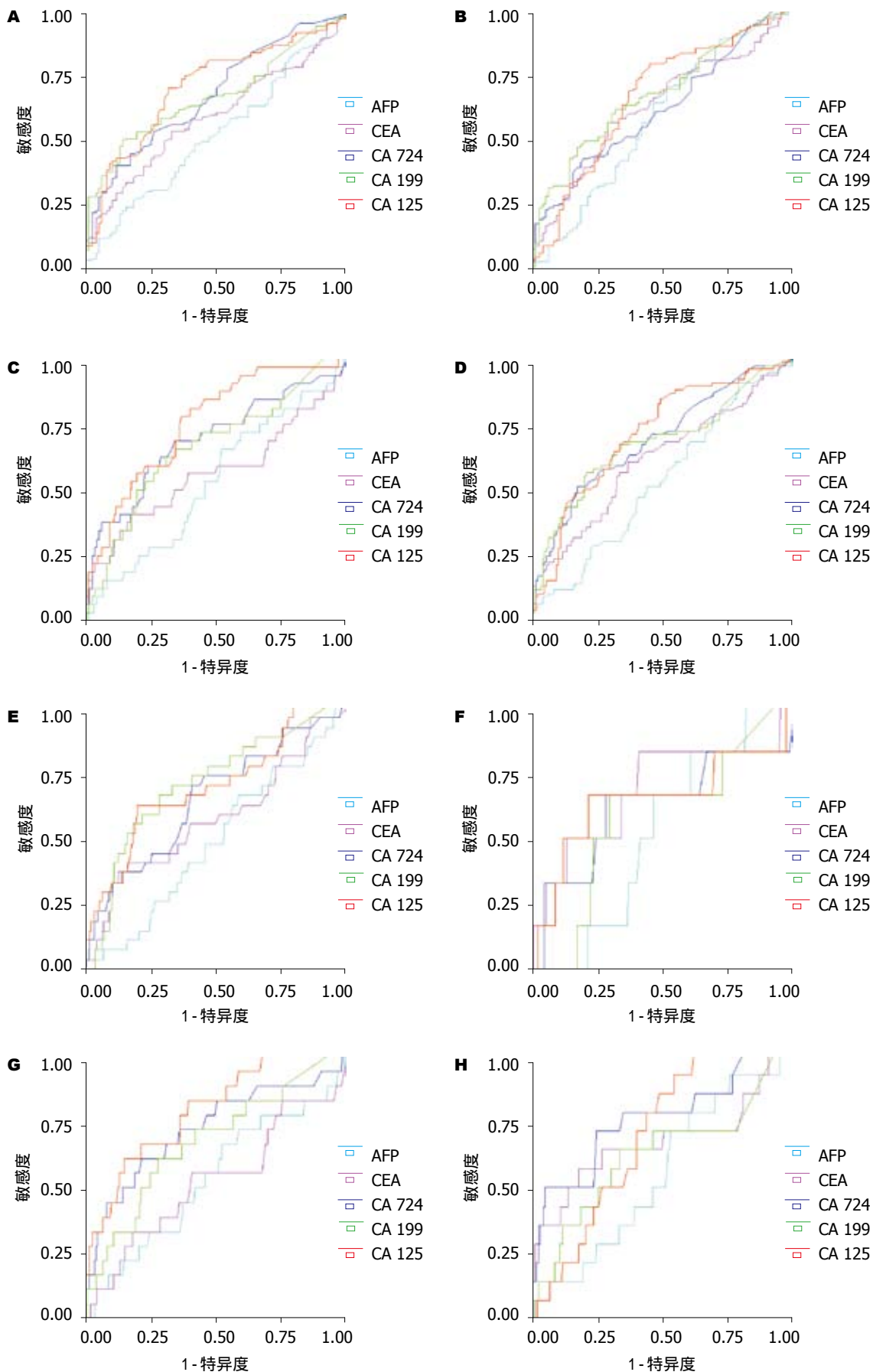


图 2 血清肿瘤标志物对胃癌术前评估价值的ROC曲线. A: 浆膜浸润; B: 淋巴结转移; C: 远处转移; D: TNM分期(Ia-IIIa/IIIb-IV); E: 可切除性; F: 肝脏转移; G: 腹膜转移; H: 远处淋巴结转移.

为MSCT扫描速度快,能完成对靶器官的多期扫描,并且可对容积扫描数据进行多层面重建(MPR),甚至可实现CT仿真胃镜检查^[19]. Yang *et al*^[7]的研究显示,MSCT对胃癌术前T和N分期的判断准确率分别达到88%和80%.近期的比较研究亦显示,MSCT对胃癌术前T, N分期的准确率(76%-83.3%和70%-75%)与EUS(86%-87.5%和79.1%-90%)无明显差别^[20-21].我们的一项比较研究亦显示,MSCT有可能代替EUS成为胃癌术前分期的首选方法^[22].

我们的研究显示,MSCT对胃癌术前T, N, M和TNM分期的准确率均较高,其鉴别I a-IIIa和IIIb-IV期胃癌的准确率达86.83%,对胃癌可切除性的判断准确率达91.36%,所以MSCT基本能够满足胃癌外科综合治疗方案实施的需要.但本研究同时显示,MSCT对腹膜转移判断的敏感度仍较低(33.33%),对早期胃癌的检出率偏低(74.47%)并且无法准确鉴别黏膜和黏膜下癌.因此,如能联合内镜超声检查、腹腔镜检查及其他分子生物学检测手段,有望进一步提高胃癌术前分期的准确率^[23-26].

血清CA125水平与胃癌最大径、组织学类型、浸润深度、淋巴结转移、远处转移、腹膜转移、TNM分期和可切除性密切相关.ROC分析进一步显示,血清CA125对胃癌浸润深度、远处转移、腹膜转移和TNM分期(I a-IIIa/III b-IV)判断的准确率均较高.所以,血清CA125水平与胃癌进展程度密切相关,其对胃癌术前评估的临床应用价值较大,但35 kU/L可能并非其最佳工作点.当35 kU/L作为其临界值时,血清CA125水平与胃癌远处转移、腹膜转移和可切除性密切相关,但与肝脏和远处淋巴结转移无关,其对腹膜转移判断的敏感度、特异度和准确率分别达33.33%(6/18), 95.54%(193/202)和90.45%(199/220),其敏感度与MSCT相当. Nakata *et al*^[27]采用35 kU/L作为血清CA125的临界值,结果显示其对胃癌腹膜转移判断的敏感度、特异度和准确率分别达39.39%(13/33), 95.7%(336/351)和90.89%(349/384),敏感度高于CT(21.2%),其结果与本研究结果基本一致.所以,当35 kU/L作为血清CA125的临界值时,其对胃癌腹膜转移判断的特异度非常高,并且可以获得与MSCT相当的敏感度,具有较高的临床应用价值.

ROC分析显示,血清CA19-9对胃癌可切除性判断的准确率较高.当37 kU/L作为血清

CA19-9的临界值时,血清CA19-9水平与胃癌最大径、浸润深度、淋巴结转移、远处转移、腹膜转移、TNM分期和可切除性密切相关,其对胃癌浆膜浸润和淋巴结转移判断的阳性预测值分别达92.0%(46/50), 88.57%(31/35),对胃癌可切除性判断的准确率达78.64%(173/220),对腹膜转移判断的敏感度和特异度分别为44.44%(8/18)和79.21%(160/202). Choi *et al*^[8]的研究进一步显示,术前和术后血清CA19-9水平对胃癌腹膜复发判断的敏感度较高,说明血清CA19-9水平与胃癌进展程度密切相关,其对胃癌术前评估具有一定的临床应用价值.

血清CA72-4水平与胃癌最大径、浸润深度、淋巴结转移和TNM分期密切相关,当5.3 kU/L作为血清CA72-4的临界值时,血清CA72-4水平与胃癌最大径、浸润深度、淋巴结转移、远处转移、腹膜转移、远处淋巴结转移、TNM分期和可切除性密切相关,其对胃癌浆膜浸润和淋巴结转移判断的阳性预测值分别达89.80%(44/49), 82.05%(32/39),对腹膜转移判断的敏感度和特异度分别为55.56%(10/18)和80.69%(163/202),对远处淋巴结转移判断的敏感度和特异度分别为50.0%(7/14)和79.61%(164/206). Louhimo *et al*^[28]的研究显示,术前血清CA72-4水平与胃癌TNM分期密切相关,并且是胃癌患者的独立预后因素,说明血清CA72-4水平与胃癌进展程度密切相关,其对胃癌术前评估具有一定的临床应用价值.

当10 μg/L作为血清CEA的临界值时,血清CEA水平与患者性别、胃癌最大径、组织学类型、浸润深度、远处转移、远处淋巴结转移和TNM分期密切相关,其对远处淋巴结转移判断的敏感度、特异度和准确率分别为35.71%(5/14), 94.17%(194/206)和90.45%(199/220),说明血清CEA水平与胃癌进展程度密切相关,其对胃癌术前评估具有一定的临床应用价值. Marrelli *et al*^[29]的研究显示,术前血清CEA水平与术后血行复发密切相关,但本研究显示血清CEA水平与胃癌肝脏转移无关($P = 0.07$),可能系由于本组肝脏转移病例数较少所致,故有待进一步扩大病例数以明确其关系.血清AFP水平与患者年龄、性别、肿瘤部位、肿瘤最大径、组织学类型、浸润深度、淋巴结转移、远处转移、肝脏转移、腹膜转移、远处淋巴结转移、TNM分期和可切除性均无关.血清AFP阳性的胃癌是一种特殊

类型胃癌,即产AFP胃癌,仅占有胃癌病例的2.7%-4.3%^[3,16]。Ishigami *et al*^[9]的研究显示,产AFP胃癌浸润深度较深、淋巴结转移率高,术后复发者均伴有肝脏转移,预后较差。Kono *et al*^[30]的研究亦显示,产AFP胃癌浸润深度较深、淋巴结转移率高,肝脏转移率高,TNM分期较晚,预后较差。本研究中产AFP胃癌仅有6例(2.73%),其血清AFP阳性率与胃癌各临床病理因素间均无显著相关,并且所有产AFP胃癌患者均未发生同时性肝脏转移,说明血清AFP对胃癌术前评估的价值有限,对于产AFP胃癌的临床病理特征则有待累积病例数以深入研究。

总之,我们认为多层螺旋CT和血清肿瘤标志物CA125, CA19-9, CA72-4和CEA对胃癌术前评估具有较大的临床应用价值,但血清AFP对胃癌术前评估的价值有限。

4 参考文献

- Shin KS, Kim SH, Han JK, Lee JM, Lee HJ, Yang HK, Choi BI. Three-dimensional MDCT Gastrography Compared With Axial CT for the Detection of Early Gastric Cancer. *J Comput Assist Tomogr* 2007; 31: 741-749
- Kim JH, Eun HW, Choi JH, Hong SS, Kang W, Auh YH. Diagnostic performance of virtual gastroscopy using MDCT in early gastric cancer compared with 2D axial CT: focusing on interobserver variation. *AJR Am J Roentgenol* 2007; 189: 299-305
- Chen CY, Wu DC, Kang WY, Hsu JS. Staging of gastric cancer with 16-channel MDCT. *Abdom Imaging* 2006; 31: 514-520
- Shimizu K, Ito K, Matsunaga N, Shimizu A, Kawakami Y. Diagnosis of gastric cancer with MDCT using the water-filling method and multiplanar reconstruction: CT-histologic correlation. *AJR Am J Roentgenol* 2005; 185: 1152-1158
- Chen CY, Hsu JS, Wu DC, Kang WY, Hsieh JS, Jaw TS, Wu MT, Liu GC. Gastric cancer: preoperative local staging with 3D multi-detector row CT--correlation with surgical and histopathologic results. *Radiology* 2007; 242: 472-482
- Kim HJ, Kim AY, Oh ST, Kim JS, Kim KW, Kim PN, Lee MG, Ha HK. Gastric cancer staging at multi-detector row CT gastrography: comparison of transverse and volumetric CT scanning. *Radiology* 2005; 236: 879-885
- Yang DM, Kim HC, Jin W, Ryu CW, Kang JH, Park CH, Kim HS, Jung DH. 64 multidetector-row computed tomography for preoperative evaluation of gastric cancer: histological correlation. *J Comput Assist Tomogr* 2007; 31: 98-103
- Choi SR, Jang JS, Lee JH, Roh MH, Kim MC, Lee WS, Qureshi W. Role of serum tumor markers in monitoring for recurrence of gastric cancer following radical gastrectomy. *Dig Dis Sci* 2006; 51: 2081-2086
- Ishigami S, Natsugoe S, Nakashima H, Tokuda K, Nakajo A, Okumura H, Matsumoto M, Nakashima S, Hokita S, Aikou T. Biological aggressiveness of alpha-fetoprotein (AFP)-positive gastric cancer. *Hepatogastroenterology* 2006; 53: 338-341
- Fujimura T, Kinami S, Ninomiya I, Kitagawa H, Fushida S, Nishimura G, Kayahara M, Shimizu K, Ohta T, Miwa K. Diagnostic laparoscopy, serum CA125, and peritoneal metastasis in gastric cancer. *Endoscopy* 2002; 34: 569-574
- 严超, 朱正纲, 燕敏, 陈克敏, 陈军, 项明, 陈明敏, 刘炳亚, 尹浩然, 林言箴. 进展期胃癌CT征象与其临床病理特征的关系. *外科理论与实践* 2005; 10: 413-418
- Takao M, Fukuda T, Iwanaga S, Hayashi K, Kusano H, Okudaira S. Gastric cancer: evaluation of triphasic spiral CT and radiologic-pathologic correlation. *J Comput Assist Tomogr* 1998; 22: 288-294
- D'Elia F, Zingarelli A, Palli D, Grani M. Hydrodynamic CT preoperative staging of gastric cancer: correlation with pathological findings. A prospective study of 107 cases. *Eur Radiol* 2000; 10: 1877-1885
- 燕敏, 严超. 胃癌术前分期与外科综合治疗. *外科理论与实践* 2006; 11: 481-485
- Napieralski R, Ott K, Kremer M, Becker K, Boulesteix AL, Lordick F, Siewert JR, Hofler H, Keller G. Methylation of tumor-related genes in neoadjuvant-treated gastric cancer: relation to therapy response and clinicopathologic and molecular features. *Clin Cancer Res* 2007; 13: 5095-5102
- Roth AD, Fazio N, Stupp R, Falk S, Bernhard J, Saletti P, Koberle D, Borner MM, Rufibach K, Maibach R, Wernli M, Leslie M, Glynn-Jones R, Widmer L, Seymour M, de Braud F. Docetaxel, cisplatin, and fluorouracil; docetaxel and cisplatin; and epirubicin, cisplatin, and fluorouracil as systemic treatment for advanced gastric carcinoma: a randomized phase II trial of the Swiss Group for Clinical Cancer Research. *J Clin Oncol* 2007; 25: 3217-3223
- den Dulk M, Verheij M, Cats A, Jansen EP, Hartgrink HH, Van de Velde CJ. The essentials of locoregional control in the treatment of gastric cancer. *Scand J Surg* 2006; 95: 236-242
- D'Ugo D, Persiani R, Rausei S, Biondi A, Vigorita V, Boccia S, Ricci R. Response to neoadjuvant chemotherapy and effects of tumor regression in gastric cancer. *Eur J Surg Oncol* 2006; 32: 1105-1109
- Hur J, Park MS, Lee JH, Lim JS, Yu JS, Hong YJ, Kim KW. Diagnostic accuracy of multidetector row computed tomography in T- and N staging of gastric cancer with histopathologic correlation. *J Comput Assist Tomogr* 2006; 30: 372-377
- Bhandari S, Shim CS, Kim JH, Jung IS, Cho JY, Lee JS, Lee MS, Kim BS. Usefulness of three-dimensional, multidetector row CT (virtual gastroscopy and multiplanar reconstruction) in the evaluation of gastric cancer: a comparison with conventional endoscopy, EUS, and histopathology. *Gastrointest Endosc* 2004; 59: 619-626
- Habermann CR, Weiss F, Riecken R, Honarpisheh H, Bohnacker S, Staedtler C, Dieckmann C, Schoder V, Adam G. Preoperative staging of gastric adenocarcinoma: comparison of helical CT and endoscopic US. *Radiology* 2004; 230: 465-471
- 陈军, 严超, 朱正纲, 燕敏, 陈克敏, 诸琦, 刘炳亚, 尹浩然, 林言箴. 内镜超声检查和多层螺旋CT对胃癌术前T、N分期的比较研究. *中国实用外科杂志* 2005; 25: 278-281
- Yan C, Zhu ZG, Zhu Q, Yan M, Chen J, Liu BY, Yin

- HR, Lin YZ. A preliminary study of endoscopic ultrasonography in the preoperative staging of early gastric carcinoma. *Zhonghua Zhongliu Zazhi* 2003; 25: 390-393
- 24 Bentrem D, Gerdes H, Tang L, Brennan M, Coit D. Clinical correlation of endoscopic ultrasonography with pathologic stage and outcome in patients undergoing curative resection for gastric cancer. *Ann Surg Oncol* 2007; 14: 1853-1859
- 25 Song KY, Kim JJ, Kim SN, Park CH. Staging laparoscopy for advanced gastric cancer: is it also useful for the group which has an aggressive surgical strategy? *World J Surg* 2007; 31: 1228-1223
- 26 Yan C, Zhu ZG, Yu YY, Ji J, Zhang Y, Ji YB, Yan M, Chen J, Liu BY, Yin HR, Lin YZ. Expression of vascular endothelial growth factor C and chemokine receptor CCR7 in gastric carcinoma and their values in predicting lymph node metastasis. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 783-790
- 27 Nakata B, Hirakawa-YS Chung K, Kato Y, Yamashita Y, Maeda K, Onoda N, Sawada T, Sowa M. Serum CA 125 level as a predictor of peritoneal dissemination in patients with gastric carcinoma. *Cancer* 1998; 83: 2488-2492
- 28 Louhimo J, Kokkola A, Alfthan H, Stenman UH, Haglund C. Preoperative hCGbeta and CA 72-4 are prognostic factors in gastric cancer. *Int J Cancer* 2004; 111: 929-933
- 29 Marrelli D, Pinto E, De Stefano A, de Manzoni G, Farnetani M, Garosi L, Roviello F. Preoperative positivity of serum tumor markers is a strong predictor of hematogenous recurrence of gastric cancer. *J Surg Oncol* 2001; 78: 253-258
- 30 Kono K, Amemiya H, Sekikawa T, Iizuka H, Takahashi A, Fujii H, Matsumoto Y. Clinico-pathologic features of gastric cancers producing alpha-fetoprotein. *Dig Surg* 2002; 19: 359-365; discussion 365

编辑 程英升 电编 马文华

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

抵抗素基因启动子-420C/G多态性与日本高知地区非酒精性脂肪肝炎的相关性

马瑞宏, 黄颖秋, 西元利治

背景资料
NASH是一种全球性疾病, 常与肥胖、2型糖尿病、脂类代谢异常等多种代谢综合征集结出现。近年来患病率有明显增高趋势。Resistin是Steppan *et al*在研究一类治疗糖尿病新药-噻唑烷二酮类药物作用机制时发现的, 被认为可能使胰岛素作用通路障碍而引发IR。目前resistin的生物学作用还不十分明确, 存在很多争议。

马瑞宏, 黄颖秋, 本溪钢铁(集团)公司总医院消化内科 辽宁省本溪市 117000
西元利治, 高知医科大学消化内科 日本高知市 780-0870
马瑞宏, 2005年佳木斯大学临床医学院消化内科硕士研究生, 2005年赴日本高知医科大学交流学习, 医师, 主要从事非酒精性脂肪肝炎的研究。
通讯作者: 马瑞宏, 117000, 辽宁省本溪市人民路29号, 本溪钢铁(集团)公司总医院消化内科. maruihong120@yahoo.com.cn
电话: 0414-2215138
收稿日期: 2007-08-22 修回日期: 2007-10-04

C/G homozygotes of resistin single nucleotide polymorphism at -420 are associated with non-alcoholic steatohepatitis

Rui-Hong Ma, Ying-Qiu Huang, Sibara Toshiji

Rui-Hong Ma, Ying-Qiu Huang, Department of Gastroenterology, General Hospital of Benxi Iron and Steel Co., Benxi 117000, Liaoning Province, China
Saibara Toshiji, Department of Hepatology and Gastroenterology, Kochi Medical University, Kochi 780-0870, Japan
Correspondence to: Dr. Rui-Hong Ma, Department of Gastroenterology, General Hospital of Benxi Iron and Steel Co., 29 Renmin Road, Benxi 117000, Liaoning Province, China. maruihong120@yahoo.com.cn
Received: 2007-08-22 Revised: 2007-10-04

Abstract

AIM: To investigate the relationship between the C/G genotypes of resistin single nucleotide polymorphism (SNP) at -420 and the development and progression of non-alcoholic steatohepatitis (NASH) in the Kochi area of Japan.

METHODS: Polymerase chain reaction (PCR) and restriction fragment length polymorphism (RFLP) were used to determine a common polymorphism of the human resistin gene, -420C > G, in 107 controls and 77 patients with NASH. In patients with NASH, 12-hour fasting serum resistin level was determined by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). CT was used to assess liver visceral fat infiltration.

RESULTS: Homozygotes for -420G of the resis-

tin gene were more frequent in NASH patients than in controls (0.552 *vs* 0.407, $P < 0.01$). Resistin level was significantly higher in NASH patients homozygous for -420G of the resistin gene than in those with other genotypes ($27.1 \pm 4.7 \mu\text{g/L}$ *vs* $16.4 \pm 6.2 \mu\text{g/L}$, $P < 0.001$). NASH patients homozygous for -420G of the resistin gene were sensitive to the progression not only of impaired glucose tolerance ($OR = 3.80$; 95% CI, 1.14-12.67; $P < 0.05$), but also of liver fibrosis (2.25 ± 0.68 *vs* 1.61 ± 0.65 , $P < 0.02$).

CONCLUSION: The G homozygote of the resistin gene SNP at -420 is associated with NASH in the Kochi area of Japan.

Key Words: Resistin; Single nucleotide polymorphism; Insulin resistance; Nonalcoholic steatohepatitis; Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism

Ma RH, Huang YQ, Toshiji S. C/G homozygotes of resistin single nucleotide polymorphism at -420 are associated with non-alcoholic steatohepatitis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007; 15(30): 3204-3209

摘要

目的: 研究抵抗素(resistin)基因启动子-420C/G多态性与日本高知地区非酒精性脂肪肝炎(Nonalcoholic steatohepatitis, NASH)的相关性。

方法: 应用聚合酶链反应-限制性片段长度多态性(PCR-RFLP)分别检测77例NASH患者和107例正常者resistin基因启动子-420C/G多态性的变异。酶链免疫测定法测定NASH组患者空腹12 h血清resistin水平等, 同时采用HOMA公式评价胰岛素抵抗指数和分泌指数HOMA-IR和HOMA- β , 并用糖负荷30 min净增胰岛素/净增葡萄糖 $\Delta I30/\Delta G30$ 比值评价早期胰岛素分泌反应及应用CT扫描评估内脏及肝脏脂肪浸润面积。

结果: 在校正年龄、性别等因素之后, Resistin基因启动子-420C/G的多态性分析中发现,

NASH患者组的G等位基因频率与正常对照组比较, 差异有显著性(0.552 vs 0.407 , $P < 0.01$). NASH患者组中GG基因型携带者的resistin血浆含量显著高于其他基因型携带者($27.1 \pm 4.7 \mu\text{g/L}$ vs $16.4 \pm 6.2 \mu\text{g/L}$, $P < 0.001$), GG基因型组肝纤维化程度更重(2.25 ± 0.68 vs 1.61 ± 0.65 , $P < 0.02$)且更易发生糖耐量异常($OR = 3.80$, 95%可信区间: $1.14-12.67$, $P < 0.05$).

结论: Resistin基因启动子-420位点的G等位基因与NASH发生发展具有显著相关性.

关键词: 抵抗素; 单核苷酸多态性; 胰岛素抵抗; 非酒精性脂肪肝炎; 聚合酶链反应-限制性片断长度多态性

马瑞宏, 黄颖秋, 西元利治. 抵抗素基因启动子-420C/G多态性与日本高知地区非酒精性脂肪肝炎的相关性. 世界华人消化杂志 2007;15(30):3204-3209
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/3204.asp>

0 引言

非酒精性脂肪肝炎(NASH)是一种代谢综合症, 常合并内脏性肥胖、血脂紊乱、高血压、糖调节异常和2型糖尿病等多元代谢紊乱^[1-2]. 在NASH的发展进程中, 胰岛素抵抗伴随肝细胞脂肪变性被认为是NASH形成的重要影响因素^[3-4]. 已有证据显示, 抵抗素(resistin), 也被称作ADSF(adipocyte secreted factor)或FIZZ3(found in inflammatory zone 3), 可能是通过提升肝糖输出, 削弱胰岛素诱导的葡萄糖转运作用而在引发胰岛素抵抗过程中扮演生理学角色^[5-7], 有可能是导致内脏性肥胖患者肝脏胰岛素抵抗的一种重要细胞因子^[8]. 然而, resistin在代谢类疾病中的确切作用目前还有争议^[9-10], 尚待进一步研究. 我们就resistin基因启动子第-420C/G等位基因单核苷酸多态性与NASH疾病相关性作初步探讨.

1 材料和方法

1.1 材料 选取无亲缘关系的日本高知地区共184人, 其中经肝脏活检证实NASH患者组77例, 男38例, 女39例; 年龄 44 ± 16 岁, BMI: 28.9 ± 4.9 , 正常对照组107例, 男53例, 女54例, 年龄 42 ± 17 , BMI: 22.9 ± 3.3 . NASH患者组为高知医大附属医院消化内科门诊及住院患者. PCR扩增仪是美国应用生物系统公司(ABI)生产的GeneAmp PCR System 9700.

1.2 方法

1.2.1 DNA的制备 两组受试者均提取外周静脉

血白细胞, 用常规法制备DNA. 方法概括为: 抽取受试者外周静脉血3 mL, 经抗凝处理后, 加入9 mL红细胞溶血剂, 红细胞充分溶解后, 再加入2 mL白细胞溶解剂, 隔夜后, 将667 μL 的蛋白质沉淀剂加入上述未出现沉淀等异常现象的溶液内, 离心后取上清液, 加入2-丙醇(2-propanol)2 mL, 振荡至液体澄清, 可见白色絮状物出现, 即为DNA.

1.2.2 肝脏穿刺活组织切片检查 肝活组织检查是在全面临床检查评估后并征得NASH患者同意进行的. 肝活检组织用40 g/L甲醛固定(pH7.4), 经石蜡包埋, 切片用苏木精、伊红染色. 经处理后的活组织切片由病理学者H.E.分析并依据Brunt对NASH病理改变的提议确定病理分期^[1](表1). 依据Chevallier半定量评分系统^[11], 分别对肝脏炎症程度及纤维化进行评分. NASH患者组筛选过程中, 已知使用过甲氨蝶呤、他莫昔芬、肾上腺皮质类固醇、胰岛素的NASH患者, 每日饮酒量超过20 g的脂肪肝患者和患有其他肝脏疾病的患者(病毒性肝炎、血色沉着病、Wilson病和自身免疫性肝病)均被排除在外.

1.2.3 血液实验室检查 对77例NASH患者进行空腹12 h临床血指标检查, 包括应用酶链免疫测定法测定血清resistin水平(Fermentas, Burlington Canada), 同时用全自动生化仪测定血清白蛋白、血清丙氨酸转氨酶(ALT)、血清总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)、高密度脂蛋白(HDL-C)值, 空腹血糖(FPG, 葡萄糖氧化酶法)、空腹胰岛素(FINS, 胰岛素放射免疫试剂盒Fermentas, Burlington Canada, 放射免疫分析法)、糖化血红蛋白(HbA1C, 高效液相法DCA2000+, Bayer Germany)和脱水山梨糖醇1.5-AG浓度(气相层析法, shimadzu, GC-9A). 测量身高、体质量、腰围及血压, 并计算出体质量指数(BMI = 体质量 kg 身高的平方 m^2). 采用稳态模式评估法(HOMA公式)评价胰岛素抵抗指数(HOMA-IR)和胰岛素分泌指数(HOMA- β), 并用糖负荷30 min净增胰岛素/净增葡萄糖($\Delta\text{I30}/\Delta\text{G30}$)比值评价早期胰岛素分泌反应(insulinogenic index), 各参数计算公式如下: $\text{HOMA-IR} = \text{FPG} \times \text{FINS} / 22.5$; $\text{HOMA-}\beta = 20 \times \text{FINS} / (\text{FPG} - 3.5)$; OGTT胰岛素曲线下面积 = $(\text{S}_0 + \text{S}_{180}) + (\text{S}_{30} + \text{S}_{60} + \text{S}_{120}) / 2$, 其中 S_0 , S_{30} , S_{60} , S_{120} , S_{180} 分别代表0, 30, 60, 120, 180 min所测的胰岛素数值.

1.2.4 CT扫描 NASH患者组CT扫描使用螺旋CT(ProSeed, General Electric Yokogawa Medical Systems, Tokyo, Japan), 厚度和间隔均以10 mm

研发前沿
目前更多的研究集中于从生物学作用和基因水平方面来探讨resistin在IR中所扮演的角色, 这为NASH的发病机制提供了新的研究途径, 从而为NASH的治疗带来新的希望.

创新盘点

鉴于resistin生物学特性与NASH的发病机制及发病进程有许多待证实的交叉点,而以往研究多从试验动物着手,本文从临床患者方面研究发现resistin基因启动子-420位点的G等位基因与NASH发生发展具有显著相关性。

表 1 NASH病理分期

级(G)	炎症活动度		纤维化程度	
	汇管区及周围	小叶内	期(S)	纤维化程度
0	无炎症	无炎症	0	无
1	汇管区炎症	变性,点,灶状坏死或嗜酸性小体	1	肝腺泡区静脉旁,肝窦周围和肝细胞周围纤维化,灶性或泛在
2	轻度PN	变性,点,灶状坏死或嗜酸性小体	2	同1,伴灶性或泛在的汇管区纤维化
3	中度PN	融合坏死或见BN	3	桥接纤维化,灶性或泛在
4	重度PN	BN广泛,累及多个小叶(多小叶坏死)	4	在肝硬化

PN: 碎屑坏死; BN: 桥接坏死。

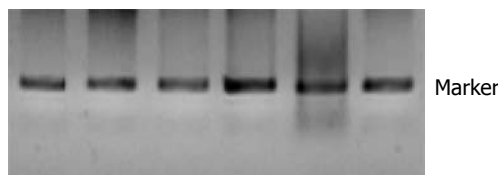


图 1 PCR扩增resistin基因电泳照片。

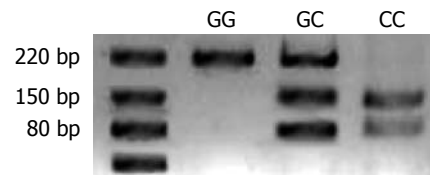


图 2 resistin基因三种酶切产物电泳照片。

为单位,避开血管和同源区域伪影。肝脏CT平均值依据左右叶实质的平均值得出,在脾脏相似区域用同样方法得出平均值,进而计算出L/S值。L/S = 0.9与肝脏脂肪浸润面积达30%相对应,作为区分易发NASH分界指标,用于肝脏脂肪沉积的半定量评价^[12]。77例患者内脏脂肪(VF)和皮下脂肪(SF)含量的测定选择平脐周部位,采用FatScan系统(N2 System, Japan)扫描。

1.2.5 Resistin基因启动区第-420位点基因型的测定 利用已制备的两组受试者的DNA,应用PCR扩增包括resistin基因启动子第-420位点等位基因在内的219 bp长度片段。从GenBank(AF323081)中查取人抵抗素基因序列(略),使用primer Premier 5.0 Demo软件进行在线引物设定。引物序列为:上游引物5'CTGCTTGTCTACCTGTTCTCTC3',下游引物为5'GGGCTTCCTGTCTTGGCTAATAA3',由日本北海道sequence株式会社合成及纯化。PCR反应体系含Taq PCR mixture 15 μ L(QIAGEN Taq PCR core kit试剂盒),上游引物600 pmol,下游引物600 pmol,模板DNA<1 μ g,加超纯水至30 μ L。PCR扩增循环:94 $^{\circ}$ C预变性5 min,94 $^{\circ}$ C 30 s,58 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 1 min 30 s,72 $^{\circ}$ C延伸7 min,4 $^{\circ}$ C终止,37个循环。取PCR扩增产物3 μ L,40 g/L琼脂糖凝胶电泳15 min,电压100 V,Kodak电泳图像分析系统EDAS290比较PCR扩增产物,并根据marker条带位置确定PCR扩增产物是否为目的基因片段。另

取PCR扩增产物3 μ L,混入0.5 μ L 10 \times BufferG,0.5 μ L限制性内切酶*Bpi* I (Bbv II, Fermentas, Burlington, Canada),4 μ L超纯水,对PCR扩增产物进行酶切,条件是37 $^{\circ}$ C 12 h。酶切产物经40 g/L琼脂糖凝胶电泳20 min,电压100 V,用Kodak电泳图像分析系统观察带型并拍照。

统计学处理 应用SPSS10.0软件包,文中有关变量用mean \pm SD表示。HOMA-IR经对数转换后进行分析,相对危险度和相关分析采用软件包中的比值比(odds ratio, OR)和Chi-Square检验。 $P<0.05$ 具有显著差异性。

2 结果

2.1 抵抗素基因启动子-420C/G多态性分析 2组受试者均可检测到预计的219 bp片段,且均符合Hardy-Weinberg平衡检验及卡方Chi-Square检验($P>0.05$)。限制性内切酶*Bpi* I (Bbv II)对resistin基因PCR扩增产物(图1)酶切后存在三种基因型(图2): GG(缺乏*Bpi*I酶切位点,仅见与扩增产物一样的219 bp片段)、GC(可见219 bp片段,131 bp片段和88 bp片段)、CC(可见131 bp片段和88 bp片段)。NASH患者组与正常对照组相比,G等位基因频率有显著差异性(55.2% vs 40.7%, $P<0.01$,OR = 1.80)。NASH患者组的GG基因型频率要显著高于正常对照组(36.3% vs 18.7%, $P<0.01$,OR = 2.49)(表2)。

2.2 NASH患者组的3组基因型临床数据分析 依

表 2 NASH患者组和NC组resistin 基因启动子第-420位点基因型及C/G等位基因的分布

	等位基因		基因型		
	C	G	C/C	C/G	G/G
NASH(<i>n</i> = 77)	0.448	0.552 ^a	0.260	0.377	0.363 ^b
NC(<i>n</i> = 107)	0.593	0.407	0.374	0.439	0.187

^a*P*<0.01, *OR* = 1.80; ^b*P*<0.01, *OR* = 2.49.

