

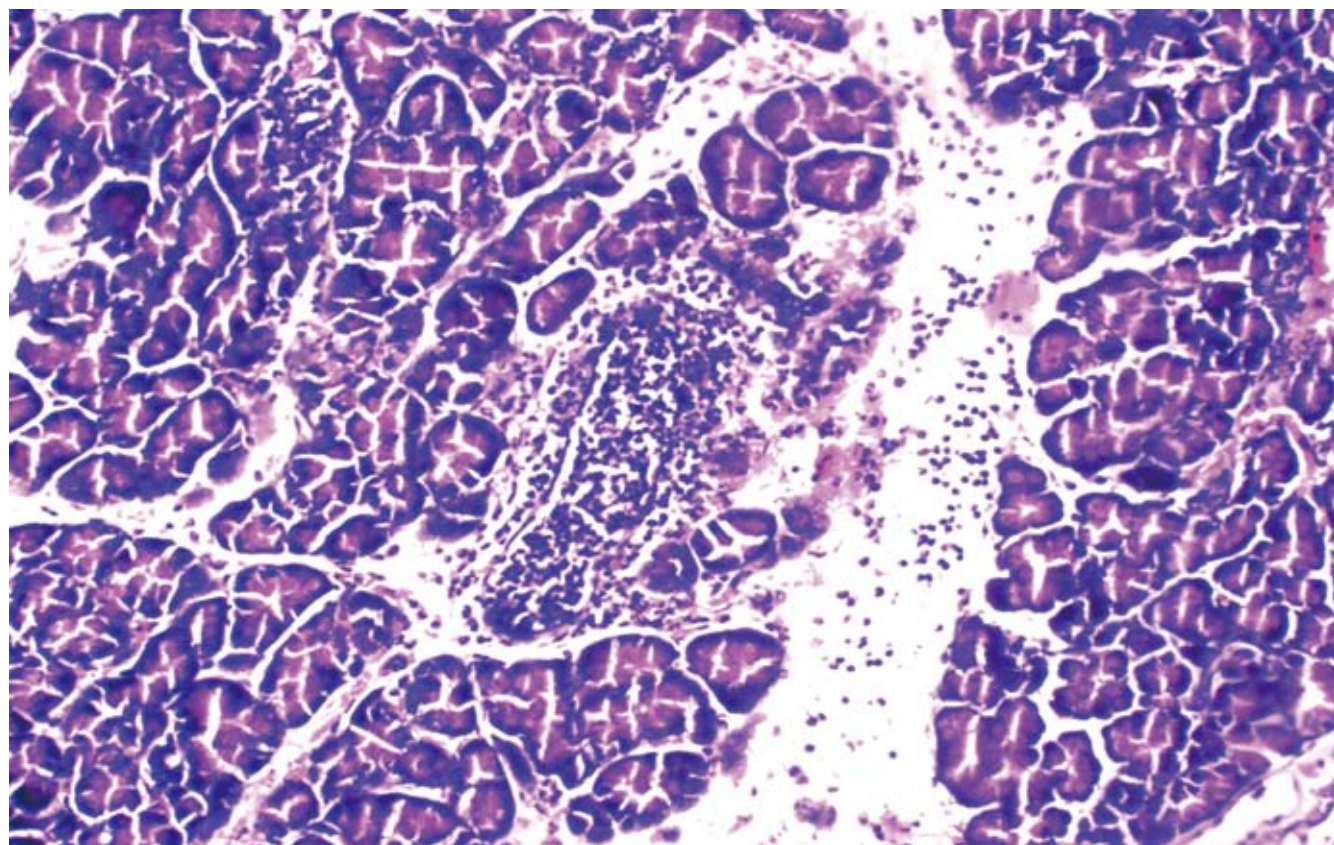
ISSN 1009-3079 (print)
ISSN 2219-2859 (online)
CN 14-1260/R

世界华人消化杂志®

**WORLD CHINESE
JOURNAL OF DIGESTOLOGY**

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

2011 年 8 月 28 日 第 19 卷 第 24 期 (Volume 19 Number 24)



24/2011

ISSN 1009-3079



9 771009 307056

名誉总编辑

潘伯荣

总编辑

马连生

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

世界华人消化杂志®

编辑委员会

2009-01-01/2011-12-31

wcjd@wjgnet.com www.wjgnet.com

总顾问

陈可冀教授
黄象谦教授
黄志强教授
王宝恩教授
危北海研究员
吴孟超教授
杨春波教授
周殿元教授

名誉总编辑

潘伯荣教授

社长/总编辑

马连生教授

副总编辑

纪小龙教授
姜洪池教授
王苑本教授
吴云林教授
徐克成教授
杨思凤教授
姚希贤教授
岳茂兴教授
张万岱教授
周学文教授

常务编委

程英升教授
范学工教授
高毅主任医师
江学良主任医师
李岩教授
刘连新教授
吕宾教授
罗和生教授
聂青和教授
王小众教授

编委

消化内科学

白爱平副教授
苒新明教授
陈国忠副主任医师
陈洪刚教授
陈其奎教授
陈卫昌教授
陈贻胜教授
程斌教授
迟宝荣教授
崔立红教授

邓长生教授
丁士刚教授
董蕾教授
杜雅菊主任医师
杜奕奇副教授
樊晓明主任医师
房静远教授
冯志杰主任医师
傅春彬主任医师
高峰副教授
戈之铮教授
关玉盘教授
关晓辉主任医师
郭晓钟教授
郝建宇教授
何松教授
洪天配教授
侯晓华教授
胡伏莲教授
胡和平主任医师
黄培林教授
黄晓东主任医师
黄颖秋教授
黄缘教授
霍丽娟教授
季国忠教授
江米足主任医师
姜春萌教授
姜慧卿教授
姜相君主任医师
金瑞教授
蓝宇教授
李定国教授
李淑德教授
李瑜元教授
李玉民教授
李玉明教授
廖家智副主任医师
林志辉教授
刘冰熔教授
刘凤斌教授
刘改芳主任医师
刘海峰主任医师
刘海林主任医师
刘铁夫教授
刘莹副主任医师
刘占举教授
陆伦根教授
吕志武教授
马红主任医师
马欣主任医师
毛高平教授

孟庆华教授
倪润洲教授
欧希龙副教授
潘秀珍教授
朴云峰教授
秦成勇教授
任粉玉副教授
任建林教授
邵先玉教授
沈琳主任医师
沈守荣教授
沈薇教授
施瑞华教授
宋军副教授
宋于刚教授
唐世刚教授
田宇彬教授
宛新建副教授
王邦茂教授
王炳元教授
王承党教授
王江滨教授
王俊平教授
王晓艳副教授
闻勤生教授
夏冰教授
夏时海副教授
徐可树教授
许乐主任医师
杨建民教授
姚树坤教授
叶红军主任医师
张春清教授
张国梁主任医师
张军教授
张小晋主任医师
张晓岚教授
张筱茵副教授
张志坚教授
郑培永副教授
郑鹏远教授
郑素军副主任医师
周国雄主任医师
周晓东副教授
周宇教授
朱春兰主任医师
邹晓平主任医师
诸琦教授
于珮主任医师

消化外科学

白雪巍副主任医师

蔡开琳副教授
蔡三军主任医师
曹杰主任医师
陈光教授
陈海龙教授
陈积圣教授
陈进宏副主任医师
陈力教授
陈立波教授
陈凇教授
陈强谱教授
陈汝福教授
陈亚军主任医师
陈钟教授
程爱国教授
程爱群主任医师
程树群副教授
崔云甫教授
戴朝六教授
戴冬秋教授
丁义涛教授
董明教授
杜成友教授
杜顺达副主任医师
房林副教授
傅红副教授
傅华群教授
傅志仁主任医师
高成新教授
葛海燕教授
巩鹏副教授
谷俊朝主任医师
顾国利副主任医师
顾岩教授
韩天权教授
郝纯毅主任医师
郝立强副教授
何超教授
何晓顺教授
何裕隆教授
黄志勇教授
季加孚教授
英卫东教授
姜波健教授
蒋龙元副教授
金山副教授
黎乐群教授
李革副教授
李国威教授
李华副教授
李华山主任医师

李杰教授
李奇林教授
李胜研究员
李涛副主任医师
李文岗教授
李小荣教授
李旭副教授
李永翔主任医师
李志霞教授
李宗芳教授
梁力建教授
刘宝林教授
刘超副教授
刘建教授
刘颖斌主任医师
卢实春教授
陆才德教授
陆云飞教授
禄韶英副主任医师
吕明德教授
吕云福教授
彭吉润主任医师
彭心宇教授
齐清会教授
秦春宏副主任医师
秦华东教授
秦环龙教授
秦建民副主任医师
邱宝安主任医师
邱双健副教授
邱伟华副主任医师
仇毓东副教授
裘正军教授
单云峰副主任医师
沈柏用副教授
沈世强教授
施宝民教授
施诚仁教授
施晓雷副主任医师
石毓君副研究员
宋振顺教授
孙诚谊教授
孙学英教授
孙延平副主任医师
邵升副教授
谭晓冬教授
汤朝晖副主任医师
汤恢焕教授
汤绍涛教授
唐南洪教授
田晓峰教授
汪波副主任医师

汪根树副教授
王春友教授
王德盛副主任医师
王凤山教授
王广义教授
王健生教授
王鲁副教授
王蒙副教授
王石林主任医师
王文跃主任医师
王悦华副主任医师
王振宁教授
王正康教授
王志刚副主任医师
王忠裕教授
吴河水教授
吴健雄教授
吴金术教授
吴泰璜教授
吴志勇教授
伍晓汀教授
谢敏主任医师
谢晓华副教授
邢光明教授
徐大华主任医师
徐迅迪教授
徐洪副教授
徐戈良教授
许剑民教授
薛东波教授
严律南教授
杨柏霖副主任医师
杨桦教授
杨家和主任医师
杨维良教授
杨银学教授
杨尹默教授
伊力亚尔·夏合丁教授
殷正丰教授
于聪慧教授
于则利教授
禹正杨副教授
郁宝铭教授
元云飞教授
张必翔主任医师
张宏伟教授
张佳林教授
张进祥副教授
张俊副研究员
张力为副教授
张群华教授
张水军教授
张宗明教授
赵刚副教授

智绪亭教授
周伟平教授
邹小明教授

消化感染病学

陈国凤主任医师
陈红松研究员
陈建杰教授
陈仕珠主任医师
陈志辉副主任医师
党双锁教授
丁惠国教授
范建高教授
范小玲主任医师
高润平教授
高泽立副教授
高志良主任医师
龚国忠教授
管世鹤副教授
郝春秋副教授
何生松教授
胡国信副主任医师
靳雪源副主任医师
林菊生教授
刘正稳教授
宁琴教授
牛俊奇教授
钱林学主任医师
孙殿兴主任医师
谭德明教授
汤华研究员
唐霓副研究员
唐晓鹏教授
王凯教授
王怡主任医师
魏来教授
吴建国教授
吴君主任医师
宣世英教授
杨江华副教授
杨林副研究员
姚鹏副教授
张继明教授
张明辉副主任医师
张占卿主任医师
赵桂鸣主任医师
赵连三教授
赵秀英副教授
周霞秋教授
朱传武教授
庄林主任医师

消化中医药学

蔡淦教授

陈治水主任医师
杜群副研究员
黄恒青主任医师
李军祥教授
李康副教授
李晓波教授
李勇副教授
李振华教授
刘成海研究员
刘平教授
刘绍能主任医师
龙致贤教授
南极星教授
牛英才研究员
沈洪教授
司富春教授
唐志鹏研究员
王富春教授
王新月教授
邢建峰副教授
徐列明教授
许玲副教授
徐庆教授
袁红霞研究员
张声生教授

消化肿瘤学

曹秀峰教授
曹志成院士
陈公琰主任医师
陈克能教授
代智副研究员
华海清教授
李瑗教授
刘宝瑞教授
刘彬彬副研究员
刘云鹏教授
秦叔逵教授
沈克平主任医师
王阁教授
向德兵副教授
肖文华主任医师
谢丹教授
熊斌教授
张凤春教授

消化影像学

白彬主任医师
陈克敏教授
官泳松教授
韩新巍教授
胡红杰主任医师
李健丁教授
龙学颖副主任医师

倪才方教授
施海彬教授
魏经国教授
肖恩华教授
徐爱民副教授
徐辉雄教授
徐克教授
严惟力副教授
杨业发教授
杨建勇教授
赵卫主任医师

消化内镜及介入治疗学

丁佑铭教授
郝俊鸣副主任医师
茅爱武教授
潘林娜教授
孙明军教授
万军教授
吴硕东教授
袁友红副教授

消化中西医结合学

唐文富副教授
王学美研究员
魏睦新教授
杨钦河教授
张春虎副教授

消化基础研究

曹洁副教授
曹鹏副研究员
曹师承教授
陈敬贤教授
陈秋生教授
陈志龙教授
崔莲花副教授
樊红教授
高春芳研究员
高国全教授
高英堂研究员
管冬元副教授
何敏教授
黄昆教授
黄文林教授
黄园教授
李东辉教授
李刚教授
李杰副教授
李君文研究员
李永哲副研究员
李增山副教授
刘克辛教授
刘森副教授

梅林教授
钱其军研究员
钱睿哲教授
任超世研究员
任浩副教授
任晓峰副教授
台桂香教授
谭学瑞教授
田文静副教授
田颖刚副研究员
汪思应教授
王钦红教授
魏继福副研究员
吴道澄教授
吴军研究员
吴俊华副教授
徐宁志研究员
许文燮教授
姚登福教授
阴赅宏研究员
郁卫东副研究员
喻荣彬教授
张青云研究员
张学教授
赵平副教授
周南进研究员
周士胜教授
周素芳教授
周晓东研究员
周晓武副主任医师
朱进霞教授