表 3 NASH患者三组基因型临床数据间的比较

基因型	G/G	C/G	C/C	<i>P</i>
年龄	44.9 ± 16.9	49.7 ± 15.2	35.2 ± 16.2	n.s.
性别(M/F)	15/13	13/16	11/9	n.s.
腰围(cm)	90.7 ± 16.0	81.4 ± 5.0	99.1 ± 10.6	n.s.
BMI	30.0 ± 5.0	27.0 ± 3.2	30.1 ± 5.8	n.s.
收缩压(mmHg)	132.8 ± 12.7	124.0 ± 16.8	138.3 ± 16.4	n.s.
舒张压(mmHg)	80.3 ± 11.8	73.9 ± 9.8	81.5 ± 10.4	n.s.
ALT(IU/L)	92.9 ± 61.0	76.1 ± 38.5	111.9 ± 53.9	n.s.
白蛋白Albumin(g/L)	44 ± 3	46 ± 3	46 ± 3	n.s.
TG(mg/dL)	168.1 ± 104.4	179.5 ± 110.6	136.8 ± 61.0	n.s.
TC(mg/dL)	201.6 ± 37.1	208.9 ± 56.1	175.6 ± 35.7	n.s.
HDL - Chol(mg/dL)	47.1 ± 14.2	47.6 ± 15.1	41.8 ± 10.5	n.s.
Resistin(μg/L)	27.1 ± 4.7 ^M	18.7 ± 5.7	13.4 ± 5.5	<0.001
糖耐量正常(NGT)/糖耐量减低(IGT)/2型糖尿病(DM)	4/14/10 ^M	11/11/7	8/6/6	<0.05
HbA1c (%)	5.6 ± 0.8	5.8 ± 1.3	5.8 ± 1.9	n.s.
脱水山梨糖醇1.5 - AG(mg/L)	15.5 ± 10.6 ^M	19.1 ± 9.3	24.2 ± 8.9	<0.02
空腹血糖FPG(mg/dL)	114.6 ± 35.5	100.7 ± 14.4	104.4 ± 16.2	n.s.
空腹胰岛素FINS(mU/L)	13.4 ± 10.5	9.9 ± 8.7	13.0 ± 9.6	n.s.
HOMA - IR	3.27 ± 2.83	3.00 ± 2.71	3.25 ± 2.33	n.s.
HOMA - β(%)	111.8 ± 99.3	96.3 ± 76.1	136.8 ± 107.4	n.s.
Insulinogenic index	0.62 ± 0.54	0.75 ± 0.55	1.94 ± 1.78 ^N	<0.02
胰岛素曲线下面积AUCinslin[mIU/(h·L)]肝脏组织学检查	231.8 ± 128.5	213.2 ± 127.1	379.8 ± 257.9 ^N	<0.01
纤维化分期	2.25 ± 1.14 ^M	1.63 ± 0.84	1.59 ± 0.89	<0.02
脂肪肝炎活动度	1.77 ± 0.62	1.91 ± 0.42	1.81 ± 0.78	n.s.
肝脏脂肪浸润面积(%)CT	43.8 ± 21.3 ^M	60.7 ± 19.7	67.5 ± 23.2	<0.001
L/S比值	0.69 ± 0.31	0.72 ± 0.27	0.70 ± 0.26	n.s.
内脏脂肪面积(cm ²)	174.5 ± 55.5	141.8 ± 46.6	212.4 ± 55.7 ^N	<0.001

M: G/G基因型组的临床特征性指标; N: C/C基因型的临床特征性指标; n.s.: 统计学无显著差异, *P*>0.05.

据resistin基因PCR扩增产物酶切后3种基因型, 将NASH患者分为GG组、GC组和CC组, 3组基因型临床资料数据见表3.

2.2.1 GG组有显著统计学意义的临床特征性指标 (1)血清resistin水平明显高于其他两组(27.1 ± 4.7 μg/L vs 18.7 ± 5.7 μg/L, 13.4 ± 5.5 μg/L, *P*<0.001); (2)合并IGT和DM患者的数量要多于其他两组(*OR* = 3.80, 95%可信区间: 1.14-12.67), 而血液脱水山梨糖醇1.5-AG水平低于其他两组(15.5 ± 10.6 μg/L

vs 19.1 ± 9.3 μg/L, 24.2 ± 8.9 μg/L, *P*<0.02), 这反映GG组血糖水平高于其他两组, 二者情况相一致; (3)尽管肝脏脂肪浸润面积要少于其他两组(43.8 ± 21.3 vs 60.7 ± 19.7, 67.5 ± 23.2, *P*<0.001), 肝纤维化进展迅速于其他两组(2.25 ± 1.14 vs 1.63 ± 0.84, 1.59 ± 0.89, *P*<0.02).

2.2.2 CC组有显著统计学意义的临床特征性指标 (1)po糖耐量实验过程中的胰岛素AUC要明显大于其他2组(*P*<0.01), 提示CC组糖负荷后胰岛素反应能力强于其他组, 这也可以解释经CT检测

应用要点
本文就resistin 基因启动子第-420C/G等位基因单核苷酸多态性与NASH疾病相关性做初步探讨, 希望为NASH发病机制的研究提供新的思路.

名词解释

胰岛素抵抗(IR):是指外周靶组织对内/外源性胰岛素的敏感性和反应性降低,他是代谢综合征赖以生存的基础.随着IR在代谢综合征中的作用进一步证实,认为IR在NASH病变过程中也扮演着重要角色,引起了各国学者越来越浓厚的兴趣.

的内脏脂肪浸润面积要明显大于其他2组($212.4 \pm 55.7 \text{ cm}^2$ vs $174.5 \pm 55.5 \text{ cm}^2$, $141.8 \pm 46.6 \text{ cm}^2$, $P < 0.001$); (2)早期胰岛素分泌反应insulinogenic index显著高于其他2组(1.94 ± 1.78 vs 0.62 ± 0.54 , 0.75 ± 0.55 , $P < 0.02$).

GG基因组的HOMA-IR, BMI与其他两组基因型相比较并无显著统计学差异.

3 讨论

Resistin是由脂肪组织分泌,属于富含半胱氨酸的分泌型抵抗素样蛋白质分子家族中的一员,由于其有可能在肥胖和IR之间起潜在的连结作用,故近来备受关注^[1,13-15].现今,IR和高胰岛素血症通过降低肝脏血糖输出及甘油三酯转运障碍而引起内脏性肥胖等机制,参与NASH的发病已被广为接受^[3,16-20].基于以上观点,越来越多的研究集中于从生物学作用和基因水平方面来探讨resistin在IR中所扮演的角色^[21-26],但其中也有研究表示resistin的表达与IR和(或)中心性肥胖并无关联^[9,27-29].鉴于resistin生物学特性与NASH的发病机制及发病进程有许多待证实的交叉点,而以往研究多从试验动物着手^[30-31],我们试图从临床患者方面,对resistin基因启动子-420C/G多态性与NASH相关性进行研究.研究显示,NASH患者组中resistin基因启动子-420G等位基因的出现频率要远高于正常对照组.NASH患者组中,与其他基因型相比,GG基因型携带者的resistin血浆含量更高,更易发生糖耐量异常,纤维化程度更重;而CC组则保有比较高的胰岛素分泌能力.但在我们的研究中,GG基因组的HOMA-IR与其他两组基因型相比较并无显著统计学差异.在这三组患者中其他临床数据没有提示有价值的信息.

基因表现型是遗传和环境互应的结果,对外界环境因素的忽略有可能降低研究的力度.此外,研究样本人数偏少及研究条件的差异,都有可能限制研究的结果.在NASH的发病机制及发展进程中, resisitin所起的作用需要更进一步的研究探讨.

4 参考文献

- 1 Brunt EM. Nonalcoholic steatohepatitis. *Semin Liver Dis* 2004; 24: 3-20
- 2 Ratzliff V, Tahiri M, Bonyhay L. Nonalcoholic steatohepatitis. *Ann Endocrinol (Paris)* 2005; 66: 1571-80
- 3 Choudhury J, Sanyal AJ. Insulin resistance in NASH. *Front Biosci* 2005; 10: 1520-1533
- 4 Palasciano G, Moschetta A, Palmieri VO, Grattagliano I, Iacobellis G, Portincasa P. Non-alcoholic fatty liver disease in the metabolic syndrome.

Curr Pharm Des 2007; 13: 2193-2198

- 5 Steppan CM, Bailey ST, Bhat S, Brown EJ, Banerjee RR, Wright CM, Patel HR, Ahima RS, Lazar MA. The hormone resistin links obesity to diabetes. *Nature* 2001; 409: 307-312
- 6 Banerjee RR, Rangwala SM, Shapiro JS, Rich AS, Rhoades B, Qi Y, Wang J, Rajala MW, Pocai A, Scherer PE, Steppan CM, Ahima RS, Obici S, Rossetti L, Lazar MA. Regulation of fasted blood glucose by resistin. *Science* 2004; 303: 1195-1198
- 7 Steppan CM, Lazar MA. The current biology of resistin. *J Intern Med* 2004; 255: 439-447
- 8 Muse ED, Obici S, Bhanot S, Monia BP, McKay RA, Rajala MW, Scherer PE, Rossetti L. Role of resistin in diet-induced hepatic insulin resistance. *J Clin Invest* 2004; 114: 232-239
- 9 Vozarova de Courten B, Degawa-Yamauchi M, Considine RV, Tataranni PA. High serum resistin is associated with an increase in adiposity but not a worsening of insulin resistance in Pima Indians. *Diabetes* 2004; 53: 1279-1284
- 10 Rajala MW, Obici S, Scherer PE, Rossetti L. Adipose-derived resistin and gut-derived resistin-like molecule-beta selectively impair insulin action on glucose production. *J Clin Invest* 2003; 111: 225-230
- 11 Chevallier M, Guerret S, Chossegros P, Gerard F, Grimaud JA. A histological semiquantitative scoring system for evaluation of hepatic fibrosis in needle liver biopsy specimens: comparison with morphometric studies. *Hepatology* 1994; 20: 349-355
- 12 Ludwig J, McGill DB, Lindor KD. Review: nonalcoholic steatohepatitis. *J Gastroenterol Hepatol* 1997; 12: 398-403
- 13 Lesniowski B, Kumor A, Jasinska A, Daniel P, Pietruczuk M, Malecka-Panas E. Is resistin may be a new laboratory marker in diagnosis acute pancreatitis? *Pol Merkuri Lekarski* 2007; 22: 385-387
- 14 Norata GD, Ongari M, Garlaschelli K, Tibolla G, Grigore L, Raselli S, Vettoretti S, Baragetti I, Noto D, Cefalu AB, Bucciatti G, Averna M, Catapano AL. Effect of the -420C/G variant of the resistin gene promoter on metabolic syndrome, obesity, myocardial infarction and kidney dysfunction. *J Intern Med* 2007; 262: 104-112
- 15 Wentworth JM, Harrison LC. Does insulin resistance need resistin? *J Clin Endocrinol Metab* 2007; 92: 2036-2037
- 16 Wiegand J, Mossner J, Tillmann HL. Non-alcoholic fatty liver disease and non-alcoholic steatohepatitis. *Internist (Berl)* 2007; 48: 154-163
- 17 Roberts EA. Non-alcoholic steatohepatitis in children. *Clin Liver Dis* 2007; 11: 155-172, x
- 18 Chitturi S, Abeygunasekera S, Farrell GC, Holmes-Walker J, Hui JM, Fung C, Karim R, Lin R, Samarasinghe D, Liddle C, Weltman M, George J. NASH and insulin resistance: Insulin hypersecretion and specific association with the insulin resistance syndrome. *Hepatology* 2002; 35: 373-379
- 19 Wang H, Chu WS, Hemphill C, Elbein SC. Human resistin gene: molecular scanning and evaluation of association with insulin sensitivity and type 2 diabetes in Caucasians. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87: 2520-2524
- 20 Verma S, Li SH, Wang CH, Fedak PW, Li RK, Weisel RD, Mickle DA. Resistin promotes endothelial cell activation: further evidence of adipokine-endothelial

- interaction. *Circulation* 2003; 108: 736-740
- 21 Juan CC, Au LC, Fang VS, Kang SF, Ko YH, Kuo SF, Hsu YP, Kwok CF, Ho LT. Suppressed gene expression of adipocyte resistin in an insulin-resistant rat model probably by elevated free fatty acids. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 289: 1328-1333
- 22 Ma X, Warram JH, Trischitta V, Doria A. Genetic variants at the resistin locus and risk of type 2 diabetes in Caucasians. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87: 4407-4410
- 23 Baranova A, Liotta L, Petricoin E, Younossi ZM. The role of genomics and proteomics: technologies in studying non-alcoholic fatty liver disease. *Clin Liver Dis* 2007; 11: 209-220, xi
- 24 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 adipose tissue of obese patients with non-alcoholic fatty liver disease and insulin resistance. *Obes Surg* 2006; 16: 1118-1125
- 25 de Oliveira CP, Stefano JT, de Lima VM, de Sa SV, Simplicio FI, de Mello ES, Correa-Giannella ML, Alves VA, Laurindo FR, de Oliveira MG, Giannella-Neto D, Carrilho FJ. Hepatic gene expression profile associated with non-alcoholic steatohepatitis protection by S-nitroso-N-acetylcysteine in ob/ob mice. *J Hepatol* 2006; 45: 725-733
- 26 Day CP. The potential role of genes in nonalcoholic fatty liver disease. *Clin Liver Dis* 2004; 8: 673-691, xi
- 27 McTernan CL, McTernan PG, Harte AL, Levick PL, Barnett AH, Kumar S. Resistin, central obesity, and type 2 diabetes. *Lancet* 2002; 359: 46-47
- 28 Nagaev I, Smith U. Insulin resistance and type 2 diabetes are not related to resistin expression in human fat cells or skeletal muscle. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 285: 561-564
- 29 Engert JC, Vohl MC, Williams SM, Lepage P, Loredó-Osti JC, Faith J, Dore C, Renaud Y, Burt NP, Villeneuve A, Hirschhorn JN, Altshuler D, Groop LC, Despres JP, Gaudet D, Hudson TJ. 5' flanking variants of resistin are associated with obesity. *Diabetes* 2002; 51: 1629-1634
- 30 Maebuchi M, Machidori M, Urade R, Ogawa T, Moriyama T. Low resistin levels in adipose tissues and serum in high-fat fed mice and genetically obese mice: development of an ELISA system for quantification of resistin. *Arch Biochem Biophys* 2003; 416: 164-170
- 31 Lu SC, Shieh WY, Chen CY, Hsu SC, Chen HL. Lipopolysaccharide increases resistin gene expression *in vivo* and *in vitro*. *FEBS Lett* 2002; 530: 158-162

同行评价
本文选题新颖, 观察指标较系统, 结论明确, 具有很强的学术价值和临床研究意义。

编辑 李军亮 电编 马文华

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。

粪钙卫蛋白在溃疡性结肠炎诊断中的价值

李刚, 李玉林, 张国顺

背景资料
溃疡性结肠炎是发病机制尚不十分明确的慢性结肠炎症, 其在我国的发病率不断上升。目前诊断溃疡性结肠炎及其活动性主要依靠结肠镜检查, 但患者依从性差。近年来国外研究发现一种在外界环境中极其稳定的粪便生物标记物钙卫蛋白能动态监测溃疡性结肠炎活动性的变化。本文通过对粪便钙卫蛋白检测来探讨其在溃疡性结肠炎诊断中的价值。

李刚, 李玉林, 张国顺, 华北煤炭医学院附属医院消化内科
河北省唐山市 063000

李刚, 华北煤炭医学院2005级硕士研究生, 主要从事溃疡性结肠炎基础与临床研究。

通讯作者: 李玉林, 063000, 河北省唐山市路北区建设南路73号, 华北煤炭医学院附属医院消化内科。liyulin1@medmail.com.cn

电话: 0315-3725948

收稿日期: 2007-06-18 修回日期: 2007-10-08

Value of fecal calprotectin in diagnosis of ulcerative colitis

Gang Li, Yu-Lin Li, Guo-Shun Zhang

Gang Li, Yu-Lin Li, Guo-Shun Zhang, Department of Gastroenterology, the Affiliated Hospital of North China Coal Medical College, Tangshan 063000, Hebei Province, China

Correspondence to: Yu-Lin Li, Department of Gastroenterology, the Affiliated Hospital of North China Coal Medical College, 73 Jianshe South Road, Lubei District, Tangshan 063000, Hebei Province, China. liyulin1@medmail.com.cn

Received: 2007-06-18 Revised: 2007-10-08

Abstract

AIM: To research the value of fecal calprotectin as a non-invasive marker of disease activity in ulcerative colitis (UC).

METHODS: We recruited 60 control patients and 82 patients with UC. All the patients were asked to collect 10 g fecal samples for 1 wk after colonoscopy. An (enzyme linked immunosorbent assay) ELISA was used to determine fecal calprotectin. To conduct follow-up visits with 23 patients with UC in activity 3 grade. To guide clinical therapy and observe effects caused by the level of fecal calprotectin.

RESULTS: There was no significant difference in fecal calprotectin level between the inactive UC and control groups. There was a significant difference in fecal calprotectin level between patients with active and inactive UC ($603.2 \mu\text{g/g}$ vs $8.2 \mu\text{g/g}$, $P < 0.01$), and identical results existed between patients with active UC and controls ($603.2 \mu\text{g/g}$ vs $6.6 \mu\text{g/g}$, $P < 0.01$). Significant difference existed in active grades (1, 2, 3) of UC each other ($103.5 \mu\text{g/g}$ vs $582.9 \mu\text{g/g}$; $582.9 \mu\text{g/g}$ vs $1340.6 \mu\text{g/g}$; $103.5 \mu\text{g/g}$

vs $1340.6 \mu\text{g/g}$, $P < 0.01$). A significant correlation between the endoscopic grade of disease activity and fecal calprotectin concentration ($r = 0.89$, $P < 0.01$) was found. Twenty-three patients with grade 3 UC were cured to inactive UC, and fecal calprotectin level was significantly decreased ($1383.5 \mu\text{g/g}$ vs $8.0 \mu\text{g/g}$, $P < 0.01$).

CONCLUSION: Patients with active or inactive UC can be diagnosed by fecal calprotectin level and the directions of fecal calprotectin to clinical medication of UC can be better curative effect.

Key Words: Calprotectin; Ulcerative colitis; Enzyme linked immunosorbent assay

Li G, Li YL, Zhang GS. Value of fecal calprotectin in diagnosis of ulcerative colitis. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2007; 15(30): 3210-3214

摘要

目的: 研究粪便钙卫蛋白检测作为一种无创性方法用于诊断溃疡性结肠炎(UC)活动性的价值。

方法: UC患者82例, 60例经结肠镜检查正常的患者作为对照, 留取结肠镜检查1 wk内的粪便样本10 g, 采用ELISA方法进行粪便钙卫蛋白检测。对23例活动期3级患者实施随访, 监测粪便钙卫蛋白水平, 用于指导临床治疗用药并观察疗效。

结果: UC缓解期组粪便钙卫蛋白水平和正常对照组之间差异无统计学意义, 活动期粪便钙卫蛋白水平与缓解期和正常对照组比均有统计学意义($603.2 \mu\text{g/g}$ vs $8.2 \mu\text{g/g}$, $6.6 \mu\text{g/g}$, $P < 0.01$), 活动期1级($103.5 \mu\text{g/g}$)、2级($582.9 \mu\text{g/g}$)和3级($1340.6 \mu\text{g/g}$)两两比较差异均有统计学意义($P < 0.01$)。粪便钙卫蛋白水平与UC内镜分级显著相关($r = 0.89$, $P < 0.01$)。UC活动期3级患者23例经治疗后至缓解期, 粪便钙卫蛋白水平显著下降, 其治疗前后相比差异有统计学意义($1383.5 \mu\text{g/g}$ vs $8.0 \mu\text{g/g}$, $P < 0.01$)。

结论: 粪便钙卫蛋白能较准确地诊断UC活动

期和缓解期, 用于指导临床治疗较好.

关键词: 钙卫蛋白; 溃疡性结肠炎; ELISA方法

李刚, 李玉林, 张国顺. 粪钙卫蛋白在溃疡性结肠炎诊断中的价值. 世界华人消化杂志 2007;15(30):3210-3214
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/3210.asp>

0 引言

溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)是一种较常见的肠道慢性炎症性疾病, 其病因与发病机制尚不十分清楚^[1], 但普遍认为与机体免疫应答、肠黏膜免疫识别失调^[2]及个体遗传易感性有关. 当前诊断UC活动性主要依靠结肠镜检查, 有研究认为UC内镜下的活动性可反映疾病严重性^[3-4], 但患者往往不能很好配合. 临床外周血WBC, PLT, CRP, IgG, ESR虽可用于诊断UC的活动性, 但因易受其他因素的影响, 故敏感度不高. 钙卫蛋白(calprotectin)是一种杂合性的钙结合蛋白, 具有耐热性和抗蛋白酶活性, 在肠腔和外界环境中可长期保持相对稳定而不被酶和细菌所破坏^[5]. 其主要生物学功能包括: 抗微生物活性^[6], 免疫调节作用^[7]; 参与细胞信号传递; 抗增殖和诱导细胞凋亡, 炎症反应中调节蛋白^[8]等. 他是中性粒细胞和活化巨嗜细胞胞质中的重要蛋白质^[9], 可作为一种炎性标志物^[10]. 国外研究表明, 粪便中钙卫蛋白的稳定性要好于以前的粪便生物标记物, 其浓度在UC活动期显著增加^[11]. 我们检测UC患者不同时期的粪便钙卫蛋白含量并与血液指标WBC, PLT, CRP, IgG, ESR相比较, 把他作为调整临床治疗方案的依据并且观察疗效, 旨在探讨粪便钙卫蛋白检测在溃疡性结肠炎诊断中的价值.

1 材料和方法

1.1 材料 2006-01/2007-03符合2000年成都会议标准^[12]确诊的UC患者82例, 男36例, 女46例, 平均年龄41(25-69)岁. 随访活动期3级患者23例至缓解期后均重复结肠镜检查 and 粪便标本采集, 一共进行结肠镜检查105次, 组织活检105份, 采集粪便标本105份. 选用肠镜及活检正常的60例患者为对照组. 肝、肾功能及血液指标WBC, PLT, CRP, IgG, ESR均正常, 男23例, 女37例, 平均年龄42(18-70)岁. 入选者均无明显上消化道症状及胃和小肠疾患, 无严重心、肺、肝、胰、肾和神经、精神疾病, 近1个月内未曾应用过糖皮质激素和免疫抑制剂, 并排除孕妇、药瘾者、长期使

表 1 随访UC活动期3级患者粪便钙卫蛋白的变化

分组	n	钙卫蛋白($\mu\text{g/g}$)		
		median	(range)	
缓解	23	8.0	(4.9 20.1)	
活动3级	23 ^b	1383.5	(588.9 2187.3)	

^b $P<0.01$ vs 缓解期.

用非甾体抗炎药及质子泵抑制剂者^[13-14]、类风湿性关节炎及系统性红斑狼疮患者、酗酒者等. UC患者依据Truelove内镜分级标准^[15]被分为缓解期、活动1, 2, 3级. 留取患者肠镜检查1 wk内的粪便, 2 h内送至医院, 密封后置于-20℃保存, 以备钙卫蛋白检测. 所有入选者在肠镜检查当日行肝、肾功能及WBC, PLT, CRP, IgG, ESR检测. 肠镜检查时均取活检, 病理诊断采用Truelove-Witts标准^[16-17]. 人粪便钙卫蛋白检测ELISA试剂盒购自芬兰Hycult公司, 酶标仪为USA Bio-Rad 550型.

1.2 方法 将留存粪便在室温解冻后, 用取样环取约50-150 mg, 放入螺口试管中一并称其质量, 计算出粪便的净含量, 按照质量/容积(kg/L) = 1 : 50的比例加入萃取液, 充分振荡20 min混匀后取1 mL匀浆离心10000 g 20 min, 取上清液0.5 mL留备用, -20℃保存. 酶联免疫反应严格按照人粪便钙卫蛋白检测ELISA试剂盒说明书进行, 将钙卫蛋白提取液室温解冻, 以1 : 10比例稀释, 常规ELISA操作程序(双抗体夹心法). 将酶标仪设置为450 nm进行测定, 标准品包括7个质量浓度(100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.13, 1.56 $\mu\text{g/L}$), 最高浓度标准液的光密度值为2.373, 以1 : 10比例稀释的标本若超出标准曲线范围没有被测出, 则需进一步扩大稀释比例直至测出为止.

统计学处理 应用SPSS11.5统计软件进行分析. 正态分布的计量资料, 计算均数及标准差, 采用方差分析和LSD- t 检验. 非正态分布的计量资料, 计算中位数、四分位间距及全距, 采用非参数检验Mann-Whitney U检验. 计数资料, 采用 χ^2 检验. 相关系数 r 应用Spearman相关分析计算并检验. $P<0.05$ 为差异有统计学意义.

2 结果

2.1 UC活动性与粪钙卫蛋白、血IgG和CRP 活动期粪便钙卫蛋白水平显著高于缓解期和正常对照组($P<0.01$)(表1), 缓解期和对组之间差异无统计学意义($P>0.05$), 活动期各级之间差异均

研发前沿
临床用于诊断溃疡性结肠炎活动性或预测其是否复发的方法很多. 目前粪便生物标记物倍受重视, 被认为有很好的临床应用价值. 钙卫蛋白作为一种较理想的诊断溃疡性结肠炎活动性的生物标记物之一, 已逐渐成为研究热点, 得到越来越多的关注.

相关报道

国外研究显示, 溃疡性结肠炎活动时粪便钙卫蛋白水平明显升高, 其含量与疾病严重程度呈正比, 与内镜和组织学严重程度呈显著正相关。粪钙卫蛋白还可预测炎症性肠病的复发, 且对溃疡性结肠炎和克罗恩病的意义有所不同, 前者大于后者。

表 2 UC患者粪便钙卫蛋白、血IgG和CRP的变化

分组	n	钙卫蛋白(μg/g)			lgG(g/L)	CRP(mg/L)		
		median	(range)		mean ± SD	median	(range)	
对照	60	6.6	(0.03	26.8)	9.88 ± 1.1	0.06	(0.003	0.1)
缓解	30	8.2	(3.9	33.6)	9.73 ± 1.2	0.04	(0.004	0.13)
活动	75	603.2 ^b	(15.8	2531.6)	15.63 ± 5.3 ^b	1.73 ^b	(0.15	23.19)
1级	18	103.5 ^b	(15.8	153.6)	12.47 ± 3.0 ^a	0.69 ^b	(0.15	2.26)
2级	31	582.9 ^d	(165.8	2176.3)	15.49 ± 5.6 ^c	1.98 ^f	(0.18	20.36)
3级	26	1340.6	(303.6	2531.6)	17.98 ± 5.2	2.98 ^f	(0.18	23.19)

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs 对照组和缓解期; ^c $P < 0.05$, ^d $P < 0.01$ vs 1, 3级; ^f $P < 0.01$ vs 1级。

表 3 UC患者血PLT, ESR和WBC的变化

分组	n	PLT($\times 10^9/\text{L}$)	ESR(mm/1 h)		WBC($\times 10^9/\text{L}$)
		mean \pm SD	median	(range)	mean \pm SD
对照	60	188.6 ± 25.2	5	(1 10)	6.4 ± 1.1
缓解	30	191.0 ± 34.5	6	(1 12)	6.1 ± 1.3
活动	75	277.1 ± 77.5^b	9 ^b	(2 39)	7.6 ± 2.1^b
1级	18	229.5 ± 66.1^a	7 ^a	(2 13)	7.3 ± 1.8^a
2级	31	274.2 ± 69.1^c	8	(2 33)	7.5 ± 2.0
3级	26	313.4 ± 77.8	12 ^e	(3 39)	7.8 ± 2.2

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs 对照组和缓解期; ^c $P < 0.05$ vs 1, 3级; ^e $P < 0.05$ vs 1, 2级。

有统计学意义。23例活动期3级患者治疗后至缓解期, 粪便钙卫蛋白水平显著下降, 其治疗前后差异有统计学意义($P < 0.01$)。粪便钙卫蛋白与肠镜分级显著相关($r = 0.89$, $P < 0.01$)。缓解期IgG, CRP与对照组之间差异无统计学意义($P > 0.05$)。活动期IgG和CRP水平高于缓解期和正常对照组($P < 0.01$)。IgG活动期各级之间差异均有统计学意义, CRP活动期2、3级之间差异无统计学意义。IgG, CRP与肠镜分级相关($r = 0.64$, 0.76 , $P < 0.01$, 表2)。

2.2 UC活动性与血PLT, ESR和WBC 缓解期PLT, ESR, WBC和对照组之间差异无统计学意义($P > 0.05$)。活动期PLT, ESR, WBC水平高于缓解期和正常对照组($P < 0.01$)。PLT活动期各级之间差异均有统计学意义, ESR活动期1、2级之间差异无统计学意义, WBC活动期各级之间差异均无统计学意义。PLT, ESR, WBC与肠镜分级相关($r = 0.58$, 0.43 , 0.31 , $P < 0.01$)(表3)。

3 讨论

Fagerhol *et al*最早在1980年从中性粒细胞和单核细胞中分离出钙卫蛋白。他广泛分布于人体

组织、体液及细胞中, 是中性粒细胞更新的标志物, 是一种重要的炎症反应性蛋白。因UC的病变特点为结肠慢性炎症, 故粪便炎性标志物要比血清标志物更敏感地反应肠道局部炎症程度。考虑到粪便中的钙卫蛋白既稳定又是活化的炎性生物标记物, 故用其来诊断UC的活动性。在实验中, 准确把握UC内镜分级标准并对患者进行详细分级。结果表明, 粪便钙卫蛋白含量在UC活动期为603.2 $\mu\text{g/g}$, 缓解期为8.2 $\mu\text{g/g}$, 对照组为6.6 $\mu\text{g/g}$, 这与国外研究基本吻合^[18-21]。也就是说, 粪便钙卫蛋白检测可较好地诊断UC的活动期和缓解期, 并能准确地反应病情动态变化。

目前临床血液指标WBC, PLT, CRP, IgG, ESR均可用于UC活动性的诊断。我们发现, 活动期CRP水平高于缓解期和正常对照, 和以往研究结果很类似^[22-23], 诊断UC活动性的敏感度为64%, 诊断UC活动期2、3级的敏感度优于1级。活动期IgG水平与缓解期和正常对照均有差异, 与以前的研究结果相同^[24-25], 表明活动期UC患者体内免疫功能失调紊乱, 诊断UC活动性的敏感度为46.6%, 诊断UC活动期1、2级的敏感度较差。活动期PLT水平高于缓解期和正常对照, 与Jaremo *et al*^[26]及Chiarantini *et al*^[27]的研究结果相一致, 证明活动期UC患者体内血液呈高凝状态, 易发生血管栓塞, 诊断UC活动性的敏感度为45.3%, 对活动期3级的敏感度较好。活动期ESR水平与缓解期和正常对照均有差异, 国外也有相同报道^[28-29], 诊断UC活动性的敏感度为24%, 对活动期1、2、3级的敏感度均不高, 但相对于3级较敏感。活动期WBC水平与缓解期和正常对照存在差异^[30], 诊断UC活动性的敏感度为13.3%, 对活动期1、2、3级敏感度均差。上述血液指标易受全身因素的影响, 对肠道局部病变的敏感度较低, 且升高时常见于重症患者, 故诊断

创新盘点

本文主要侧重于探讨粪便钙卫蛋白含量与溃疡性结肠炎活动性的关系。通过与临床常用的客观指标血WBC, PLT, CRP, IgG, ESR及内镜相对比, 对23例活动期患者进行随访, 依据粪便钙卫蛋白含量变化调整治疗, 结果发现粪便钙卫蛋白能较准确地诊断溃疡性结肠炎活动期, 用于指导临床治疗。

UC活动性的敏感度不稳定. 与血液指标相比, 粪便钙卫蛋白在UC活动期显著高于缓解期和正常对照, 活动期各级之间差异均有统计学意义, 与UC内镜分级标准的相关性极高^[31], 明显高于上述各项指标; 诊断UC活动性的敏感度为98.7%, 对UC活动期各级均高度敏感, 经 χ^2 检验, 粪便钙卫蛋白诊断UC活动性的敏感度与其他血液指标差异均有统计学意义($P<0.01$), 显著高于其他指标.

研究表明, 当患者粪便钙卫蛋白水平明显升高时(临床症状、体征往往较重), 及时调整治疗方案(更换药物或剂量等)后, 若病情好转, 则粪便钙卫蛋白水平亦随之逐渐下降; 若病情不缓解, 则粪便钙卫蛋白水平将仍持续偏高, 待进一步依据粪便钙卫蛋白水平更改治疗用药后, 则随着临床症状的改善, 粪便钙卫蛋白水平亦最终降至较低水平, 且与肠镜复查结果高度一致. 而对那些经治疗后粪便钙卫蛋白含量始终处在较低水平观察后发现, 不调整治疗方案, 其病情亦能长期保持相对稳定, 此时只需维持治疗和预防复发. 可见, 粪便钙卫蛋白检测在一定程度上可替代结肠镜检查, 方便、准确地用于指导UC各期临床治疗用药, 一方面有利于医生对疾病的动态变化进行监控, 另一方面还能大大减轻患者痛苦和降低治疗费用. 但因本研究所涉及的病例数尚少, 故粪便钙卫蛋白检测对UC各期的临床治疗指导作用还有待于今后进一步深入研究. 我们认为粪便钙卫蛋白检测比结肠镜更容易被患者接纳并可弥补其许多缺点, 尤其是对那些年龄较小的UC患者, 这一点非常重要. 对于急性发作期的重症患者, 结肠镜检查往往被视为禁忌, 以免引起肠穿孔, 此时粪便钙卫蛋白检测就显得尤为重要. 粪便钙卫蛋白检测可替代结肠镜较准确地诊断UC的活动期和缓解期, 正确反映病情动态变化, 明显优于目前常用的血液指标. 粪便钙卫蛋白能在短期内重复多次测定, 通过他可及时监测疾病的缓解、加重和复发, 从而正确调整治疗方案, 指导临床治疗.

4 参考文献

- 1 Fiocchi C. Inflammatory bowel disease: etiology and pathogenesis. *Gastroenterology* 1998; 115: 182-205
- 2 Ameho CK, Adjei AA, Harrison EK, Takeshita K, Morioka T, Arakaki Y, Ito E, Suzuki I, Kulkarni AD, Kawajiri A, Yamamoto S. Prophylactic effect of dietary glutamine supplementation on interleukin 8 and tumour necrosis factor alpha production in trinitrobenzene sulphonic acid induced colitis. *Gut*

- 1997; 41: 487-493
- 3 Powell-Tuck J, Day DW, Buckell NA, Wadsworth J, Lennard-Jones JE. Correlations between defined sigmoidoscopic appearances and other measures of disease activity in ulcerative colitis. *Dig Dis Sci* 1982; 27: 533-537
- 4 Seo M, Okada M, Yao T, Okabe N, Maeda K, Oh K. Evaluation of disease activity in patients with moderately active ulcerative colitis: comparisons between a new activity index and Truelove and Witts' classification. *Am J Gastroenterol* 1995; 90: 1759-1763
- 5 Johne B, Fagerhol MK, Lyberg T, Prydz H, Brandtzaeg P, Naess-Andresen CF, Dale I. Functional and clinical aspects of the myelo-monocyte protein calprotectin. *Mol Pathol* 1997; 50: 113-123
- 6 Lehrer RI. Holocrine secretion of calprotectin: a neutrophil-mediated defense against *Candida albicans*? *J Lab Clin Med* 1993; 121: 193-194
- 7 Brun JG, Haga HJ, Boe E, Kallay I, Lekven C, Berntzen HB, Fagerhol MK. Calprotectin in patients with rheumatoid arthritis: relation to clinical and laboratory variables of disease activity. *J Rheumatol* 1992; 19: 859-862
- 8 Brun JG, Haland G, Haga HJ, Fagerhol MK, Jonsson R. Effects of calprotectin in avridine-induced arthritis. *APMIS* 1995; 103: 233-240
- 9 Poullis A, Foster R, Northfield TC, Mendall MA. Review article: faecal markers in the assessment of activity in inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2002; 16: 675-681
- 10 Kerkhoff C, Klempt M, Sorg C. Novel insights into structure and function of MRP8 (S100A8) and MRP14 (S100A9). *Biochim Biophys Acta* 1998; 1448: 200-211
- 11 Sander J, Fagerhol MK, Bakken JS, Dale I. Plasma levels of the leucocyte L1 protein in febrile conditions: relation to aetiology, number of leucocytes in blood, blood sedimentation reaction and C-reactive protein. *Scand J Clin Lab Invest* 1984; 44: 357-362
- 12 欧阳钦, 潘国宗, 温忠慧, 万学虹, 胡仁伟, 林三仁, 胡品津. 对炎症性肠病诊断治疗规范的建议. *中华消化杂志* 2001; 21: 236-239
- 13 Meling TR, Aabakken L, Roseth A, Osnes M. Faecal calprotectin shedding after short-term treatment with non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Scand J Gastroenterol* 1996; 31: 339-344
- 14 Poullis A, Foster R, Mendall MA, Shreeve D, Wiener K. Proton pump inhibitors are associated with elevation of faecal calprotectin and may affect specificity. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2003; 15: 573-574; author reply 574
- 15 陈振华, 邵先玉. 溃疡性结肠炎的X线和肠镜检查. *世界华人消化杂志* 2000; 8: 335-336
- 16 Truelove SC, Witts LJ. Cortisone in ulcerative colitis; final report on a therapeutic trial. *Br Med J* 1955; 2: 1041-1048
- 17 江学良, 权启镇, 王志奎. 溃疡性结肠炎的诊断、分型及疗效标准. *世界华人消化杂志* 2000; 8: 332-334
- 18 Bunn SK, Bisset WM, Main MJ, Golden BE. Fecal calprotectin as a measure of disease activity in childhood inflammatory bowel disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2001; 32: 171-177
- 19 Hanai H, Tozawa K, Takeuchi K, Iida T, Arai H, Kanaoka S, Sugimoto K, Yoshida K, Iwasaki T, Nakamura A, Hosoda Y, Shirai N, Hirasawa K,

应用要点
粪便钙卫蛋白能正确地反映溃疡性结肠炎病情动态变化, 较准确地诊断其活动性, 其检测方法简单、安全、无创、经济, 患者依从性好、短期内可多次复查, 能够弥补内镜检查的一些不足, 具有较高的临床应用价值.

同行评价
本文立意、内容
新颖, 具有较好的
学术价值和较强的
可读性.

- 20 Takahira K, Kataoka H, Sano M, Osawa M, Sugimoto S. Clinical significance of faecal calprotectin levels in patients with ulcerative colitis. *Nippon Shokakibyo Gakkai Zasshi* 2003; 100: 21-27
- 21 Costa F, Mumolo MG, Bellini M, Romano MR, Ceccarelli L, Arpe P, Sterpi C, Marchi S, Maltinti G. Role of faecal calprotectin as non-invasive marker of intestinal inflammation. *Dig Liver Dis* 2003; 35: 642-647
- 22 Amati L, Passeri ME, Selicato F, Mastronardi ML, Penna A, Jirillo E, Covelli V. New insights into the biological and clinical significance of fecal calprotectin in inflammatory bowel disease. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 2006; 28: 665-681
- 23 Poullis AP, Zar S, Sundaram KK, Moodie SJ, Risley P, Theodossi A, Mendall MA. A new, highly sensitive assay for C-reactive protein can aid the differentiation of inflammatory bowel disorders from constipation- and diarrhoea-predominant functional bowel disorders. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2002; 14: 409-412
- 24 Solem CA, Loftus EV Jr, Tremaine WJ, Harmsen WS, Zinsmeister AR, Sandborn WJ. Correlation of C-reactive protein with clinical, endoscopic, histologic, and radiographic activity in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 2005; 11: 707-712
- 25 Gouni-Berthold I, Baumeister B, Berthold HK, Schmidt C. Immunoglobulins and IgG subclasses in patients with inflammatory bowel disease. *Hepatogastroenterology* 1999; 46: 1720-1723
- 26 Philipsen EK, Bondesen S, Andersen J, Larsen S. Serum immunoglobulin G subclasses in patients with ulcerative colitis and Crohn's disease of different disease activities. *Scand J Gastroenterol* 1995; 30: 50-53
- 27 Jaremo P, Sandberg-Gertzen H. Platelet density and size in inflammatory bowel disease. *Thromb Haemost* 1996; 75: 560-561
- 28 Chiarantini E, Valanzano R, Liotta AA, Cellai AP, Fedi S, Ilari I, Prisco D, Tonelli F, Abbate R. Hemostatic abnormalities in inflammatory bowel disease. *Thromb Res* 1996; 82: 137-146
- 29 Ha JS, Lee JS, Kim HJ, Moon TG, Chang DK, Lee JH, Kim YH, Rhee PL, Kim JJ, Rhee JC. Comparative usefulness of erythrocyte sedimentation rate and C-reactive protein in assessing the severity of ulcerative colitis. *Korean J Gastroenterol* 2006; 48: 313-320
- 30 Martinez Salmeron JF, Rodrigo M, Nogueras F, de Sola C, Corral C, Ortega C, Martin-Vivaldi R. Comparison of the indexes of serologic activity with endoscopy in intestinal inflammatory disease. *Gastroenterol Hepatol* 1996; 19: 344-346
- 31 Lampinen M, Ronnblom A, Amin K, Kristjansson G, Rorsman F, Sangfelt P, Safsten B, Wagner M, Wanders A, Winqvist O, Carlson M. Eosinophil granulocytes are activated during the remission phase of ulcerative colitis. *Gut* 2005; 54: 1714-1720
- 32 Hanai H, Takeuchi K, Iida T, Kashiwagi N, Saniabadi AR, Matsushita I, Sato Y, Kasuga N, Nakamura T. Relationship between fecal calprotectin, intestinal inflammation, and peripheral blood neutrophils in patients with active ulcerative colitis. *Dig Dis Sci* 2004; 49: 1438-1443

编辑 程剑侠 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 •

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.

超声内镜在食管常见疾病诊断中的价值

陈立刚, 任建林

背景资料
超声内镜(EUS)是在普通内镜顶端安装上微型高频超声探头,通过内镜直接观察脏器腔内的形态,同时利用超声探头实施实时超声扫描,获得脏器及其毗邻脏器的超声图像。机械环形扫描超声内镜主要用于消化道本身及邻近器官疾病的诊断。电子线阵超声内镜扫描平面与镜身平行,可实时监测穿刺针的位置,多用于穿刺活检或超声内镜引导下治疗。因其对食管疾病具有重要的应用价值,目前在临床上广泛应用于各种食管疾病的诊断。

陈立刚, 任建林, 厦门大学附属中山医院消化内科, 厦门大学消化疾病研究所, 厦门市消化疾病诊治中心, 福建省厦门市 361004

通讯作者: 陈立刚, 361004, 福建省厦门市, 厦门大学附属中山医院消化内科, 厦门大学消化疾病研究所, 厦门市消化疾病诊治中心. chenligang663@163.com
电话: 0592-2993171

收稿日期: 2007-09-12 修回日期: 2007-10-20

摘要

超声内镜(Endoscopic ultrasonography, EUS)问世于1980年,自美国的Dimagno首先报道了超声内镜用于检查动物的消化道试验以来,这种技术有了很大的发展。1988年,日本Olympus公司开发出具有360度环行扫描可在7.5 MHz及12 MHz之间切换的GF2UM3超声胃镜以及7 MHz的超声微探头以后,超声内镜逐渐得到广泛应用。由于超声探头随内镜插入脏器腔内时更接近病变部位,缩短了超声波的传导途径并降低了声衰减,提高了图像分辨率,相应大大地提高了微小病灶的检出能力。近年来,超声内镜对于食管疾病的诊断,在临床上应用非常广泛。超声内镜对于食管黏膜下病变的鉴别诊断和食管癌的分期有重要的价值,对于其他食管疾病的诊断也具有重要意义。本文对超声内镜在食管常见疾病诊断中的价值加以综述。

关键词: 超声内镜; 食管疾病; 诊断

陈立刚, 任建林. 超声内镜在食管常见疾病诊断中的价值. 世界华人消化杂志 2007;15(30):3216-3218

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/3216.asp>

0 引言

食管由黏膜层、黏膜下层、固有肌层和外膜层构成。常规内镜与黏膜活检可以帮助很多食管疾病得到准确的诊断,但是对于黏膜深层和黏膜以下的病变,常规内镜往往不能满足临床的需求。超声内镜(EUS)不但能清楚地显示食管壁的层次结构,而且可以通过分析病变与食管壁的关系,根据病变回声强弱、均匀与否、病变边缘情况、有无包膜、周围淋巴结情况等,准确判断食管病变的性质,是目前诊断食管病变

的最佳手段。食管管壁厚度约3 mm, EUS可以清晰显示食管壁的解剖层次结构^[1],由内向外依次为:第1层为薄的高回声层,相当于黏膜层;第2层为低回声层,相当于黏膜肌层;第3层为高回声层,相当于黏膜下层;第4层为较厚的低回声层,相当于固有肌层;第5层为高回声层,相当于外膜层。Kawano *et al*^[2]报道健康患者的食管壁在20 MHz的高频小探头超声内镜下最多可以显示13层结构,但有时由于内镜探头不能将超声束准确聚焦于食管管壁,探头水囊又可以使食管管壁受压变薄,因此只能显示3层回声^[3]。

1 EUS在食管黏膜下病变的诊断价值

食管黏膜下病变(submucosal lesion)包括真正的黏膜下肿瘤(submucosal tumor, SMT),例如平滑肌瘤、脂肪瘤、淋巴瘤、颗粒细胞瘤等,也包括其他一些非肿瘤病变,如食管结核、食管囊肿等。食管平滑肌瘤是最常见的食管黏膜下肿瘤(SMTs),约占食管良性肿瘤发病率的50%-90%。近年来,国内外文献多将其称为间质瘤(gastrointestinal stromal tumors, GISTs)。食管平滑肌瘤多见于中青年,生长缓慢,症状轻微,早期可无任何临床症状,以食管中下段多见,主要表现为吞咽不畅、异物感,胸骨后不适、疼痛,不易引起患者重视,多在行胃镜或消化道钡餐检查时发现。在EUS下,平滑肌瘤表现为第2层(黏膜肌层)或第4层(固有肌层)的低回声,呈椭圆形、半圆形、梭形,大多小于3 cm,边界清楚,有较为完整的强回声包膜,对周围无侵袭,内部回声均匀,无周围淋巴结转移。平滑肌肉瘤与平滑肌瘤鉴别比较困难,但其多大于5 cm,在EUS下表现为不均匀低回声,其内可见低回声或无回声的坏死组织液化,有分隔,形态不规则,边界不清,若有周围组织侵袭或淋巴结转移时,应行超声内镜引导下穿刺活检。而平滑肌瘤质地较硬,细针穿刺活检诊断价值有限^[4]。食管血管瘤常孤立存在,多无症状,偶可见消化道大出血。内镜显示黏膜下蓝色包块,在EUS下表现为第2层的低回声,边界清楚,彩色多普勒可见丰富的

血流信号. 食管脂肪瘤多位于食管中下段, 周围黏膜正常, 多不引起食管狭窄, 在EUS下第3层(黏膜下层)的高回声. 食管颗粒细胞瘤常较小, 直径小于5 mm, EUS下表现为第2层(黏膜肌层)的低回声, 确诊往往需要病理. 食管神经源性肿瘤临床多无明显症状, 在EUS下表现为第3层、第4层的低回声肿物, 边缘不规则, 其内回声不均匀. 食管囊肿多为先天性, 食管中下段多见, 多发生在幼儿及儿童, 囊肿较大可引起压迫症状, 并引发肺炎、支气管扩张, 可并发溃疡引起出血或破入气管、支气管形成瘘道, 在EUS下表现为第3层(黏膜下层)的无回声, 呈圆形或椭圆形, 边界清楚, 不侵及食管管壁, 彩色多普勒显示无血流信号. 食管结核临床少见, 可见食管黏膜光滑隆起, 充血破溃, 有白色豆渣样液体流出, 在EUS下表现为食管壁内颗粒样低回声, 可穿透外膜.

2 EUS在食管癌诊断中的价值

食管癌是常见的消化道恶性肿瘤, 位于全球肿瘤发病的第八位, 肿瘤死亡的第四位. 我国是食管癌高发地区, 每年死亡约15万多人, 位居第三位, 严重威胁着人们的生命和健康. 早期食管癌的诊断常缺乏客观证据, 往往通过手术病理证实. 早期食管癌是指病变仅局限于黏膜层和黏膜下层, EUS为早期食管癌的诊断及确定相应治疗方案给予很大帮助. 绝大多数食管癌EUS下表现为低回声结节, 边界不清, 内部回声不均匀. 微探头超声(miniprobe sonography, MPS)检查可以清楚显示病灶浸润深度, 对于微小病灶的发现具有很大意义^[5]. 有报道称MPS对早期食管癌诊断率为81%, 高于普通EUS的56%^[6]. 三维管超声内镜对于早期食管癌的诊断越来越受到重视. 食管癌的病死率高, 手术风险大, 因此术前分期很关键. EUS对食管癌TNM分期提供很大帮助, 同时在评价肿瘤的可切除性、治疗方案的制定、术式的选择、预后评估等具有重要的意义. 食管癌的EUS图像根据癌肿的浸润深度分为: 黏膜层癌、黏膜下层癌、固有肌层癌、外膜层癌、外膜外癌. EUS主要从淋巴结的大小、形态、边界、内部回声等方面判断有无淋巴结转移. 恶性淋巴结多大于1 cm, 呈圆形, 边界较清, 内部回声不均匀. 食管癌手术可切除性的判定主要来源于纵隔脏器是否被浸润, EUS可以清晰显示胸主动脉、气管、心包、下腔静脉等. 近年来, 关于EUS及MPS对于食管癌诊断及治疗的研究开展得很广泛^[7-8]. 很多研究显示, EUS对食管癌的TN分期优于CT、PET和MRI, 其敏感性和特异性均

优于其他检查手段^[9-10]. 有报道称EUS对食管癌T分期的准确率达到85%-90%, 高于CT(50%); 对N分期的准确率达到75%, 也高于CT(50%).

对于食管腔外的压迫性病变, 普通内镜的活检和挖掘式取材危险性既大, 诊断价值又极其有限. 利用线阵式超声内镜引导下的细针穿刺活检(endoscopic ultrasound-guided fine-needle aspiration, EUS-FNA)可以对食管黏膜下病变及食管外的病变抽取组织进行病理组织活检, 明确相关疾病的手术前诊断, 制定正确合理的治疗方案^[11-13].

3 EUS在其他食管疾病诊断中的价值

3.1 食管息肉 食管息肉起源于上皮细胞, 发病率居食管良性肿瘤的第二位, 40岁后多见, 临床主要表现为吞咽困难和胸骨后不适, EUS有助于其与食管间质细胞瘤鉴别, 在EUS下食管息肉表现为第1层的高回声, 食管壁无明显增厚, 边界清楚^[14]. 在内镜下治疗前利用EUS对食管息肉进行详细诊察, 被认为是适宜和安全的^[15].

3.2 食管静脉曲张 临床上我常常经皮经肝门静脉造影来检查门脉高压症患者食管远端的侧支静脉, 但是难以分辨食管壁内外的血管结构. MPS则可以清晰显示食管壁内外结构. 食管静脉曲张在EUS下表现为第1层(黏膜层)或第3层(黏膜下层)的椭圆形无回声, 沿食管壁走行. Hino *et al*^[16]利用EUS观察胃左静脉主干、分支的血流速度、血流量来理解食管静脉曲张的发病机制. EUS可以通过内镜下超声图像提供食管静脉曲张治疗后的预后依据. Suzuki *et al*^[17]认为EUS对于预测食管静脉曲张行硬化和结扎后的复发具有重要意义. Irisawa *et al*^[18]研究也表明, 利用20 MHz的EUS对38名行食管静脉曲张硬化治疗的患者观察食管旁静脉丛的周围静脉和穿静脉, 发现两者与预后相关. 周围静脉曲张程度越严重, 穿静脉数目越多, 黏膜下静脉曲张的程度也越严重, 治疗后复发率越高.

3.3 Barrett食管 Barrett食管是指食管下段正常的复层鳞状上皮被化生的柱状上皮替代的一种病理现象, 多见于中老年患者, 临床上可有反酸、胸骨后烧灼感、吞咽困难等症状. Deviere的研究显示, 其发生癌变危险率是正常人群的30-150倍^[19], 因此临床上Barrett食管的早期诊断具有较为重要的意义. Barrett食管的诊断主要依靠内镜下活检, Barrett食管在EUS下表现为局灶性增厚. EUS有利于发现早期食管癌, 但是在临床应用过程中, 可能由于Barrett食管黏膜结节样改变存在对诊断过度分期的现象.

同行评价
本文总结超生内镜对食管常见疾病的诊断价值,虽然内容一般,但具有一定的临床参考价值。

3.4 贲门失弛缓症 贲门失弛缓症是一种食管运动障碍性疾病,以食管缺乏蠕动和食管下括约肌(lower esophageal sphincter, LES)松弛不良为特征。临床上贲门失弛缓症表现为液体和固体食物的吞咽困难,体质量减轻,餐后反食,夜间呛咳以及胸骨后不适或疼痛。以上临床症状加上食管吞钡检查发现食管-胃连接处典型的鸟嘴样狭窄、食管扩张以及食管下括约肌压力测定显示LES压力升高,吞咽引起的反射性LES松弛消失,可以确诊贲门失弛缓症。EUS诊断贲门失弛缓症的优势在于可以明确诊断出固有肌层的增厚,鉴别出食管下段狭窄是否是由于壁内肿瘤或外压所致。

以上我们综述了EUS对各种主要食管疾病的诊断价值。他作为一项新技术,对食管疾病的诊断价值越来越受到人们的重视,但是目前国内还缺乏大样本病例的研究调查,在相关食管疾病的诊断应用价值还有待于进一步探讨和研究。同时,EUS在临床中也有一定局限性,对老年体弱患者、心肺功能衰弱的患者进行检查时,操作时间不宜过长,不宜注水过多,避免引起误吸导致窒息。一部分疾病在EUS并无特征性改变,需要结合其他检查手段和病理组织学诊断才能明确诊断。超声探头分辨率高,但穿透力较差,因此要想既获得高分辨率图像,又显示准确病变的浸润深度,还需要进一步研究。随着对于EUS发展的多样化、与多普勒超声有机结合、三维立体超声内镜和EUS-FNA的应用,EUS在食管疾病的诊断方面将会取得更大的进展。

4 参考文献

- Aibe T, Fuji T, Okita K, Takemoto T. A fundamental study of normal layer structure of the gastrointestinal wall visualized by endoscopic ultrasonography. *Scand J Gastroenterol Suppl* 1986; 123: 6-15
- Kawano T, Ohshima M, Iwai T. Early esophageal carcinoma: endoscopic ultrasonography using the Sonoprobe. *Abdom Imaging* 2003; 28: 477-485
- 金震东, 李兆申. 消化超声内镜学. 第1版, 北京: 科学出版社, 2006: 201-233
- Ando N, Goto H, Niwa Y, Hirooka Y, Ohmiya N, Nagasaka T, Hayakawa T. The diagnosis of GI stromal tumors with EUS-guided fine needle aspiration with immunohistochemical analysis. *Gastrointest Endosc* 2002; 55: 37-43
- Abad R, Varas MJ, Espinos JC, da Costa M, Turro J. Transendoscopic ultrasonography with miniprobe. *Rev Esp Enferm Dig* 2001; 93: 259-260
- Hunerbein M, Ulmer C, Handke T, Schlag PM. Endosonography of upper gastrointestinal tract cancer on demand using miniprobe or endoscopic ultrasound. *Surg Endosc* 2003; 17: 615-619
- Hu H, Xiang JQ, Zhang YW, Chen J, Gu YJ, Miao LS, Ma LF. Comparison of mini-probe endoscopic ultrasonography with computed tomography in preoperative staging of esophageal cancer. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi* 2006; 28: 123-126
- Esaki M, Matsumoto T, Moriyama T, Hizawa K, Ohji Y, Nakamura S, Hirakawa K, Hirahashi M, Yao T, Iida M. Probe EUS for the diagnosis of invasion depth in superficial esophageal cancer: a comparison between a jelly-filled method and a water-filled balloon method. *Gastrointest Endosc* 2006; 63: 389-395
- Weaver SR, Blackshaw GR, Lewis WG, Edwards P, Roberts SA, Thomas GV, Allison MC. Comparison of special interest computed tomography, endosonography and histopathological stage of oesophageal cancer. *Clin Radiol* 2004; 59: 499-504
- Pfau PR, Perlman SB, Stanko P, Frick TJ, Gopal DV, Said A, Zhang Z, Weigel T. The role and clinical value of EUS in a multimodality esophageal carcinoma staging program with CT and positron emission tomography. *Gastrointest Endosc* 2007; 65: 377-384
- Yamao K, Ohashi K, Mizutani S, Furukawa T, Watanabe Y, Nakamura T, Suzuki T, Takeda K. Endoscopic ultrasound-guided fine-needle aspiration (EUS-FNA) for the diagnosis of digestive diseases. *Endoscopy* 1998; 30 Suppl 1: A176-A178
- Marsman WA, Brink MA, Bergman JJ, Tytgat GN, ten Kate FJ, van Lanschot JJ, Fockens P. Potential impact of EUS-FNA staging of proximal lymph nodes in patients with distal esophageal carcinoma. *Endoscopy* 2006; 38: 825-829
- Sudhoff T, Hollerbach S, Wilhelms I, Willert J, Reiser M, Topalidis T, Schmiegell W, Graeven U. Clinical utility of EUS-FNA in upper gastrointestinal and mediastinal disease. *Dtsch Med Wochenschr* 2004; 129: 2227-2232
- Rice TW. Benign esophageal tumors: esophagoscopy and endoscopic esophageal ultrasound. *Semin Thorac Cardiovasc Surg* 2003; 15: 20-26
- Gillard V. Evaluation of polyps by endoscopic ultrasonography (eus): implication for endotherapy. *Acta Gastroenterol Belg* 1999; 62: 196-199
- Hino S, Kakutani H, Ikeda K, Uchiyama Y, Sumiyama K, Kuramochi A, Kitamura Y, Matsuda K, Arakawa H, Kawamura M, Masuda K, Suzuki H. Hemodynamic assessment of the left gastric vein in patients with esophageal varices with color Doppler EUS: factors affecting development of esophageal varices. *Gastrointest Endosc* 2002; 55: 512-517
- Suzuki T, Matsutani S, Umebara K, Sato G, Maruyama H, Mitsunashi O, Nakano Y, Fukamachi T, Saisho H. EUS changes predictive for recurrence of esophageal varices in patients treated by combined endoscopic ligation and sclerotherapy. *Gastrointest Endosc* 2000; 52: 611-617
- Irisawa A, Saito A, Obara K, Shibukawa G, Takagi T, Shishido H, Sakamoto H, Sato Y, Kasukawa R. Endoscopic recurrence of esophageal varices is associated with the specific EUS abnormalities: severe periesophageal collateral veins and large perforating veins. *Gastrointest Endosc* 2001; 53: 77-84
- Devire J. Barrett's oesophagus: the new endoscopic modalities have a future. *Gut* 2005; 54 Suppl 1: i33-i37

编辑 程剑侠 电编 李军亮

食管癌内镜治疗进展

林振和, 刘明, 任建林

林振和, 刘明, 任建林, 厦门大学附属中山医院消化内科, 厦门大学消化病研究所, 厦门市消化疾病诊治中心, 福建省厦门市 361004

通讯作者: 林振和, 361004, 福建省厦门市湖滨南路201号, 厦门大学附属中山医院消化内科. zhenhelin@163.com

电话: 0592-2293171 传真: 0592-2293170

收稿日期: 2007-09-12 修回日期: 2007-10-20

摘要

食管癌(esophageal cancer)是全球第九大常见恶性肿瘤, 目前早期食管癌的诊断率还很低, 患者确诊时多已失去手术机会, 而晚期食管癌患者由于吞咽梗阻而不能正常进食, 全身情况极差, 有时根本不能耐受常规放、化疗, 因而食管癌的内镜下治疗显得更重要. 近年来, 随着内镜技术的迅速发展, 许多早期或中晚期食管癌的患者均可通过镜下治疗获得满意的效果.

关键词: 食管癌; 内镜治疗

林振和, 刘明, 任建林. 食管癌内镜治疗进展. 世界华人消化杂志 2007;15(30):3219-3225

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/3219.asp>

0 引言

食管癌是全球第九大常见恶性肿瘤, 其发病率占全部恶性肿瘤的1%-2%, 食管癌位居世界范围内癌症死亡病例中第6位. 尽管近10年对其研究取得了明显的进展, 但早期食管癌的诊断率还很低. 临床1/3-1/4属晚期, 已失去手术时机, 而治疗晚期食管癌的有效手段—全身化疗和局部放疗, 杀灭肿瘤细胞的同时也损伤了正常的组织细胞, 且疗效低, 毒副作用大. 对于这部分患者因吞咽梗阻而不能正常进食, 全身情况极差, 有时根本不能耐受常规放、化疗, 因而食管癌的内镜下治疗显得意义重大. 对早期食管癌由于患者高龄或因身体状况不能耐受手术, 或因患者拒绝手术, 可行EMR等内镜下根治切除术. 而对有梗阻、吞咽困难、气管食管瘘、上消化道出血的食管癌患者可考虑接受非侵入性治疗. 不能切除或根治切除的患者出现吞咽困难, 更

为主要的目标是改善症状, 改善患者营养状况, 提高生活质量. 现就近年来食管癌的内镜下治疗作一综述^[1-4].

1 内镜下黏膜切除术

1988年内镜黏膜切除术(endoscopic mucosal resection, EMR)在早期食管癌的临床应用开创了微创外科治疗早期食管癌的先河. EMR即在内镜下将病变黏膜剥离, 并用高频电流完整切除. EMR是在息肉电切术、黏膜下注射术以及钛夹止血术等内镜技术的基础上逐步发展起来的针对浅表型黏膜病变的一种新型治疗手段. EMR的主要原理是通过黏膜下注射等渗盐水使黏膜病变抬高, 然后用高频电圈套法切除病变黏膜, 达到根除黏膜层早期癌或癌前病变的目的. EMR主要术式有圈套切除术、大块活检术、剥离术及吸引套切术等, 这些方法均以EMR为基本方法逐步演变而来^[5]. EMR具有诊断和治疗的双重作用, 术后可从回收的病变标本中检查肿瘤浸润深度及切除是否彻底, 是目前内镜治疗的主要方法, 已为许多国家和地区所接受并积累了比较成熟的经验. 通常认为EMR治疗早期食管癌的适应证为: (1)黏膜内癌和原位癌, (2)病灶最大直径应小于3 cm, (3)病灶侵及食管周径小于2/4, 2/4-3/4可作为相对适应证, (4)同期可切除1-4个病灶, (5)最佳部位是中下段的后侧壁. 这些适应证目前还是相对的, 随着设备改进, 经验积累, 相信EMR治疗范围还会拓宽, 并逐渐发育成熟. 内镜下可切除黏膜内的癌性病灶, 黏膜切除术的切除深度是黏膜下层, 加之黏膜下癌的淋巴转移率高达15%-40%, 故黏膜下癌是黏膜切除术的禁忌证. 病变浸润深度多以内镜下观察和超声内镜评估为主, 前者的准确率达80%, 两者结合可达90%. 大量临床资料表明, 作为微创技术, EMR的局部根治性治疗与外科手术相比不仅能够减少手术费用、减少并发症、提高患者生活质量, 而且远期生存率也较高, 其术后并发症包括出血、穿孔、狭窄^[6].

背景资料

食管癌是全球第九大常见恶性肿瘤, 目前早期诊断率还很低, 患者确诊时多已失去手术机会, 而晚期食管癌患者有时无法耐受常规放、化疗. 近年来, 随着内镜技术的迅速发展, 许多早期或中晚期食管癌的患者均可通过镜下治疗获得满意的效果. 目前内镜黏膜切除术、内镜下激光热效应疗法、光动力学疗法、内镜下局部注射化疗、射频治疗、内镜下食管扩张术、食管内支架治疗、食管腔内冷冻治疗、内镜电化学治疗、微波治疗、氩离子凝固法等多种镜下治疗方法的选择, 可为患者提供个体化的最佳治疗方案. 但能否将内镜支架赋予更多的功能, 如将含放射材料和化疗药物的“治疗性”支架植入食管管腔, 变单一支架姑息治疗模式为综合治疗模式, 是值得众多临床医师探索的领域.