消化病理学

杜祥教授
李菊玲副教授
李淳副教授
李晟磊副主任医师
刘丽江教授
刘勇钢副主任医师
吕宁主任医师
马大烈教授
门秀丽教授
潘兴华副主任医师
孙伟副研究员
王鲁平主任医师
王娅兰教授
颜宏利副教授
于颖彦教授
余宏宇教授
张锦生教授
赵春玲副教授
赵景民教授
朱亮副教授

世界华人消化杂志

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

● 目 次 ● 2011年8月28日 第19卷 第24期 (总第356期)

述 评

2515 盆腔器官脱垂的动态MRI研究进展

崔国策, 李华山, 王晓锋

基 础 研 究

2521 靶向SET的shRNA真核表达质粒的构建及鉴定

师海蓉, 付政祺, 邓昊, 王绪明, 镇鸿燕, 陈莹, 刘丽江

2527 ω -3多不饱和脂肪酸对大鼠肝切除术后肝脏紧密连接及肝再生的影响

严笑鹏, 王升, 杨跃, 仇毓东

2534 实验性Beagle犬肥胖症并2型糖尿病模型的建立

付峻林, 朱惠明, 郑丽

文 献 综 述

2540 整合素在胃癌侵袭转移及靶向药物治疗中的研究进展

罗登, 郑梦瑶, 黄华

2546 间充质干细胞联合胰岛细胞治疗1型糖尿病研究进展

朱从元, 李建平

2551 五羟色胺与慢性便秘

张卫平, 江滨

2555 肿瘤抗淋巴管生成研究进展

吴而回, 燕敏

研 究 快 报

2562 Trop-2表达下调对食管鳞癌EC9706细胞增殖和细胞迁移的影响

李慎柯, 范天黎, 寇洁, 崔瑶

2567 血必净对大鼠重症急性胰腺炎的治疗作用

耿小峰, 脱红芳, 彭彦辉, 赵宝川

临 床 经 验

2572 HLA等免疫相关基因及MTHFR在新疆哈萨克族食管癌中的筛检效果评价

蔡金凤, 秦江梅, 廖佩花, 曾同霞, 刘翔, 李锋

2577 替比夫定对eAg+慢性乙型肝炎患者外周血树突状细胞及淋巴细胞亚群的影响

朱斌, 张平, 禹萌, 王天宝, 毛乾国

2583 内镜超声引导下经胃穿刺置管引流治疗胰腺假性囊肿36例

戴其利, 秦鸣放, 王震宇, 王庆, 勾承月, 李宁, 赵宏志, 郑明伟

2587 益生菌制剂治疗轻微型肝性脑病的荟萃分析

汤绍辉, 王旷靖, 吴小娟, 张嫚嫚

2593 内镜下切除结直肠高危腺瘤随访166例

张慧, 曹海龙, 王邦茂

2597 TNF- α 在结直肠癌患者血清中的水平及与瘦素及胰岛素抵抗的关系

沈名扬, 陈春生, 丛进春, 王俊江

附 录	<p>2602 《世界华人消化杂志》投稿须知</p> <p>2607 2011年国内国际会议预告</p>
志 谢	<p>2608 志谢世界华人消化杂志编委</p>
消 息	<p>2526 《世界华人消化杂志》外文字符标准</p> <p>2533 中国科技信息研究所发布《世界华人消化杂志》影响因子0.625</p> <p>2539 <i>WJG</i>成功通过评审被PMC收录</p> <p>2550 《世界华人消化杂志》入选《中国学术期刊评价研究报告-RCCSE权威、核心期刊排行榜与指南》</p> <p>2561 招聘生物医学编辑部主任</p> <p>2571 《世界华人消化杂志》正文要求</p> <p>2576 《世界华人消化杂志》性质、刊登内容及目标</p> <p>2582 《世界华人消化杂志》入选北京大学图书馆2008年版《中文核心期刊要目总览》</p> <p>2586 《世界华人消化杂志》参考文献要求</p> <p>2592 <i>WJG</i>总被引频次排名位于第174名</p> <p>2601 《世界华人消化杂志》2011年开始不再收取审稿费</p>
封面故事	<p>耿小峰, 脱红芳, 彭彦辉, 赵宝川. 血必净对大鼠重症急性胰腺炎的治疗作用.</p> <p>世界华人消化杂志 2011; 19(24): 2567-2571</p> <p>http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/2567.asp</p>
本期责任人	<p>编务 周媛; 送审编辑 李军亮; 组版编辑 何基才; 英文编辑 王天奇; 责任编辑 李军亮; 审核编辑 李军亮;</p> <p>形式规范 马连生</p>

<p>世界华人消化杂志</p> <p>Shijie Huaren Xiaohua Zazhi</p> <p>吴阶平 题写封面刊名 陈可冀 题写版权刊名</p> <p>(旬刊)</p> <p>创 刊 1993-01-15 改 刊 1998-01-25 出 版 2011-08-28 原刊名 新消化病学杂志</p> <p>名誉总编辑 潘伯荣 总 编 辑 马连生 编辑部主任 李军亮</p> <p>期 刊 名 称 世界华人消化杂志 主 管 单 位 山西省科学技术厅 主 办 单 位 太原消化病研治中心</p>	<p>编辑 世界华人消化杂志编辑委员会 030001, 山西省太原市双塔西街77号 电话: 0351-4078656 E-mail: wcjd@wjgnet.com http://www.wjgnet.com</p> <p>出版 世界华人消化杂志编辑部 030001, 山西省太原市双塔西街77号 电话: 0351-4078656 E-mail: wcjd@wjgnet.com http://www.wjgnet.com</p> <p>印刷 北京科信印刷厂</p> <p>发行 国内: 北京报刊发行局 国外: 中国国际图书贸易总公司 (100044, 北京市399信箱)</p> <p>订购 全国各地邮电局</p> <p>邮购 世界华人消化杂志编辑部 030001, 山西省太原市双塔西街77号 电话: 0351-4078656 E-mail: wcjd@wjgnet.com http://www.wjgnet.com</p>	<p>世界华人消化杂志是一份同行评议性的旬刊, 是一份被《中国科技论文统计源期刊》和《中文核心期刊要目总览》收录的学术类期刊.《世界华人消化杂志》的英文摘要被美国《化学文摘》, 荷兰《医学文摘库/医学文摘》和俄罗斯《文摘杂志》收录.</p> <p>世界华人消化杂志正式开通了在线办公系统(http://www.baishideng.com/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.</p> <p>特别声明 本刊刊出的所有文章不代表本刊编辑部和本刊编委会的观点, 除非特别声明. 本刊如有印装质量问题, 请向本刊编辑部调换.</p> <p>2011年版权归世界华人消化杂志所有</p>
<p>中国标准连续出版物号 ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) 邮发代号 国外代号 国内定价 广告经营许可证 CN 14-1260/R 82-262 M 4481 每期56.00元 全年2016.00元 1401004000050</p> <p>www.wjgnet.com</p>		

World Chinese Journal of Digestology

August 2011 Contents in Brief Volume 19 Number 24

EDITORIAL	2515 Dynamic magnetic resonance imaging of pelvic organ prolapse: recent research progress <i>Cui GC, Li HS, Wang XF</i>
BASIC RESEARCH	2521 Construction of eukaryotic vectors expressing shRNAs targeting the set gene <i>Shi HR, Fu ZQ, Deng H, Wang XM, Zhen HY, Chen Y, Liu LJ</i> 2527 Effect of ω -3 polyunsaturated fatty acids on hepatic tight junctions and liver regeneration in rats after partial hepatectomy <i>Yan XP, Wang S, Yang Y, Qiu YD</i> 2534 Establishment of a Beagle dog model of obesity and type 2 diabetes <i>Fu SL, Zhu HM, Zheng L</i>
REVIEW	2540 Role of integrins in invasion and metastasis of gastric cancer: potential therapeutic implications <i>Luo D, Zheng MY, Huang H</i> 2546 Cotransplantation of mesenchymal stem cells and islet in the treatment of type 1 diabetes mellitus: recent progress <i>Zhu CY, Li JP</i> 2551 Role of serotonin in the pathogenesis of chronic constipation <i>Zhang WP, Jiang B</i> 2555 Lymphangiogenesis in cancers: a therapy target <i>Wu EH, Yan M</i>
RAPID COMMUNICATION	2562 Down-regulation of Trop-2 expression inhibits cell proliferation and migration in human esophageal squamous cell carcinoma cell line EC9706 <i>Li SK, Fan TL, Kou J, Cui Y</i> 2567 Therapeutic effect of Xuebijing on experimental severe acute pancreatitis in rats <i>Geng XF, Tuo HF, Peng YH, Zhao BC</i>
CLINICAL PRACTICE	2572 Value of detection of HLA, other immune-related genes and MTHFR in the screening of esophageal cancer in Xinjiang Kazakh population <i>Cai JF, Qin JM, Liao PH, Zeng TX, Liu X, Li F</i> 2577 Association of HBeAg negative conversion with the effect of telbivudine on peripheral blood dendritic cells and lymphocyte subsets in patients with HBeAg-positive chronic hepatitis B <i>Zhu B, Zhang P, Yu M, Wang TB, Mao QG</i> 2583 Endoscopic ultrasound-guided transgastric drainage of pancreatic pseudocysts: an analysis of 36 cases <i>Dai QL, Qin MF, Wang ZY, Wang Q, Gou CY, Li N, Zhao HZ, Zheng MW</i> 2587 Efficacy of probiotics in the treatment of minimal hepatic encephalopathy: a meta-analysis <i>Tang SH, Wang KJ, Wu XJ, Zhang MM</i> 2593 A follow-up study of 166 cases of advanced colorectal adenomas after polypectomy <i>Zhang H, Cao HL, Wang BM</i> 2597 Correlation of serum TNF- α with serum leptin and insulin resistance in patients with colorectal cancer <i>Shen MY, Chen CS, Cong JC, Wang JJ</i>

APPENDIX	2602 Instructions to authors of World Chinese Journal of Digestology 2607 Meeting events calendar in 2011
ACKNOWLEDGMENT	2608 Acknowledgments to reviewers of World Chinese Journal of Digestology
COVER	<i>Geng XF, Tuo HF, Peng YH, Zhao BC.</i> Therapeutic effect of Xuebijing on experimental severe acute pancreatitis in rats. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2011; 19(24): 2567-2571 http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/2567.asp
RESPONSIBLE EDITORS FOR THIS ISSUE	Assistant Editor: <i>Yuan Zhou</i> Review Editor: <i>Jun-Liang Li</i> Electronic Page Editor: <i>Ji-Cai He</i> English Language Editor: <i>Tian-Qi Wang</i> Editor-in-Charge: <i>Jun-Liang Li</i> Proof Editor: <i>Jun-Liang Li</i> Layout Editor: <i>Lian-Sheng Ma</i>

Indexed/Abstracted by Chemical Abstracts, EMBASE/ Excerpta Medica and Abstract Journals

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

Founded on January 15, 1993
Renamed on January 25, 1998
Publication date August 28, 2011

NAME OF JOURNAL

World Chinese Journal of Digestology

RESPONSIBLE INSTITUTION

Department of Science and Technology
of Shanxi Province

SPONSOR

Taiyuan Research and Treatment Center
for Digestive Diseases, 77 Shuangta Xijie,
Taiyuan 030001, Shanxi Province, China

EDITING

Editorial Board of *World Chinese Journal of Digestology*, 77 Shuangta Xijie, Taiyuan 030001, Shanxi Province, China
Telephone: +86-351-4078656
E-mail: wjcd@wjgnet.com

PRINTING

Beijing Kexin Printing House

PUBLISHING

Editorial Department of *World Chinese Journal of Digestology*, 77 Shuangta Xijie, Taiyuan 030001, Shanxi Province, China
Telephone: +86-351-4078656
E-mail: wjcd@wjgnet.com
<http://www.wjgnet.com>

OVERSEAS DISTRIBUTOR

Beijing Bureau for Distribution of Newspapers and Journals (Code No. 82-261)
China International Book Trading Corporation PO Box 399, Beijing, China (Code No. M4481)

HONORARY EDITOR-IN-CHIEF

Bo-Rong Pan

EDITOR-IN-CHIEF

Lian-Sheng Ma

SCIENCE EDITORS

Director: Jun-Liang Li

SUBSCRIPTION

RMB 56 Yuan for each issue
RMB 2016 Yuan for one year

CSSN

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

COPYRIGHT

© 2011 Published by *WCJD*. All rights reserved; no part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise without the prior permission of *WCJD*. Authors are required to grant *WCJD* an exclusive licence to publish.

SPECIAL STATEMENT

All articles published in this journal represent the viewpoints of the authors except where indicated otherwise.

INSTRUCTIONS TO AUTHORS

Full instructions are available online at www.wjgnet.com/1009-3079/tgxz.asp. If you do not have web access please contact the editorial office.

Copyright © 2011 by Editorial Department of *World Chinese Journal of Digestology*

盆腔器官脱垂的动态MRI研究进展

崔国策, 李华山, 王晓锋

崔国策, 李华山, 王晓锋, 中国中医科学院广安门医院肛肠科 北京市 100053

李华山, 主任医师, 主要从事肛肠疾病的防治与研究工作.

国家自然科学基金资助项目, No. 30973757

作者贡献分布: 本文选题设计及审校由李华山完成; 文献资料搜集由崔国策与王晓锋共同完成; 写作由崔国策与李华山共同完成.