同行评价
本文内容较好, 层次清楚, 有一定的临床应用价值

Endo *et al*^[7]应用这项技术对215例食管癌患者行EMR术, 结果发现肿瘤局限在上皮层、黏膜层、黏膜下层的患者其5年生存率分别达90%、84%、56%以上. 早期食管癌的传统食管切除治疗效果, 国内外资料5年生存率均为85%-90%, 与EMR结果不相上下, 但EMR操作简单、安全、痛苦小和医疗费用低等, 因而EMR代表未来的治疗方向, 是早期食管癌治疗模式的里程碑. 但也有报道称早期食管癌EMR疗效不一, 其原因可能与适应症的选择和术者内镜技术水平的不同有关. Kim *et al*^[8]回顾性总结了888例食管癌患者, 早期食管癌70例(7.9%), 其中10例行EMR术, 50例行常规开放手术, 60例早期食管癌患者中黏膜癌18例(30%), 黏膜下癌42例(70%), 结果总的5年生存率为84.3%, 比较EMR组与手术组二者肿瘤根除率(80% *vs* 84%)、复发率(20% *vs* 16%)和5年生存率(100% *vs* 78.3%), 差别均无统计学意义. 因而他们认为, 通过早期发现早期诊断食管癌其根除效果较好, 而且EMR可作为一种根除早期食管癌有效的手段. 国内王贵齐 *et al*^[9]应用透明帽法切除71例早期食管癌及食管鳞状上皮重度异型增生患者的食管黏膜, 结果术后5例出血, 其中1例动脉出血, 4例渗血. 应用内镜压迫、肾上腺素盐水注射及氩离子凝固术(APC)治疗均成功止血. 术后4例发生狭窄, 其中3例是由于切除范围超出食管全周3/4, 术后1 mo应用水囊扩张, 狭窄均缓解, 未有穿孔等严重并发症发生.

2 内镜下激光热效应疗法

Goodale于1970年应用硬管胃镜以CO₂激光治疗犬的胃糜烂出血从而将激光与内镜结合起来. 随后有学者研制成可传导高能Ar⁺激光和Nd:YAG(掺钕钇石榴石)激光的石英光导纤维, 纤维内镜激光才进入到临床研究和应用阶段. 目前临床应用的高能激光主要有CO₂激光、Ar⁺激光和Nd:YAG激光等^[10]. 激光作用于肿瘤, 引起肿瘤组织产生热效应、压强效应和生化效应等一系列反应, 而实现组织切割、气化和凝固效果, 达到治疗食管癌的目的. 激光治疗的优点是: 创口出血少或不出血, 清除病灶准确、迅速, 操作简便、患者痛苦少, 方便门诊患者, 而且他可直接进入并可开通完全被肿瘤闭塞的食管腔.

Eriksen^[11]回顾性分析了用氩激光治疗失去手术机会的31例晚期食管和贲门癌患者, 经1-18次(平均5次)激光照射, 89%的患者吞咽困

难可以得到缓解, 大部分患者吞咽困难的平均进步率为2级(0-4级平分法), 每次治疗间隔时间为1-175 d(平均25 d), 与治疗相关的穿孔及死亡发生率分别为1.8%和1.2%, 平均生存时间为190 d, 1年生存率为19%. 他们认为激光治疗患者耐受性好, 安全有效, 并发症少, 治疗次数可接受, 并且简单价廉, 且所需设备简单. 但激光治疗的主要缺陷就是需要重复反复多次治疗, 平均4-6 wk要进行1次. 多位学者对激光治疗与食管置管术的疗效进行了对照研究, 结果不一. Macken *et al*^[12]应用激光(71例)、塑料支架(45例)、SEMS(37例)3组进行非随机对照研究, 结果激光治疗组并发症发生率低($P = 0.001$)、吞咽梗阻缓解的时间长($P = 0.012$). 但还有随机研究显示^[13], 病灶长度短于4 cm者, 激光治疗优于置管术; 病灶长度超过4 cm者, 置管术优于激光治疗. 可见从目前的资料显示, 在缓解吞咽困难及改善生活质量方面, 置管术及激光治疗孰优孰劣难以定论. Shcherbakov *et al*^[14]报道激光治疗联合放射治疗对于长度小于3 cm但失去手术机会的食管癌患者亦取得了良好效果, 平均存活时间为20.2 mo, 对于未发生远处转移的患者其1年、2年、3年生存率分别达到96.6%、72%、47.6%.

3 光动力学疗法

光动力学疗法(photodynamic therapy, PDT)又称光敏疗法, 该疗法通过注射某种光敏物质, 利用特定的光敏物质在肿瘤或某些组织中浓度较高, 而在其他正常组织和器官中浓度低的特点, 以一定敏感波长的光照射光敏物质集中的部位, 照射区肿瘤组织及细胞变性坏死而正常组织不受损伤, 有别于放疗及化疗, 是较为新颖的内镜下治疗技术. 可使早期食管癌达到微创根治, 提高治疗后的生活质量, 并且可以重复多次治疗, 不但用于晚期食管癌的姑息治疗而且用于早期食管癌的根治^[15-17]. 食管癌的光动力治疗临床使用安全, 他在治疗食管恶性肿瘤中的作用正在发生变化, 不但对食管重度不典型增生或Barrett's食管有良好的治疗价值, 对早期食管癌病变疗效也较好, 但对晚期食管癌患者只有姑息性疗效^[18-19].

Heier *et al*^[20]报道, PDT与Nd:YAG激光治疗食管癌吞咽梗阻的随机对照(PDT组32例)与(Nd:YAG激光组20例)研究表明, 两组均能缓解吞咽梗阻, 但PDT组维持的时间长($P = 0.008$).

PDT对于病灶位于食管上段或下段且长度大于10 cm者, 具有明显的优越性, 但并发症的发生率两组相似. 另外, Scheider *et al*^[21]报道PDT治疗8例食管置管术后肿瘤支架内生长具有良好效果. 可见如果能获得更有效的光敏剂, PDT光源制作更加简单便利, 并将获得越来越广泛的应用. McCaughand *et al*^[22]报道77例, 均为常规手段“无法治疗”的患者. 其中I期患者10例, 光动力治疗后近期临床治愈率达100%, 平均随访期38 mo均存活; II、III、IV期患者的治疗后中位生存期分别为12 mo、6.2 mo及3.5 mo, 梗阻缓解时间和生存质量不亚于已见报道的多数疗法.

总之, PDT的优点是特异性高, 照射区肿瘤组织坏死而正常组织不被影响, 有别于放疗及化疗.

4 内镜下局部注射化疗

内镜局注化疗多与放疗综合应用, 具有局部肿瘤药物浓度高, 作用时间长, 而且抗癌药物可通过淋巴管引流至区域淋巴结, 对转移淋巴结亦有作用, 全身毒副作用小等优点. 目前多选用MMC、5-FU、BLM、DDP等抗肿瘤药物进行局部注射, 多数学者认为上述化疗药物具有放射增效作用. 实验研究证实DDP尤其能增强乏氧细胞的放射敏感性, 低浓度DDP即可使哺乳动物细胞的放射反应增强. 许多学者观察了DDP配合放射治疗恶性肿瘤的疗效, 发现两者有协同增敏作用. Natsugoes *et al*^[23]在手术前1-3 d内镜直视下把吸附在活性碳的BLM 1 mL注射于肿瘤和食管的黏膜下, 结果在纵隔、颈部、腹部的淋巴结和结缔组织均测出BLM活性, 在23个有转移灶的淋巴结中, 6个可观察到有变性和炎症改变, 认为活性碳-博来霉素是一种有用的靶向化疗工具. 日本学者Hagiwara *et al*^[24]报告, 用微粒活性碳吸附MMC等抗癌药物在肿瘤局部注射, 发现肿瘤局部及局部所属淋巴结内的抗癌药物浓度极高, 且证实对癌细胞增殖有较高的杀伤作用, 并可阻碍癌细胞DNA复制和生物合成, 抑制癌细胞分裂生长. Ortner *et al*^[25]每4 wk 1次在内镜直视下用5 mm的细针把吸附在活性碳的丝裂霉素10 mL(15 mg)注射到无法手术的晚期食管鳞癌(IV期)肿瘤组织, 结果发现肿瘤体积明显减小, 吞咽困难明显缓解, 用于评价生活质量的Karnofsky指数明显提高, 患者耐受性良好, 未观察到明显不良反应, 因而认为其是一种有效、廉价、耐受性好的晚期食管癌治疗方

法. Wadleigh *et al*^[26]还报道2例用950 mL/L的无水乙醇局部注射到无法手术切除的食管鳞癌组织, 并配合放疗和化疗, 结果发现1例随访25 mo未发现肿瘤复发, 1例16 mo后死于肿瘤复发, 认为该法成本较低. 但晚期食管癌常由于肿瘤明显扩散, 内镜下局部注射化疗效果不佳, 早期食管癌不适合手术者, 则疗效比较好.

5 射频治疗

射频治疗时以正弦波释放频率为200-750 kHz的电磁波, 在短时间内病变组织内积蓄大量热能, 而使组织蛋白凝固、坏死、炭化, 起到治疗的作用. 另外, 射频治疗的探头表面涂有聚氟, 治疗时不会与病变组织黏连, 易与治疗后的焦痂坏死组织脱离, 避免因治疗时探头与组织黏连牵拉而造成出血、穿孔^[27-29].

临床发现, 单纯支架置入术后3 mo左右, 癌组织可能纵向生长超过支架或自支架网格中向腔内生长导致食管再狭窄, 并向周围深处生长和远处转移. 所以, 谷中红 *et al*^[30]主张支架置入后应该不失时机地给予放疗、化疗或中医药等综合治疗, 抑制肿瘤生长, 延长患者的生存时间. 对于无法接受放疗而再次出现癌性狭窄的患者, 谷中红 *et al*采取射频灼扩治疗, 结果表明, 实现阻塞管腔有效再通后, 进食困难和精神状况明显改善, 近期效率达100%, 平均积分下降明显. 随访1年生存率62.5%, 1-3年生存率67.5%, 3年以上生存率5%, 说明该方法的远期疗效也是肯定的. 而内镜下射频治疗的操作方法简单, 安全而无严重不良反应, 易被患者接受, 并根据病情可多次重复治疗, 实为目前较理想的姑息治疗方法之一.

射频治疗晚期食管贲门癌能缩小癌体, 疏通管道, 解决患者进食问题, 效果迅速, 起姑息治疗的作用. 短期疗效好, 但远期疗效差, 一般1-2 mo需重复治疗. 射频止血适合于渗血、涌血, 在治疗息肉及凝固癌灶的同时起到止血的作用. 内镜射频治疗因是双极导线传输, 对患者和医务人员无辐射, 导线工作中不发热, 不会损伤高档内镜设备. 人体阻抗一般在100 Ω -200 Ω 范围, 治疗过程中病灶升温, 水份蒸发, 当病灶蛋白变性后, 其阻抗升高于300 Ω , 仪器自动降低输出量到最低点, 阻抗增大到一定系数, 仪器会自动停止. 电极头接触病灶, 才有输出, 离开组织输出停止, 脚踏开关又可控制输出. 只要认真操作, 安全有保证, 内镜射频治疗可获较好效果. 此方法操作方便, 易掌握, 治疗费用低, 可反复治疗,

疗效明显,患者易于接受,治疗时患者无痛苦,一般患者均可在门诊进行治疗。但对有心脏严重疾患或安有心脏起搏器者及有严重凝血功能障碍者属禁忌症^[31]。

6 内镜下食管扩张术

食管、贲门癌术后吻合口狭窄是术后较多见的并发症之一,尤其近年来用吻合器吻合后发生率有上升趋势,临床上主要以吞咽困难、食物反流、呕吐为主要表现。既往的治疗方法较多,有放置支架、手术治疗、导丝引导下Savary-Gillard扩张器扩张、胃镜下气囊扩张、X线透视下球囊导管扩张等文献报告。球囊导管吻合口扩张的机制是通过机械扩张的作用,使狭窄病灶局部瘢痕松解,撑胀或撕裂以达到缓解吻合口狭窄的目的。在球囊扩张过程中,应注意以下几个方面的问题:(1)严格掌握适应证和禁忌证,准确按照操作程序实施治疗成功及预防并发症的关键;(2)球囊中央一定要置于吻合口部,这样才能充分发挥他放射方向的扩张力,避免术中因球囊不时的上下滑动而需调整位置而延长手术时间;(3)动作要轻柔,压力需逐渐增加,扩张时间由短变长,不要急于改变球囊的亚铃状外形。最后换大号球囊时,维持时间应达到15-20 min;(4)球囊在扩大的吻合口内能比较方便的推进及拉出;(5)使用金属吻合器的个别患者只有见到环状金属链断离以后才能达到扩张效果。球囊扩张有较多的适应证,除术后吻合口狭窄的治疗以外,还有如灼烧后食管狭窄、贲门失弛症、幽门梗阻及内支架联合用于晚期食管癌的治疗。总之,一旦食管贲门癌术后发生吻合口狭窄,在排除肿瘤复发因素后,应及时行球囊扩张术。对于有严重心肺疾病或体质情况极差,狭窄口过长,特别是导丝无法插入胃腔者应视为禁忌证。

张威庆 *et al*^[32]对32例食管狭窄患者进行内镜下气囊扩张术,结果发现扩张有效率为96.88%。术后随访观察21例,1 mo后出现再狭窄者3例,2 mo后再狭窄者4例,3-6 mo后再狭窄者10例。因而认为内镜下扩张术可缓解吞咽困难,改善患者一般情况,提高患者生活质量,但易再狭窄,需要反复扩张。

内镜下食管扩张术的优点是:操作简便,安全可靠,既可减少患者痛苦,又能节省费用,改善患者生活质量,减轻其心理负担。扩张术的主要并发症是局部出血和食管穿孔。根据食管狭

窄的程度和患者的反应情况,决定扩张器的直径和注气压力,操作动作要轻,注气压力要逐渐升高,可减少或避免并发症的发生。

7 食管内支架治疗

进展期食管癌患者大多数是因食管狭窄、食管痿,无法进食,营养障碍而致死亡。既往对食管狭窄多采用胃造瘘术,因手术创伤大,术后并发症多,往往患者及家属难以接受。采用单纯扩张、气囊扩张、高频电刀及激光切开松解等方法,疗效不稳定,维持时间短,对食管痿亦无很好的治疗方法。1983年法国Frimberger使用膨胀金属螺旋管治疗恶性食管狭窄,后来韩国Song *et al*又报道用包裹有硅胶膜的金属支架治疗癌性食管狭窄,均获得成功,从而找到了一条新的治疗晚期食管癌的途径。近年来由于国产金属支架的研制成功,费用大大降低,加快了食管支架在我国临床的应用。内支架采用钛镍记忆合金做成,因记忆合金具有保持温度反应特性,加上支架网状编织结构特点,使支架置入容易,进入食管后,体温作用下弹性恢复良好,支架力加强,自行扩张固定。食管支架解决了患者临时进食问题,为其他治疗创造了条件,但他仅仅是一种姑息性的治疗手段,因他对癌细胞没有杀伤作用,癌组织会很快再从网孔长出挤入腔内或从支架两端长出,引起再梗阻。因此必须配合积极有效的放疗及化疗^[33]。

自从1990年德国学者Domschke *et al*成功使用金属自扩支架(self-expanding metallic stent, SEMS)治疗首例食管癌吞咽困难患者以来,随着材料科学及工艺上的进步,发展了多种不同材料(不锈钢、不锈钢合金丝或镍钛合金丝)制成的不同类型的食管SEMS,并广泛应用于临床。应用较多的有:Gianturco Z支架、Ultralex支架、Wallstent支架、Esophacoil支架以及国产的多种SEMS。近期国外还研制了一种可以生物降解的支架,更适合一些食管良性狭窄或食管黏膜切除术后继发食管狭窄的患者^[34]。在国内,1996年许国铭 *et al*^[35]报道应用SEMS(不带膜Ultralex支架)治疗食管癌引起的吞咽梗阻,获得成功。目前食管支架置入术已经成为晚期食管癌患者吞咽困难的首选治疗。选择治疗用食管内支架的原则应当是置入方便、耐久性、生物相容性好、不易移位、不影响或较少影响食管正常的蠕动功能并且在需要时能较方便地取出。目前应用较多的食管带膜金属支架大致分为不

锈钢“Z”型支架和镍钛记忆合金网状支架2种. 其中“Z”型支架弹性好, 强度高, 但柔韧性差, 不易释放; 记忆合金网状支架因其质地软, 释放相对容易并具有温度相关的变形性, 有利于术中术后的位置调整, 更加符合选择标准. 支架置入后的酸反流是术后最常见并发症之一, 如有条件, 应尽量选用抗反流支架^[36].

Wengrower *et al*^[37]在1998年报道食管癌Instant金属支架置入术治疗的平均生存期为4 mo(0.5-20 mo), 不同时期使用不同类型支架对吞咽困难的缓解和补堵瘘成功率也不尽一致. 近年来采用带膜支架治疗恶性食管贲门狭窄, 治疗后吞咽困难的平均进步率为1.6-2.3级(0-4级平分法), 87.5%-90%的患者在支架安放后48 h内可从原来的无法进食或少量流质饮食恢复到半固体饮食, 5%-8%的患者可改善到固体饮食. 据统计, 在支架置入后的生存期内, 吞咽困难总体缓解率约为63%-71%^[35].

放置食管内支架治疗食管内、外瘘可使患者免于开胸手术, 痛苦小, 费用低, 操作简便, 尤其对一些体质差、年龄大、不能经受手术的患者, 可解决患者饮食问题, 延长患者的生命. 但不是所有食管瘘的患者都可放置内支架, 病例的选择关系到成功率和疗效. 方道连 *et al*^[38]认为手术后吻合口瘘是支架堵瘘的最佳适应征. 手术吻合口扩张度差, 有利支架固定, 但瘘口以2 cm以内较适宜. 晚期癌肿和放疗后患者多因食管堵塞, 患者用力吞咽而穿破气管膜部, 也可因肿瘤溃烂而穿破. 这类患者若肿瘤侵犯食管长度小于8 cm, 瘘口低于距门齿22 cm, 瘘口上方无肿瘤浸润, 可经内镜下微波、热电极、注射药物等治疗, 疏通食管后放置支架. 食管肿瘤过长, 瘘口过高或肿瘤距门齿过近, 均不适宜支架.

食管内支架治疗并发症包括扩张后出血、食管穿孔及与内镜术本身有关的并发症. 食管穿孔是最严重的并发症, 可导致纵膈气肿、大出血等, 危及生命. 关键是根据术前的造影检查选择合适大小的扩张器, 结合内镜图像将导丝放入正确的径路. 若瘘口直径过大, 应慎行预扩张以免扩大瘘口或直接造成穿孔, 同时备好心电图监护及相关抢救设备, 以备发生心律失常、窒息、低氧血症等情况时及时处置. 术后并发症主要有以下几点: (1)胸骨后疼痛、不适感, 术后即时发生, 大多数患者均有该症状. 但经适当止痛治疗大多可在1 wk内消失, 少数支架位置

偏高的患者有可能因其反复刺激食管而导致顽固性胸痛. 若疼痛发作明显且持续止痛治疗无效者, 必要时调整支架位置或移除支架而考虑外科治疗; (2)术后出血, 扩张术后均有多少不等的消化道出血. 多数患者仅为粪便隐血试验阳性或少量黑便, 经一般止血、制酸、保护黏膜治疗后可很快好转. 若患者出现大量呕血, 应考虑到食管穿孔的可能, 需紧急处理; (3)支架滑脱, 在带膜支架的放置中是一个常见的并发症, 主要与支架类型、释放技术、剧烈呕吐以及过早进食固体食物有关. 为减少该并发症的发生, 术前应根据造影结果及拟采用扩张器直径选择合适管径和硬度的支架, 尽量选择喇叭口支架, 少选用全覆膜支架, 术后6-12 h内不进固体食物, 若患者呕吐剧烈及时给予对症治疗. 一旦发生滑脱, 患者可重新出现呛咳或梗阻等症状, 可经内镜下套取或重新放置; (4)胃食管反流, 支架位于食管下段或贲门口者, 其中大多数患者可经制酸、保护黏膜等治疗缓解. 近年来出现的抗反流支架对本并发症有很好的抑制效果, 有条件者应尽量选用; (5)食物嵌顿, 患者进食粗纤维食物及肉食时可出现, 术后应嘱患者避免生冷饮食, 选择短纤维易消化温热食物, 小口吞咽, 饭后多饮水, 发生嵌顿后可经内镜下再通; (6)再发食管瘘, 部分患者为肿瘤自然生长所致, 而支架硬度和张力均较大的病例, 食管局部的炎症、支架位于主动脉弓附近, 均是再发内瘘的危险因素; (7)术后再狭窄, 这是支架术后最突出而长期以来没有得到很好解决的问题. 对覆膜支架来说, 再狭窄的部位存在于支架的一端或两端, 其原因主要包括癌性狭窄和肉芽组织增生2个方面. 前者为肿瘤组织沿支架两端或网眼向腔内浸润生长所致, 往往需要再次扩张、置入支架解决, 若患者身体条件允许, 应鼓励患者术后继续进行放、化疗以限制肿瘤的快速生长. 后者系因置入的支架作为异物反复刺激食管壁所致, 可经再次支架置入或内镜下激光、氩气电刀等治疗解决. 如何降低术后较高的再狭窄率, 是当前食管狭窄治疗中亟待研究和解决的重要问题^[39].

8 其他内镜治疗方法

如食管腔内冷冻治疗可致癌组织坏死, 坏死组织脱落后即可达到疏通食管管腔、缓解吞咽困难的目的. 内镜电化学治疗可使肿瘤局部产生电化学反应和组织结构的改变, 破坏肿瘤的生

存条件,使癌细胞发生多种病理反应,以达到杀伤肿瘤的作用.采用内镜电化学治疗食管癌,能使肿瘤组织迅速坏死,吻合口狭窄扩张,解除管腔内的机械性梗阻,患者经口进食,迅速改善患者一般状况,使失去手术时机的食管癌患者提高生存质量、延长生存时间.但这种方法毕竟是一种局部的、非根治性的治疗措施,当患者一般状况改善后,应辅以放疗、化疗等综合治疗措施.微波治疗通过高温使癌组织发生凝固、坏死,而对正常细胞无明显损害,其较激光、高频电更为安全,不至产生深层组织损伤,穿孔等并发症.有报告称与放射治疗合用有协同增效作用,可提高疗效,减少放射剂量,减轻放疗反应.氩离子凝固法(APC)通过氩气等离子化后将能量传递至组织,可产生轴向及侧向的电流传导,是一种较新的非接触性电凝技术,因此可在治疗范围内保证同样的治疗深度,较激光治疗易于操作,费用较低^[40-42].

9 选择最优化的治疗技术和治疗方案

对于食管癌患者来说,外科切除仍是现有治疗手段中最好和首选的方法,但对中晚期老年食管癌患者或因失去手术时机,或因身体状况不能耐受手术,或因患者拒绝手术,则可选择内镜下治疗.食管内镜治疗技术与手术治疗相比,属于微创外科技术,具有创伤小、适应症广、改善生活质量明显、花费少、效果好等优点,是在外科治疗基础之上的选择.也就是说,根据超声内镜、CT等表现可以将食管癌中可根治切除的肿瘤和不可根治切除的肿瘤鉴别开来,分别选择根治性手术或姑息性手术,对于没有淋巴结转移的黏膜癌可采用内镜下局部黏膜切除,而对于食管癌中晚期患者解决吞咽困难可以采用食管扩张及支架植入、内镜激光、微波和局部注射抗癌药等多种方法,配合化疗、放疗,从而为患者提供个体化的最佳治疗方案^[40].

10 结论

食管癌多年来以外科手术为主,具有较大的创伤和风险,伴有严重的并发症和后遗症,术后生活质量下降.而内镜、激光、微波和局部注射抗癌药物等微创治疗创伤小,无严重并发症,术后生活质量高,已被广泛应用于早期食管癌,因此内镜治疗已成为食管癌外科治疗的一个补充手段.治疗后的主要问题是残余灶的复发和多发病的异时性发生.当明确残余病灶局限于黏膜层

时,可再次行内镜黏膜切除;如果病变浸润深度超过黏膜下层,则应行外科食管切除治疗.治疗以后,辅以光动力或氩激光治疗,可以消除残余病灶,降低癌的复发.无论采用何种治疗方法都应严格遵守癌症处理的原则,癌灶边缘和深部的安全边界必须充分考虑,淋巴结和血管侵犯的危险性亦应估计,术后的随访不能忽视^[43].

内镜下治疗术中术后出血、穿孔以及支架的移位与狭窄等亦是临床上常见的问题.金属支架置入后因移位和堵塞而需再次内镜干预的频率颇高,这是各类支架面临的共同难题.支架置入后不同时期造成干预治疗的原因不同,早期的主要原因是支架移位、扩张不全和食物堵塞端口,后期的首要原因则是肿瘤生长和肉芽组织堵塞支架内部.处理肿瘤细胞生长过快堵塞支架的最佳办法是置入新的带膜(覆膜)支架,内镜下激光治疗、冷冻治疗以及扩张治疗等方法仅能短时间内缓解症状,并需反复多次进行,患者的顺从性差,均非理想的方法,多数学者已不主张将其作为常规手段推荐.能否将内镜支架赋予更多的功能,即将含放射材料和化疗药物的“治疗性”支架植入食管管腔(这种支架不仅具有支撑食管腔的作用,而且还有一定的局部治疗作用)变单一支架姑息治疗模式为综合治疗模式,从治疗高度来改善患者的生存质量,是近期和今后一段时间值得众多临床医师探索的领域.总之,内镜微创治疗将是21世纪治疗早期食管癌和癌前病变的主要手段和方向^[40].

11 参考文献

- 1 Esophageal Cancer Clinical Practice Guidelines. www.nccn.org/professionals/physician_gls/PDF/esophageal.pdf
- 2 Pisani P, Bray F, Parkin DM. Estimates of the world-wide prevalence of cancer for 25 sites in the adult population. *Int J Cancer* 2002; 97: 72-81
- 3 May A, Ell C. Diagnosis and treatment of early esophageal cancer. *Curr Opin Gastroenterol* 2006; 22: 433-436
- 4 Ponc R, Kimmey MB. Endoscopic therapy of esophageal cancer. *Surg Clin North Am* 1997; 77: 1197-1217
- 5 Lambert R. Treatment of esophagogastric tumors. *Endoscopy* 2003; 35: 118-126
- 6 王国清,郝长青,王贵齐,吕宁,林冬梅,谢永强,赖少清. 内镜黏膜切除治疗癌前病变和早期食管癌. *中华消化内镜杂志* 2002; 19: 218-220
- 7 Endo M. Endoscopic resection as local treatment of mucosal cancer of the esophagus. *Endoscopy* 1993; 25: 672-674
- 8 Kim JH, Chung HS, Youn YH, Park SW, Song SY, Chung JB, Kim CB, Lee YC. Treatment outcomes of 70 cases of early esophageal carcinoma: 12 years of

- experience. *Dis Esophagus* 2007; 20: 297-300
- 9 王贵齐, 魏文强, 郝长青, 张晓华, 赖少清, 余桂香, 菊凤环, 乔友林, 董志伟, 王国清. 内镜下食管黏膜切除并发病的预防和治疗. *中华消化内镜杂志* 2003; 20: 107-109
- 10 Hurley JF, Cade RJ. Laser photocoagulation in the treatment of malignant dysphagia. *Aust N Z J Surg* 1997; 67: 800-803
- 11 Eriksen JR. Palliation of non-resectable carcinoma of the cardia and oesophagus by argon beam coagulation. *Dan Med Bull* 2002; 49: 346-349
- 12 Macken E, Gevers A, Hiele M, Rutgeerts P. Treatment of esophagorespiratory fistulas with a polyurethane-covered self-expanding metallic mesh stent. *Gastrointest Endosc* 1996; 44: 324-326
- 13 Carter R, Smith JS, Anderson JR. Laser recanalization versus endoscopic intubation in the palliation of malignant dysphagia: a randomized prospective study. *Br J Surg* 1992; 79: 1167-1170
- 14 Shcherbakov AM, Kanaev SV, Shulepov AV. Endoscopic argon-plasma coagulation and combined radiotherapy for short (up to 3 cm) esophageal cancers. *Vopr Onkol* 2005; 51: 719-721
- 15 Kashtan H, Konikoff F, Haddad R, Skornick Y. Photodynamic therapy of cancer of the esophagus using systemic aminolevulinic acid and a non laser light source: a phase I/II study. *Gastrointest Endosc* 1999; 49: 760-764
- 16 Marcus SL, McIntyre WR. Photodynamic therapy systems and applications. *Expert Opin Emerg Drugs* 2002; 7: 321-334
- 17 Ha BW, Kim JI, Hwang EM, Oh YK, Cheung DY, Park SH, Kim JK, Choi KY. A case of photodynamic therapy for early esophageal cancer recurred after esophagectomy. *Korean J Gastroenterol* 2007; 49: 331-335
- 18 Tokar JL, Haluszka O, Weinberg DS. Endoscopic therapy of dysplasia and early-stage cancers of the esophagus. *Semin Radiat Oncol* 2007; 17: 10-21
- 19 Chen M, Pennathur A, Luketich JD. Role of photodynamic therapy in unresectable esophageal and lung cancer. *Lasers Surg Med* 2006; 38: 396-402
- 20 Heier SK, Rothman KA, Heier LM, Rosenthal WS. Photodynamic therapy for obstructing esophageal cancer: light dosimetry and randomized comparison with Nd:YAG laser therapy. *Gastroenterology* 1995; 109: 63-72
- 21 Scheider DM, Siemens M, Cirocco M, Haber GB, Kandel G, Kortan P, Marcon NE. Photodynamic therapy for the treatment of tumor ingrowth in expandable esophageal stents. *Endoscopy* 1997; 29: 271-274
- 22 McCaughan JS Jr, Ellison EC, Guy JT, Hicks WJ, Jones JJ, Laufman LR, May E, Nims TA, Spiridonidis CH, Williams TE. Photodynamic therapy for esophageal malignancy: a prospective twelve-year study. *Ann Thorac Surg* 1996; 62: 1005-1009; discussion 1009-1010
- 23 Natsugoe S, Aikou T, Shimada M, Kumano T, Shimazu H, Nakamura K. Loco-regional treatment for esophageal cancer with bleomycin adsorbed to activated carbon particles. *Anticancer Res* 1993; 13: 1785-1787
- 24 Hagiwara A, Takahashi T, Kitamura K, Sakakura C, Shirasu M, Ohgaki M, Imanishi T, Yamasaki J. Endoscopic local injection of a new drug delivery formulation, anticancer drug bound to carbon particles, for digestive cancers: pilot study. *J Gastroenterol* 1997; 32: 141-147
- 25 Ortnier MA, Taha AA, Schreiber S, Wirth J, Weber-Eibl J, Ernst H, Lochs H. Endoscopic injection of mitomycin adsorbed on carbon particles for advanced esophageal cancer: a pilot study. *Endoscopy* 2004; 36: 421-425
- 26 Wadleigh RG, Abbasi S, Korman L. Palliative ethanol injections of unresectable advanced esophageal carcinoma combined with chemoradiation. *Am J Med Sci* 2006; 331: 110-112
- 27 Dunkin BJ, Martinez J, Bejarano PA, Smith CD, Chang K, Livingstone AS, Melvin WS. Thin-layer ablation of human esophageal epithelium using a bipolar radiofrequency balloon device. *Surg Endosc* 2006; 20: 125-130
- 28 葛勤利, 杨伟捷, 张红霞. 内镜下综合治疗食管恶性肿瘤85例. *世界华人消化杂志* 2005; 13: 2884-2885
- 29 朱亚芳, 王建红, 周建明, 张琴芳, 汤志英. 内镜射频治疗食管恶性梗阻. *中华消化内镜杂志* 2003; 20: 138-139
- 30 谷中红, 刘昱辰, 高培培. 经内镜射频治疗食管支架置入术后再狭窄40例. *中华消化内镜杂志* 2002; 19: 52-53
- 31 曹映林, 李可, 庄桂华, 谢永莲. 经内镜射频治疗消化道疾病. *临床消化病杂志* 2004; 16: 39-40
- 32 张威庆, 邵先玉. 内镜下气囊扩张术治疗食管狭窄32例. *世界华人消化杂志* 2004; 12: 1504-1505
- 33 Costamagna G, Marchese M, Iacopini F. Self-expanding stents in oesophageal cancer. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2006; 18: 1177-1180
- 34 Saito Y, Tanaka T, Andoh A, Minematsu H, Hata K, Tsujikawa T, Nitta N, Murata K, Fujiyama Y. Novel Biodegradable Stents for Benign Esophageal Strictures Following Endoscopic Submucosal Dissection. *Dig Dis Sci* 2007
- 35 Petruzzello L, Costamagna G. Stenting in esophageal strictures. *Dig Dis* 2002; 20: 154-166
- 36 Wenger U, Johnsson E, Arnelo U, Lundell L, Lagergren J. An antireflux stent versus conventional stents for palliation of distal esophageal or cardia cancer: a randomized clinical study. *Surg Endosc* 2006; 20: 1675-1680
- 37 Wengrower D, Fiorini A, Valero J, Waldbaum C, Chopita N, Landoni N, Judchack S, Goldin E. EsophaCoil: long-term results in 81 patients. *Gastrointest Endosc* 1998; 48: 376-382
- 38 方道连, 杨红旗, 杨婧, 李志红, 杜涓. 放置内支架治疗食管内外瘘37例. *中华消化内镜杂志* 2006; 23: 142-143
- 39 施瑞华, 于莲珍, 肖斌, 丁静, 许迎红, 陶桂, 陈阿芬. 内镜下置放覆膜合金支架治疗食管瘘的临床应用. *中华消化内镜杂志* 2006; 23: 119-121
- 40 李健, 易会兴, 王立东. 食管癌内镜技术最优化原则的思考. *医学与哲学* 2004; 25: 17-20
- 41 Wojcicki M, Kostyrka R, Kaczmarek B, Kordowski J, Romanowski M, Kaminski M, Klonek J, Zielinski S. Electrochemical therapy in palliative treatment of malignant dysphagia: a pilot study. *Hepatogastroenterology* 1999; 46: 278-284
- 42 Nomura T, Miyashita M, Makino H, Maruyama H, Katsuta M, Kashiwabara M, Takahashi K, Sasajima K, Yamashita K, Tajiri T. Argon plasma coagulation for the treatment of superficial esophageal carcinoma. *J Nippon Med Sch* 2007; 74: 163-167
- 43 李健, 李振峰, 段芳龄. 食管癌内镜诊断与治疗进展. *胃肠病学和肝病学杂志* 2003; 6: 583-588

编辑 程剑侠 电编 李军亮

胶囊内镜的临床使用价值

王琳, 任建林

背景资料
消化道内镜技术的发展有150多年的历史, 在2000年以前, 经历了硬式内镜、半曲式内镜、光导纤维内镜和电子内镜4个发展阶段, 进入新世纪后, 胶囊内镜的出现标志着消化内镜技术发展史上又一个新的里程碑之诞生。

王琳, 任建林, 厦门大学附属中山医院消化内科, 厦门大学消化疾病研究所, 厦门市消化疾病诊治中心, 福建省厦门市361004

任建林, 医学博士、教授、主任医师、博士生导师, 厦门大学附属中山医院消化内科主任, 厦门大学消化疾病研究所常务副所长, 厦门市消化疾病诊治中心常务副主任。

通讯作者: 任建林, 361004, 福建省厦门市湖滨南路201号, 厦门大学附属中山医院消化内科, jianlin.ren@xmzsh.com

电话: 0592 - 2993170

收稿日期: 2007-09-12 修回日期: 2007-10-20

摘要

小肠是消化道最长的器官, 各种小肠疾病目前越来越被人们认识, 而既往传统的各种检查方法敏感性和准确性都较低, 很难在术前作出明确诊断。胶囊内镜是一种无创、可靠、操作简便的内镜, 他能对小肠进行全程实景观察, 使小肠不再是内镜检查的盲区。

关键词: 胶囊内镜; 小肠疾病; 不明原因消化道出血

王琳, 任建林. 胶囊内镜的临床使用价值. 世界华人消化杂志 2007;15(30):3226-3228

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/3226.asp>

0 引言

胶囊内镜(capsule endoscopy)也称无线胶囊内镜(wirelesscapsule endoscopy), 正式名称是M2ATM胶囊, 是以色列吉文成像公司(Given Image Ltd.)研制成功的一项新的检查技术。2001-08获得美国FDA认证, 并在美国及欧洲各国开始应用^[1]。胶囊内镜的问世填补了小肠可视性检查的空白, 也为消化道无创检查带来新的革命, 为不宜行有创性检查的老年消化道疾病患者带来福音。

1 胶囊内镜结构和原理

胶囊内镜由三个主要系统组成: 一个可摄像的胶囊, 一个数据记录器和配备有成像软件的计算机工作站^[2]。胶囊通过胃肠蠕动推进并在腔内拍成照片显示成视频。该胶囊为一次性, 不能重复使用, 其利用数字无线频率通信, 将信号传输到绑在体外的记录器。便携的数据记录器内置可接收/记录的元件, 能接收从胶囊发出的数据信号。另外他还包括附在腹部的传感器和一个

对每个传感器信号强度测量的接收器, 接收器选择最强的信号然后记录下其视频数据并保存。然后, 数据通过一个高智能的数字化转换到能对获得的数据进行存储、分析的计算机工作站, 利用先进的RAPID成像软件对工作站内的视频图像进行处理。胶囊内镜的胶囊大小为27 mm×11 mm, 其电池照明时间长达8 h。该胶囊由微型摄像镜头、发光管、电池和电脑微芯片组成^[3]。胶囊从口吞入, 无需充气, 借助胃肠动力, 自然通过胃肠道, 连续摄片形成视频, 以发现胃肠道病变。

2 胶囊内镜的使用方法

检查前禁食8-10 h。在吞入胶囊前将记录器紧贴腹部绑在腰间, 吞下胶囊后, 患者不必限制活动, 但必须禁水2 h, 4 h后可进简餐。胶囊内镜的电池可以提供大约8 h能量, 吞入胶囊8 h后, 将患者的记录器中的数据下载至RAPID工作站, 用相关专业软件显示成视频, 分析解释结果, 作出诊断。

3 适应征

胶囊内镜是一种无创、安全检查整个小肠的诊断技术, 其主要适应症为不明原因消化道出血、克罗恩病和可疑小肠肿瘤等^[4-8]

3.1 小肠出血 胶囊内镜主要应用于急性、复发性、隐性小肠出血, 胃镜及结肠镜检查无异常的患者。目前针对小肠出血有创检查方法有肠系膜动脉造影和双气囊小肠镜, 而无创伤性检查有核素扫描、X线小肠钡餐和胶囊内镜。肠系膜动脉造影对消化道出血常具有定位和定性作用, 消化道出血量 ≥ 0.5 mL/min, 造影时可能见到造影剂从血管内外漏, 出血部位能明确定位, 对急性下消化道出血的阳性诊断率平均为47%, 如大量活动性出血, 阳性率为61%-72%, 但对出血量 <0.5 mL/min的下消化道出血诊断阳性率明显下降。动脉造影除了能显示活动性出血处, 还能显示某些非活动性出血病灶, 如血管发育不良和血供丰富的小肠肿瘤。核素扫描有助于原因不明显性出血定位, 最常使用的是⁹⁹锝红

研发前沿
胶囊内镜也称无线胶囊内镜, 正式的名称是M2ATM胶囊, 是由以色列吉文成像公司研制成功的一项新的检查技术。2001-08获得美国FDA认证, 并已在美国及欧洲各国开始应用。胶囊内镜是目前在诊断胃肠道疾病内窥镜中一项革命性技术, 他对胃肠疾病特别是小肠疾病具有较高的诊断价值。

细胞标记, 当出血量达到0.1-0.4 mL/min, 扫描可得到阳性结果, 阳性率为45%, 但由于假阳性和假阴性发生率均较高, 因此不能单凭核素扫描决定手术或介入性治疗。双气囊小肠镜对不明原因消化道出血也有较高诊断率。钟捷 *et al*^[9]在20例不明原因消化道出血患者中的明确诊断率为80%, 但由于检查时间长(全小肠检查需6-8 h), 属有创伤性检查, 在出血期间检查患者常常无法承受, 而家属也有顾虑。X线小肠钡餐包括全消化道钡餐和小肠钡灌检查, 前者对隐形成出血诊断率很低, 仅为6.5%; 而后者是将细导管经口/鼻/内镜插到近屈氏韧带, 注入空气和钡剂, 使小肠X线造影质量得到改善, 对不明原因消化道出血诊断率提高到10%-25%, 但对小肠血管畸形的诊断率仍然很低, 而且插管时患者亦感到不适。由于胶囊内镜检查属无创伤性、非侵入性诊断方法, 因此对于合并严重的心肺等多脏器功能不全、无法承受肠系膜动脉造影和双气囊小肠镜等有创性检查的患者尤为合适。Adamek *et al*^[10]采用胶囊内镜对诊断不明的26例小肠出血, 81%找到出血原因。陈海英 *et al*^[11]对91例不明原因消化道出血患者采用胶囊内镜进行了94次检查, 胶囊内镜检查的阳性率为74.7%, 疑诊率为11.0%, 明显高于既往传统检查, 认为可作为不明原因消化道出血的首选方法。褚晔 *et al*^[11]对53例不明原因消化道出血患者、22例因心肺脑功能不全无法耐受常规胃肠镜检查的消化道出血患者, 采用胶囊内镜进行胃肠道检查。结果75例中有74例(98.6%)完成检查, 发现消化道病变64例, 检出率是86.5%。但是胶囊内镜检查时间的选择对出血原因的检出率有重大的影响。Pennazio^[13]报道, 100例出血患者胶囊内镜检查的病源总检出率为47%, 其中明显出血组病源检出率为92.3%, 隐性出血组为44.2%, 而以往有出血史、目前无出血组检出率仅为12.9%, 因此出血后择时行胶囊内镜检查可望提高检出率。

3.2 小肠其他器质性病变 从目前资料显示, 胶囊内镜对其他小肠疾病诊断优于小肠X线和肠道CT检查。综合国外胶囊内镜检查1024例, 小肠肿瘤诊断率为6.0%-8.9%。Mow *et al*^[14]对有临床症状的肠肠激综合征患者行胶囊内镜检查, 确诊克罗恩病20例, 疑诊10例, 阳性率达54.5%。因此认为胶囊内镜可作为诊断小肠克罗恩病的首选检查。

3.3 食管、胃、结肠器质性病变 胶囊内镜在食管通过时间很快, 对食管疾病的诊断价值有限。

胶囊内镜的摄像头的焦距仅几毫米, 因此对胃内疾病诊断也有限。由于胶囊内镜电池只能持续8 h, 当胶囊到达结肠时已电力不足, 结肠腔较小肠大, 可能因胶囊内镜由于摄像方向不全而遗漏一些可疑部位的检测, 加上结肠的粪便影响视野, 使得数据分析困难和可靠性下降。由于胶囊内镜的移动不可控制, 无活检功能, 受消化道积液对观察的影响以及图像分辨率不如电子内镜, 因此目前不能替代传统的电子胃镜和电子结肠对食管、胃、结肠疾病的诊断。

3.4 消化道功能性病变 胶囊内镜依靠消化道动力作用向前推进, 因此在获得消化道图像的同时, 可在无创、生理的肠蠕动情况下记录到胃肠运转时间。卫炜 *et al*^[15]分析124例完成胶囊内镜全小肠检查结果, 胃平均排空时间为44.5 min, 小肠平均通过时间为286 min, 年龄影响其通过小肠的时间, 性别、体质量指数对消化道指数无影响。因此在检查同时记录转运时间对消化道动力的研究有一定的价值。

4 禁忌症

凡能妨碍胶囊正常通过消化道的疾病均属检查禁忌症, 如胃肠道狭窄、梗阻、穿孔、肠瘘和大憩室等。也不推荐在安装有起搏器患者和儿童中使用。

5 并发症

5.1 胶囊嵌顿 胶囊内镜检查的主要并发症是胶囊嵌顿, 他可嵌顿在狭窄处, 停留大憩室内或术后胃的输入襻无法排出, 其发生率约1%^[16]。当患者大便无胶囊排出, 提示可能发生嵌顿, 最后图像提示嵌顿的位置, 因此诊断并不困难。当胶囊无法排出, 则需外科手术方法取出, 胶囊内镜检查前行X线检查对预测是否发生嵌顿并无帮助。国外相关研究^[17]提示, 腹部手术史、内分泌功能紊乱(如糖尿病)和肠腔内新生物是影响胶囊未完成全小肠检查的危险因素。现国外已研制成功即将用于临床的胶囊内镜探路系统^[13], 即先服用与M2A胶囊内镜同样大小的胶囊, 如能成功排出, 体外可行正式胶囊内镜检查, 否则不能检查。滞留在体内的探路胶囊其后可自行溶解排出。这一技术的应用可为将来胶囊内镜的普遍应用提供有效的预测方法。卫炜 *et al*^[15]的研究建议对年龄>60岁患者、有肠道克罗恩病史或疑诊肠道克罗恩病者、怀疑小肠存在新生物者行胶囊内镜检查前, 口服促动力药能提高胶囊内镜检查效率。

相关报道
迄今为止, 全世界至少已有超过8000例患者接受胶囊内镜的检测。研究胶囊内镜的许多临床试验还包括在炎症性肠病、息肉综合征、腹腔疾病等, 均显示出胶囊内镜良好的应用前景。

创新盘点
胶囊内镜是目前在诊断性胃肠道内镜中一项显著的技术创新。特别是在不明原因胃肠道出血疾病上, 胃镜和肠镜不能识别出胃肠道出血的具体位置, 因而胶囊内镜具有很强的吸引力, 使之成为第三代内镜。

同行评价
本文提出的问题
明确, 内容详细,
为临床提供了一
些前沿信息, 有
一定的临床意义.

5.2 胃内滞留 Hollerbach *et al*^[18]发现2例有幽门运动功能异常的的患者, 胶囊在胃内滞留时间过长(达4 h), 后经胃镜送入十二指肠.

5.3 其他 胶囊内电池原料有一定的毒性, 但胶囊在胃肠道的完整性不被破坏, 就不会产生毒性作用. 在现有报道资料中, 尚未发现胶囊破裂现象, 也未发现其他并发症.

6 结论

胶囊内镜为小肠疾病的诊断提供了一个全新的检查手段, 无创、无交叉感染, 易为患者接受. 他对小肠疾病的诊断率较其他传统的方法有所提高, 但是由于胶囊运动的不可控制性和无活检功能, 在一定程度上影响诊断和应用.

7 参考文献

- 1 Yu M. M2A capsule endoscopy. A breakthrough diagnostic tool for small intestine imaging. *Gastroenterol Nurs* 2002; 25: 24-27
- 2 Fireman Z, Mahajna E, Broide E, Shapiro M, Fich L, Sternberg A, Kopelman Y, Scapa E. Diagnosing small bowel Crohn's disease with wireless capsule endoscopy. *Gut* 2003; 52: 390-392
- 3 Iddan G, Meron G, Glukhovskiy A, Swain P. Wireless capsule endoscopy. *Nature* 2000; 405: 417
- 4 Gong F, Swain P, Mills T. Wireless endoscopy. *Gastrointest Endosc* 2000; 51: 725-729
- 5 Fleischer DE. Capsule endoscopy: the voyage is fantastic--will it change what we do? *Gastrointest Endosc* 2002; 56: 452-456
- 6 Ge ZZ, Hu YB, Xiao SD. Capsule endoscopy and push enteroscopy in the diagnosis of obscure gastrointestinal bleeding. *Chin Med J (Engl)* 2004; 117: 1045-1049
- 7 Lewis BS, Swain P. Capsule endoscopy in the evaluation of patients with suspected small intestinal bleeding: Results of a pilot study.

- Gastrointest Endosc* 2002; 56: 349-353
- 8 Ge ZZ, Hu YB, Xiao SD. Capsule endoscopy in diagnosis of small bowel Crohn's disease. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 1349-1352
- 9 钟捷, 张晨莉, 张吉, 吴云林, 江石湖. 推进式双气囊电子小肠镜在小肠疾病诊断中的应用. *中华消化杂志* 2003; 23: 591-594
- 10 Adamek HE, Hartmann D, Hahne M, Schilling D, Riemann JF. [Endoscopy of the small intestine without tube or enema? A video capsule makes it possible] *MMW Fortschr Med* 2002; 144: 34-5
- 11 陈海英, 戈之铮, 高云杰, 胡运彪, 萧树东. 胶囊内镜对不明原因消化道出血诊断价值的评估. *胃肠病学* 2006; 11: 586-589
- 12 褚晔, 吴云林, 张曙, 钟捷, 张晨莉, 翟祖康, 尹路, 姚季生. 消化道出血患者的胶囊内镜检查. *上海第二医科大学学报* 2005; 25: 886-888
- 13 Pennazio M. Enteroscopy and capsule endoscopy. *Endoscopy* 2006; 38: 1079-1086
- 14 Mow WS, Lo SK, Targan SR, Dubinsky MC, Treyzon L, Abreu-Martin MT, Papadakis KA, Vasilias E. Initial experience with wireless capsule enteroscopy in the diagnosis and management of inflammatory bowel disease. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2004; 2: 31-40
- 15 卫伟, 戈之铮, 高云杰, 顾静莉, 胡运彪, 萧树东. 胶囊内镜检查对消化道转运时间的影响. *上海交通大学学报* 2006; 26: 519-522
- 16 Signorelli C, Rondonotti E, Villa F, Abbiati C, Beccari G, Avesani EC, Vecchi M, de Franchis R. Use of the Given Patency System for the screening of patients at high risk for capsule retention. *Dig Liver Dis* 2006; 38: 326-330
- 17 Quan C, Chen G, Lee-Henderson M, Kalpakian M, Chan S, Tran T, Enayati P, Dulai G, Kitahara F, Arnott I, Sul J, Jutabha R. Overtube-assisted placement of wireless capsule endoscopy device. *Gastrointest Endosc* 2005; 61: 914-916
- 18 Hollerbach S, Kraus K, Willert J, Schulmann K, Schmiegeler W. Endoscopically assisted video capsule endoscopy of the small bowel in patients with functional gastric outlet obstruction. *Endoscopy* 2003; 35: 226-229

编辑 李军亮 电编 李军亮

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.

介入性超声内镜技术的研究进展

陈建民, 任建林

陈建民, 任建林, 厦门大学附属中山医院消化内科, 厦门大学消化疾病研究所, 厦门市消化疾病诊治中心, 福建省厦门市 361004

通讯作者: 陈建民, 361004, 福建省厦门市, 厦门大学附属中山医院消化内科. jianmin.chen@xmzsh.com

电话: 0592-2993171

收稿日期: 2007-09-12 修回日期: 2007-10-20

摘要

随着超声内镜(endoscopic ultrasonography, EUS)技术不断改进和提高, EUS在仪器性能和临床运用上已经发展成一项成熟的技术, 其应用也已从最初单纯的诊断工具, 发展成为一种很有前途的介入治疗工具, 并且在临床上发挥越来越重要的作用。目前, EUS引导下细针穿刺细胞学检查和EUS引导下注射技术已成为内镜医生诊治疾病的有力武器。随着超声内镜设备的不断改进, 更多的EUS新技术将不断涌现。本文就目前的介入性超声内镜技术作一概述。

关键词: 超声内镜; 介入; 穿刺

陈建民, 任建林. 介入性超声内镜技术的研究进展. 世界华人消化杂志 2007;15(30):3229-3232

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/3229.asp>

0 引言

自1980年Dimagno *et al*首次将电子线阵式超声内镜用于动物消化道检查的试验获得成功以来, EUS技术不断改进和提高, 在仪器性能和临床运用上已经发展成一项成熟的技术^[1-3]。介入线阵EUS, 与传统的环扫EUS不同, 其超声扫描平面与内镜的长轴一致, 在进行内镜下穿刺时, 穿刺针始终在超声的监视之下, 大大提高了介入诊疗的范围。彩色多普勒超声内镜(endoscopic color Doppler ultrasonography, ECDUS)能够显示周围局部血流信号, 进一步提高诊断的准确性, 并扩大应用范围。目前在临床上运用较成熟的EUS介入技术有EUS引导下细针穿刺抽吸活检技术、EUS引导下细针注射技术和EUS引导下胰腺囊肿引流技术等。

1 超声内镜介导下细针吸取细胞学检查

超声内镜介导下细针吸取细胞学检查(Endos-

copic ultrasonography guided fine needle aspiration, EUS-FNA)是发展最早的EUS介入技术, 即用超声内镜观察和追踪穿刺的细针, 对可疑病灶进行穿刺抽吸活检, 以进行细胞学检查。EUS-FNA不同于体表超声引导和CT引导下的穿刺, EUS-FNA因从腔内进行穿刺, 穿刺距离较短, 同时避免皮下脂肪、肠腔气体和腹水等因素的影响, 能准确定位穿刺点, 并能避开重要血管, 所以成功率较高^[4]。此外, 由于EUS较高的超声频率, 其分辨率明显优于体表超声, 可以显示更小的病灶, 技术熟练的超声内镜医师可以对直径小于5 mm的病变进行EUS-FNA, 这是目前任何其他影像技术指导下穿刺难以实现的^[5-8]。目前较为成熟的穿刺部位有: (1)食管旁淋巴结针吸活检, (2)胰腺、肾上腺占位病灶针吸活检, (3)纵隔肿瘤针吸活检, (4)结肠癌根治术后吻合口周围淋巴结穿刺活检, (5)上消化道周围性质不明的肿块如腹腔内不明原因的肿瘤、淋巴结、肝左叶病变和左肾上腺肿瘤、胆管癌、壶腹癌等, (6)消化道黏膜下肿瘤, 尤其是胃肠间质瘤。Varadarajulu *et al*^[9]对6例CT和EUS诊断为胆囊癌的患者行EUS-FNA, 其中5例显示为腺癌, 1例为良性病变, 6例患者均经过手术或随访证实。Sasaki *et al*^[10]对22例病变位于或临近结肠或直肠肠壁的患者行EUS-FNA, 结果有21例(95.5%)获得了足够用于检测评估的组织, EUS-FNA检测恶性和良性肿瘤的总检出率为95.5%。由于EUS-FNA取材仅能作细胞学检查, 有时对病变性质难以作出正确的判断。近年来有人采用内镜超声下的切割针(Trucut Needle)^[11], 可以在内镜超声引导下对病变进行切割活检, 大大提高了取材质量, 可以取得完整的组织条, 进行组织学诊断。Larghi *et al*^[12]对23例经放射学检查发现有胰腺实质性包块的患者进行EUS引导下的Trucut Needle穿刺, 结果有17例成功获取了胰腺组织, 总体诊断准确率为61%(17/23), 在活检成功并随访的16例患者中, 诊断准确率为87.5%, 且未出现并发症。

2 EUS介导下细针注射技术

EUS介导下细针注射技术(EUS-guided fine

背景资料

EUS是消化内镜领域发展最快的技术之一, 中国越来越多的医院近年来开展了EUS, 但大多数仍然局限在诊断。能开展介入治疗的医疗单位仍然很少。本文就国内外EUS在介入治疗方面的进展作一综述, 以供EUS医师参考。

研发前沿
EUS的最大特点在于能在更近的距离进行超声扫描和准确穿刺,利用这一特点,可以将药物、细胞因子、同位素、射频等准确引导到肿瘤局部,从而提高治疗效果。EUS引导下的注射技术在肿瘤的局部治疗方面有十分广阔的应用前景。

needle injection, EUS-FNI)是在EUS引导下将药物通过穿刺针注射到病灶局部,以达到预期的治疗目的。目前使用较成熟的有: EUS引导下的腹腔神经丛阻滞(Celiac Block, Endosonography-guided celiac plexus neurolysis, EUS-CPN)和EUS引导下注射肉毒杆菌毒素治疗贲门失弛缓症等。

2.1 EUS介导下的腹腔神经丛阻滞 应用超声内镜引导将神经破坏剂注射于腹腔神经节区域,用于治疗由胰腺癌和慢性胰腺炎等上腹部疾病引起的剧烈腹痛。腹腔神经节位于腹主动脉的前侧方,腹腔神经节与腹腔干根部的相对关系比较固定,在EUS下可以清晰显示,所以EUS可以较为准确地对腹腔神经节进行定位。在EUS的引导下对腹腔神经节区域注射局部麻醉药、神经破坏剂或糖皮质激素类药物,通过阻滞、毁损神经丛中断痛觉通路或消除局部炎症,达到止痛目的。Gunaratnam *et al*^[13]对58例胰腺癌引起的腹痛患者行EUS-CPN,结果78%的患者在第1次治疗后,疼痛缓解明显缓解,维持止痛可达24 wk。与传统经皮穿刺方法比较,腹腔神经节与胃腔仅一壁相隔,穿刺距离近,定位准确,因此副损伤和并发症大大减少。Gress *et al*^[14]研究显示,在90例行EUS-CPN的患者中,有50例(55%)疼痛明显减轻,治疗后2-4 wk疼痛指数从治疗前的8下降到2,26%的患者在治疗后12 wk仍然有效,10%的患者在治疗后24 wk仍然有效,但对45岁以下和过去有胰腺手术史患者的止痛效果较差。

2.2 EUS介导下注射肉毒杆菌毒素治疗贲门失弛缓症 应用线阵式超声内镜引导可准确地对食管括约肌注射肉毒杆菌毒素,最大限度地阻断神经肌肉接头,来达到治疗贲门失弛缓症的目的。与一般内镜下注射相比,EUS引导可以准确将肉毒杆菌毒素注射入增厚的肌层内,疗效更可靠,是贲门失弛缓症安全、微创的治疗方法之一,可作为贲门失弛缓扩张治疗的补充。Hoffman *et al*^[15]应用线阵式超声内镜下显示下食管括约肌的平滑肌层后,通过活检通道插入细针在四个不同的象限分别注射1 mL的肉毒杆菌毒素(总剂量为80 U-100 U)治疗4例患者,随访5-13 mo,吞咽困难无1例复发,明显优于一般内镜下注射肉毒杆菌毒素的疗效。

2.3 内镜超声介导下肿瘤局部注射治疗 利用EUS-FNI准确定位的特点,近年来有学者^[16]提出将其应用于肿瘤的局部注射,这无疑为肿瘤的治疗又提供了一种崭新的手段。EUS引导下肿瘤的局部注射主要针对于失去根治手术机

会、或术后复发的上消化道及其周围的恶性肿瘤,如某些纵膈肿瘤和胰腺肿瘤等。化疗药物或其他抗肿瘤药物采用局部注射的方式可以提高局部治疗的效果,减少用药剂量,减少药物的毒性反应。EUS引导下不仅定位准确,而且穿刺路径短,大大减少副损伤和药物外漏造成的并发症,尤其是采用有多普勒功能的EUS,可以应用彩色血流图或彩色多普勒能量图了解病变周围的血管和肿瘤的血运情况,以减少血管损伤。局部注射的药物一般采用化疗药物,可根据肿瘤的来源选择相应的化疗药物,如健泽、丝裂霉素和氟尿嘧啶等,也可以联合注射免疫增强剂以提高注射的疗效。近年来随着基因治疗的发展,EUS-FNI技术已成为治疗晚期胰腺癌的重要手段。Chang *et al*^[17]通过EUS-FNI技术对8例中晚期胰腺癌患者在线阵超声的引导下将同种淋巴细胞注射到局部肿瘤组织中,术后随访其毒副作用、肿瘤应答、远期生活质量评估及生存率,结果显示3名患者达到部分缓解,2名患者病情继续进展。试验中,未发现肿瘤反应与植入同种淋巴细胞的数量和生存率存在相关性,患者生存平均时间为13.2 mo。Hecht *et al*^[18]利用ONYX-15减毒腺病毒(因E1B基因被去除,在人类只能于抑瘤基因功能异常的细胞中复制)能够裂解p53失活的靶细胞这一特点,对胰腺癌患者进行了I、II期临床试验。借助于EUS-FNI技术多点注射在肿瘤组织中,结果发现21例晚期胰腺癌患者中有4例达到缓解水平,11例病情继续发展,平均半年生存率约67%。随着基因治疗和免疫治疗的进步,EUS-FNI技术的应用前景必然十分广阔。

3 EUS介导下射频切除技术(EUS-guided radio-frequency ablation, EUS-RFA)

经皮射频消融术适用于局灶性肿瘤组织的摧毁,特别是肝实质性肿瘤和肝血管瘤等。其他的治疗方法还包括冷凝、微波、光动力、激光和酒精注射等。在EUS引导下,将带有射频发生器的穿刺针刺入深部肿瘤组织内,然后以射频高温使肿瘤组织发生坏死可以达到治疗目的。Goldenberg *et al*^[19]对动物的胰腺进行了射频消融试验,在EUS定位下,利用19G的细针电极经胃壁穿刺到正常胰腺组织中,以285 mA的电流持续消融6 min,比较安全地形成局限的、边界清楚的凝固性坏死灶。并发症包括局灶性胰腺炎(1/13),脂肪酶升高(1/13)和组织周围的电灼伤

(3/13). 该动物试验的结果显示, EUS介导消融治疗有望被用于治疗小的胰腺内分泌肿瘤、不可切除的晚期胰腺癌及肝左叶肿瘤。

4 EUS介导放射性粒子植入(EUS-guided implantation of radiation seeds)

对于无法行切除术的晚期胰腺癌患者, 术中在胰腺植入放射性粒子¹²⁵I可以有效缓解癌性疼痛缓解, 延长患者生存时间。EUS因其创伤小、相对安全等方面的优势为这种粒子植入术的开展创造了良好的条件。国内金震东 *et al*^[20]在超声内镜引导下对10例手术无法切除的胰腺癌患者行¹²⁵I粒子定向植入术, 结果9例患者疼痛于3 d内有所缓解, 术后1 mo随访时4例疼痛部分缓解, 3例疼痛轻度缓解, 1例肿瘤部分缩小。

5 EUS介导下的胆胰疾病引流技术

经十二指肠逆行胰胆管造影(ERCP)以及相应的支架治疗在解除胆、胰管梗阻方面作用显著, 但约10%-15%的患者因为十二指肠乳头的通路被阻断(如肿瘤浸润、压迫等), ERCP较难开展, 而经皮肝胆管穿刺造影及引流(PTCD)并发症较多且外引流袋十分不便, 此时EUS可发挥其不可替代的作用。在EUS引导下选择合适的位置, 避开血管, 将穿刺针刺入囊肿或胆总管, 并置入导丝, 再通过导丝将引流支架置入囊肿, 从而实现了囊肿与胃或十二指肠之间的造瘘, 使假性囊肿得到引流、胆胰管狭窄得到解除。1996年Wiersma *et al*^[21]报道了首例完全在EUS引导下的胰腺假性囊肿内镜引流术。1992年Grimm *et al*^[22]首先在扇形线阵扫描型EUS引导下, 成功地进行胰腺假性囊肿胃置管引流术。目前, 这一技术方法已较为成熟, 只要囊肿已经成熟, 囊肿壁与胃肠道壁之间的最短距离小于1 cm, 即使囊肿未突入胃腔造成压迫, 也可在EUS引导下行穿刺引流术。Giovannini *et al*^[23]于2001年首先开展了EUS下胆总管-十二指肠吻合术, 对1例阻塞性黄疸患者常规ERCP失败后, 在治疗性EUS引导下, 用5F针状切开刀切开十二指肠壁进入总胆管, 造影成功后拔出切开刀置入导丝, 沿导丝置入6.5 F Soehendra扩张器扩张穿刺道, 随后更换大孔道十二指肠镜, 置入10 Fr塑料支架, 5 d后患者黄疸减退, 血胆红素降至正常, 无并发症发生。在胆胰疾病引流中, EUS的作用主要是介导穿刺, 由于EUS可以清楚显示穿刺路径, 减少血管损伤。同时, 胃肠道内引流也可以减少感染的发

生。因此, EUS介导的引流技术在将来的应用将会越来越广泛。

6 结论

介入性超声内镜技术已经在临床上取得了许多可喜的成就。随着超声内镜设备不断发展完善, 相关医学技术的不断深入, 超声内镜作为一种新兴的介入治疗工具的应用范围将会十分广阔。

7 参考文献

- 1 金震东. 现代腔内超声学. 第1版. 北京: 北京科学出版社, 2000: 99
- 2 Caletti G, Fusaroli P. Endoscopic ultrasonography. *Endoscopy* 2001; 33: 158-166
- 3 Fockens P. Future developments in endoscopic imaging. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2002; 16: 999-1012
- 4 Wiersema MJ, Vilmann P, Giovannini M, Chang KJ, Wiersema LM. Endosonography-guided fine-needle aspiration biopsy: diagnostic accuracy and complication assessment. *Gastroenterology* 1997; 112: 1087-1095
- 5 Giovannini M, Moutardier V, Pesenti C, Bories E, Lelong B, Delperro JR. Endoscopic ultrasound-guided bilioduodenal anastomosis: a new technique for biliary drainage. *Endoscopy* 2001; 33: 898-900
- 6 Chang KJ, Erickson RA, Nguyen P. Endoscopic ultrasound (EUS) and EUS-guided fine-needle aspiration of the left adrenal gland. *Gastrointest Endosc* 1996; 44: 568-572
- 7 Tsukinaga S, Imazu H, Uchiyama Y, Kakutani H, Kuramoti A, Kato M, Kanazawa K, Kobayashi T, Searashi Y, Tajiri H. Diagnostic approach using endosonography guided fine needle aspiration for lymphadenopathy in primary sclerosing cholangitis. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 3758-3759
- 8 Takahashi K, Yamao K, Okubo K, Sawaki A, Mizuno N, Ashida R, Koshikawa T, Ueyama Y, Kasugai K, Hase S, Kakumu S. Differential diagnosis of pancreatic cancer and focal pancreatitis by using EUS-guided FNA. *Gastrointest Endosc* 2005; 61: 76-79
- 9 Varadarajulu S, Eloubeidi MA. Endoscopic ultrasound-guided fine-needle aspiration in the evaluation of gallbladder masses. *Endoscopy* 2005; 37: 751-754
- 10 Sasaki Y, Niwa Y, Hirooka Y, Ohmiya N, Itoh A, Ando N, Miyahara R, Furuta S, Goto H. The use of endoscopic ultrasound-guided fine-needle aspiration for investigation of submucosal and extrinsic masses of the colon and rectum. *Endoscopy* 2005; 37: 154-160
- 11 Wiersema MJ, Levy MJ, Harewood GC, Vazquez-Sequeiros E, Jondal ML, Wiersema LM. Initial experience with EUS-guided trucut needle biopsies of perigastric organs. *Gastrointest Endosc* 2002; 56: 275-278
- 12 Larghi A, Verna EC, Stavropoulos SN, Rotterdam H, Lightdale CJ, Stevens PD. EUS-guided trucut needle biopsies in patients with solid pancreatic masses: a prospective study. *Gastrointest Endosc* 2004; 59: 185-190
- 13 Gunaratnam NT, Sarma AV, Norton ID, Wiersema