通讯作者: 李华山, 主任医师, 100053, 北京市宣武区北线阁5号, 中国中医科学院广安门医院肛肠科. lihuashan@263.net

电话: 010-88001025 传真: 010-63014195

收稿日期: 2011-06-23 修回日期: 2011-08-08

接受日期: 2011-08-12 在线出版日期: 2011-08-28

Dynamic magnetic resonance imaging of pelvic organ prolapse: recent research progress

Guo-Ce Cui, Hua-Shan Li, Xiao-Feng Wang

Guo-Ce Cui, Hua-Shan Li, Xiao-Feng Wang, Department of Proctology, Guang'anmen Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100053, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30973757

Correspondence to: Hua-Shan Li, Department of Proctology, Guang'anmen Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, 5 Beixiang, Xuanwu District, Beijing 100053, China. lihuashan@263.net

Received: 2011-06-23 Revised: 2011-08-08

Accepted: 2011-08-12 Published online: 2011-08-28

Abstract

Pelvic organ prolapse (POP) refers to herniation of pelvic organs caused by the weak pelvic floor support structures. Magnetic resonance imaging (MRI) is a non-radioactive, non-invasive, fast, comprehensive, high-resolution imaging technique that has strong soft tissue contrast and can clearly show the changes of muscles and fascia structures of pelvic floor to the resting and dynamic position. It can help understand the state of pelvic organizations and provide objective imaging data for the clinical diagnosis. Dynamic MRI is commonly used for the diagnosis of bladder prolapse and swelling, uterine and vaginal prolapse, rectal prolapse and enterocele. Currently, there are no unified diagnostic criteria for POP in China. Although the US HMO system is frequently used for assessing the degree of POP, it needs to be further explored whether this sys-

tem is fit for the Chinese population. In short, dynamic MRI permits a comprehensive evaluation of pelvic organ prolapse. It is an important way to study the living anatomy, shape and movement of pelvic floor. In addition to clinical evaluations, dynamic MRI (especially dynamic MRI defecography) plays a role in guiding the interdisciplinary treatment of pelvic floor dysfunction.

Key Words: Dynamic MRI; Pelvic organ prolapse; Rectal prolapse

Cui GC, Li HS, Wang XF. Dynamic magnetic resonance imaging of pelvic organ prolapse: recent research progress. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(24): 2515-2520

摘要

盆腔器官脱垂(pelvic organ prolapse, POP)是指由于盆底支持结构薄弱导致的盆腔器官脱出. 动态MRI为无放射性、无创、快捷、全面、高分辨率的检查方法, 其软组织对比性强, 可清晰显示静息位及动态位时盆底肌肉和筋膜组织结构及功能上的变化, 了解盆腔多组织器官的状况, 为临床提供客观影像学数据. 动态MRI常用于膀胱脱垂与膨出、子宫和阴道脱垂、直肠脱垂及肠疝的诊断, 有多种检查技术和方法. 目前国内还没有统一的POP诊断的影像标准, 其诊断多参照美国UCLA的标准, 采取HMO分度系统, 但是否适合于我国人种, 尚需进一步探讨. 总之, 动态MRI可综合评价盆腔器官脱垂, 是研究活体盆底解剖、形态和运动的重要方法; 特别是动态MRI结合排粪造影术, 除了临床评价外, 对指导盆底功能障碍性疾病的跨学科治疗也具有一定作用.

关键词: 动态MRI; 盆腔器官脱垂; 直肠脱垂

崔国策, 李华山, 王晓锋. 盆腔器官脱垂的动态MRI研究进展. *世界华人消化杂志* 2011; 19(24): 2515-2520

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/2515.asp>

0 引言

盆腔器官脱垂(pelvic organ prolapse, POP)是指

■背景资料

随着社会发展及平均寿命延长, 盆腔器官脱垂逐渐成为影响人们生活质量的疾病, 广泛引起社会及医学领域的重视, 所以有关盆腔器官脱垂的检查与治疗是目前国内外外科学研究的热点.

■同行评议者

刘宝林, 教授, 中国医科大学附属盛京医院普通外科; 许剑民, 教授, 上海市复旦大学附属中山医院普外科; 王正康, 教授, 北京中日友好医院普外科

■ 研发前沿

目前, 动态MRI已成为盆腔器官脱垂患者的主要影像学检查方法之一, 而我国还没有统一的POP诊断影像标准, 国外的相关评价体系是否适合于我国, 以及提出符合我国种族情况的影像学诊断标准将是今后研究的重要方向。

由于盆底支持结构薄弱导致的盆腔器官疝出。Yang等^[1]与廖伟^[2]将盆底分为3个腔室: 前盆腔, 包括膀胱、尿道; 中盆腔, 包括阴道、宫颈、子宫; 后盆腔, 包括直肠。相应病变划分为盆腔前部、中部及后部器官脱垂。3个腔室都由盆底或尿生殖隔的肌肉筋膜支持, 一个以上肌肉筋膜单元损害就可导致单个或多个器官脱垂^[3]。随着现代学科分支越来越细, 泌尿科、肛肠科及妇科医师常将研究的重点放在本学科领域, 难以顾及相关学科的疾病及其相互影响, 诊断上如果没有检出所有盆底病变, 将导致治疗不彻底, 患者症状往往并不能得到全面的改善, 疗效也不能令人满意。因整个盆底是一个复杂而互相联系的系统整体, 一个部位或器官的机能失调常慢慢地以连锁且互相促进的方式引发多个部位或器官的功能障碍^[4,5], 所以为了全面了解盆部病变, 以对比度及分辨率良好且可取得任意断层图像的动态核磁共振影像学(magnetic resonance imaging, MRI)为主要影像学检查方法日益收到人们重视^[6-8], 现就动态MRI在POP患者影像学检查中的应用进展综述如下。

1 MRI技术用于POP的优势

以前POP的诊断和分期主要依靠病史、体格检查及放射影像。辅助性的检查方法包括B超、排粪造影、单一的盆腔器官造影术或某两种技术的联合如动态膀胱直肠造影术(dynamic cystoproctography)、排粪腹膜腔造影术(defecoperitoneocography)及排粪造影结合小肠或乙状结肠造影术、同步联合盆腔器官造影术^[9](同步联合膀胱尿道、盆腔、阴道及排粪造影术)和MRI检查。盆腔B超在诊断膀胱颈下移而引起的尿失禁方面具有优势, 但对盆腔深部组织的分辨率不足, 不能对阴道穹窿脱垂、直肠黏膜脱垂、直肠套叠等进行诊断。单一造影检查可提供功能性诊断, 但均为侵入性检查, 每一项检查只能反映一个盆腔脏器的脱垂情况, 均不能全面评价盆底功能失调, 而同步联合盆腔器官造影术可达到全面评价盆底功能失调的目的^[9], 但存在操作复杂, 需要较长的检查时间, 涉及放射线辐射以及不能显示软组织影像, 具有一定的侵害性和危险性等限制。目前采用静息和最大用力时盆底动态MRI有效地克服了上述检查的不足, MRI在无创、无放射性、全面、快速、组织分辨率高等方面具有明显优势^[10-12], 在动态MRI检查同时,

可以并行常规盆腔MRI检查, 全面了解盆腔情况, 包括有无其他病变, 为术前准备提供更多的信息和帮助。

2 常用的MRI技术

描述POP的文献^[1,13]中有多种MRI技术和方法, 动态MRI要求患者在检查前10 min排空膀胱。主要包括患者静息状态、仅要求患者最大用力而不排泄(Valsalva动作)或排便状态进行MRI检查^[14], 无膀胱、阴道及直肠对比剂进行MRI检查^[15,16]; 膀胱内注入等渗盐水、直肠阴道内注入超声用凝胶的MRI检查^[17]; 或仅使用了直肠对比剂的盆腔MRI扫描^[18]。如果不使用对比剂及排泄相进行成像, 检查时间较短, 在15 min内就可完成检查, 但是未排泄及无对比剂的MRI检查与X线造影相比, 两者的结果在文献报道中差异较大, 可比性欠佳。由于MRI检查所采用的体位通常为仰卧位, 不能达到生理性排泄状态, Berstchinger等^[19]提出开放式排泄相MRI可作为封闭式MRI的替代品。Lienemann等^[20]采用了阴道、膀胱和直肠全部充盈对比剂的最大用力单期相MRI扫描, 发现MRI的敏感性和特异性均优于X线检查。由于X线检查在排泄相中盆底肌得到最大程度的松弛, 脱垂器官得以充分显露, 而用力不排泄的MRI检查无法保证患者用力的程度, 因此, 作者认为动态MRI检查应尽量使用对比剂和排泄相扫描, 更接近人体生理状态。使用的快速扫描序列主要为^[21]: 单次激发快速自旋回波序列(single shot fast spin echo; SSFSE, GE公司)和半傅里叶采集turbo自旋回波(half fourier acquisition turbo spin echo; HASTE, Siemens)。采集层面为横断面、矢状面和冠状面。完成基础参数设置盆腔扫描后, 确立耻骨联合下缘到骶尾骨间关节的连线为中位线, 指导患者完成Valsalva动作, 同时在正中矢状面快速完成半傅立叶T2加权成像序列扫描, 此后在Valsalva动作下依次完成冠状面和横断面影像扫描。可反复进行静息及动态MRI检查2-3次, 以获得最佳的核磁共振影像^[10]。MRI检查前向患者告知需要配合动作的口令, 并进行检查前的训练。患者应穿着较为宽松的裤子, 去除内衣、尿垫和子宫托进行检查, 以反映盆腔器官脱垂的严重程度。检查前应充分与患者交流, 让其明白检查的方法, 不宜做Valsalva动作的患者(如冠心病患者)可让患者依照平时排便的感觉来增加腹部压力, 以替代Valsalva运动。检查时采取仰卧位, 屈膝并尽可能外翻, 尽量模拟膀胱截石位。

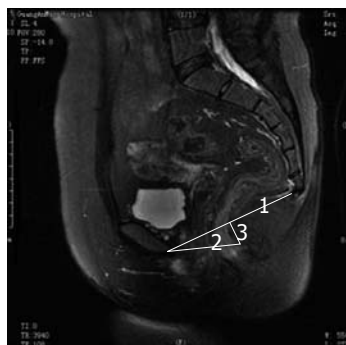


图1 女, 盆底动态MRI矢状位T2加权像显示正常盆底表现。1: PCL线; 2: H线; 3: M线。

3 动态MRI诊断及测量方法

盆腔器官脱垂的动态MRI诊断标准参照美国UCLA的标准^[10]。1991年Yang等^[11]和Kruyt等^[22]首先报道了运用动态MRI阐述膀胱、阴道和直肠的移动与耻尾线、耻骨联合和骶骨的相对关系。此后, 运用不同的动态MRI方法研究POP的文献越来越多, 由于采用不同的解剖学参考位置和参考平面^[23,24], 针对POP的动态MRI的分度测量方法也各具特色。为使POP患者的MRI检查结果获得统一的诠释和建立POP患者的MRI分度标准, Pannu等^[25]提出了HMO分度系统, 即在最大Valsalva动作时采用快速半傅立叶T2加权成像序列扫描的正中矢状面上测量H线、M线和脱垂器官最远端距离H线的距离, 统一了动态MRI对盆腔器官脱垂的诊断标准。测量方法见图1。在正中矢状切面图像中划线测量: PCL线(pubococcygeal line, PCL)是耻骨联合下缘到末端尾椎1-2间隙的连线, 由于尾骨可以随肛提肌运动发生位置改变, 可将PCL改为耻骨联合下缘到骶尾骨间关节的连线^[15]; H线是耻骨联合下缘到直肠后壁耻骨直肠肌附着点的连线; M线是直肠后壁耻骨直肠肌附着点到PCL线的垂线^[26]。HMO系统中的“O”特指在Valsalva动作时膨出器官最远端至“H”线的最短距离, 特指下降的器官。盆腔器官最远端低于H线水平即诊断为“盆腔器官脱垂”。分度标准: 0度(无脱垂), H线以上; 1度(轻度脱垂), 低于H线0-2 cm; 2度(中度脱垂), 2-4 cm; 3度(重度脱垂), 低于H线超过4 cm; 4度为盆腔器官完全脱出H线以下。HMO系统明确了盆腔器官脱垂的概念, 为评价盆腔器官脱垂提供了影像学方面的客观量化依据。而盆腔器官脱垂的临床诊断常用ICS(International Continence Society)推荐的POP-Q(pelvic organ prolapse quantification)标准^[45]对盆腔脏器脱垂及其程度进行诊断, 此分期系统是分别利用阴道前壁的

最远端、宫颈/阴道顶端和阴道后壁的最远端与处女膜平面的距离作为测量值以诊断脱垂程度。随着临床应用的发展, 目前国内还没有我们自己的被统一的POP诊断的影像标准, 但是盆腔器官最远端低于PCL-耻骨联合下缘到尾骨尖的连线是被广泛认可的诊断标准。上尿道、尿道膀胱结合部、膀胱、上部阴道、子宫、小肠、乙状结肠、肠系膜脂肪、直肠都应在PCL线上方。广泛认可的分度标准: 轻度, 低于PCL 0-2 cm, 中度, 2-4 cm, 重度超过4 cm。有研究显示不同人种之间POP的发生率有所不同, 所以国外的相关评价体系是否适合于我国, 尚需要进一步探讨。