应用要点
随着纵轴超声内镜技术的发展, EUS正逐步从单纯的诊断工具发展成—重要的介入工具, 其在深部器官肿瘤的治疗方面的应用会愈加广泛。

同行评价
本文内容较好,反映了当代技术进展概况,具有很强的临床指导意义。

- MJ. A prospective study of EUS-guided celiac plexus neurolysis for pancreatic cancer pain. *Gastrointest Endosc* 2001; 54: 316-324
- 14 Gress F, Schmitt C, Sherman S, Ciaccia D, Ikenberry S, Lehman G. Endoscopic ultrasound-guided celiac plexus block for managing abdominal pain associated with chronic pancreatitis: a prospective single center experience. *Am J Gastroenterol* 2001; 96: 409-416
- 15 Hoffman BJ, Knappe WL, Bhutani MS, Verne GN, Hawes RH. Treatment of achalasia by injection of botulinum toxin under endoscopic ultrasound guidance. *Gastrointest Endosc* 1997; 45: 77-79
- 16 Chang KJ. EUS-guided fine needle injection (FNI) and anti-tumor therapy. *Endoscopy* 2006; 38 Suppl 1: S88-S93
- 17 Chang KJ, Nguyen PT, Thompson JA, Kurosaki TT, Casey LR, Leung EC, Granger GA. Phase I clinical trial of allogeneic mixed lymphocyte culture (cytoimplant) delivered by endoscopic ultrasound-guided fine-needle injection in patients with advanced pancreatic carcinoma. *Cancer* 2000; 88: 1325-1335
- 18 Hecht JR, Bedford R, Abbruzzese JL, Lahoti S, Reid TR, Soetikno RM, Kirn DH, Freeman SM. A phase I/II trial of intratumoral endoscopic ultrasound injection of ONYX-015 with intravenous gemcitabine in unresectable pancreatic carcinoma. *Clin Cancer Res* 2003; 9: 555-561
- 19 Goldberg SN, Mallery S, Gazelle GS, Brugge WR. EUS-guided radiofrequency ablation in the pancreas: results in a porcine model. *Gastrointest Endosc* 1999; 50: 392-401
- 20 金震东, 李兆申, 刘岩, 杜奕奇, 王洛伟, 湛先保, 陈洁. 超声胃镜引导下定向植入放射性¹²⁵I粒子治疗胰腺癌的临床研究. *中华消化内镜杂志* 2006; 23: 15-18
- 21 Wiersema MJ. Endosonography-guided cystoduodenostomy with a therapeutic ultrasound endoscope. *Gastrointest Endosc* 1996; 44: 614-617
- 22 Grimm H, Binmoeller KF, Soehendra N. Endosonography-guided drainage of a pancreatic pseudocyst. *Gastrointest Endosc* 1992; 38: 170-171
- 23 Giovannini M, Pesenti C, Rolland AL, Moutardier V, Delperio JR. Endoscopic ultrasound-guided drainage of pancreatic pseudocysts or pancreatic abscesses using a therapeutic echo endoscope. *Endoscopy* 2001; 33: 473-477

编辑 李军亮 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 •

厦门大学消化疾病研究所和厦门市消化疾病诊治中心 承办海峡两岸消化论坛

本刊讯 由福建省医学会, 消化病学会、消化内镜学会、肝病学会主办; 厦门市医学会, 厦门大学附属中山医院、厦门大学消化疾病研究所、厦门市消化疾病诊治中心承办的“海峡两岸消化论坛”将于2007-11-16/18在厦门召开。厦门大学消化疾病研究所、厦门市消化疾病诊治中心由厦门大学附属中山医院消化内科、肝胆外科、胃肠外科、消化内镜中心、博士后工作站和消化实验室组成。目前承担厦门大学医学院本科生、硕士研究生、博士研究生和博士后的教学任务, 是海峡两岸重要的消化疾病医疗、教学和科学研究中心之一。其与我国台湾、香港及亚太地区的医疗中心具有良好合作关系, 重点开展消化系统肿瘤基础和临床、消化内镜新技术、肝病的防治等科学研究。消化内科全体成员见封面。第二排左起第五位为科主任任建林教授, 第四位为科副主任刘明博士, 右起第四位陈建民主任医师, 第三位王琳主任医师, 第二位施华秀博士; 后排左起为陈美娅硕士, 廉亚美, 周静平硕士, 卢雅丕硕士, 潘金水博士, 董菁博士, 孙娟娟, 陈立刚博士, 叶震世, 胡益群博士, 许鸿志硕士; 第三排右起第一位为林逊汀, 第二位林振和硕士。其他为护理人员。

肝内外胆管结石的内镜治疗

司丽娟, 任建林, 迟宝荣

司丽娟, 任建林, 厦门大学附属中山医院消化内科, 厦门大学
消化疾病研究所 福建省厦门市 361004
迟宝荣, 吉林大学第一医院消化内科 吉林省长春市 116011
通讯作者: 迟宝荣, 130021, 吉林省长春市新民大街1号, 吉林大
学第一医院消化内科. baorong_chi@yahoo.com.cn
电话: 0431-85612437
收稿日期: 2007-09-12 修回日期: 2007-10-20

摘要

胆道疾病内镜治疗最常见的途径有经口(peroral)、经皮(percutaneous)和腹腔镜(Lc)治疗三种, 根据适应证选择不同的治疗方法. 本文综述肝内外胆管结石经口十二指肠镜及经皮胆管镜治疗的进展, 具体操作方法, 适应症的选择, 合并症的产生、预防和治疗.

关键词: 胆管结石; 内镜治疗

司丽娟, 任建林, 迟宝荣. 肝内外胆管结石的内镜治疗. 世界华人消化杂志 2007;15(30):3233-3236
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/3233.asp>

0 引言

随着内镜治疗技术的迅猛发展, 胆道疾病的内镜治疗也越来越引起人们的重视. 由于其具有创伤小、并发症少、病变显示清晰、操作时间短和可反复实施等优点, 内镜介入(interventional endoscopy)方法已成为治疗胆道疾病的重要手段. 胆道疾病内镜治疗最常见的途径有经口(peroral)、经皮(percutaneous)和腹腔镜(Lc)治疗三种, 根据适应证选择不同的治疗方法. 经口途径侵入性小, 为首选方法, 临床上应用广泛. 对不适宜经口途径以及经口治疗失败的胆道疾病, 再选择经皮途径. LC在急症中应用甚少, 主要限于择期患者.

1 经口内镜治疗胆总管结石

1968年McCune^[1]成功完成了首例逆行胰胆管造影术(ERCP), 为胆胰疾病提供了一个可靠的诊断方法. 1974年Kawai *et al*^[2]和Classen *et al*^[3]及相马 *et al*相继报道经内镜十二指肠乳头括约肌切开术(EST)治疗胆总管结石(CBDS). EST是内

镜治疗的典型代表, 目前已成为胆管结石的主要治疗手段. 1983年Stariz *et al*^[4]首创经内镜乳头气囊扩张(EPBD)治疗CBDS, 他将成为一种可保留括约肌功能的取石方法, 取代了部分EST. 近年来, 随着内镜技术的提高及内镜医师经验的积累, 内镜治疗胆总管结石的成功率大大提高, 并发症减少, 在治疗胆总管结石方面有广阔的前景.

1.1 经内镜十二指肠乳头括约肌切开(EST)治疗胆总管结石 1974年Kawai和Classen *et al*^[2-3]首次采用EST治疗胆总管结石. CBD结石取石成功率为80%-90%^[5-7]. 内镜下乳头括约肌切开取石术, 已是十分成熟的治疗技术, 创伤小, 恢复迅速. 在欧美国家, 80%以上的胆管结石都通过EST进行治疗, 这也是胆管结石最常用的内镜取石方法.

对EST并发症, 各家报道不一. 文献报道EST的近期并发症为6.8%-10%. 出血是最常见的并发症之一, 发生率为1.2%-3%, 急性胰腺炎的发生率为1%-6%. ERCP术后胰腺炎的发生, 不是人为能控制的, 但避免插管过程中反复乳头及胰管插管, 减少术中造影剂反复进入胰管, 防止术中造影压力过大, 术后放置胰管支架, 可一定程度上减少胰腺炎的发生. 胆管炎的发生率为1%-3%, 术后放置鼻胆管引流可减少或避免其发生, 穿孔的发生率<1%. EST死亡率为0.5%-3.3%. 随着EST的广泛应用, 出现了关于EST的远期并发症报道, 其中最常见的并发症是胆道复发结石, 发生率为5.6%. 对于复发结石, 可反复用内镜方法取石, 而不用外科手术.

内镜下乳头括约肌切开后用常规网篮及气囊取石方法, 对于直径<10 mm的胆总管结石效果较好, 而对于直径>15 mm的胆总管结石则需要借助于多种碎石方法来完成.

1.2 内镜下碎石取石术治疗胆总管结石

1.2.1 内镜下机械碎石(EML) 1982年Demling *et al*^[8]首先报道了EML的应用, 使胆总管结石的治疗有了重大进展. 当乳头括约肌切开后, 胆

背景资料

我国是肝内外胆管结石的高发区, 以往肝内外胆管结石的主要治疗方法为外科手术, 但手术治疗创伤大, 结石的残留率及复发率都较高. 本文旨在通过进一步论述经口十二指肠镜及经皮经肝胆道镜途径治疗肝内外胆管结石, 降低手术风险, 减少创伤性, 减少结石的残留和复发, 提高结石的清除率, 使肝内外胆管结石的非手术治疗得到更加广泛的推广和应用.

同行评价
本文内容全面, 文笔流畅, 建议增加大样本多中心研究结果的内容及共识意见。

管内结石不能用普通网篮及气囊成功取出时, 首选的方法就是采用内镜下机械碎石法碎石后再取出结石。EML是一种简单的碎石方法, 成功率在90%以上。EML的应用使内镜下取石不再受结石大小限制, 但对于结石直径 >20 mm者应慎用, 因为较大而坚硬的结石, EML很难粉碎。20 mm者碎石成功率为100%, >20 mm者成功率为88%, >40 mm者成功率为84%。对于初次取石困难的大结石, 可采用短期放置鼻胆管引流或胆管塑料支架的方法, 使结石缩小后, 择期再行碎石取石术, 或采用其他的碎石方法。

1.2.2 内镜下液电碎石(EHL) 作为碎石法的一种, Burhenne^[9]在1975年首次将EHL用于治疗胆管结石。1977年, Cipolletta *et al*^[10]应用EHL在十二指肠镜下经十二指肠乳头括约肌将高压液电碎石器送入胆总管, 碎石成功。EHL碎石成功率在70%以上, 多在结石直径 >20 mm, EML失败时应用。这种操作较复杂, 需要在经口胆道子母镜直视下进行, 操作时可能会造成胆管壁损伤, 甚至穿孔, 形成胆瘘。

1.2.3 内镜下激光碎石(ELL) 波长540 nm的香豆素绿染色的闪光灯-脉冲激光器产生一种激光脉冲, 他可以被结石吸收并加热其表面, 引起胆汁聚集并迅速扩散而产生一种机械性压力波, 激光产生的能量也可用于碎石^[11]。Dye激光较为常用。ELL的优点是安全, 可在经口胆道子母镜直视下进行, 也可以在盲视或X线透视下进行排石, 成功率87%-97%^[12-13], 无死亡或与激光有关的并发症发生。

1.2.4 体外震波碎石(ESWL) ESWL已用于治疗胆管结石, 其方法同治疗肾结石相似。多数中心使用碎石机时借助X线透视来定位结石, 同时通过经皮插管或鼻胆管注入造影剂, 预计有80%的患者结石可完全清除^[14], 但需要多次的ESWL和内镜下治疗。

几种碎石方法比较, 内镜下EML碎石, 最为经济、实用、安全, 应用最为广泛, 使用方便。

1.3 经内镜乳头括约肌扩张(EPBD)治疗胆总管结石 EST开展已有多, 至今仍广泛应用。但随着远期随访与有关乳头括约肌功能的研究, EST造成括约肌结构破坏、功能丧失的远期影响已被人们所注意, 并在寻求可保留括约肌功能的取石方法。

姚礼庆 *et al*^[15]建议, 对于小于5 mm的结石可在乳头气囊扩张后取出, 乳头通常用直径8-10 mm注满水的气囊进行扩张, 扩张后通过气囊、

网篮或机械碎石术取出结石。这种方法侵入性小, 不破坏括约肌的解剖结构, 术后乳头括约肌功能基本恢复。但此种方法较易并发胰腺炎和胆管炎。EPBD成功率为85%-100%。

有关乳头括约肌功能的研究提示, 在EPBD术后1 mo左右, 乳头括约肌功能基本恢复, 解剖结构也无明显改变。在保持乳头括约肌解剖结构, 保留其功能方面, EPBD优于EST。EPBD作为不用乳头括约肌切开的取石技术, 最好的适应症为结石 <10 mm, 而且没有乳头及胆总管狭窄, 尤其适合较年轻的患者。

2 经皮经肝胆管镜(PTCS)治疗肝内外胆管结石

胆管镜的一大特点是他可以进入病理扩张的一级肝内胆管, 因为有结石的胆管其结石之上经常有扩张, 尽管开口处可能有膜样狭窄, 但胆管镜一般都能进入扩张的Ⅱ级或Ⅲ级肝内胆管, 通过网篮或加压冲洗等方法可以取出更远一级(Ⅲ级或Ⅳ级)肝管结石^[11]。国内利用胆道镜技术使结石取净率达98.5%^[16]。

2.1 PTCS 治疗肝内胆管结石(ISH)在东南亚地区肝内胆管结石是一种常见的疾病, 以台湾、香港和中国南部的发病率最高。外科手术是传统的治疗方法, 手术后结石的残留和复发率高达70%, 通过术中和术后胆道镜的应用已使其降至10%-30%。利用胆道镜技术使结石的清除率达97%^[7]。

2.1.1 IHS分型 黑龙江省医院任旭 *et al*^[17]采用的分型方法是日本厚生省特定疾病研究班分型, 主要根据结石部位、胆管狭窄和扩张程度、部位分型。根据结石部位分为肝内型(i型)和肝内外型(ie型)。位于肝内胆管的结石分左叶型(l型)、右叶型(r型)和左右叶型(lr型)。根据胆管狭窄程度分为: 无狭窄, 轻度狭窄(直径 >2 mm)和重度狭窄(直径 ≤ 2 mm)。狭窄部位: 末梢部狭窄(2级分支胆管以上), 中央部狭窄(1级分支-2级分支之间), 左右肝管、肝总管、胆总管狭窄。根据胆管扩张程度分为: 无扩张、轻度扩张和重度扩张(肝外胆管 ≥ 20 mm, 肝内胆管 ≥ 10 mm)。根据胆管扩张部位分为: 同胆管狭窄记录部位。

2.1.2 治疗 (1)PTBD: PTBD目前主要采用超声引导下穿刺, 操作简单, 有肝胆管扩张者成功率为98%-100%。其穿刺部位经右季肋区穿刺右侧肝内胆管和经上腹部穿刺左侧肝内胆管, 根据结石部位和胆管扩张情况选择。胆管扩张明显

和结石多的肝叶为首选穿刺部位; (2)扩张窦道: PTBD后1 wk, 进行探条扩张术. 目前仍主要采用逐步窦道扩张法, 探条直径由小至大依次将窦道扩张至18-22 F, 通常需要2-3次完成. 为缩短住院时间, PTBD当时可扩张到10-12 F, 但PTBD同时一次性扩张通路存在一定的危险性; (3)PTCS: 通路建立2-3 wk后, 拔出扩张管, 插入胆道镜或借助导丝插入, 直视观察下用网篮或结合EHL、激光碎石, 分次将结石取出. 一次PTCS不能完成治疗者, 继续留置引流管.

2.1.3 适应证选择 除有肝叶萎缩(属肝切除适应证)外, 有肝内胆管扩张的ISH者均适合PTCS治疗. 已发展为胆汁性肝硬化, 肝功能Child C级者, 特别是黄疸较重的患者PTCS治疗要注意, 少数患者可使肝功能不全加重, 出现肝功能衰竭或合并肾功能不全.

2.1.4 疗效 PTCS治疗IHS结石清除率为76.8%-98.5%^[18], 结石复发率3%-40%, 其复发率随治疗后时间延长而增加.

2.2 PTCS治疗胆总管结石 目前公认的胆总管结石首选的治疗方法是乳头括约肌切开术(EST)和机械碎石取石术(EML). 但对不适宜经口内镜治疗或治疗失败的CBD结石, 如上消化道狭窄, 乳头切开不成功, 胆总管巨大结石, 胃空肠吻合术后等伴有胆管扩张者均适合PTCS治疗, 特别适合不能耐受外科手术或有胆道手术史不愿接受再次手术者^[19]. 胆总管巨大结石者经PTCS-EHL结石变小后, 配合EST和EML, 可缩短住院时间.

2.3 并发症 PTCS治疗胆道系统结石较安全, 并发症发生率为14.5%-22%^[17]. 随着技术水平提高, 多数并发症可避免. 常见的并发症有: (1)胸腔积液、脓胸或膈下脓肿, 主要是PTCD穿刺肝膈顶部上段胆管所致, 发生率2.9%-3.7%; (2)胆道出血, 由于PTBD或扩张窦道导致胆管静脉曲张, 或液电碎石损伤胆管所致, 发生率2.4%-7.4%; (3)引流管脱出, 早期脱出可引起胆汁性腹膜炎, 1 wk后脱出导致建立窦道失败, 发生率1.5%-18%; (4)胆道感染, 主要由于多发结石或胆管狭窄, 或胆管部分区域的胆汁不能充分引流所致. 发生率7.7%-27.5%, 其他偶发的并发症有急性肾功能不全、肝功能衰竭、肝被膜下血肿, 以及窦道损伤等.

3 经T管窦道胆道镜取石术(POCS)

经T管窦道胆道镜取石术的适应证是手术后残留在胆总管及肝内胆管的单发或多发结石, 一

般在T管留置术后4-6 wk进行. 操作时将T管拔除, 胆道镜由窦口进入, 仔细检查肝内外胆管情况. 小的结石可用网篮取出或推入十二指肠; 大结石可联合EHL、激光碎石, 分次将结石取出. 结石不能一次清除者, 留置引流管, 择期再次取石治疗.

总之, 消化内镜技术已经越来越多地介入到胆道疾病的诊断和治疗中, 内镜下介入治疗以其微创性、可重复性、并发症少、费用低等优点正逐步取代部分外科手术, 成为胆胰疾病治疗的一个方向.

4 参考文献

- 1 McCune WS, Shorb PE, Moscovitz H. Endoscopic cannulation of the ampulla of Vater: a preliminary report. *Ann Surg* 1968; 167: 752-756
- 2 Kawai K, Akasaka Y, Murakami K, Tada M, Koli Y. Endoscopic sphincterotomy of the ampulla of Vater. *Gastrointest Endosc* 1974; 20: 148-151
- 3 Classen M, Demling L. Endoscopic sphincterotomy of the papilla of Vater and extraction of stones from the choledochal duct (author's transl). *Dtsch Med Wochenschr* 1974; 99: 496-7
- 4 Staritz M, Ewe K, Meyer zum Buschenfelde KH. Endoscopic papillary dilation (EPD) for the treatment of common bile duct stones and papillary stenosis. *Endoscopy* 1983; 15 Suppl 1: 197-198
- 5 Choudari CP, Fogel E, Gottlieb K, Sherman S, Lehman GA. Therapeutic biliary endoscopy. *Endoscopy* 1998; 30: 163-173
- 6 Wojtun S, Gil J, Gietka W, Gil M. Endoscopic sphincterotomy for choledocholithiasis: a prospective single-center study on the short-term and long-term treatment results in 483 patients. *Endoscopy* 1997; 29: 258-265
- 7 Bergman JJ, Rauws EA, Fockens P, van Berkel AM, Bossuyt PM, Tijssen JG, Tytgat GN, Huibregtse K. Randomised trial of endoscopic balloon dilation versus endoscopic sphincterotomy for removal of bile duct stones. *Lancet* 1997; 349: 1124-1129
- 8 Demling L, Seuberth K, Riemann JF. A mechanical lithotripter. *Endoscopy* 1982; 14: 100-101
- 9 Burhenne HJ. Electrohydrolytic fragmentation of retained common duct stones. *Radiology* 1975; 117: 721-723
- 10 Cipolletta L, Costamagna G, Bianco MA, Rotondano G, Piscopo R, Mutignani M, Marmo R. Endoscopic mechanical lithotripsy of difficult common bile duct stones. *Br J Surg* 1997; 84: 1407-1409
- 11 李晓林, 智发朝. 胆胰疾病内镜治疗进展. *现代消化及介入诊疗* 2002; 7: 34-36
- 12 Lee SK, Seo DW, Myung SJ, Park ET, Lim BC, Kim HJ, Yoo KS, Park HJ, Joo YH, Kim MH, Min YI. Percutaneous transhepatic cholangioscopic treatment for hepatolithiasis: an evaluation of long-term results and risk factors for recurrence. *Gastrointest Endosc* 2001; 53: 318-323
- 13 Hochberger J, Bayer J, May A, Muhldorfer S, Maiss J, Hahn EG, Ell C. Laser lithotripsy of difficult bile duct stones: results in 60 patients using a rhodamine 6G dye laser with optical stone tissue detection system. *Gut* 1998; 43: 823-829
- 14 Neuhaus H, Zillinger C, Born P, Ott R, Allescher

- H, Rosch T, Classen M. Randomized study of intracorporeal laser lithotripsy versus extracorporeal shock-wave lithotripsy for difficult bile duct stones. *Gastrointest Endosc* 1998; 47: 327-334
- 15 姚礼庆, 张波, 高卫东, 陈世耀, 何国杰, 王炳生. 经内镜乳头气囊扩张术治疗胆总管结石. *中华消化内镜杂志* 1999; 16: 80-82
- 16 任旭, 唐秀芬, 司丽娟, 朱春兰, 张国梁, 孙秀芝. 经皮胆管镜治疗肝内外胆管结石的探讨. *中华消化内镜杂志* 2004; 21: 13-16
- 17 任旭. 经皮经肝胆道镜治疗肝内外胆管结石. *现代消化及介入诊疗* 2005; 10: 31-33
- 18 刘思德. 介入内镜学在胆胰疾病中的应用. *世界华人消化杂志* 2003; 11: 827-828
- 19 Martin P, Lotterer E, Kleber G, Fleig WE. Endoscopic therapy of cholangiolithiasis by percutaneous approach. *Percutaneous gallstone therapy. Zentralbl Chir* 1998; 123 Suppl 2: 56-61

编辑 程剑侠 电编 李军亮

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

• 消息 •

2007 年国家继续学习教育项目 “小肠疾病诊治进展及双气囊小肠镜临床应用”讲习班通知

本刊讯 经国家继续医学教育委员会批准, 由南昌大学医学院第三附属医院(南昌市第一医院)主办、《世界华人消化杂志》协办的2007年国家继续医学教育项目“小肠疾病诊治进展及双气囊小肠镜临床应用”学习班[项目编号: 2007-03-03-045(国)]定于2007-11-14/17在英雄城南昌举办.

1 授课内容

本讲习班采取理论讲授与操作演示相结合的方式进行, 届时将邀请全国著名消化专家、上海交通大学附属瑞金医院消化科主任、博士生导师吴云林教授与会授课, 青年专家、国内双气囊小肠镜技术第一人钟捷教授进行操作演示, 并请江西省消化学会主任委员、南昌大学一附院副院长吕农华教授作专题演讲. 讲习班重点介绍小肠疾病诊治的历史、现状及最新进展, 传授双气囊电子小肠镜操作技术及诊治知识. 学员可亲手体验双气囊电子小肠镜操作技巧, 接受专家手把手教导. 学习结束将授予国家I类继续教育学分8分.

2 联系方式

叶华曦, 330008, 江西省南昌市象山北路128号南昌市第一医院消化内科; 付峻林, 330008, 南昌大学第三附属医院消化内科; 电话: 0791-8862387 8862213/13576061294(付峻林); E-mail: fusulin@163.com.

3 收费标准

讲习班会务费、资料费共计400元, 住宿费80-100元/天, 交通费自理. 报到日期: 2007-11-14

胰腺假性囊肿、胰腺脓肿的超声内镜下治疗进展

胡益群, 叶震世, 司丽娟

胡益群, 叶震世, 司丽娟, 厦门大学附属中山医院消化内科, 厦门大学消化疾病研究所, 厦门市消化疾病诊治中心, 福建省厦门市 361004

通讯作者: 胡益群, 361004, 福建省厦门市, 厦门大学附属中山医院消化内科. huyiqun0826@yahoo.com.cn

电话: 0592-2993171

收稿日期: 2007-09-22 修回日期: 2007-10-20

摘要

胰腺假性囊肿、胰腺脓肿的治疗方法不断推陈出新, 近年来超声内镜技术逐渐趋于成熟, 目前已成为胰腺假性囊肿、胰腺脓肿非手术治疗的主要方法之一. 本文通过系统回顾胰腺假性囊肿、胰腺脓肿的超声内镜下治疗进展, 希望有助于临床工作者对胰腺假性囊肿、胰腺脓肿超声内镜下治疗有一个更全面的理解和认识, 有利于胰腺假性囊肿、胰腺脓肿超声内镜下治疗在临床工作中的应用和普及.

关键词: 胰腺假性囊肿; 胰腺脓肿; 超声内镜

胡益群, 叶震世, 司丽娟. 胰腺假性囊肿、胰腺脓肿的超声内镜下治疗进展. 世界华人消化杂志 2007;15(30):3237-3240
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/3237.asp>

0 引言

胰腺假性囊肿是胰腺急、慢性炎症或胰腺损伤等疾病的常见并发症. 非上皮性囊壁中常积聚有胰酶、肉芽组织、纤维组织、胰腺坏死组织等成分, 可与外界相通或呈独立死腔状态, 假性囊肿可发生破裂或因体积巨大出现压迫症状, 从而出现继发感染(脓肿)、胰源性腹水、胰源性胸水、囊肿破裂、囊肿内出血、胃肠道梗阻、胰漏、腹泻等临床并发症. 而胰腺脓肿则是由急性胰腺炎的坏死组织或胰腺假性囊肿继发感染所致, 可发生在胰腺任何部位, 全身中毒症状表现严重, 脓肿溃破腐蚀邻近脏器, 可引起肠瘘或出血.

胰腺脓肿必须予以治疗. 而对于胰腺假性囊肿的治疗目前看法还不一致, 但一些研究表明^[1], 随着时间延长, 胰腺假性囊肿的并发症逐渐增多, 因此亦主张对胰腺假性囊肿进行及时有效

的治疗. 目前胰腺假性囊肿和胰腺脓肿的治疗方法有经皮穿刺引流术、外科手术治疗、内镜下引流术等技术.

近年来, 随着内镜技术的进展, 国内外学者开始采用超声内镜(endoscopic ultrasonography, EUS)治疗胰腺假性囊肿和胰腺脓肿. Cremer *et al*^[2]于1989年借助超声在内镜下穿刺引流了第1例胰腺假性囊肿, Wiersema *et al*^[3]1996年报道第1例完全借助于超声内镜引流的病例. 因超声内镜下治疗创伤微小、并发症少、死亡率低等优点, 正逐步取代传统引流术及外科手术, 成为胰腺假性囊肿、胰腺脓肿治疗的主要方法. 本文就近年来胰腺假性囊肿、胰腺脓肿的超声内镜下治疗进展作一综述.

1 胰腺假性囊肿和胰腺脓肿的形成及临床表现

胰腺炎症或外伤等引起胰腺坏死物、胰液及血液等积聚于胰腺周围、大网膜、胃以及小网膜内, 可刺激周围组织, 使结缔组织增生, 形成纤维性囊壁. 假性囊肿壁形成在人体需要4 wk-6 wk左右的时间, 而胰腺脓肿主要由于胰腺坏死组织或胰腺假性囊肿继发感染所致, 主要致病菌为大肠杆菌, 脓肿形成的时间不确定. 典型的胰腺假性囊肿多单发, 大小不一, 一般直径在3 cm-15 cm左右, 可与主胰管相交通, 因胰液的分泌压力不断地向四周扩大和肉芽组织形成, 囊壁不断增厚. 大的假性囊肿可压迫邻近脏器产生压迫症状, 胰头部囊肿可侵蚀消化道形成内瘘, 胰尾部囊肿侵及脾动脉可致腹腔内出血. 胰腺脓肿形成可引起败血症或菌血症反应, 临床表现危重, 当胰酶侵至血管及囊壁时可发生致命性囊肿破裂.

2 胰腺假性囊肿、胰腺脓肿超声内镜下治疗的演进

外科手术引流曾是胰腺假性囊肿和胰腺脓肿唯一的治疗手段, 但因其创伤大、并发症多、死亡率高, 后逐渐被一些微创的非手术治疗方法所取代.

背景资料

超声内镜下胰腺假性囊肿、胰腺脓肿的治疗技术, 是目前胰腺假性囊肿、胰腺脓肿微创治疗的一个新阶段, 因其并发症少, 死亡率低, 已经逐渐为国内外同行所认同、推崇, 此方面的基础及临床研究越来越深入.

应用要点

本文对超声内镜下胰腺假性囊肿、胰腺脓肿的治疗技术阶段性进展进行了总结,希望对此类疾病临床治疗提供参考和建议。超声内镜下胰腺假性囊肿、胰腺脓肿引流技术的发展、应用和普及,会为更多的胰腺假性囊肿、胰腺脓肿患者解除痛苦,会给更多患有胰腺假性囊肿、胰腺脓肿但不能耐受手术的患者带来福音。

1976年Drücke *et al*^[4]报道在B超引导下经囊单针穿刺抽吸囊液获得成功,此后在B超引导下经皮胰腺假性囊肿穿刺引流术逐渐开展起来,其方法简便,价格低廉,而且可反复应用,缺点是置管时间短、易复发,资料统计复发率可达50%。人们曾尝试X线引导下经皮胰腺假性囊肿穿刺引流术,但因价格昂贵,且射线对操作人员影响较大,逐渐被淘汰。国外还有人采用血管造影导管技术行囊肿置管引流术,但因损伤较大,未被临床工作者所接受。近年来,经内镜下胰腺假性囊肿引流技术的应用取得了很大进步,但因操作盲目性大、不确定因素多的缺点无法克服,限制了其推广应用。

随着内镜设备的改进与超声技术的迅速发展,超声技术和内镜技术的结合即超声内镜技术迅速发展,胰腺假性囊肿、胰腺脓肿的治疗获得了巨大突破。超声内镜引导下经胃胰腺假性囊肿、胰腺脓肿内引流术(EUS guided cytogastrostomy)是近10年发展起来治疗胰腺假性囊肿、胰腺脓肿的最新技术,目前经超声内镜腔内(胃或十二指肠)引流紧压胃或十二指肠壁的胰腺假性囊肿、脓肿已成为重要临床治疗手段并获得良好疗效^[5]。国外一项对比研究显示^[6],胰腺假性囊肿传统的超声引导下引流(conventional transmural drainage, CTD)与超声内镜下引流(EUS guided drainage, EUD)在安全性和有效性方面没有明显差别。而Grzebieniak *et al*^[7]通过对超声内镜与外科手术治疗胰腺假性囊肿、胰腺脓肿的疗效进行比较,认为超声内镜治疗胰腺假性囊肿及胰腺脓肿疗效确切,在某些选择性病例中可以取代外科手术,而且复发率较低。

对慢性胰腺炎合并胰腺假性囊肿的患者,是通过逆行胰胆管造影(endoscopic retrograde cholangiopancreatography, ERCP)技术经十二指肠乳头引流还是通过超声内镜透壁引流,目前国内外还没有人做过对比研究。但国外已经有学者在超声内镜引导下进行了较为复杂的慢性胰腺炎合并多个胰腺假性囊肿的治疗并取得了成功,提示超声内镜引导下透壁引流技术正逐渐取代外科手术治疗,成为胰腺囊性病变的重要治疗手段,这也符合胰腺假性囊肿、胰腺脓肿微创治疗的趋势和需要^[8]。

近年来,随着大孔径超声内镜的应用,胰腺脓肿越来越多的通过内镜来治疗。Giovannini *et al*^[9]在超声内镜引导下对18例胰腺囊肿感染患者

成功放置鼻囊肿引流管,术后用抗生素冲洗囊肿,7-10 d后拔管,CT复查发现胰腺脓肿均明显缩小。

3 超声内镜引导下胰腺假性囊肿、胰腺脓肿引流术的应用和进展

2001年日本和法国相继报道应用超声内镜引导一步法穿刺引流胰腺假性囊肿和胰腺脓肿的病例^[9]。

超声内镜能够对胰腺假性囊肿、胰腺脓肿进行定位,了解其与胃肠壁的位置关系,对进针途径实时监测,达到准确穿刺囊肿、脓肿放置引流管的目的。一项对超声内镜的临床研究显示^[10],囊肿、脓肿引流成功率可达90%左右;而另一项研究显示^[11],胰腺假性囊肿在胃或十二指肠壁形成压迹者,经十二指肠镜穿刺引流,放置塑料支架或鼻囊肿引流管,成功率为70%,而并发症率为19%。一项涉及51名患者的回顾性研究(2003年-2005年)显示^[12],通过超声内镜引导下一步法插入直线或双尾支架进行胰腺囊肿、脓肿胃引流或囊肿、脓肿十二指肠内引流术,仅有3名患者需再进行手术治疗。随访39 wk,由于支架移位或堵塞导致的复发率为17.7%,无死亡病例。以上研究均证明,超声内镜引导下透壁引流术,尤其是超声内镜引导下一步法透壁引流术具有较小侵入性,是有效安全的处理胰腺假性囊肿、胰腺脓肿的方法。

超声内镜引导下胰腺假性囊肿、脓肿的引流需要放置透壁支架和鼻囊肿、脓肿导管,以保持持续的冲洗和有效的引流。超声内镜引导下一步法穿刺进入囊肿、脓肿,置入引流管,可一次性直接引入2根导丝,固定引流管,省去内镜交换步骤,减少并发症和患者的痛苦,显著缩短处理时间。国外调查显示^[13],一步法平均操作时间仅为32.5 min,更加简便、安全、有效。

采用一步法治疗的内镜活检孔直径一般要求在2.4 mm以上。目前国内最新的治疗型超声内镜,活检孔已达3.2 mm,不需要换用大活检孔径的十二指肠镜。国外最新研究报道^[14],带有大操作孔径(3.7 mm-3.8 mm)线阵超声内镜目前已经投入使用,操作者可以通过这个孔径在患者胰腺假性囊肿、胰腺脓肿放置10F的支架。通过10余例患者的临床观察,无不良反应,治疗效果显著,说明超声内镜下一步法胰腺假性囊肿、脓肿引流技术正在日趋成熟,而且逐渐朝着使用大孔径线阵超声内镜的方向发展。

既往临床工作显示, 行电切开胃肠壁进行胰腺囊肿、脓肿引流, 容易发生出血等并发症. 最近有研究报道^[15], 一些医学机构在超声内镜下应用YAG激光来完成胃壁造瘘工作, 结果显示, 使用YAG激光胃壁造瘘是更加安全有效的选择, 尤其适用于那些厚壁的胰腺囊肿或脓肿.