4 盆腔器官脱垂及其MRI表现

4.1 膀胱脱垂及膨出 膀胱脱垂的定义是膀胱的一部分或全部由尿道外口脱出。正常膀胱受三角韧带、侧韧带以及周围组织的固定, 不易脱垂。尿道在内外括约肌的作用下处于关闭状态, 膀胱无法经此脱出, 但是, 如果上述结构及其功能遭受破坏和削弱, 就有发生膀胱脱垂的可能。中文文献关于膀胱脱垂报道较少, 记录颇多的是膀胱膨出。膀胱膨出是指膀胱位置下降并突入到阴道前壁内。轻者无症状, 重症时常感腰酸下坠, 自觉有物自阴道脱出, 排尿后肿物会缩小。常伴有排尿困难及尿不干净的感觉, 上述症状随患者体力劳动或站立时间延长而逐渐加重。膀胱膨出可引起膀胱尿道交界处折叠, 导致排尿困难。排尿延迟可引起反复尿道感染。耻骨宫颈筋膜向前外侧附着于盆筋膜腱弓, 向后附着于子宫颈, 正是该结构缺陷削弱了对膀胱的支持作用造成膀胱膨出。膀胱膨出的临床诊断主要依据盆腔检查结果, 并根据膨出的严重程度分度。MRI影像学检查表现为膀胱后壁弧形下降并向后移动, 引起阴道前壁变形甚至脱出阴道外口。文献中^[1,27,28], 影像学诊断膀胱膨出的标准包括: (1)膀胱下缘位于耻骨联合之下; (2)膀胱下缘位于PCL之下; (3)膀胱下缘位于PCL以下1 cm以上。动态MRI盆底用力成像时, 可显示膀胱底的位置向后下移动进入阴道前壁, 膀胱的一部分位于膀胱尿道接合部的上方, 使患者排尿时难以完全排净。直肠排空后, 膀胱膨出的程度可能会更加突出。膨出的膀胱的轮廓可成圆形, 冠状位膀胱下移成被拉长的改变^[29]。膀胱膨出严重者H线可超过5 cm^[15]。文献研究^[30]阴道前壁的动态MRI发现, 随着膀胱膨出严重程度加重, 阴道前壁的长度随之增加。在耻骨宫颈筋膜中央型

■ 相关报道

高鑫等评价动态MRI的检查技术对盆腔器官脱垂的诊断价值, 结果在46例盆腔动态MRI检查中, 43例MRI诊断与临床诊断一致。结论为动态盆腔MRI可以全面评价盆腔脏器的脱垂情况, 可作为临床有效的盆底功能评价的方法。

■创新盘点

本文所涉及的内容基本涵盖了动态MRI评价盆腔器官脱垂的研究进展,系统研究MRI评价方法与临床传统评价方法的异同及相互关系,对临床实践有一定的指导意义。

缺陷患者的MRI扫描中,可见膀胱集中在中线区域突出于阴道内。

4.2 子宫、宫颈和阴道脱垂 阴道穹隆、子宫颈位置下降称为阴道穹隆脱垂和宫颈脱垂。严重者阴道穹隆可全部外翻,于体外见到一外突的团块,患者可感觉外阴或阴道坠胀感及膨出阴道外的异物感,坐和行走都有困难。久站、劳动时加重,卧床休息则症状减轻。骶子宫韧带悬吊宫颈和阴道上部,通常认为是其损伤造成脱垂^[15,25]。若骶子宫韧带和(或)主韧带撕裂,除阴道和宫颈脱垂外,子宫也可发生脱垂^[31]。常提示为在动态MRI上,阴道穹隆或宫颈位于H线以下诊断为脱垂^[1]。由于盆底共有的支持结构,除子宫、宫颈及阴道脱垂外,常伴有其他器官的脱垂,如尿道和小肠、直肠脱垂。动态MRI上,正常状态下矢状位MRI影像学检查显示阴道上2/3为向后盆腔倾斜的水平轴向。阴道穹隆/宫颈脱垂患者上2/3阴道轴向发生改变,阴道长轴与纵轴线交角消失,阴道成垂直状。增加腹压时,由于阴道部分外翻使其变短, Douglas凹下移、间隙增大,盆腔内可见小肠袢,膨出的直肠和膀胱使阴道变形^[29]。不同于肠疝的是Douglas凹无筋膜缺损或薄弱。盆腔检查行Valsalva动作时,膀胱膨出突入阴道前壁,而阴道后壁由于直肠膨出而出现形状改变。Fauconnier等^[27]认为, MRI横断面检查阴道失去正常的“H”形态提示存在阴道侧壁缺陷。而完全性子宫脱垂检查时,常见子宫肌瘤妨碍了子宫下降,从而掩盖了盆底器官脱垂的真正程度。

4.3 直肠脱垂及膨出 直肠脱垂分为内脱垂和外脱垂,是直肠黏膜、直肠全层或部分乙状结肠向下移位的一种慢性疾病。若肠壁全层脱入到直肠或肛管内为内脱垂或套叠,如直肠肠管(包括直肠黏膜和直肠肌层组织)低于肛管水平则为外脱垂。MRI影像上,直肠位于H线以下诊断为脱垂^[1]。Fuchsjäger等^[32]认为直肠套叠是脱垂发生的机制, MRI上可以看到排便开始时肠壁内折,继续用力则套叠的肠壁进入肛管,通过肛管开口形成完全的脱垂。文献报道^[33]尽管排粪造影是诊断的一线方法,但是必须与MRI动态造影相结合,因为MRI可显示肠黏膜并区分黏膜套叠和全层肠壁套叠,还可术前帮助确定共存的其他器官的病变。直肠膨出通常指直肠的前膨出,又称直肠前突,症状以排便困难为主,肛门可有梗阻感和排空不全感。在动态MRI矢状面上自肛管的前壁画一条延长线,直肠膨出部分的最远点到此线的距离如超过2 cm则为直肠膨出^[22,27],在

直肠前壁膨出严重者冠状面MRI检查中,前盆腔影像显示直肠呈环状围绕在膀胱周围。另外,还有直肠后膨出为直肠的后壁向后膨出,是直肠壁通过缺损的肛提肌板疝出,又称会阴疝。通常冠状面和横断面MRI可见直肠侧壁缺陷,而矢状位MRI可见直肠后壁缺陷。由于直肠膨出也见于少数正常人群,因此诊断一定要结合患者的症状和病史等临床资料。

4.4 肠疝 肠疝是由于盆腔筋膜的缺损,盆腔组织突入附近薄弱的支持组织内,表现为盆腔腹膜于盆腔Douglas凹疝出并低于盆腔Douglas凹平面。肠疝包含的内容物主要为脂肪组织、小肠或乙状结肠。乙状结肠过长进入直肠子宫陷凹形成乙状结肠疝出,影像检查中发生率不及小肠疝出。在造影检查中,乙状结肠常常由于充盈欠佳而被漏掉或者低估了其疝出的程度。诊断肠疝的影像学标准包括: (1)小肠或乙状结肠位于直肠阴道隔; (2)突出肠管低于PCL水平; (3)直肠阴道隔间隙增宽; (4)异常的Douglas凹加深^[27,34]。肠疝多位于阴道后壁直肠阴道隔上方,偶尔出现在阴道前侧壁的直肠阴道隔上方。盆腔检查可发现阴道顶部与阴道后壁交界处组织脱出盆腔^[35]。在动态MRI上,小肠或乙状结肠下降到PCL以下诊断为小肠或乙状结肠疝出。在矢状面影像上,小肠袢突入阴道直肠间隙内超过2 cm提示阴道直肠筋膜撕裂。横断面可以看到小肠和乙状结肠位于阴道直肠间隙内及该间隙增宽。

5 盆底动态MRI评价盆腔器官脱垂的限制

研究显示,动态MRI对于直肠膨出的诊断价值有待深入研究^[36,37]。文献报道^[38]采用动态MRI对盆底脱垂性疾病研究表明,对于直肠膨出的诊断,动态MRI表现与临床症状具有高度的一致性。而Matsuoka等^[39]采用动态MRI与排粪造影术对女性盆底脱垂性疾病的比较研究发现,排粪造影检出的12例直肠膨出中仅1例在动态MRI上得到显示。但是,多数学者认为排粪造影对诊断肛直肠功能性疾病敏感性过高,应慎重考虑其临床意义^[40,41]。研究也证实,排粪造影对正常受试者和盆底脱垂性疾病患者的比较研究发现,正常受试者与疾病患者有部分异常影像学表现重叠的现象^[42-45]。Kelvin等^[42]研究发现,正常健康人群中仅半数直肠可完全排空,健康受试者中,也发现个别人可出现轻度膀胱膨出、肛直肠连接下降等情况。目前, MRI检查所采用的体位为仰卧

位, 不符合人体正常直立状态下同时受地球引力和腹压影响下得到最大程度的松弛、脱垂器官得以充分显露。但研究表明用力排便时对于会阴下降的程度, 仰卧位与坐位无明显差异^[22,46,47], 支持检查体位不影响诊断结果。但随着开放性MRI的应用, 这一影响将不复存在。另外, 动态MRI在观察排泄时盆腔器官和盆底的位置及形态变化时受到一定的限制, 由于未用造影剂使直肠黏膜显影, 有时肠管与病变难以区分, 文献报道^[48]未使用造影剂的MRI检查与X线造影的结果近似, 未使用造影剂的动态MRI没有更高的空间分辨率来显示直肠黏膜, 因此在盆底功能性疾病的诊断中不能显示直肠黏膜的脱垂或套叠^[49]。并且动态MRI检查时间稍长, 摄影时间长所带来的伪影致使图像质量不恒定为其缺点。

6 结论

动态MRI可综合评价盆腔器官脱垂, 是研究活体盆底解剖、形态和运动的重要方法。无创、无放射、快速、多部位动态MRI检查方法是在MRI领域的一次重大变革, 在临床诊断, 特别是术前正确评价盆腔多部位缺陷及手术修补失败时有重要作用。运用于动态MRI中的HMO盆腔器官影像学分度实现了对盆腔多部位器官脱垂的标准化分度, 为评价手术治疗盆腔器官脱垂性疾病的效果提供了客观依据, 同时为深入理解复杂性盆腔器官脱垂提供了研究方法。动态MRI对于评价膀胱膨出、子宫阴道脱垂、直肠脱垂和肠疝与同步联合盆腔器官造影术具有很高的诊断符合率, 其评价盆腔器官脱垂的主要限制能为排粪造影所弥补^[50]。因此, 动态MRI结合排粪造影术应是全面评价盆底器官脱垂的最佳影像学检查模式^[51]。在涉及多个缺陷的复合盆底异常中, 动态MRI结合排粪造影是一种简便的诊断方法, 除了临床评价外, 对盆底功能障碍性疾病的跨学科治疗也具有一定作用。

7 参考文献

- 1 Yang A, Mostwin JL, Rosenshein NB, Zerhouni EA. Pelvic floor descent in women: dynamic evaluation with fast MR imaging and cinematic display. *Radiology* 1991; 179: 25-33
- 2 廖伟. 女性盆腔病变综合影像学评价. 中华医学会第16次全国放射学学术大会论文汇编 2009: 18-24
- 3 Villet R. [Case management of pelvic floor disorders]. *Bull Acad Natl Med* 2005; 189: 1541-1558; discussion 1558-1560
- 4 Shull BL. Pelvic organ prolapse: anterior, superior, and posterior vaginal segment defects. *Am J Obstet*

- 5 Weber AM, Abrams P, Brubaker L, Cundiff G, Davis G, Dmochowski RR, Fischer J, Hull T, Nygaard I, Weidner AC. The standardization of terminology for researchers in female pelvic floor disorders. *Int Urogynecol J Pelvic Floor Dysfunct* 2001; 12: 178-186
- 6 Woodfield CA, Krishnamoorthy S, Hampton BS, Brody JM. Imaging pelvic floor disorders: trend toward comprehensive MRI. *AJR Am J Roentgenol* 2010; 194: 1640-1649
- 7 Law YM, Fielding JR. MRI of pelvic floor dysfunction: review. *AJR Am J Roentgenol* 2008; 191: S45-S53
- 8 Bolog N, Weishaupt D. Dynamic MR imaging of outlet obstruction. *Rom J Gastroenterol* 2005; 14: 293-302
- 9 龚水根, 王毅, 张伟国, 张胜本, 刘宝华, 张连阳. 同步联合盆腔器官造影术对女性盆底功能性疾病的研究. 第三军医大学学报 2004; 26: 151-154
- 10 Boyadzhyan L, Raman SS, Raz S. Role of static and dynamic MR imaging in surgical pelvic floor dysfunction. *Radiographics* 2008; 28: 949-967
- 11 Martin DR, Salman K, Wilmot CC, Galloway NT. MR imaging evaluation of the pelvic floor for the assessment of vaginal prolapse and urinary incontinence. *Magn Reson Imaging Clin N Am* 2006; 14: 523-535, vi
- 12 Macura KJ. Magnetic resonance imaging of pelvic floor defects in women. *Top Magn Reson Imaging* 2006; 17: 417-426
- 13 Colaiacono MC, Masselli G, Poletti E, Lanciotti S, Casciani E, Bertini L, Gualdi G. Dynamic MR imaging of the pelvic floor: a pictorial review. *Radiographics* 2009; 29: e35
- 14 Taylor SA. Imaging pelvic floor dysfunction. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2009; 23: 487-503
- 15 Fielding JR. Practical MR imaging of female pelvic floor weakness. *Radiographics* 2002; 22: 295-304
- 16 Rouanet JP, Filhastre M, Mazet N, Viala-Trentini M, Mayer J, Maubon A. [MRI in static and dynamic disfunction of the female floor]. *J Radiol* 2008; 89: 162-171
- 17 Morren GL, Balasingam AG, Wells JE, Hunter AM, Coates RH, Perry RE. Triphasic MRI of pelvic organ descent: sources of measurement error. *Eur J Radiol* 2005; 54: 276-283
- 18 Vanbeckevoort D, Van Hoe L, Oyen R, Ponette E, De Ridder D, Deprest J. Pelvic floor descent in females: comparative study of colpocystodefecography and dynamic fast MR imaging. *J Magn Reson Imaging* 1999; 9: 373-377
- 19 Bertschinger KM, Hetzer FH, Roos JE, Treiber K, Marincek B, Hilfiker PR. Dynamic MR imaging of the pelvic floor performed with patient sitting in an open-magnet unit versus with patient supine in a closed-magnet unit. *Radiology* 2002; 223: 501-508
- 20 Lienemann A, Anthuber C, Baron A, Kohz P, Reiser M. Dynamic MR colpocystorectography assessing pelvic-floor descent. *Eur Radiol* 1997; 7: 1309-1317
- 21 姜滨, 祁吉. 盆底薄弱及盆腔器官脱垂的MRI检查. 国外医学·临床放射学分册 2005; 28: 88-92
- 22 Kruyt RH, Delemarre JB, Doornbos J, Vogel HJ. Normal anorectum: dynamic MR imaging anatomy. *Radiology* 1991; 179: 159-163
- 23 Broekhuis SR, Kluivers KB, Hendriks JC, Vierhout ME, Barentsz JO, Fütterer JJ. Dynamic magnetic resonance imaging: reliability of anatomical landmarks and reference lines used to assess pelvic or-