目前投入使用的纵轴线阵式彩色超声内镜, 产生图像与内镜纵轴方向一致, 穿刺针刺入病变的轨迹与内镜保持一致, 保证了穿刺针进入胰腺假性囊肿、胰腺脓肿的图像一直能在内镜前端彩色多普勒超声探头的监视下, 并且可将血流分布或血管清楚显现在屏幕上, 确保穿刺针刺入的准确性, 避免损伤血管, 提高穿刺效率. 供胰腺假性囊肿或胰腺脓肿穿刺选用的超声内镜探头有旋转扇形扫描型和线阵扫描型两种. 一般穿刺前的定位可选用旋转扇形扫描型, 其穿刺时可清楚显示针道; 行细针穿刺时, 多选用线阵扫描型. 然而经研究比较, 两种类型探头对于诊断准确性和疗效, 结果并无明显差异.

4 超声内镜引导下胰腺假性囊肿、脓肿引流的应用策略

大多数的学者主张将支架放于假性囊肿或胰腺脓肿内引流出口处, 或将支架放于胰管与假性囊肿或胰腺脓肿交通处, 距离假性囊肿、脓肿越近越好. 为了更好的引流, 可放置鼻囊肿、脓肿引流管. 许多研究认为, 经消化道引流包括囊肿胃吻合术和囊肿十二指肠造口吻合术有较高成功率, 更多学者倾向于经十二指肠引流.

囊肿、脓肿周围有完整的壁围绕, 并且囊壁与胃壁或十二指肠壁紧密相邻, 则可进行引流操作. 如果囊肿直径>6 cm, 囊肿存在6 wk以上, 囊肿壁厚, 多发性囊肿, 合并慢性胰腺炎及胰管狭窄, 假性囊肿或脓肿内有较厚的分隔, 出现出血、感染、破裂、压迫等并发症, 邻近血管有动脉瘤形成则为引流禁忌. 保守治疗囊肿无缩小反而增大, 此时需外科手术或介入治疗.

超声内镜引导下胃肠道囊肿、脓肿置管引流术的主要优点有: (1)可以准确确定囊壁与胃、十二指肠壁的距离; (2)可以判断其间是否存在较大的血管, 选择最佳穿刺点; (3)可以清楚显示穿刺及置管的全过程, 避免意外发生.

5 超声内镜引导下胰腺假性囊肿、脓肿引流的可能并发症及其处理原则

超声内镜引导胰腺假性囊肿、脓肿引流的并发

症难以完全避免, 了解并预见可能的并发症以及具有处理并发症的能力, 则可降低危险的发生率. 主要并发症是穿孔, 多因囊肿腔同消化道管壁间有较大距离时发生. 穿孔后囊内液体流入后腹腔, 为预防该并发症发生, 术前须仔细检查后再行内镜下引流. 较少发生出血, 避免的方法有严格掌握适应症, 穿刺手法为垂直刺入, 切忌左右摆动针刀. 严重出血的原因是动脉撕裂(脾动脉破裂), 发生后需行动脉栓塞术. 为预防感染, 可通过操作前后预防性应用抗生素及抗真菌治疗, 可以预防并降低感染的发生. 发现坏死组织时, 须放置鼻囊肿引流管, 并定时用生理盐水冲洗确保坏死物引流干净.

6 结论

超声内镜下胰腺假性囊肿、胰腺脓肿的引流技术, 开创了胰腺假性囊肿、胰腺脓肿微创治疗的一个新阶段, 其疗效显著, 并发症少, 死亡率低, 目前已经逐渐成为胰腺囊肿、胰腺脓肿治疗的主要治疗手段. 我们相信, 随着超声内镜下胰腺假性囊肿、胰腺脓肿引流技术的发展、应用和普及, 会为更多的胰腺假性囊肿、胰腺脓肿患者解除痛苦, 会给更多患有胰腺假性囊肿、胰腺脓肿但不能耐受手术的患者带来福音.

7 参考文献

- 1 Bradley EL 3rd. A clinically based classification system for acute pancreatitis. Summary of the International Symposium on Acute Pancreatitis, Atlanta, Ga, September 11 through 13, 1992. *Arch Surg* 1993; 128: 586-590
- 2 Cremer M, Deviere J, Engelholm L. Endoscopic management of cysts and pseudocysts in chronic pancreatitis: long-term follow-up after 7 years of experience. *Gastrointest Endosc* 1989; 35: 1-9
- 3 Wiersema MJ. Endosonography-guided cystoduodenostomy with a therapeutic ultrasound endoscope. *Gastrointest Endosc* 1996; 44: 614-617
- 4 Druke TB. The pathogenesis of parathyroid gland hyperplasia in chronic renal failure. *Kidney Int* 1995; 48: 259-72
- 5 Inui K, Yoshino J, Okushima K, Miyoshi H, Nakamura Y, Watanabe S, Takashima T, Nakazawa S, Hattori T. EUS-guided one-step drainage of pancreatic pseudocysts: experience in 3 patients. *Gastrointest Endosc* 2001; 54: 87-9
- 6 Kahaleh M, Shami VM, Conaway MR, Tokar J, Rockoff T, De La Rue SA, de Lange E, Bassignani M, Gay S, Adams RB, Yeaton P. Endoscopic ultrasound drainage of pancreatic pseudocyst: a prospective comparison with conventional endoscopic drainage. *Endoscopy* 2006; 38: 355-9
- 7 Grzebieniak Z, Woyton M, Kielan W. Surgical and endoscopic treatment of pancreatic pseudocysts. *Przegl Lek* 2000; 57 Suppl 5: 50-52
- 8 Saftoiu A, Dumitrescu D, Stoica M, Gheonea DI,

同行评价
本文语句流畅, 内容丰富, 有较强的参考价值和可读性.

- Ciurea T, Georgescu A, Andrei E. EUS-assisted rendezvous stenting of the pancreatic duct for chronic calcifying pancreatitis with multiple pseudocysts. *Pancreatol* 2007; 7: 74-79
- 9 Giovannini M, Pesenti C, Rolland AL, Moutardier V, Delpero JR. Endoscopic ultrasound-guided drainage of pancreatic pseudocysts or pancreatic abscesses using a therapeutic echo endoscope. *Endoscopy* 2001; 33: 473-477
- 10 Wiersema MJ. Endosonography-guided cystoduodenostomy with a therapeutic ultrasound endoscope. *Gastrointest Endosc* 1996; 44: 614-617
- 11 Howell DA, Elton E, Parsons WG. Endoscopic management of pseudocysts of the pancreas. *Gastrointest Endosc Clin N Am* 1998; 8: 143-162
- 12 Lopes CV, Pesenti C, Bories E, Caillol F, Giovannini M. Endoscopic-ultrasound-guided endoscopic transmural drainage of pancreatic pseudocysts and abscesses. *Scand J Gastroenterol* 2007; 42: 524-529
- 13 Seewald S, Thonke F, Ang TL, Omar S, Seitz U, Groth S, Zhong Y, Yekebas E, Izbicki J, Soehendra N. One-step, simultaneous double-wire technique facilitates pancreatic pseudocyst and abscess drainage (with videos). *Gastrointest Endosc* 2006; 64: 805-808
- 14 Ahlawat SK, Charabaty-Pishvaian A, Jackson PG, Haddad NG. Single-step EUS-guided pancreatic pseudocyst drainage using a large channel linear array echoendoscope and cystotome: results in 11 patients. *JOP* 2006; 7: 616-624
- 15 Shinchu H, Takao S, Maemura K, Baba M, Tamotsu K, Aikou T. Endoscopic transgastric drainage of pancreatic pseudocyst with the use of Nd:YAG laser. *Surg Laparosc Endosc Percutan Tech* 2005; 15: 351-354

编辑 程剑侠 电编 李军亮

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.

泮托拉唑四联5 d疗法与7 d疗法随机对照研究

魏红, 杨桂彬, 胡伏莲, 牟方宏, 崔梅花

魏红, 杨桂彬, 牟方宏, 崔梅花, 北京大学航天临床医学院消化科 北京市 100049

胡伏莲, 北京大学第一医院消化科 北京市 100034

通讯作者: 胡伏莲, 100034, 北京市西城区西什库大街8号, 北京大学第一医院消化科. hufli@263.net

电话: 010-88200923

收稿日期: 2007-05-14 修回日期: 2007-10-11

A randomized controlled study of 5- and 7-d pantoprazole quadruple regimens for *Helicobacter pylori* eradication

Hong Wei, Gui-Bin Yang, Fu-Lian Hu, Fang-Hong Mu, Mei-Hua Cui

Hong Wei, Gui-Bin Yang, Fang-Hong Mu, Mei-Hua Cui, Department of Gastroenterology, Aerospace Clinical Medical School of Beijing University, Beijing 100049, China

Fu-Lian Hu, Department of Gastroenterology, First Hospital of Beijing University, Beijing 100034, China

Correspondence to: Professor Fu-Lian Hu, Department of Gastroenterology, First Hospital of Beijing University, 8 Xishiku Street, Beijing 100034, China. hufli@263.net

Received: 2007-05-14 Revised: 2007-10-11

Abstract

AIM: To compare the efficacy and tolerability of 5- and 7-days therapy with a new pantoprazole quadruple regimen for eradicating *Helicobacter pylori* infection and relieving symptoms.

METHODS: A total of 70 patients were recruited, 34 in the 5-days and 36 group in the 7-days group. Patients with *H pylori*-positive peptic ulcer disease, as well as gastritis were randomized to receive pantoprazole 40 mg, clarithromycin 250 mg, amoxicillin 1.0 g, and bismuth potassium citrate 220 mg twice daily for 5 or 7 days. *H pylori* status was determined by urease test, histology, culture and ¹³C-urea breath test. Eradication of *H pylori* and symptomatic relief were determined at week 4.

RESULTS: Thirty-three patients in the 5-days and 34 in the 7-days group finished treatment. Intention-to-treat eradication rate was 82.4% and 83.3% ($P = 0.91$), and per protocol eradication rate was 84.8% and 88.2% ($P = 0.68$) in the 5- and

7-days group, respectively. Intention-to-treat pain relief rate was 69.2% and 83.9% ($P = 0.18$) and per protocol rate was 72.0% and 89.7% ($P = 0.10$) in the 5- and 7-days group, respectively. No severe side-effects were found in either group.

CONCLUSION: The 5-days quadruple regimen with pantoprazole, clarithromycin, amoxicillin and bismuth potassium citrate achieved a high *H pylori* eradication and a high pain relief rate, and may be used as first-line therapy for *H pylori* eradication.

Key Words: *Helicobacter pylori*; Quadruple regimen; Pantoprazole

Wei H, Yang GB, Hu FL, Mu FH, Cui MH. A randomized controlled study of 5- and 7-d pantoprazole quadruple regimens for *Helicobacter pylori* eradication. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007; 15(30): 3241-3244

摘要

目的: 比较泮妥拉唑四联5 d疗法和7 d疗法的 *H pylori*根除率和症状缓解率。

方法: *H pylori*阳性的胃炎、胃溃疡或十二指肠患者70例随机接受5 d(34例)或7 d(36例)泮妥拉唑四联疗法: 泮妥拉唑40 mg、克拉霉素250 mg、阿莫西林1.0 g和胶体枸橼酸铋钾220 mg, 均为2次/d。根除治疗后第4周复查 *H pylori* 是否根除, 了解症状缓解情况。

结果: 5 d组 *H pylori*根除率为84.8%(PP)和82.4%(ITT), 7 d组 *H pylori*根除率为88.2%(PP)和83.3%(ITT), 5 d组疼痛缓解率为72.0%(PP)和69.2%(ITT), 7 d组疼痛缓解率为83.9%(ITT)和89.7%(PP)。按PP及ITT组群分析, 两组方案 *H pylori*根除率及疼痛缓解率无明显差异, 两组患者均未出现严重不良反应。

结论: 泮妥拉唑四联5 d疗法可以获得较高的 *H pylori*根除率和疼痛缓解率, 可以作为 *H pylori*根除治疗的一线治疗方案。

关键词: 幽门螺杆菌; 四联疗法; 泮妥拉唑

魏红, 杨桂彬, 胡伏莲, 牟方宏, 崔梅花. 泮妥拉唑四联

背景资料

随着 *H pylori*对抗生素耐药的增加, PPI三联根除率有减低的趋势。选择有效的一线治疗方案以提高初治成功率是预防 *H pylori*产生耐药的关键。四联疗法不良反应发生率、依从性低, 限制了其作为一线方案广泛应用。缩短疗程是减少不良反应发生率、提高治疗依从性的重要手段。

应用要点
本文提示泮托拉唑四联5 d疗法可以获得和四联7 d疗法同样满意的 *H pylori*根除率和疼痛缓解率, 可以作为根除 *H pylori* 治疗的一线治疗方案

5 d疗法与7 d疗法随机对照研究. 世界华人消化杂志 2007;15(30):3241-3244
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/3241.asp>

0 引言

幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *H pylori*)感染与慢性胃炎、消化性溃疡、MALT淋巴瘤及胃癌等上胃肠道疾病, 以及不明原因的缺铁性贫血、特发性血小板减少性紫癜等胃肠外疾病有密切关系. *H pylori*的根除成为治疗这些疾病的重要方面. 在过去的20多年中, 随着对*H pylori*研究的不断深入, 幽门螺杆菌根除治疗也取得了很大进展. 尽管如此, 根除治疗失败仍然是一个严重的问题. 在传统三联疗法的基础上加用质子泵抑制剂组成的四联疗法常被用作二线治疗方案. 不良反应发生率高、依从性低, 限制了四联疗法作为一线方案广泛应用. 缩短疗程是减少不良反应的发生率, 提高治疗依从性的重要手段. 本研究通过比较5 d和7 d四联疗法*H pylori*根除率、症状缓解率和不良反应发生率, 探讨泮妥拉唑四联5 d疗法是否可以作为*H pylori*根除治疗的一线治疗方案.

1 材料和方法

1.1 材料 2003-2006年间, 部分因上消化道症状经胃镜检查证实为*H pylori*阳性的重度胃炎(包括糜烂、萎缩、不典型增生、肠化)、胃溃疡和十二指肠溃疡, 年龄在15-80岁之间的患者纳入本研究. 排除标准: 溃疡病合并活动性溃疡出血、穿孔或幽门梗阻, 有上消化道手术史(溃疡穿孔修补术后除外), 恶性肿瘤, 对有关药物过敏, 治疗前4 wk内用过铋剂、抗生素, 治疗前4 wk内规律服用NSAIDs, 治疗前2 wk内规律用过PPI或H₂受体拮抗剂, 伴有重要器官功能不全; 妊娠期或哺乳期. 所有患者在纳入本研究时均签署知情同意书. 入选的患者随机分入四联疗法5 d组和四联疗法7 d组.

1.2 方法

1.2.1 *H pylori*检测方法 快速尿素酶试验, 组织学银染, *H pylori*培养, 13C-尿素酶呼气试验(13C-UBT). 前3项中有两项阳性或第4项阳性者为*H pylori*感染, 复查时前3项均为阴性或第4项阴性者为*H pylori*根除.

1.2.2 药物治疗方法和随访 每个患者被随机纳入5 d疗程组和7 d疗程组, 接受以下方案治疗: 泮妥拉唑(德国百克顿药厂)40 mg, 胶体枸橼酸铋

钾(丽珠集团丽珠制药厂)220 mg, 克拉霉素(美国雅培制药有限公司)250 mg, 阿莫西林(香港联邦制药有限公司)1000 mg, 均为2次/d, 疗程5 d或7 d. 疗程结束4 wk后患者复诊, 报告症状缓解和副作用发生情况, 做胃镜检查或13C呼气试验. 在做胃镜检查时取一块胃窦部标本做尿素酶试验, 一块胃窦标本和一块胃体标本做组织学检查, 一块胃窦标本和一块胃体标本做*H pylori*培养. 部分患者做13C呼气试验. 前3项均为阴性或第3项阴性者为*H pylori*根除.

1.2.3 疗效判断标准 症状评定标准: 初诊及两次复诊时, 记录患者胃肠道症状的程度及频度. 症状程度划分为: 无症状(0级); 轻度(I级), 可以感觉到有症状, 但易于接受; 中度(II级), 明显的不适, 足以干扰正常活动; 重度(III级), 不能从事正常活动. 症状频度分为: 偶发, 不是每天都发生, 每次持续数分钟缓解; 常发, 每日发生, 每次持续数分钟缓解; 频发, 每日反复发作, 每次持续数小时. 症状缓解标准: 治疗后胃肠道症状(疼痛、腹胀、反酸、胸前区烧灼感等)消失或症状的程度(或频度)减轻1级以上(含1级)认为症状缓解. 不良反应发生情况: 治疗期间发生任何不良反应均予记录, 并评价描述以下特征: 类型、发生时间、频率、持续时间、严重程度、采取的措施、结果、与试验治疗的关系等.

统计学处理 统计分析包括符合方案(per protocol)群组分析和意向治疗(intention-to-treat)群组分析. 符合方案群组只包括完成了胃镜检查和*H pylori*检测, 并且至少完成了75%治疗的患者. 意向治疗群组包括随机纳入本试验, 并且至少服用一次药物的患者. 失访的患者认为是没有治愈. *H pylori*根除率和症状缓解率用 χ^2 检验及确切概率法进行统计分析. $P < 0.05$ 有统计学意义.

2 结果

2.1 患者情况 经胃镜诊断的*H pylori*阳性胃炎和消化性溃疡患者73例, 平均年龄 49.4 ± 13.1 (17-83)岁, 病程1 mo-20年不等, 随机分入泮妥拉唑四联5 d疗程组和泮妥拉唑四联7 d疗程组. 两组病例在年龄、性别、病程、病情严重程度以及烟酒嗜好上都有可比性(表1). 以上患者资料都包含在意向治疗群组分析中. 7 d组有2个患者因失访排除在符合方案群组之外, 5 d组有1个患者因失访排除在符合方案群组之外.

2.2 *H pylori*根除率和症状缓解率 各组*H pylori*根

同行评价
本文选题密切结合临床, 方法正确, 资料可靠, 有较强的实用价值和意义。

表 1 患者一般资料

分组	<i>n</i>	平均年龄(岁)	男:女	吸烟(%)	喝酒(%)	病程(年)	上腹痛
四联5 d组	34	50.2 ± 13.4	18/16	19.0	23.5	9.4 ± 8.3	26
四联7 d组	36	48.4 ± 12.7	19/15	22.9	26.5	8.3 ± 9.7	31

表 2 两种治疗方案的 *H pylori* 根除率和症状缓解率

分组	四联5 d组	四联7 d组	<i>P</i>
ITT			
<i>H pylori</i> 根除(%)	82.4(28/34)	83.3(30/36)	0.91
疼痛缓解(%)	69.2(18/26)	83.9(26/31)	0.18
PP			
<i>H pylori</i> 根除(%)	84.8(28/33)	88.2(30/34)	0.68
疼痛缓解(%)	72.0(18/25)	89.7(26/29)	0.1

除率和症状缓解率见表2。按意向治疗群组(ITT)分析, 5 d疗法 *H pylori* 根除率与7 d疗法的根除率无明显差异($P = 0.91$), 但是按PP群组分析, 5 d疗法 *H pylori* 根除率与7 d疗法的根除率($P = 0.68$)无明显差异。无论按ITT群组分析($P = 0.18$)还是按符合方案群组(PP)PP分析($P = 0.10$), 5 d疗法获得的疼痛缓解率与7 d疗法的疼痛缓解率均无明显差异。

2.3 不良反应发生情况 本研究中仅少数患者有恶心头晕。四联5 d组出现恶心2例(2/33, 6.1%), 四联7 d组出现恶心3例(3/34, 8.8%), 两组无统计学差异($P > 0.05$)。另外四联7 d组出现头晕2例(2/34, 5.9%)。不良反应均轻微, 不需特殊处理, 未影响治疗, 服药期间或疗程结束停药后自行消失。

3 讨论

H pylori 根除治疗是治疗慢性胃炎、消化性溃疡、MALT淋巴等上胃肠道疾病, 以及不明原因的缺铁性贫血、特发性血小板减少性紫癜等胃肠外疾病的重要方面。目前最广泛推荐使用的一线根除治疗方案是PPI三联, 即联合应用质子泵抑制剂(PPI)和两种抗生素, 抗生素一般从克拉霉素、甲硝唑和阿莫西林中选择两种^[1-3]。早期研究中该方案有很高的根除率^[4-6], 但是近年来该方案在世界范围内根除率有所下降, 个别研究甚至低于80%^[7-11]。对抗生素耐药增加是造成PPI短程三联疗法根除率下降的最重要原因^[12-13], 其中甲硝唑耐药^[14-15]和克拉霉素耐药^[16-18]情况尤为严重, 阿莫西林耐药相对少见。*H pylori* 对克拉霉素和甲硝唑耐药都是基因点突变所致^[19], 反复治

疗失败是 *H pylori* 产生耐药最重要的原因^[20], 因此选择有效的一线治疗方案以提高初治成功率是预防 *H pylori* 产生耐药的关键。

传统四联疗法根除率可以达到90%以上, 但是很少用于一线治疗, 多用于三联方案根除治疗失败后的补救治疗。传统四联疗法不能广泛应用的一个重要原因是该方案治疗复杂, 不良反应发生率高, 造成该方案依从性差。通常的四联疗法疗程要7-14 d, 12 h服用一次PPI, 8 h服用一次甲硝唑, 6 h服用一次四环素和铋剂。如果将四联疗法用于初治患者的 *H pylori* 根除治疗, 则不必选用副作用大、半衰期短的四环素, 完全可以采用铋剂联合应用目前疗效最好的三联疗法PPI+克拉霉素+阿莫西林, 以获取最大的疗效。相对于补救治疗中使用的四联疗法, 这个方案选用了发展中国家耐药问题较轻的克拉霉素, 避免使用在发展中国家耐药问题最为严重的甲硝唑, 没有选用体内代谢很快、副作用较严重的四环素。所有药物均可1 d两次服用, 治疗更简单。但是目前有关这个方案的研究还较少。

近年来有几个关于7 d以下疗程的四联疗法的临床研究, 使我们对四联疗法的疗程与疗效的关系也有了初步的了解。有研究显示1 d疗法和2 d疗法疗效很差^[21-23]。还有研究报告4 d疗法疗效与7 d疗法相同, 但费用明显减少, 是性价比比较好的方案^[24-25]。我们在以往的研究中采用PPI、铋剂、克拉霉素和阿莫西林组成的四联疗法对 *H pylori* 阳性的患者进行疗程为4 d和7 d的根除治疗。结果显示4 d疗法 *H pylori* 根除率明显低于7 d疗法的根除率^[26], 与De et al的研究结果^[16-17]不一致, 考虑可能因为前述研究进行的较早。近年来随着 *H pylori* 耐药菌株的增加, 各根除 *H pylori* 方案根除率都有明显降低的趋势。另外, 我们的研究中纳入较多的慢性胃炎和胃溃疡的患者, 有文献报道在这些患者中的 *H pylori* 根除率低于十二指肠溃疡患者。有关5 d疗法的研究尚未见报道。在本研究中无论按照PP及ITT分析, 5 d疗法与7 d疗法 *H pylori* 根除率及疼痛缓解率均无明显差异。结合我们以前的研究, 本研究提示5 d是该方案能够保证疗效的最短疗程。

本研究中两组患者不良反应发生轻微,不需特殊处理,可自行缓解,患者依从性好。5 d疗法组不良反应发生率较7 d疗法组稍低,但是病例较少,无统计学意义。我们的研究提示泮托拉唑四联5 d疗法可以获得和四联7 d疗法同样满意的*H pylori*根除率和疼痛缓解率,可以作为根除*H pylori*治疗的一线治疗方案。

4 参考文献

- 1 张万岱, 萧树东, 胡伏莲. 对幽门螺杆菌若干问题的共识意见(2003·中国). 中华医学杂志 2004; 84: 522-523
- 2 Chey WD, Wong BC. American College of Gastroenterology guideline on the management of *Helicobacter pylori* infection. *Am J Gastroenterol* 2007; 102: 1808-1825
- 3 Malfertheiner P, Megraud F, O'Morain C, Bazzoli F, El-Omar E, Graham D, Hunt R, Rokkas T, Vakil N, Kuipers EJ. Current concepts in the management of *Helicobacter pylori* infection: the Maastricht III Consensus Report. *Gut* 2007; 56: 772-781
- 4 Bazzoli F. Italian omeprazole triple therapy--a 1-week regimen. *Scand J Gastroenterol Suppl* 1996; 215: 118
- 5 Lind T, Veldhuyzen van Zanten S, Unge P, Spiller R, Bayerdorffer E, O'Morain C, Bardhan KD, Bradette M, Chiba N, Wrangstadh M, Cederberg C, Idstrom JP. Eradication of *Helicobacter pylori* using one-week triple therapies combining omeprazole with two antimicrobials: the MACH I Study. *Helicobacter* 1996; 1: 138-144
- 6 Lind T, Megraud F, Unge P, Bayerdorffer E, O'morain C, Spiller R, Veldhuyzen Van Zanten S, Bardhan KD, Hellblom M, Wrangstadh M, Zeijlon L, Cederberg C. The MACH2 study: role of omeprazole in eradication of *Helicobacter pylori* with 1-week triple therapies. *Gastroenterology* 1999; 116: 248-253
- 7 Katelaris PH, Forbes GM, Talley NJ, Crotty B. A randomized comparison of quadruple and triple therapies for *Helicobacter pylori* eradication: The QUADRATE Study. *Gastroenterology* 2002; 123: 1763-1769
- 8 Gene E, Calvet X, Azagra R, Gisbert JP. Triple vs quadruple therapy for treating *Helicobacter pylori* infection: an updated meta-analysis. *Aliment Pharmacol Ther* 2003; 18: 543-544
- 9 Vakil N, Lanza F, Schwartz H, Barth J. Seven-day therapy for *Helicobacter pylori* in the United States. *Aliment Pharmacol Ther* 2004; 20: 99-107
- 10 Cardenas VM, Graham DY, El-Zimaity HM, Opekun AR, Campos A, Chavez A, Guerrero L. Rabeprazole containing triple therapy to eradicate *Helicobacter pylori* infection on the Texas-Mexican border. *Aliment Pharmacol Ther* 2006; 23: 295-301
- 11 Bochenek WJ, Peters S, Fraga PD, Wang W, Mack ME, Osato MS, El-Zimaity HM, Davis KD, Graham DY. Eradication of *Helicobacter pylori* by 7-day triple-therapy regimens combining pantoprazole with clarithromycin, metronidazole, or amoxicillin in patients with peptic ulcer disease: results of two double-blind, randomized studies. *Helicobacter* 2003; 8: 626-642
- 12 胡伏莲. 重视幽门螺杆菌耐药菌株的研究. 胃肠病学 2006; 11: 385-387
- 13 胡伏莲, 周殿元. 幽门螺杆菌感染的基础与临床. 修订版. 北京: 中国科学技术出版社, 2002: 351-359
- 14 Ling TK, Cheng AF, Sung JJ, Yiu PY, Chung SS. An increase in *Helicobacter pylori* strains resistant to metronidazole: a five-year study. *Helicobacter* 1996; 1: 57-61
- 15 van der Wouden EJ, van Zwet AA, Vosmaer GD, Oom JA, de Jong A, Kleibeuker JH. Rapid increase in the prevalence of metronidazole-resistant *Helicobacter pylori* in the Netherlands. *Emerg Infect Dis* 1997; 3: 385-389
- 16 Tankovic J, Lamarque D, Lascols C, Soussy CJ, Delchier JC. Impact of *Helicobacter pylori* resistance to clarithromycin on the efficacy of the omeprazole-amoxicillin-clarithromycin therapy. *Aliment Pharmacol Ther* 2001; 15: 707-713
- 17 Ducons JA, Santolaria S, Guirao R, Ferrero M, Montoro M, Gomollon F. Impact of clarithromycin resistance on the effectiveness of a regimen for *Helicobacter pylori*: a prospective study of 1-week lansoprazole, amoxycillin and clarithromycin in active peptic ulcer. *Aliment Pharmacol Ther* 1999; 13: 775-780
- 18 Lee JH, Shin JH, Roe IH, Sohn SG, Lee JH, Kang GH, Lee HK, Jeong BC, Lee SH. Impact of clarithromycin resistance on eradication of *Helicobacter pylori* in infected adults. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49: 1600-1603
- 19 郑小丽, 胡伏莲, 王蔚虹. 幽门螺杆菌对甲硝唑和克拉霉素耐药的分子机制. 中华医学杂志 2001; 81: 1211-1213
- 20 成虹, 胡伏莲, 李江. 幽门螺杆菌耐药性对其根除治疗影响的研究. 中华医学杂志 2006; 86: 2679-2682
- 21 de Boer WA, van Etten RJ, Coremans A, Schneeberger PM. Two-day 'weekend' lansoprazole-quadruple therapy for *Helicobacter pylori* infection. *Aliment Pharmacol Ther* 1998; 12: 77-81
- 22 Tucci A, Poli L, Tosetti C, Biasco G, Grigioni W, Varoli O, Mazzoni C, Paparo GF, Stanghellini V, Caletti G. Reversal of fundic atrophy after eradication of *Helicobacter pylori*. *Am J Gastroenterol* 1998; 93: 1425-1431
- 23 Calvet X, Garcia N, Campo R, Brullet E, Comet R, Navarro M. Two-day quadruple therapy for cure of *Helicobacter pylori* infection: a comparative, randomized trial. *Am J Gastroenterol* 1998; 93: 932-934
- 24 de Boer WA, van Etten RJ, Schade RW, Ouwehand ME, Schneeberger PM, Tytgat GN. 4-day lansoprazole quadruple therapy: a highly effective cure for *Helicobacter pylori* infection. *Am J Gastroenterol* 1996; 91: 1778-1782
- 25 de Boer SY, Siem TH. Four-day quadruple therapy as a routine treatment for *Helicobacter pylori* infection. *Aliment Pharmacol Ther* 1997; 11: 1119-1121
- 26 李晓宇, 魏虹, 胡伏莲. 泮托拉唑四联4d与7d疗法随机对照研究. 中国新药杂志 2004; 13: 448-451

编辑 程剑侠 电编 何基才

拉米夫定治疗慢性乙型肝炎中变异病毒株的动态变化

田国保, 席宏丽, 田地, 崔建军, 于敏, 陆海英, 曾争

田国保, 席宏丽, 田地, 崔建军, 于敏, 北京大学第一医院感染疾病科病毒研究室 北京市 100034
陆海英, 曾争, 北京大学第一医院感染疾病科 北京市 100034
通讯作者: 曾争, 100034, 北京市, 北京大学第一医院感染疾病科. zeng@bjmu.edu.cn
电话: 010-66551799
收稿日期: 2007-04-15 修回日期: 2007-08-18

Dynamics of hepatitis B virus variations during lamivudine treatment

Guo-Bao Tian, Hong-Li Xi, Di Tian, Jian-Jun Cui, Min Yu, Hai-Ying Lu, Zheng Zeng

Guo-Bao Tian, Hong-Li Xi, Di Tian, Jian-Jun Cui, Min Yu, Laboratory of Virology, Department of Infectious Diseases, Peking University First Hospital, Beijing 100034, China

Hai-ying Lu, Zheng Zeng, Department of Infectious Disease, Peking University First Hospital, Beijing 100034, China

Correspondence to: Zheng Zeng, Laboratory of Virology, Peking University First Hospital, Beijing 100034, China. zeng@bjmu.edu.cn

Received: 2007-04-15 Revised: 2007-08-18

Abstract

AIM: To use pyrosequencing to establish a method for monitoring hepatitis B virus mutants resistant to lamivudine.

METHODS: Plasmids cloned, sequenced and constructed from the lamivudine-resistant HBV mutants at rtM204I/V (YMDD motif) and rtL180M were used as a standard. The frequencies of mutation-site nucleotides were detected by pyrosequencing in sera from 4 patients who underwent lamivudine therapy. HBV DNA with rtM204I, rtM204V and wildtype plasmids were constructed for subtracting the background signal frequencies.

RESULTS: The frequency of background signals in all plasmids were between 0.1% and 3.9%, The frequency of background signals was determined as 5%. In all 4 patients, HBV variations were detected from 4.5% to 33% before lamivudine therapy. Virological breakthrough

was monitored for 4 to 8 months along with the gradually increasing HBV variations at positions of rtM204I/V and rtL180M.

CONCLUSION: Pyrosequencing is an effective method to quantify and monitor HBV variations during lamivudine therapy. HBV lamivudine-resistant mutants exist before lamivudine treatment and gradually increase during treatment, and then virological breakthrough and clinical resistance occur.

Key Words: Hepatitis B virus; Variation; Lamivudine; Pyrosequencing

Tian GB, Xi HL, Tian D, Cui JJ, Yu M, Lu HY, Zeng Z. Dynamics of hepatitis B virus variations during lamivudine treatment. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007; 15(30): 3245-3250

摘要

目的: 建立定量检测及监测乙肝病毒DNA的rtM204I/V(YMDD)及rtL180M变异的方法。

方法: 以克隆、测序鉴定及构建乙肝病毒DNA YMDD及变异(YIDD和YVDD)质粒作为标准, 4例接受拉米夫定治疗(100 mg/d, 疗程48 wk以上)的慢性乙型肝炎患者血清标本为对象, 用焦磷酸测序的方法检测变异位点核苷酸的频率, 并计算变异株的含量比例, 通过检测不同变异株类型的标准质粒, 确定测序峰图的背景信号。

结果: 通过检测标准质粒后, 确定背景信号为5%, 变异位点调整后的核苷酸频率转化为变异病毒株的比例后, 4例患者治疗前均检测出变异的病毒株(4.5%-33%), 并且随治疗时间延长呈增多的趋势。病毒载量及ALT分析提示基因型耐药发生后, 将发生病毒学反跳及临床耐药。

结论: 焦磷酸测序可以定量检测及动态监测变异病毒株的含量。拉米夫定耐药突变株在拉米夫定治疗前已存在, 并随治疗时间的增加而增长, 出现病毒学反弹及临床耐药。

背景资料
随着核苷(酸)类似物抗HBV的治疗以来, HBV耐药的问题越来越突出, 而目前无比较满意的监测HBV耐药突变的方法。

研发前沿
探讨新的敏感的
定量检测变异
病毒株的方法
是当前耐药研
究的热点之一。
Pyrosequencing
方法及其技术是
目前低-中通量
检测DNA突变
位点的定量方
法之一。本文
应用此技术和
方法进行HBV
耐药株的动态
监测。

关键词: 乙型肝炎病毒; 变异; 拉米夫定; 焦磷酸测序

田国保, 席宏丽, 田地, 崔建军, 于敏, 陆海英, 曾争. 拉米夫定治疗慢性乙型肝炎中变异病毒株的动态变化. 世界华人消化杂志 2007;15(30):3245-3250

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/3245.asp>

0 引言

拉米夫定作为第一个获批准国际公认的 po 抗乙肝病毒(HBV)药物, 其问世推动了慢性乙型肝炎治疗的进程。然而随着治疗时间的延长(6 mo以后), 其DNA聚合酶的基序酪氨酸-蛋氨酸-天冬氨酸-天冬氨酸(YMDD)(rtM204I/V)变异的发生率逐渐增高达到14%-32%(1年)、38%(2年)、49%(3年)及66%(4年)^[1], 并且常伴随其上游位点rtL180M的变异^[2]。有研究表明未经拉米夫定治疗的HBV感染者血清中可检测HBV的YMDD变异的病毒株^[3], 而且治疗后常常表现为变异株与野生株的共生。目前尚无满意的定量检测变异株的方法。我们通过采用焦磷酸测序(pyrosequencing)分析变异位点的核苷酸频率, 以乙型肝炎病毒(HBV)聚合酶区(rtM204I/V及rtL180M)为研究位点, 动态观察4例拉米夫定治疗的慢性乙型肝炎患者体内变异病毒株的动态变化情况。

1 材料和方法

1.1 材料 4例慢性乙型肝炎患者均为北京大学第一医院就诊者, 均为男性, 诊断标准符合2005年慢性乙型肝炎防治指南标准, 并排除其他原因如甲型、丙型及戊型肝炎病毒所致肝脏损害。4例患者都服用拉米夫定(用法: 100 mg, 1次/d)至少48 wk, 治疗中定期进行肝功能检查、血清学检查(HBeAg和anti-HBe, 美国Abbott AxSYM)及HBV DNA定量检测(罗氏Cobas Amplicor HBV monitor), 并作详细记录。留取血清标本, 保存于-20℃冰箱。

1.2 方法

1.2.1 血清HBV DNA的提取 采用QIAgen全血基因组提取试剂盒(德国Qiagen公司), 操作按试剂盒说明书进行。

1.2.2 标准质粒的构建 以3例被DNA测序法证明分别为YMDD、YIDD及YVDD的HBV DNA为模板, PCR产物(793 bp)经琼脂糖凝胶电泳鉴定后, 采用DNA胶回收试剂盒(TIANGEN DNA gel extraction kit(中国北京天根生化科技有限公司)纯化, 而后与pGEM-T载体(pGEM-T vector

ligation assay(Promega, USA))连接并转化感受态的大肠杆菌, 接种于含有氨苄青霉素的培养皿中, 37℃, 16 h。每个培养皿随机挑选8个克隆接种于5 mL LA细菌培养基中进行增菌培养, 提取质粒(E.Z.N.A plasmid miniprep kit(Omega))后, 用引物P1和P2进行PCR扩增后, 测序鉴定。引物P1(5'CTCWSCCATATCGTCAATC3' W = A/T, S = C/G, 106-124 bp)和P2(5'AACTYCCAATTACATATCCC3' Y = C/T, 879-898 bp)。

1.2.3 焦磷酸测序 (1)测序前PCR扩增: 以上述试剂盒提取的HBV DNA为模板, 以引物P3(5'ACAAAACCTWCGGACGGA3'W = A or T, 572-589 bp)和P4(5'Biotin-SAAAGGGACTCAAGATGT3'S = C or G, 774-791 bp, 5'端生物素标记)扩增片段包括rtM204I/V及rtL180M位点的片段(220 bp)。扩增体系: 2.5 μ L dNTP, 5 μ L 10 \times Buffer(含有1.5 mmol/L MgCl₂), 1 μ L Primer, 0.5 μ L Hotstart Taq DNA聚合酶(5 U/ μ L TaKaRa大连宝生物工程公司), 4 μ L模板和36 μ L ddH₂O, 总体积50 μ L。扩增条件: 94℃ 5 min预变性, 而后94℃ 30 s、55℃ 20 s和72℃ 20 s, 50个循环, 最后72℃ 10 min充分延伸。最后扩增片段用20 g/L琼脂糖凝胶电泳鉴定。(2)单链DNA模板的准备: 将PCR产物转移至96孔PCR板, 加45 μ L 1 \times 结合缓冲液(10 mmol/L Tris-HCl、2 mol/L NaCl、1 mmol/L EDTA和1 mL/L Tween20)和4 μ L链霉素磁珠(10 g/L, Dynabeads M280-链霉素磁珠), 1400 r/min离心30 min, 充分摇动混匀。被固定在磁珠上PCR产物先后在750 mL/L乙醇、0.5 mol/L NaOH(变性使之变成单链)、复性缓冲液(20 mmol/L Tris-Acetate、5 mmol/L MgAc)及ddH₂O中分别洗涤1 min。(3)测序引物杂交: 测序引物P5(5'-AGTGGGCTCAGTCCGTTTC-3'645-664 bp, 针对rtL180M位点)或P6(5'CTGTYTGGCTTTTCAGT3' Y = C or T, 720-735 bp, 针对rtM204I/V位点)和单链DNA模板随磁珠转入45 μ L复性缓冲液(含测序引物10 μ mol/L), 在80℃杂交3 min, 冷却至室温。(4)利用PSQ96MA测序仪(中科奥华基因组研究所有限公司提供)和SNP通用试剂盒(Pyrosequencing AB公司, 瑞典), 按仪器和试剂盒说明书进行PCR产物SNP的焦磷酸测序, 分别检测rtL180M位点(CTG)及rtM204I/V位点(TATATGGATGAT)中变异位点的核苷酸频率。

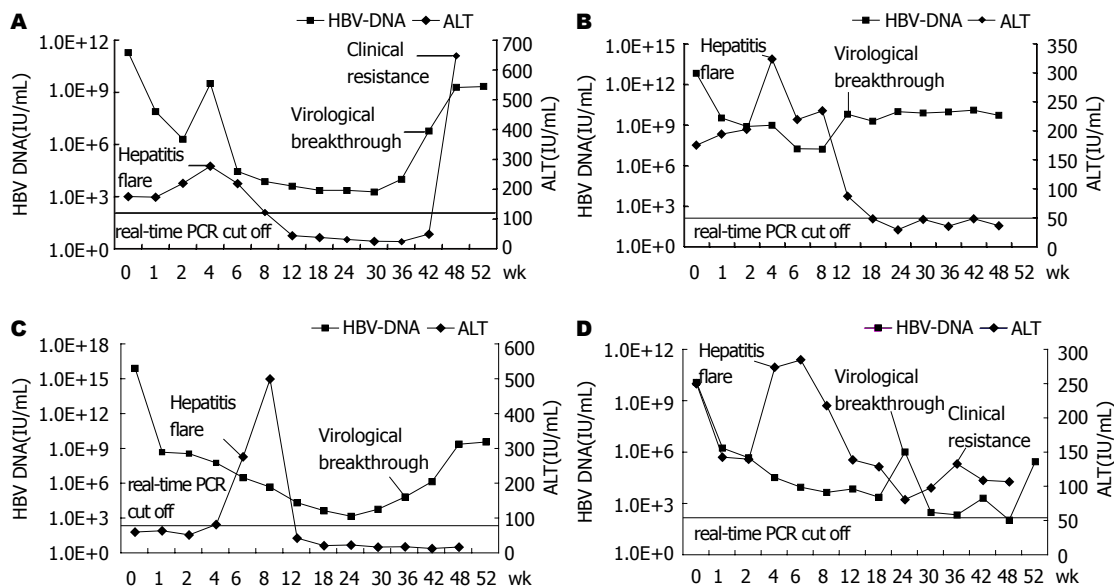


图1 4例慢性乙型肝炎患者拉米夫定治疗中HBV DNA和ALT的动态变化。A: male 32岁; B: male 21岁; C: male 37岁; D: male 19岁。

2 结果

2.1 拉米夫定治疗中HBV DNA和ALT的动态变化

4例慢性乙型肝炎患者在接受拉米夫定治疗后, HBV DNA在1-2 wk后病毒核酸部分应答, 4-8 wk后出现一过性的ALT升高, 而后伴随着HBV DNA的进一步下降和ALT的复常或下降(部分应答)。然而治疗18-36 wk后不同程度上均发生了HBV DNA的反跳(virological breakthrough, 病毒学反弹), 伴随或不伴随ALT的再次升高(clinical resistance, 临床耐药)(图1)。4例患者从治疗开始到结束, 持续HBeAg(+)及HBeAb(-), 均未发生血清学转换。

2.2 HBV DNA YMDD, YIDD和YVDD质粒的构建示意图及测序鉴定结果

构建质粒的示意图如图2, 挑选18个克隆后, 质粒测序鉴定结果如图3。由图3看出, 患者(B)治疗前血清中可检测到变异病毒株(1/7)。

2.3 焦磷酸测序定量检测变异位点核苷酸频率的调整

通过检测代表不同变异类型的标准质粒, 结果显示背景峰核苷酸频率在0.1%-3.9%之间。为了增加特异性, 确定5%为测序背景信号峰核苷酸频率, 也就是说碱基频率分析的敏感性可以达到5%。因为用 α -硫化的三磷酸腺苷(dATP α S)替代三磷酸腺苷(dATP)后, 尽管可以有效地被DNA聚合酶利用而不被荧光素识别, 但是核苷酸“A”的信号峰会偏高, 所以频率分析软件计算“A”的频率时默认把“A”的峰值乘86%后, 重新计算“A”的频率。

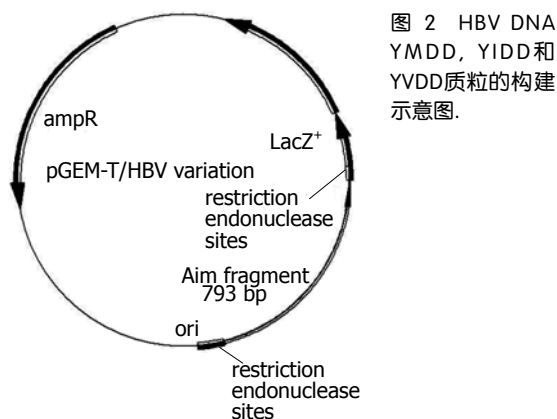


图2 HBV DNA YMDD, YIDD和YVDD质粒的构建示意图。

2.4 变异位点调整后的核苷酸频率转化为变异病毒株的比例

rtL180M位点(CTG)和rtM204I/V位点(TATATGGATGAT)调整后, 核苷酸频率如图4所示。既然编码密码子已知为: Leu(CTG和TTG)、Met(ATG)、Ile(ATT、ATC及ATA)和Val(GTG), 那么把核苷酸频率转化为变异株比例为: rtL180M位点, 野生株所占比例为1-A%, 变异株所占比例为A%; rtM204I/V位点, YMDD所占比例为G2%-G1%, YIDD所占比例为1-G2%, YVDD所占比例为G1%(图4)。

2.5 拉米夫定治疗中变异病毒株的动态变化

按上述计算4例慢性乙型肝炎患者在接受拉米夫定治疗时的血清中变异病毒株比例后, 4例患者治疗前血清中均可检测出变异的病毒株(4.5%-33%)。随着治疗时间的延长, 变异病毒株的比例呈增多的趋势(图5)。结合临床资料(病毒载量及ALT)分析, 基因型耐药发生后, 发生的病

相关报道
国外学者分别通过探针杂交、荧光定量PCR及挑选多个克隆测序的办法, 动态观察了变异病毒的存在变化, 但以上方法有其自身的缺点。

创新盘点
本文应用较先进的焦磷酸测序, 通过检测变异位点的核苷酸频率来定量观察了变异病毒株的变化, 方法快速、准确而且结果直观。

应用要点
本文建立的焦磷酸测序方法, 可以对变异病毒株进行定量, 有潜在的临床应用价值。

	rtL180M	rtL204I/V
B 0W	GL SPFLLAQF	TSAICSUURR
B 0W	-----	AFPHCLAFSY
B 0W	-----	MDDUULGAKS
B 0W	-----	-----
B 0W	-----	-----
B 0W	-----	-----
B 0W	-----	-----
B 0W	-----	-----
B 48W	-----	-----
B 48W	-----	-----
B 48W	-----	-----
B 48W	-----	-----
B 48W	-----	-----
B 48W	-----	-----
B 48W	-----	-----
B 48W	-----	-----
A 60W	-----	-----
A 60W	-----	-----
A 60W	-----	-----
A 60W	-----	-----
A 60W	-----	-----
A 60W	-----	-----
A 60W	-----	-----
A 60W	-----	-----

图 3 挑选18个克隆后质粒测序鉴定结果。

病毒反跳及临床耐药在时间上不尽一致, 提示可能与其他因素有关, 如变异病毒株本身的复制能力及机体的免疫力状态等。

3 讨论

1995年拉米夫定作为临床上较早而且广泛应用的口服抗HBV的药物, 能够迅速降低患者血清中HBV DNA的载量, 并且患者耐受性较好。然而随着治疗时间的延长, 病毒耐药的问题越来越突出。值得注意的是拉米夫定治疗后发生的耐药变异常常为变异株和野生株共生, 即变异病毒株的载量不同或变异病毒株在共生的总病毒中所占的比例不同产生对变异界定的差异(国外有学者以共生病毒中变异株>5%定义为发生了变异), 从而影响变异发生后对治疗应答的判断。因此, 对耐药变异的诊断, 包括有无变异, 变异病毒株载量及所占比例等, 是当前迫切需要解决的问题^[4-5]。

目前, 定量检测变异病毒株的方法主要有探针杂交(line probe hybridization)^[6]、实时扩增突变阻止系统PCR(real-time amplification refractory mutation system PCR)^[7]以及聚合酶链式反应(PCR)扩增、克隆、鉴定及测序^[8]等。但是上述方法可能存在如敏感性低(线性探针敏感性为变异株>10%以上才检测出)且操作烦琐等问题。焦磷酸测序(pyrosequencing)是由4种酶催化的同一反应体系中的酶级联化学发光反应, 每一轮测序反应依次只加入一种dNTP, 若该dNTP与模板配对, 聚合酶就可以将其掺入到引物链中并释放出等摩尔数的焦磷酸基团(PPi)。PPi可最终转化为可见光信号, 并由PyrogramTM转化为一个峰值, 然后加入下一种dNTP, 继续DNA链的合成。因为每个峰值的高度与反应中掺入的核苷酸数目成正比, 所以在

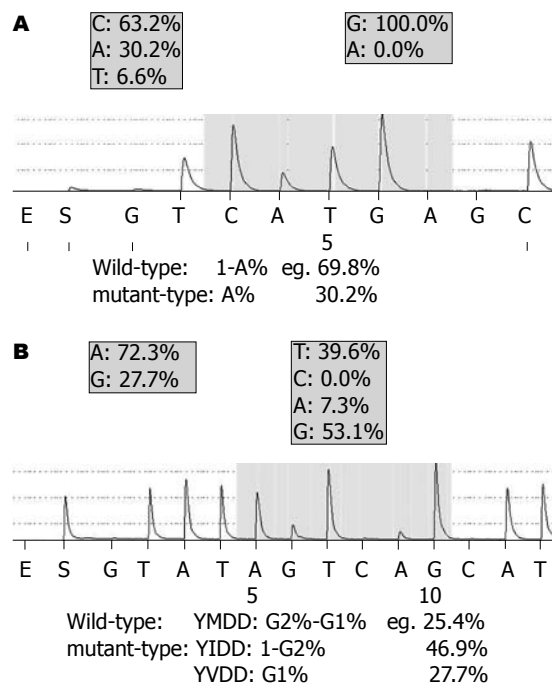
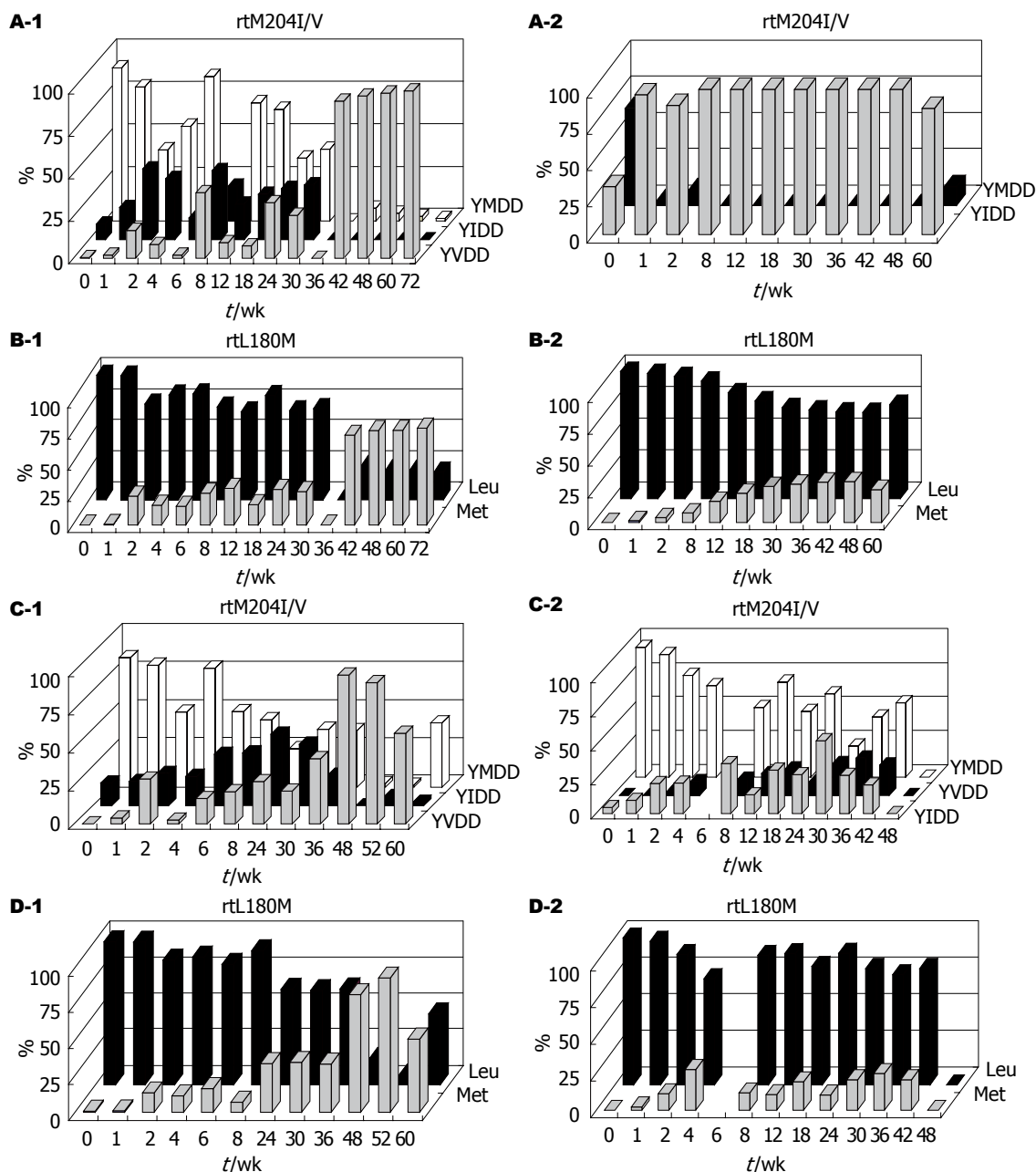


图 4 变异位点调整后的核苷酸频率转化为变异病毒株的比例。A: rtL180M; B: YMDD。

遗传多态性关联研究中, 该技术常常与DNA池(DNA pooling)技术相结合, 来研究不同组DNA池中的等位基因频率。有研究证实该方法检测的核苷酸频率与实际的核苷酸频率相关性达97%-99%, 敏感性达2%^[9]。因为测序过程可能会有一定的背景信号峰, 本实验通过检测构建的纯代表野生株或变异株的标准质粒, 结果显示背景峰核苷酸频率在0.1%-3.9%之间。为了增加特异性, 确定5%为测序背景信号峰核苷酸频率, 也就是说核苷酸频率分析的敏感性可以达到5%。另外该技术具有不用制胶、不需要荧光染料和同位素标记、高通量、快速(96个/10 min)、结果直观等优点。

应用拉米夫定治疗后, 出现变异病毒株的机制有两种学说。一是选择学说, 即自然状态下就存在处于劣势的对拉米夫定不敏感的变异病毒株。拉米夫定治疗中野生株迅速受到抑制, 而变异病毒株逐渐转变为优势病毒株, 目前多数学者支持此学说。本实验的4例慢乙肝患者治疗前均可检测到变异病毒株(4.5%-33%), 与国外学者^[7-8]采用其他方法研究的结果一致。另一是诱导学说, 如国内学者^[10]采用治疗前克隆(20个克隆/份标本)测序的方法, 未检测到变异病毒株, 尽管不能排除诱导出现变异的可能, 我们认为可能与挑选的克隆数较少(国外学者挑选30个克隆/份标本)及标本中变异病毒株所占的比例较低(可能<5%)有关。本实验结合临床资料(总病毒



名词解释
焦磷酸测序技术: 是由4种酶催化的同一反应体系中的酶级联化学发光反应, 既可进行DNA序列分析, 又可进行基于序列分析的SNP检测及等位基因频率测定; 有操作简单、高通量、准确等优点。

图 5 拉米夫定治疗中变异病毒株(rtL180M和rtM204I/V)的动态变化。

载量及ALT)分析显示, 随着治疗时间的延长, 变异病毒株的比例呈增多的趋势。但是基因型耐药发生后, 发生的病毒学反跳及临床耐药在时间上不尽一致, 可能与变异病毒株本身的复制能力(治疗前变异病毒株比例及类型等)^[11]及机体的免疫力状态等有关, 有待于进一步研究。

4 参考文献

- Lai CL, Dienstag J, Schiff E, Leung NW, Atkins M, Hunt C, Brown N, Woessner M, Boehme R, Condeary L. Prevalence and clinical correlates of YMDD variants during lamivudine therapy for patients with chronic hepatitis B. *Clin Infect Dis* 2003; 36: 687-696
- Allen MI, Deslauriers M, Andrews CW, Tipples GA, Walters KA, Tyrrell DL, Brown N, Condeary LD. Identification and characterization of mutations in hepatitis B virus resistant to lamivudine. *Hepatology* 1998; 27: 1670-1677
- Kobayashi S, Ide T, Sata M. Detection of YMDD motif mutations in some lamivudine-untreated asymptomatic hepatitis B virus carriers. *J Hepatol* 2001; 34: 584-586
- 拉米夫定临床应用专家组. 2004年拉米夫定临床应用专家共识. *中华肝脏病杂志* 2004; 12: 425-428
- 侯金林, 孙剑. 核苷类似物抗乙肝病毒治疗后耐药新认识. *中华传染病杂志* 2006; 24: 145-14
- Pas SD, de Man RA, Fries E, Osterhaus AD, Niesters HG. The dynamics of mutations in the YMDD motif of the hepatitis B virus polymerase gene during and after lamivudine treatment as determined by reverse hybridization. *J Clin Virol* 2002; 25: 63-71
- Punia P, Cane P, Teo CG, Saunders N. Quantitation

同行评价
本文语言表达比较流畅, 研究方法新颖, 贴近临床实际, 为进一步研究HBV耐药性问题提供了一条思路, 具有一定的科学性和实用性.

- of hepatitis B lamivudine resistant mutants by real-time amplification refractory mutation system PCR. *J Hepatol* 2004; 40: 986-992
- 8 Pallier C, Castera L, Soulier A, Hezode C, Nordmann P, Dhumeaux D, Pawlotsky JM. Dynamics of hepatitis B virus resistance to lamivudine. *J Virol* 2006; 80: 643-653
- 9 Gruber JD, Colligan PB, Wolford JK. Estimation of single nucleotide polymorphism allele frequency in

DNA pools by using pyrosequencing. *Hum Genet* 2002; 110: 395-401

- 10 封波, 魏来, 陈明, 韩方正, 汪莉萍. 拉米夫定治疗前后乙型肝炎病毒P区基因的动态变化. *中华肝脏病杂志* 2006; 14: 327-330
- 11 Lee CH, Kim SO, Byun KS, Moon MS, Kim EO, Yeon JE, Yoo W, Hong SP. Predominance of hepatitis B virus YMDD mutants is prognostic of viral DNA breakthrough. *Gastroenterology* 2006; 130: 1144-1152

编辑 李军亮 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 •

世界华人消化杂志个性化服务订购活动

本刊讯 为了满足读者的多样化需求, 解决一些作者因为资金不足而导致订阅印刷版的困难, 自2007年开始, 世界华人消化杂志(WCJD), 推出以下个性化服务策略来为广大读者服务.

1 精彩专家述评专辑印刷版杂志

WCJD旬刊的服务方式: (1)每月8, 18, 28日通过E-mail发送精彩专家述评PDF; (2)2007年底将精彩专家述评专辑一本挂号邮寄用户收. 定价: 50元/年.

2 WCJD电子杂志

WCJD旬刊的服务方式: (1)每月8, 18, 28日通过E-mail提醒PDF电子杂志(1-36期). 定价: 180元/年.

3 WCJD网络版杂志

WCJD旬刊的服务方式: (1)每月8, 18, 28日通过E-mail提醒网络版杂志(1-36期). 定价: 160元/年.

4 WCJD印刷版杂志

WCJD印刷版1-36期. 定价: 864元/年.

5 订购信息

邮政编码, 姓名, 地址, 部门, 机构名称, E-mail, 手机号.

6 汇款的方式

邮局汇款: 世界胃肠病学杂志社收, 100023, 北京市2345信箱. 附言注明订购的内容.

银行汇款: 户名: 北京百世登生物医学科技有限公司; 开户银行: 中国工商银行北京商务中心区支行国贸大厦分理处; 账号: 0200041609020180741. 附言注明: 订购的内容和发票的抬头.

总之, WCJD将尽自己的最大努力, 满足广大读者的需求, 同时欢迎更多个性化服务的意见和建议E-mail发至: h.n.zhang@wjgnet.com. 谢谢! (世界胃肠病学杂志社 2007-09-30).

剧烈呕吐致食管破裂1例

陈晓文

陈晓文, 中国人民解放军第四二一医院内五二科 广东省广州市 510318

通讯作者: 陈晓文, 510318, 广东省广州市新港中路子468号, 中国人民解放军第四二一医院内五二科. gznkzj91@126.com

电话: 020-61636369

收稿日期: 2007-08-03 修回日期: 2007-09-22

摘要

剧烈呕吐致食管破裂1例, 以呕吐和腹痛为首发表现, 累及消化系统及呼吸系统, CT示纵膈气肿, 双侧胸腔积液, 合并双肺基底段肺不张, 左上腹大量气体影. 胃镜检查提示距门齿40-45 cm处食管黏膜可见大量白色脓苔附着, 脓苔中可见有气泡冒出, 考虑为食管穿孔. 治疗上以手术为主.

关键词: 呕吐; 食管破裂

陈晓文. 剧烈呕吐致食管破裂1例. 世界华人消化杂志 2007;15(30):3251

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/3251.asp>

0 引言

自发性食管破裂是由于各种原因引起的腹压突然升高, 挤压胃部使食管腔内压力骤然增加而导致食管肌层及黏膜破裂. 消化液及食物通过裂孔漏入胸腔直达基底部, 刺激膈肌、胸膜, 出现腹痛、胸痛, 呼吸急促, 腹部压痛和颈部皮下气肿等. 我院2006年收治以呕吐及腹痛为首发表现的食管破裂患者1例, 临床上较为罕见, 现报告如下.

1 病例报告

男, 30岁, 因呕吐后出现持续上腹部疼痛3 d于2006-04-23入院. 患者于本月20日中午饮酒后出现剧烈呕吐, 呕吐物为咖啡样液体, 量较多, 呕吐后出现持续性上腹部疼痛, 考虑为胃出血, 予止血抗炎治疗后腹痛减轻. 23日上午患者腹痛突然加重, 我院腹部平片考虑肠梗阻, 门诊以

“肠梗阻”收入院. 查体: 生命体征尚平稳, 神清, 端坐呼吸, 胸骨上窝及附近可扪及明显捻发音, 双肺呼吸音减弱, 未闻及明显干湿性罗音, 腹部平坦, 未见肠形及蠕动波, 右上腹压痛明显, 未扪及明显包块, 肝区叩痛(+), 移动性浊音阴性, 肠鸣音弱. 辅助检查: 血液分析示白细胞明显高于正常, CT示纵膈气肿, 双侧胸腔积液, 右侧量较多, 合并双肺基底段肺不张, 左上腹大量气体影, 不排除胃穿孔可能. 胃镜检查提示距门齿40-45 cm处食管黏膜可见大量白色脓苔附着, 脓苔中可见有气泡冒出, 考虑为食管穿孔. 于2006-04-30行手术治疗, 术后诊断为自发性食管破裂.

2 讨论

自发性食管破裂是由于各种原因引起的腹压突然升高, 挤压胃部使食管腔内压力骤然增加而导致食管肌层及黏膜破裂. 消化液及食物通过裂孔漏入胸腔直达基底部, 刺激膈肌、胸膜, 出现腹痛、胸痛, 呼吸急促, 腹部压痛和颈部皮下气肿等. 临床上容易和自发性气胸、急性纵膈炎、心梗、溃疡穿孔、急性坏死胰腺炎等混淆, 误诊率高达72.4%, 死亡率高达33.3%. 本病诊断并不难, 凡有剧烈呕吐病史, 若有饱餐、酒后突发胸痛或上腹痛, 颈部皮下气肿, 一侧或双侧液气胸者即应怀疑, 依靠X线检查、食管造影, 螺旋CT气管成像有助诊断. 值得一提的是, 此类患者, 一般不主张内镜检查, 若经其他检查仍无法明确诊断者, 行内镜检查前需有家属签字同意书. 明确诊断后尽早行食管裂口修补术, 不宜行食管破裂修补术者, 亦可行破裂段食管切除、食管-胃吻合术.

3 参考文献

- 1 Antonis JH, Poeze M, Van Heurn LW. Boerhaave's syndrome in children: a case report and review of the literature. *J Pediatr Surg* 2006; 41: 1620-1623

同行评价

本文报道剧烈呕吐致食管破裂1例, 对临床认识这类疾病有一定帮助.

编辑 程剑侠 电编 李军亮