■应用要点

盆腔器官脱垂诊断主要依据临床检查结果, POP不正确或不完整的诊断常导致治疗不充分或不合理。影像学在这方面具有不可替代的作用, 以往主要采用传统的X线造影检查, 随着MRI技术的飞速发展, 克服了传统检查方法的不足, 在评价盆底的组织结构及其病变中显现出优势。

■同行评价

本综述立题具有一定新颖性与实用性, 提供了比较全面的信息, 对目前临床上的诊断方法的采用有指导性意义。

- gan prolapse. *Int Urogynecol J Pelvic Floor Dysfunct* 2009; 20: 141-148
- 24 Broekhuis SR, Fütterer JJ, Barentsz JO, Vierhout ME, Kluivers KB. A systematic review of clinical studies on dynamic magnetic resonance imaging of pelvic organ prolapse: the use of reference lines and anatomical landmarks. *Int Urogynecol J Pelvic Floor Dysfunct* 2009; 20: 721-729
- 25 Pannu HK, Kaufman HS, Cundiff GW, Genadry R, Bluemke DA, Fishman EK. Dynamic MR imaging of pelvic organ prolapse: spectrum of abnormalities. *Radiographics* 2000; 20: 1567-1582
- 26 高鑫, 王文艳, 有慧, 刘冬, 朱兰, 冯逢. 动态MRI评价女性盆腔器官脱垂的初步研究. *磁共振成像* 2010; 1: 204-207
- 27 Fauconnier A, Zareski E, Abichedid J, Bader G, Falissard B, Fritel X. Dynamic magnetic resonance imaging for grading pelvic organ prolapse according to the International Continence Society classification: which line should be used? *Neurourol Urodyn* 2008; 27: 191-197
- 28 Kelvin FM, Hale DS, Maglinte DD, Patten BJ, Benson JT. Female pelvic organ prolapse: diagnostic contribution of dynamic cystoproctography and comparison with physical examination. *AJR Am J Roentgenol* 1999; 173: 31-37
- 29 Pannu HK. Dynamic MR imaging of female organ prolapse. *Radiol Clin North Am* 2003; 41: 409-423
- 30 Hsu Y, Chen L, Summers A, Ashton-Miller JA, DeLancey JO. Anterior vaginal wall length and degree of anterior compartment prolapse seen on dynamic MRI. *Int Urogynecol J Pelvic Floor Dysfunct* 2008; 19: 137-142
- 31 Fielding JR. MR imaging of pelvic floor relaxation. *Radiol Clin North Am* 2003; 41: 747-756
- 32 Fuchsjäger MH, Maier AG. Imaging fecal incontinence. *Eur J Radiol* 2003; 47: 108-116
- 33 Dvorkin LS, Hetzer F, Scott SM, Williams NS, Gedroyc W, Lunniss PJ. Open-magnet MR defaecography compared with evacuation proctography in the diagnosis and management of patients with rectal intussusception. *Colorectal Dis* 2004; 6: 45-53
- 34 Comiter CV, Vasavada SP, Barbaric ZL, Gousse AE, Raz S. Grading pelvic prolapse and pelvic floor relaxation using dynamic magnetic resonance imaging. *Urology* 1999; 54: 454-457
- 35 王文艳, 朱兰. 动态MRI用于盆底功能障碍性疾病的研究进展. *现代妇产科进展* 2010; 19: 628-629
- 36 王毅, 龚水根, 张伟国, 陈金华, 鲁宏, 谭勇. 正常女性盆底解剖、形态的动态MRI研究. *中国医学影像技术* 2003; 19: 1711-1714
- 37 王毅, 龚水根, 张伟国, 陈金华, 陈留斌, 谭勇. 盆底功能性疾病的动态MRI研究. *临床放射学杂志* 2004; 23: 401-404
- 38 Rentsch M, Paetzel C, Lenhart M, Feuerbach S, Jauch KW, Fürst A. Dynamic magnetic resonance imaging defecography: a diagnostic alternative in the assessment of pelvic floor disorders in proctology. *Dis Colon Rectum* 2001; 44: 999-1007
- 39 Matsuoka H, Wexner SD, Desai MB, Nakamura T, Nogueras JJ, Weiss EG, Adami C, Billotti VL. A comparison between dynamic pelvic magnetic resonance imaging and videoproctography in patients with constipation. *Dis Colon Rectum* 2001; 44: 571-576
- 40 Felt-Bersma RJ, Luth WJ, Janssen JJ, Meuwissen SG. Defecography in patients with anorectal disorders. Which findings are clinically relevant? *Dis Colon Rectum* 1990; 33: 277-284
- 41 Yoshioka K, Matsui Y, Yamada O, Sakaguchi M, Takada H, Hioki K, Yamamoto M, Kitada M, Sawaragi I. Physiologic and anatomic assessment of patients with rectocele. *Dis Colon Rectum* 1991; 34: 704-708
- 42 Kelvin FM, Maglinte DD, Benson JT. Evacuation proctography (defecography): an aid to the investigation of pelvic floor disorders. *Obstet Gynecol* 1994; 83: 307-314
- 43 Shorvon PJ, McHugh S, Diamant NE, Somers S, Stevenson GW. Defecography in normal volunteers: results and implications. *Gut* 1989; 30: 1737-1749
- 44 Pinho M, Yoshioka K, Keighley MR. Are pelvic floor movements abnormal in disordered defecation? *Dis Colon Rectum* 1991; 34: 1117-1119
- 45 Bump RC, Mattiasson A, Bø K, Brubaker LP, DeLancey JO, Klarskov P, Shull BL, Smith AR. The standardization of terminology of female pelvic organ prolapse and pelvic floor dysfunction. *Am J Obstet Gynecol* 1996; 175: 10-17
- 46 Stoker J, Halligan S, Bartram CI. Pelvic floor imaging. *Radiology* 2001; 218: 621-641
- 47 Healy JC, Halligan S, Reznick RH, Watson S, Bartram CI, Phillips R, Armstrong P. Dynamic MR imaging compared with evacuation proctography when evaluating anorectal configuration and pelvic floor movement. *AJR Am J Roentgenol* 1997; 169: 775-779
- 48 Gufler H, Laubenberg J, DeGregorio G, Dohnicht S, Langer M. Pelvic floor descent: dynamic MR imaging using a half-Fourier RARE sequence. *J Magn Reson Imaging* 1999; 9: 378-383
- 49 王毅, 龚水根, 张伟国, 陈金华, 刘宝华, 张连阳. 女性正常盆底与盆底脱垂性疾病的MRI初步研究. *第三军医大学学报* 2004; 26: 1055-1057
- 50 王毅, 龚水根, 张伟国, 刘宝华, 张连阳. 动态磁共振成像与盆腔器官造影术诊断女性盆底功能失调的对比研究. *中华胃肠外科杂志* 2005; 8: 206-209
- 51 Seynaeve R, Billiet I, Vossaert P, Verleyen P, Steegmans A. MR imaging of the pelvic floor. *JBR-BTR* 2006; 89: 182-189

编辑 曹丽鸥 电编 何基才

靶向SET的shRNA真核表达质粒的构建及鉴定

师海蓉, 付政祺, 邓昊, 王绪明, 镇鸿燕, 陈莹, 刘丽江

师海蓉, 付政祺, 镇鸿燕, 陈莹, 江汉大学医学院病理学与病理生理学教研室 湖北省武汉市 430056

师海蓉, 邓昊, 刘丽江, 江大病理诊断所 湖北省武汉市 430056

王绪明, 武汉大学基础医学院 湖北省武汉市 430071

师海蓉, 讲师, 主要从事胃肠道肿瘤病理学与病理生理学的研究。

国家自然科学基金资助项目, No. 30870981; No. 81001082; No. 81000884

作者贡献分布: 此课题由师海蓉与刘丽江设计; 研究过程由师海蓉、付政祺、邓昊、王绪明及镇鸿燕等完成; 数据分析由师海蓉与陈莹完成; 本论文写作由师海蓉完成。

通讯作者: 刘丽江, 教授, 430056, 湖北省武汉市沌口经济技术开发区三角湖路8号, 江大病理诊断所. liulijiang@163.com

电话: 027-82411803 传真: 027-84226503

收稿日期: 2011-06-07 修回日期: 2011-08-12

接受日期: 2011-08-23 在线出版日期: 2011-08-28

Construction of eukaryotic vectors expressing shRNAs targeting the set gene

Hai-Rong Shi, Zheng-Qi Fu, Hao Deng, Xu-Ming Wang, Hong-Yan Zhen, Ying Chen, Li-Jiang Liu

Hai-Rong Shi, Zheng-Qi Fu, Hong-yan Zhen, Ying Chen, Department of Pathology and Pathophysiology, School of Medicine, Jiangnan University, Wuhan 430056, Hubei Province, China

Hai-Rong Shi, Hao Deng, Li-Jiang Liu, JiangDa Pathology Institute, Jiangnan University, Wuhan 430056, Hubei Province, China

Xu-Ming Wang, Department of Pathology, Basic Medical College of Wuhan University, Wuhan 430071, Hubei Province, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, Nos. 30870981, 81001082 and 81000884

Correspondence to: Professor Li-Jiang Liu, JiangDa Pathology Institute, Jiangnan University, 8 Sanjiaohu Road, Wuhan 430056, Hubei Province, China. liulijiang@163.com

Received: 2011-06-07 Revised: 2011-08-12

Accepted: 2011-08-23 Published online: 2011-08-28

Abstract

AIM: To construct eukaryotic vectors expressing short hairpin RNAs (shRNAs) targeting the set gene which encodes an endogenous inhibitor of PP2A.

METHODS: Four oligonucleotides targeting the SET gene were synthesized and cloned into the eukaryotic expression plasmid pGPU6. The resulting four recombinant plasmids, pGPU6/

GFP/Neo-SET-shRNA-1, 2, 3 and 4, were introduced into BGC-823 cells by lipofectamine-mediated transfection. The gene silencing efficiency was measured by Western blot

RESULTS: DNA sequencing and enzyme digestion analysis confirmed the identity of the four recombinant shRNA expression vectors. Immunofluorescence demonstrated that transfection efficiency was above 80%. Transfection of pGPU6/GFP/Neo-SET-shRNA-3 significantly knocked down the expression of SET protein as revealed by Western blot. The silencing effect of pGPU6/GFP/Neo-SET-shRNA-3 on the expression of SET protein was most remarkable at 72 h after transfection.

CONCLUSION: Eukaryotic vectors expressing shRNAs targeting the set gene have been constructed successfully and can be used to study the role of SET in gastric cancer.

Key Words: Set gene; Short hairpin RNA; Gastric cancer; PP2A

Shi HR, Fu ZQ, Deng H, Wang XM, Zhen HY, Chen Y, Liu LJ. Construction of eukaryotic vectors expressing shRNAs targeting the set gene. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2011; 19(24): 2521-2526

摘要

目的: 针对PP2A内源性抑制剂SET基因的不同部位, 构建靶向SET的shRNA真核表达质粒, 鉴定并筛选出最佳抑制效率的表达质粒。

方法: 针对SET基因的不同部位设计4对短发卡RNA(shRNA)的寡核苷酸片段, 克隆到真核表达载体pGPU6中, 构建靶向SET的shRNA真核表达质粒pGPU6/GFP/Neo-SET-shRNA-1、2、3、4。利用脂质体转染人胃癌细胞株BGC-823, Western blot法检测并筛选最佳抑制效率的shRNA表达质粒。

结果: 4个靶向SET的shRNA真核表达质粒pGPU6/GFP/Neo-SET-shRNA-1、2、3、4经限制性酶切和测序证实基因已正确插入, 荧光

■背景资料

人类恶性肿瘤细胞PP2A活性受抑制的分子机制尚不清楚, 且PP2A作为肿瘤抑制因子的证据多来自病毒抗原或化学抑制剂所致肿瘤, 尚缺乏人胃癌细胞中PP2A活性受内源性抑制剂抑制的实验和临床依据。

■同行评议者

门秀丽, 教授, 河北联合大学病理生理学教研室; 于颖彦, 教授, 上海交通大学医学院附属瑞金医院器官移植中心病理室

■研究前沿

PP2A内源性抑制剂SET目前在胃癌发生发展中的机制尚不明确。

显示转染效率可达到80%以上。Western blot法证实pGPU6/GFP/Neo-SET-shRNA-3明显降低BGC-823细胞内SET蛋白的表达。pGPU6/GFP/Neo-SET-shRNA-3对SET蛋白表达的抑制效应在72 h达到最强。

结论: 成功构建靶向SET的shRNA真核表达质粒pGPU6/GFP/Neo-SET-shRNA-1、2、3、4, 并筛选出最佳抑制效率的表达质粒, 为今后研究SET在胃癌中的作用机理奠定了基础。

关键词: SET; 短发卡RNA; 胃癌; 蛋白磷酸酶2A

师海蓉, 付政祺, 邓昊, 王绪明, 镇鸿燕, 陈莹, 刘丽江. 靶向SET的shRNA真核表达质粒的构建及鉴定. 世界华人消化杂志 2011; 19(24): 2521-2526
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/2521.asp>

0 引言

SET(patient SE translocation)基因, 1992年由von Lindern等^[1]首次鉴定于1例急性未分化性白血病病例, 因为发现于患者SE的染色体畸变-9号染色体异位产生了SET-CAN融合蛋白, 被命名为SET基因(SE translocation, SET). SET基因定位于染色体9q34, 全长2 575 bp, 开放阅读框834 bp, 编码277个氨基酸, 蛋白相对分子质量约39 000 Da. 作为潜在的肿瘤抑制因子PP2A的特异性抑制剂, SET蛋白已被发现与多种生物活动相关, 因此有多个名称, 如模板活化因子-1(template activating factor 1 β , TAF1 β)^[2]、蛋白磷酸酶2A抑制剂-2(inhibitor of protein phosphatase 2 A-2, I2PP2A)^[1]、组织相容性白细胞抗原II相关蛋白(putative histocompatibility leukocyte antigen class II protein, PHAP-II)^[3,4]、及inhibitor of histone acetyltransferase(INHAT)^[5]等. 已有研究表明SET广泛表达于人类不同组织和细胞系, 其表达异常与多种疾病相关. 对胃癌组织mRNA进行SET cDNA表达分析发现肿瘤组织中SET表达是相应正常组织的2倍或更高^[6]. 然而, 目前对于SET基因和蛋白表达、功能调控的机制研究尚不丰富. 为进一步阐明SET基因和蛋白表达在胃癌中的机制, 拟通过构建靶向SET的短发卡RNA(shRNA)真核表达质粒并转染人胃癌细胞株, 为深入研究奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料 人胃癌BGC-823细胞株购自中国医学科学院, 为本实验室保存. pGPU6/GFP/Neo-

siRNA Expression Vector Kit购自上海吉玛制药技术有限公司. 实验中所用的各种工具酶、核酸标准分子量Marker以及蛋白预染Marker均为TaKaRa公司产品. 去内毒素质粒大量提取试剂盒为德国Qiagen公司产品. 质粒转染试剂LipofectamineTM 2000购自美国invitrogen公司. 兔多克隆抗体SET以及辣根过氧化物酶标记的羊抗兔IgG购自美国Santa Cruz公司, 鼠单克隆抗体GAPDH(BM1623)购自武汉博士德生物工程有限公司. 用于Western blot检测的增强化学发光试剂ECL和BCA蛋白定量试剂盒为美国Pierce公司产品. PVDF转印膜购自美国Millipore公司. 引物的合成及DNA序列测定均由上海英骏生物技术有限公司完成。

1.2 方法

1.2.1 靶向SET的shRNA设计: 根据GenBank中SET的cDNA序列, 参考shRNA设计原则, 选择cDNA序列上的4个部位作为目标序列, 同时将选中的shRNA中的碱基序列随机打乱设计为阴性对照(shRNA. NC), 对照序列经BLAST检测证实与SET mRNA及其他基因编码序列无同源性. shRNA模板中的Loop结构选用了TTCAAGAGA以避免形成终止信号, shRNA的转录终止序列采用T6结构. 正义链模板的5'端添加了CACC, 与Bbs I酶切后形成的粘端互补; 反义链模板的5'端添加了GATC, 与BamH I酶切后形成的粘端互补; 如果siRNA的第1个碱基不是G, 则在CACC后补加一个G. 序列见表1。

1.2.2 靶向SET shRNA表达质粒的构建和鉴定: 在PCR仪上按照如下程序进行退火处理: 将DNA Oligo分别用TE(pH8.0)溶解, 浓度为100 μ mol/L取相应的正义链和反义链Oligo溶液, 按照如下配比配置退火反应体系. 10 \times shDNA Annealing Buffer 5 μ L, sense strand(100 μ mol/L)5 μ L, anti-sense strand(100 μ mol/L)5 μ L, ddH₂O 35 μ L. 退火处理: 95 $^{\circ}$ C 5 min; 85 $^{\circ}$ C 5 min; 75 $^{\circ}$ C 5 min; 70 $^{\circ}$ C 5 min; 4 $^{\circ}$ C保存. 退火处理后得到浓度为10 μ mol/L的shRNA模板. 将所得模板溶液稀释500倍, 终浓度为20 nmol/L, 用于连接反应. 用T4 DNA连接酶将准备好的插入片段连接到纯化质粒载体pGPU6的Bbs I与BamH I之间, 22 $^{\circ}$ C 1 h, 转化到JM 109感受态细胞. 每个连接反应挑取6个菌落, 接种到含50 mg/L Kanamycin的LB培养集中. 使用碱裂解法抽提质粒, 所得质粒用BamH I, Pst I分别酶切鉴定. 阳性重组载体应该可以被BamH I切开, 而不能被Pst I切开. 并

表 1 大鼠胰腺组织光镜下病理学评分(mean ± SD)

shRNA	序列
shRNA. NC	正义 5'-caccgttctccgaacgtgtcacgtcaagagattacgtgacacgttcggagaatttttg-3' 反义 5'-gatccaaaaaattctccgaagctgtcacgtaattcttgcacgtgacacgttcggagaac-3'
shRNA-1	正义 5'-caccgctccagtcagatttaattcaagagattaatctgcactggagccgctttttg-3' 反义 5'-gatccaaaaagcggctccagtcagatttaattcttgaattaatctgcactggagccgc-3'
shRNA-2	正义 5'-caccgggataccagatagctcaattcaagagatattgagctatctggtatccctttttg-3' 反义 5'-gatccaaaaagggtataccagatagctcaattcttgaattattgagctatctggtatccc-3'
shRNA-3	正义 5'-caccgctctaagcccaagtatacattcaagagatgtataactggcattagagctttttg-3' 反义 5'-gatccaaaaagctctaagcccaagtatacattcttgaattataactggcattagagc-3'
shRNA-4	正义 5'-caccgcatgtcttcattggctatattcaagagaatagccaatgaagacacatgctttttg-3' 反义 3'-gatccaaaaagcatgtcttcattggctatattcttgaatatagccaatgaagacatgc-3'

■创新盘点

本研究拟从PP2A的内源性抑制剂SET入手, 构建针对SET的shRNA质粒, 为后续研究siRNA在胃癌防治中潜在的临床应用价值建立基础。

将阳性克隆送上海英骏生物技术有限公司测序鉴定。酶切原理基于如下机制: 原始载体中有*Pst* I 酶切位点, 当插入shRNA片段后此*Pst* I 酶切位点就被替换掉, 因此在后续酶切鉴定过程中, 用*Pst* I 酶切是切不开的, 呈现质粒带型。而*Bam* H I 酶切位点构建后依旧保留, 故可以用*Bam* H I 将载体切成线性化。

1.2.3 SET shRNA转染人胃癌BGC-823细胞: 采用Lipofectamine™ 2000脂质体转染试剂, 按使用说明进行转染实验。将SET shRNA表达质粒瞬时转染入BGC-823细胞, 同时以转染shRNA. NC质粒为对照。

1.2.4 荧光显微镜检查转染效率: 细胞转染48 h后置于荧光显微镜下观察。计算转染效率。转染效率 = (发出绿色荧光的细胞数/可见光下的总细胞数) × 100%。

1.2.5 Western blot法检测重组质粒对SET蛋白表达的影响: 将转染shRNA-NC和SET-shRNA-1、2、3、4的细胞48 h后收取细胞总蛋白, 进行SDS-PAGE电泳, 电泳后湿转至PVDF膜, 含5%脱脂奶粉的TBS-T(含0.05% Tween-20的TBS)37 °C封闭60 min, 加1:1 000稀释的抗SET蛋白的多克隆抗体4 °C孵育过夜。TBS-T漂洗5 min × 3次, 加入1:4 000稀释的辣根过氧化物酶标记的羊抗兔IgG 37 °C孵育45 min。TBS-T漂洗5 min × 3次, ECL化学发光试剂检测。将转染shRNA-NC和SET shRNA-3分别转染BGC-823细胞, 于转染后24、48、72 h收取细胞总蛋白, 进行Western blot, 以检测其对SET蛋白表达的抑制效应。

统计学处理 采用SPSS13.0统计软件进行方差分析、*t*检验。*P* < 0.05表示结果具有显著性差异。

2 结果

2.1 重组质粒的鉴定 每个连接反应挑取6个菌落。接种到含50 mg/L Kanamycin的LB培养基中。使用碱裂解法抽提质粒, 所得质粒用*Bam* H I, *Pst* I 分别酶切鉴定, 阳性重组载体被*Bam* H I 切开, 而不能被*Pst* I 切开(图1)。将阳性克隆送测序。测序结果证实设计序列正确插入载体且无突变。酶切结果表明, 所有质粒均为阳性重组载体, 每组选择两个克隆进行测序鉴定(上海英骏生物技术有限公司)。测序结果正确。

2.2 重组质粒转染效率的检测 BGC-823细胞转染重组质粒24 h后, 荧光显微镜观察显示细胞中均表达绿色荧光蛋白(GFP)(图2)。重组质粒24 h转染效率为80%以上。

2.3 重组质粒转染后对SET蛋白表达的影响 Western blot结果显示重组质粒SET shRNA-1、2、3、4对BGC-823细胞SET蛋白表达的抑制效果, 以SET shRNA-3明显(图3)。

2.4 重组质粒SET shRNA-3对SET蛋白表达的抑制 Western blot结果显示, SET shRNA-3持续稳定抑制SET蛋白表达。与对照组比较24、48和72 h SET蛋白表达均下降, 以72 h最为显著(图4)。

3 讨论

胃癌是我国最常见的恶性肿瘤之一, 死亡率居恶性肿瘤的第2位^[7-9]。尽管胃癌的综合治疗措施不断完善, 如手术切除、内镜下切除和化学治疗等, 但疗效仍不令人满意, 死亡率高, 预后不良。因此, 探索胃癌发生、发展的分子机制并探寻新的防治靶点和干预策略, 具有重要意义^[10,11]。

蛋白磷酸酶2A(protein phosphatase 2A, PP2A)是真核生物体内的主要丝或苏氨酸蛋白磷酸酶, 参与细胞周期、DNA复制、信号转

■应用要点

本文通过总结优化siRNA-SET质粒构建及鉴定,为探讨SET在胃癌防治中的作用打下基础,为其他相似研究提供参考与借鉴。

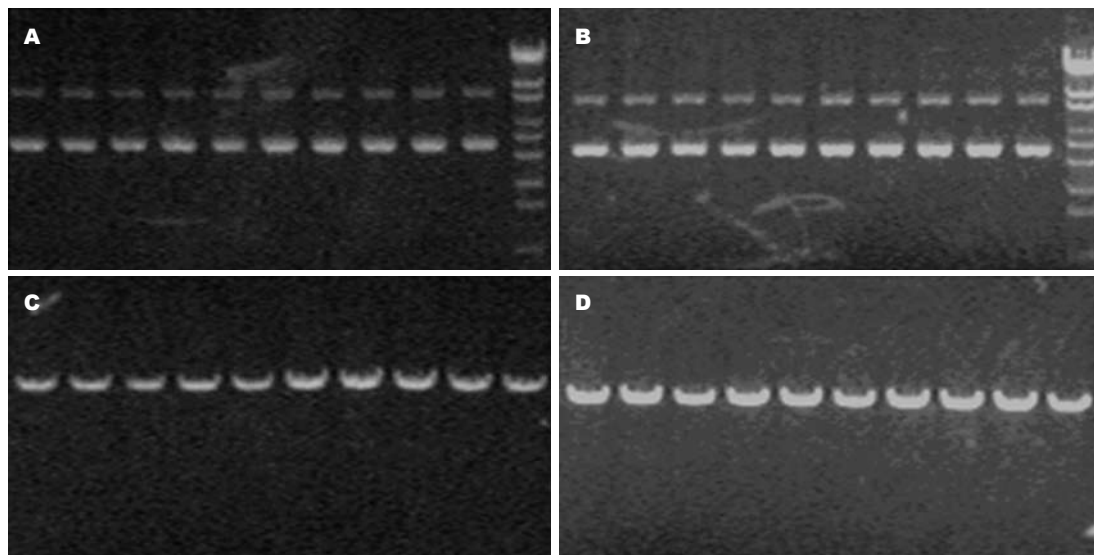


图1 重组质粒的鉴定. A, B: *Pst* I 酶切shRNA-1, 2, 3, 4; C, D: *Bam*H I 酶切shRNA-1, 2, 3, 4.

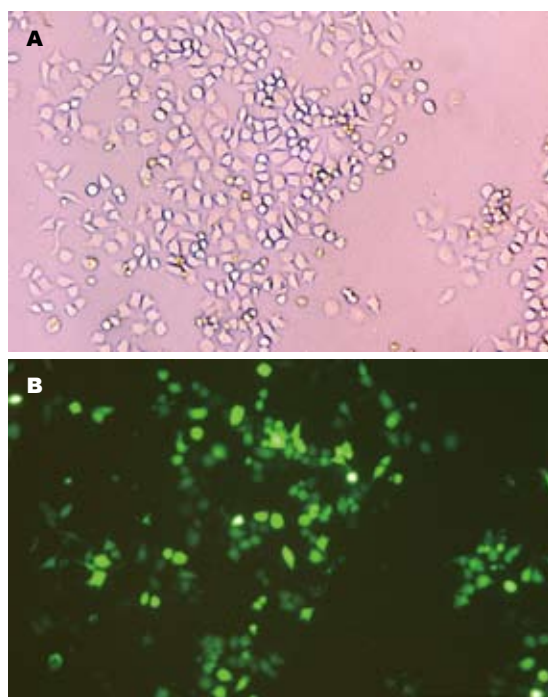


图2 重组质粒转染BGC-823细胞后绿色荧光蛋白的表达($\times 100$). A: 明视野下; B: 荧光视野下.

导、细胞分化和细胞恶性转化等多种细胞生物学事件^[12]. 作为潜在的肿瘤抑制因子^[13-18], PP2A活性的抑制被认为是细胞转化的前提条件^[19,20]. 因此, 探寻抑制PP2A活性的分子靶标极具防治肿瘤意义.

PP2A活性除受磷酸化^[21,22]和甲基化^[3,23-25]修饰外还受内源性抑制剂SET的调节^[24], SET是蛋白磷酸酶2A(protein phosphatase 2A, PP2A)的胞内抑制蛋白^[3], 具有特异性、非竞争性和热稳定

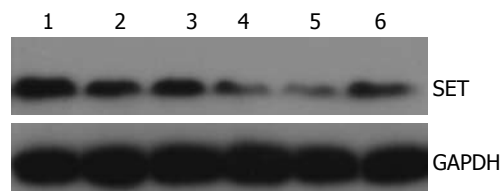


图3 Western blot检测重组质粒对SET蛋白表达的抑制. 1: shRNA-Con; 2: shRNA-NC; 3-6: SET shRNA-1、2、3、4.

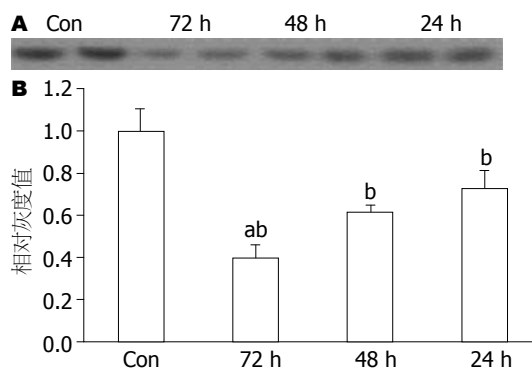


图4 SET shRNA-3对SET蛋白表达的抑制效应. A: Western blot; B: 灰度值分析. ^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs 对照组.

性^[22]. 体外研究表明SET以非底物竞争方式抑制酶, 且抑制常数为纳摩尔水平^[25,26]. SET和PP2A在哺乳动物的细胞和亚细胞水平分布的共定位及二者的活性变化也进一步支持了SET对PP2A的抑制作用^[27]. 大量的研究表明SET广泛表达于人类不同组织和细胞系, 具有高度保守的结构特征和进化机制, 提示SET蛋白具有重要的功能. 因此下调在胃癌中过表达的SET可作为一个潜在的肿瘤治疗的靶点.

Cervoni等^[6]报道, 在子宫、胃、结肠、直肠肿瘤组织, SET mRNA表达是相应正常组织的2倍以上. 本实验室前期研究也发现, 人胃癌组织中有PP2A抑制剂SET(蛋白及mRNA)的表达, 且其表达水平明显高于癌旁黏膜及正常组织. 虽然目前关于SET与PP2A、nm23-H1、beta-Catenin等^[28-31]作用的机制不断出现, 然而其在肿瘤发生发展过程中的作用机制及临床相关性仍不清楚, 该蛋白能否成为诊断肿瘤的标志物以及癌症治疗的靶点仍需要进一步研究.

因此构建靶向SET的shRNA真核表达质粒pGPU6/GFP/Neo-SET, 是进一步深入研究SET基因的结构和功能的基础. 我们构建的载体其优势是选用人U6 RNA聚合酶III启动子, 并利用相对单一的启动子和终止序列从而能够产生大量的shRNA达到有效的干扰效果. 另外在对急性未分化性白血病的研究中发现SET基因转录剪切产生TAF-I α 和SET/TAF-I β 2个亚型, 对两个亚型的进一步研究表明: 只发现SET/TAF-I β 染色体异位; 在小鼠卵巢、睾丸、MA-10细胞和爪蟾卵, SET/TAF-I β 为主要形式^[32], 而TAF-I β 促进DNA复制、染色质转录和精子染色体解聚的活性均明显高于TAF-I α , 提示SET/TAF-I β 亚型可能发挥着SET蛋白的主要生物学作用. 因此本研究针对SET/TAF-I β 亚型设计shRNA序列进一步探讨SET基因与相关疾病发生发展的关系.

针对目的基因我们共设计了4对shRNA序列, 构建了4个重组质粒, 将这些重组质粒分别转染人胃癌细胞株BGC-823和SGC-7901(结果未显示)后, 采用免疫荧光验证转染效率, Western blot法验证重组质粒对靶基因的抑制效率. 实验结果显示shRNA-2、3均具有较高的抑制效率, 分别达到79%和90%, 而shRNA-1对靶基因无抑制作用, shRNA-4对靶基因抑制效率较低. 因此选择抑制效率高的shRNA-3进行后续研究, 为进一步研究SET在胃癌发生发展中的作用以及胃癌的分子生物学治疗奠定了基础.

4 参考文献

- 1 von Lindern M, van Baal S, Wiegant J, Raap A, Hagemeijer A, Grosveld G. Can, a putative oncogene associated with myeloid leukemogenesis, may be activated by fusion of its 3' half to different genes: characterization of the set gene. *Mol Cell Biol* 1992; 12: 3346-3355
- 2 Nagata K, Kawase H, Handa H, Yano K, Yamasaki M, Ishimi Y, Okuda A, Kikuchi A, Matsumoto K. Replication factor encoded by a putative oncogene, set, associated with myeloid leukemogenesis. *Proc*

- Natl Acad Sci U S A* 1995; 92: 4279-4283
- 3 Li M, Makkinje A, Damuni Z. The myeloid leukemia-associated protein SET is a potent inhibitor of protein phosphatase 2A. *J Biol Chem* 1996; 271: 11059-11062
- 4 Vaesen M, Barnikol-Watanabe S, Götz H, Awni LA, Cole T, Zimmermann B, Kratzin HD, Hilschmann N. Purification and characterization of two putative HLA class II associated proteins: PHAPI and PHAPII. *Biol Chem Hoppe Seyler* 1994; 375: 113-126
- 5 Seo SB, McNamara P, Heo S, Turner A, Lane WS, Chakravarti D. Regulation of histone acetylation and transcription by INHAT, a human cellular complex containing the set oncoprotein. *Cell* 2001; 104: 119-130
- 6 Cervoni N, Detich N, Seo SB, Chakravarti D, Szyf M. The oncoprotein Set/TAF-1beta, an inhibitor of histone acetyltransferase, inhibits active demethylation of DNA, integrating DNA methylation and transcriptional silencing. *J Biol Chem* 2002; 277: 25026-25031
- 7 NCCN. National Comprehensive Cancer Network (NCCN) Clinical Practice Guidelines in Oncology. 2006-01; cited 2011-08. Available from: www.nccn.org
- 8 Corley DA, Buffler PA. Oesophageal and gastric cardia adenocarcinomas: analysis of regional variation using the Cancer Incidence in Five Continents database. *Int J Epidemiol* 2001; 30: 1415-1425
- 9 刘丽江, 张应天. 胃癌淋巴结微转移的组织学诊断及间质反应的研究. *中华病理学杂志* 2000; 29: 339-341
- 10 吕伟, 陈凇. 胃癌分子靶向治疗的现状与进展. *世界华人消化杂志* 2007; 15: 2672-2678
- 11 曲磊磊, 刘云鹏. 晚期胃癌分子靶向治疗的现状及其发展趋势. *世界华人消化杂志* 2011; 19: 919-924
- 12 Sontag E. Protein phosphatase 2A: the Trojan Horse of cellular signaling. *Cell Signal* 2001; 13: 7-16
- 13 Mumby M. PP2A: unveiling a reluctant tumor suppressor. *Cell* 2007; 130: 21-24
- 14 Janssens V, Goris J, Van Hoof C. PP2A: the expected tumor suppressor. *Curr Opin Genet Dev* 2005; 15: 34-41
- 15 Kalev P, Sablina AA. Protein phosphatase 2A as a potential target for anticancer therapy. *Anticancer Agents Med Chem* 2011; 11: 38-46
- 16 李天祝, 向本琼. 蛋白磷酸酶PP2A的结构及其肿瘤抑制因子功能. *生物化学与生物物理进展* 2009; 36: 133-142
- 17 Eichhorn PJ, Creighton MP, Bernards R. Protein phosphatase 2A regulatory subunits and cancer. *Biochim Biophys Acta* 2009; 1795: 1-15
- 18 Westermarck J, Hahn WC. Multiple pathways regulated by the tumor suppressor PP2A in transformation. *Trends Mol Med* 2008; 14: 152-160
- 19 Junttila MR, Puustinen P, Niemelä M, Ahola R, Arnold H, Böttzauw T, Ala-aho R, Nielsen C, Ivaska J, Taya Y, Lu SL, Lin S, Chan EK, Wang XJ, Grénman R, Kast J, Kallunki T, Sears R, Kähäri VM, Westermarck J. CIP2A inhibits PP2A in human malignancies. *Cell* 2007; 130: 51-62
- 20 钱安平, 辛彦, 肖玉平. CIP2A与肿瘤关系的研究进展. *世界华人消化杂志* 2009; 17: 2700-2704
- 21 Guo H, Reddy SA, Damuni Z. Purification and characterization of an autophosphorylation-activated protein serine threonine kinase that phosphorylates and inactivates protein phosphatase 2A. *J Biol*

■同行评价

本研究通过构建靶向SET的短发卡RNA真核表达质粒并转染人胃癌细胞株, 对进一步阐明SET基因和蛋白表达在胃癌中的机制奠定了一定基础. 研究选题较新颖, 具有一定的科学意义.

- Chem 1993; 268: 11193-11198
- 22 Brautigan DL. Flicking the switches: phosphorylation of serine/threonine protein phosphatases. *Semin Cancer Biol* 1995; 6: 211-217
 - 23 Favre B, Zolnierowicz S, Turowski P, Hemmings BA. The catalytic subunit of protein phosphatase 2A is carboxyl-methylated in vivo. *J Biol Chem* 1994; 269: 16311-16317
 - 24 Li L, Sengupta A, Haque N, Grundke-Iqbal I, Iqbal K. Memantine inhibits and reverses the Alzheimer type abnormal hyperphosphorylation of tau and associated neurodegeneration. *FEBS Lett* 2004; 566: 261-269
 - 25 Li M, Makkinje A, Damuni Z. Molecular identification of I1PP2A, a novel potent heat-stable inhibitor protein of protein phosphatase 2A. *Biochemistry* 1996; 35: 6998-7002
 - 26 Gantier R, Gilbert D, Dumanchin C, Campion D, Davoust D, Toma F, Frébourg T. The pathogenic L392V mutation of presenilin 1 decreases the affinity to glycogen synthase kinase-3 beta. *Neurosci Lett* 2000; 283: 217-220
 - 27 Tanimukai H, Grundke-Iqbal I, Iqbal K. Inhibitors of protein phosphatase-2A: topography and subcellular localization. *Brain Res Mol Brain Res* 2004; 126: 146-156
 - 28 Switzer CH, Cheng RY, Vitek TM, Christensen DJ, Wink DA, Vitek MP. Targeting SET/I(2)PP2A oncoprotein functions as a multi-pathway strategy for cancer therapy. *Oncogene* 2011; 30: 2504-2513
 - 29 Ozbek U, Kandilci A, van Baal S, Bonten J, Boyd K, Franken P, Fodde R, Grosveld GC. SET-CAN, the product of the t(9; 9) in acute undifferentiated leukemia, causes expansion of early hematopoietic progenitors and hyperproliferation of stomach mucosa in transgenic mice. *Am J Pathol* 2007; 171: 654-666
 - 30 Fan Z, Beresford PJ, Oh DY, Zhang D, Lieberman J. Tumor suppressor NM23-H1 is a granzyme A-activated DNase during CTL-mediated apoptosis, and the nucleosome assembly protein SET is its inhibitor. *Cell* 2003; 112: 659-672
 - 31 Christensen DJ, Ohkubo N, Oddo J, Van Kanegan MJ, Neil J, Li F, Colton CA, Vitek MP. Apolipoprotein E and peptide mimetics modulate inflammation by binding the SET protein and activating protein phosphatase 2A. *J Immunol* 2011; 186: 2535-2542
 - 32 Zhang P, Compagnone NA, Fiore C, Vigne JL, Culp P, Musci TJ, Mellon SH. Developmental gonadal expression of the transcription factor SET and its target gene, P450c17 (17alpha-hydroxylase/c17,20 lyase). *DNA Cell Biol* 2001; 20: 613-624

编辑 曹丽鸥 电编 何基才

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

• 消息 •

《世界华人消化杂志》外文字符标准

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

ω-3多不饱和脂肪酸对大鼠肝切除术后肝脏紧密连接及肝再生的影响

严笑鹏, 王升, 杨跃, 仇毓东

严笑鹏, 王升, 杨跃, 仇毓东, 南京大学医学院附属鼓楼医院肝胆外科 江苏省南京市 210008

严笑鹏, 2009级南京大学硕士, 主要从事肝再生的研究.

国家传染病防治科技重大专项基金资助项目, No. 2008ZX10002-26

作者贡献分布: 此课题由仇毓东与严笑鹏设计; 研究过程由严笑鹏、王升及杨跃操作完成; 研究所用新试剂及分析工具由仇毓东提供; 数据分析由严笑鹏、王升及杨跃完成; 本论文写作由严笑鹏、王升及仇毓东完成.

通讯作者: 仇毓东, 主任医师, 210008, 江苏省南京市中山路321号, 南京大学医学院附属鼓楼医院肝胆外科.

yudongqiu510@163.com

电话: 025-83594913

收稿日期: 2011-06-09 修回日期: 2011-08-22

接受日期: 2011-08-26 在线出版日期: 2011-08-28

Effect of ω-3 polyunsaturated fatty acids on hepatic tight junctions and liver regeneration in rats after partial hepatectomy

Xiao-Peng Yan, Sheng Wang, Yue Yang, Yu-Dong Qiu

Xiao-Peng Yan, Sheng Wang, Yue Yang, Yu-Dong Qiu, Department of Hepatobiliary Surgery, the Affiliated Drum Tower Hospital of Nanjing University Medical School, Nanjing 210008, Jiangsu Province, China

Supported by: the China National Key S&T Projects for Major Infectious Diseases, No. 2008ZX10002-26

Correspondence to: Professor Yu-Dong Qiu, Department of Hepatobiliary Surgery, the Affiliated Drum Tower Hospital of Nanjing University Medical School, 321 Zhongshan Road, Nanjing 210008, Jiangsu Province, China. yudongqiu510@163.com

Received: 2011-06-09 Revised: 2011-08-22

Accepted: 2011-08-26 Published online: 2011-08-28

Abstract

AIM: To investigate the effect of ω-3 polyunsaturated fatty acids (PUFAs) on hepatic tight junctions and liver regeneration in rats after partial hepatectomy (PH)

METHODS: A rat model of 70% PH was used in this study. Eighty male SD rats were randomly divided into sham operation group, PH group, PH + low-dose ω-3 PUFA (1 mL/kg) group and PH + high-dose ω-3 PUFA (2 mL/kg) group. Serum samples were collected to measure the

levels of total bile acids, total bilirubin, alanine aminotransferase (ALT) and albumin on days 1, 2, 3 and 5 after PH. Tissue samples were collected for detecting the expression of hepatic tight junction proteins (Occludin, Claudin-3 and ZO-1) and PCNA (a parameter reflecting liver regeneration) by Western blot. Tissue samples were also collected for observation of structural changes in hepatic tight junctions by confocal microscopy.

RESULTS: In comparison with the PH group on day 1, the levels of total bile acids (181.2 ± 63.9 , 166.7 ± 68.9 vs 228.9 ± 37.7), total bilirubin (13.5 ± 8.8 , 7.6 ± 0.1 vs 25.9 ± 15.3) and ALT (1042.2 ± 179.7 , 901.4 ± 182.3 vs 2703.9 ± 130.0) decreased significantly in the low- and high-dose ω-3 PUFA groups (all $P < 0.05$), whereas no marked changes in the level of albumin (27.2 ± 1.1 , 29.8 ± 0.9 vs 30.5 ± 1.2) were observed. Compared to the PH group on day 2, a significant decrease in the levels of total bilirubin (6.8 ± 9.2 , 6.1 ± 2.0 vs 17.7 ± 1.1) and ALT (452.8 ± 258.5 , 499.8 ± 155.9 vs 1466.5 ± 30.2) was noted in the low- and high-dose ω-3 PUFA groups (all $P < 0.05$), whereas no marked changes in the level of albumin (26.8 ± 0.4 , 27.7 ± 1.0 vs 25.7 ± 0.6) were observed. The expression of hepatic tight junction proteins (Occludin, Claudin-3 and ZO-1) increased significantly on days 1, 2 and 5 after PH (all $P < 0.05$), and liver regeneration was enhanced significantly on days 1, 2, 3 and 5 after PH (all $P < 0.05$). Treatment with ω-3 PUFAs promoted structural restoration of hepatic tight junctions.

CONCLUSION: ω-3 PUFAs not only promote the expression of tight junction proteins and protect the structure of hepatic tight junctions but also promote liver regeneration and protect liver function in rats after PH.

Key Words: ω-3 polyunsaturated fatty acids; Hepatic tight junction; Liver regeneration

Yan XP, Wang S, Yang Y, Qiu YD. Effect of ω-3

■背景资料

肝脏切除术是治疗肝脏肿瘤、胆管疾病等常用的治疗方法,挽救了大量患者的生命.然而,病灶切除后的残余肝脏能否维持功能、顺利修复再生将直接影响患者的生存,因此,肝切除术后肝功能的维护及肝再生的促进是防止术后肝功能衰竭的重要措施.

■同行评议者

秦建民, 副教授, 上海中医药大学附属普陀医院肝胆外科; 吴泰瑞, 教授, 山东省立医院肝胆外科; 徐迅迪, 教授, 中南大学湘雅二医院肝胆胰外科

■研究前沿

有关 ω -3多不饱和脂肪酸对肝切除术后肝脏紧密连接及肝再生的作用机制的深入研究仍是下一步研究的热点。

polyunsaturated fatty acids on hepatic tight junctions and liver regeneration in rats after partial hepatectomy. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2011; 19(24): 2527-2533

摘要

目的: 探讨 ω -3多不饱和脂肪酸(ω -3PUFA)对大鼠肝切除术后肝脏紧密连接和肝脏再生的影响。

方法: 采用大鼠70%肝切除模型, δ SD大鼠80只随机分为假手术组、70%肝切除对照组、小剂量 ω -3PUFA组(1 mL/kg)和大剂量 ω -3PUFA组(2 mL/kg). 检测术后1、2、3、5 d血清总胆汁酸、总胆红素、ALT和白蛋白值. Western blot检测肝脏紧密连接蛋白Occludin, Claudin-3和ZO-1表达及反映肝再生的PCNA表达. 激光共聚焦显微镜下观察肝脏紧密连接结构变化。

结果: 术后1 d, 与对照组相比较, ω -3PUFA组血清总胆汁酸(181.2 ± 63.9 , 166.7 ± 68.9 vs 228.9 ± 37.7), 总胆红素(13.5 ± 8.8 , 7.6 ± 0.1 vs 25.9 ± 15.3)和ALT(1042.2 ± 179.7 , 901.4 ± 182.3 vs 2703.9 ± 130.0)均显著降低($P < 0.05$), 白蛋白(27.2 ± 1.1 , 29.8 ± 0.9 vs 30.5 ± 1.2)无明显变化. 术后2 d, 与对照组相比较, ω -3PUFA组血清总胆红素(6.8 ± 9.2 , 6.1 ± 2.0 vs 17.7 ± 1.1)和ALT(452.8 ± 258.5 , 499.8 ± 155.9 vs 1466.5 ± 30.2)均显著降低($P < 0.05$), 白蛋白(26.8 ± 0.4 , 27.7 ± 1.0 vs 25.7 ± 0.6)无明显变化. ω -3PUFA组术后1、2、5 d肝脏紧密连接(Occludin, Claudin-3, ZO-1)的表达显著增加($P < 0.05$), 术后1、2、3、5 d肝脏再生程度明显增加($P < 0.05$). 激光共聚焦显示 ω -3 PUFA组肝脏紧密连接结构恢复。

结论: ω -3PUFA可以促进大鼠肝切除术后肝脏紧密连接的稳定高表达, 保护其结构, 并促进肝再生, 保护肝功能。

关键词: ω -3多不饱和脂肪酸; 肝脏紧密连接; 肝再生

严笑鹏, 王升, 杨跃, 仇毓东. ω -3多不饱和脂肪酸对大鼠肝切除术后肝脏紧密连接及肝再生的影响. 世界华人消化杂志 2011; 19(24): 2527-2533

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/2527.asp>

0 引言

肝脏紧密连接(tight junction, TJ)不仅存在于肝细胞间, 还分布于胆小管上, 构成血液-胆汁屏

障, 使胆汁在胆小管内与血液循环分离开来, 并对于细胞间的通透性, 胆汁的分泌和细胞的极性起到了重要的作用^[1,2]. 肝脏紧密连接同其他组织细胞间紧密连接一样, 由不同的TJ蛋白组成. TJ主要由跨膜蛋白Occludin、Claudins、JAMs和连接蛋白ZOs等构成, 对于组织结构的稳定和功能的维持起到重要的作用^[3-7]. 在肝再生的过程中, TJ的形成对于肝脏功能的维持起到了重要的作用, 并可导致胆小管结构的重建以及肝细胞极性的重新形成^[8-13]. 为了控制肝切除术后肝衰, 提高术后生存率, 对于肝再生的促进及肝脏紧密连接的保护就显得尤为重要. 本研究通过围手术期应用具有抗炎、抗氧化和保肝等作用的营养制剂 ω -3多不饱和脂肪酸(ω -3PUFA)^[14-19], 采用70%大鼠肝切除模型, 探索其对于大鼠部分肝切除术后肝脏TJ的表达和结构以及肝再生的影响。

1 材料和方法

1.1 材料 实验采用体质量220-250 g的 δ SD大鼠(购自南京大学附属鼓楼医院动物实验中心). ω -3多不饱和脂肪酸(ω -3PUFA, 商品名尤文注射液, 批号: 16DA0043)购自德国费森尤斯卡比公司. 羊抗Occludin和羊抗Claudin-3抗体购自Santa Cruz公司, 兔抗ZO-1和小鼠抗PCNA购自Invitrogen公司, 小鼠抗Actin购自Sigma-Aldrich公司。

1.2 方法

1.2.1 分组及造模: 实验大鼠随机分为假手术组、对照组、小剂量 ω -3PUFA组和大剂量 ω -3PUFA组. 假手术组仅作开腹, 对照组行70%肝切除, 其他大鼠从术前两天开始, 分别以1 mL/kg和2 mL/kg的剂量, 静脉给予 ω -3PUFA, 肝切除手术结束以及术后每天亦给予相应剂量的鱼油, 直至处死的时间点(术后1、2、3、5 d). 每组每时间点设10个样本行Western blot、激光共聚焦、肝功能和残肝/体质量比检查. 大鼠70%肝切除模型参照Higgins-Anderson^[20]所采用的肝切除方法进行, 切除大鼠左叶, 中叶, 保留右叶和尾状叶。

1.2.2 肝功能测定: 各组分别于肝切除术后1、2、3、5 d从大鼠眶后静脉丛采血2 mL送鼓楼医院检验科生化试验室检验, 用大型生化分析仪检测血清中总胆汁酸、总胆红素、ALT及白蛋白的水平。

1.2.3 肝脏紧密连接蛋白的表达: 各组分别于肝切除术后1、2、3、5 d取10 g左右大鼠肝组织冻

表 1 大鼠70%肝切除术后血清总胆汁酸的变化 ($n = 10$, mean \pm SD)

术后时间	总胆汁酸($\mu\text{mol/L}$)			
	假手术组	对照组	小剂量 ω -3PUFA组	大剂量 ω -3PUFA组
1 d	11.2 \pm 0.8	228.9 \pm 37.7 ^a	181.2 \pm 63.9 ^c	166.7 \pm 68.9 ^c
2 d	15.7 \pm 2.3	93.6 \pm 12.6 ^a	173.8 \pm 58.5 ^c	156.1 \pm 59.1 ^c
3 d	14.1 \pm 1.5	81.7 \pm 27.1 ^a	72.3 \pm 47.1	82.6 \pm 47.9
5 d	13.6 \pm 1.8	42.6 \pm 6.1 ^a	52.0 \pm 30.1	41.6 \pm 26.1

^a $P < 0.05$ vs 假手术组; ^c $P < 0.05$ vs 对照组.表 2 大鼠70%肝切除术后血清总胆红素的变化 ($n = 10$, mean \pm SD)

术后时间	总胆红素($\mu\text{mol/L}$)			
	假手术组	对照组	小剂量 ω -3PUFA组	大剂量 ω -3PUFA组
1 d	1.3 \pm 0.2	25.9 \pm 15.3 ^a	13.5 \pm 8.8 ^c	7.6 \pm 0.1 ^c
2 d	1.2 \pm 0.1	17.7 \pm 1.1 ^a	6.8 \pm 9.2 ^c	6.1 \pm 2.0 ^c
3 d	1.2 \pm 0.2	4.0 \pm 1.2	4.6 \pm 8.4	4.9 \pm 3.1
5 d	1.2 \pm 0.1	3.1 \pm 0.2	1.8 \pm 0.8	1.4 \pm 0.4

^a $P < 0.05$ vs 假手术组; ^c $P < 0.05$ vs 对照组.表 3 大鼠70%肝切除术后血清ALT的变化 ($n = 10$, mean \pm SD)

术后时间	ALT(U/L)			
	假手术组	对照组	小剂量 ω -3PUFA组	大剂量 ω -3PUFA组
1 d	71.8 \pm 0.5	2703.9 \pm 130.0 ^a	1042.2 \pm 179.7 ^c	901.4 \pm 182.3 ^c
2 d	67.2 \pm 3.2	1466.5 \pm 30.2 ^a	452.8 \pm 258.5 ^c	499.8 \pm 155.9 ^c
3 d	62.5 \pm 3.8	256.6 \pm 25.4 ^a	211.7 \pm 51.3	178.2 \pm 41.5
5 d	68.3 \pm 2.7	112.8 \pm 49.4 ^a	90.7 \pm 12.8	87.9 \pm 19.7

^a $P < 0.05$ vs 假手术组; ^c $P < 0.05$ vs 对照组.

存于液氮罐中, 取0.1 g的肝脏组织加入500 mL的组织蛋白裂解液, 充分研磨后取上清蛋白溶液, Western blot法检测肝脏紧密连接蛋白的表达水平.

1.2.4 肝脏紧密连接蛋白结构的变化: 各组分别于肝切除术后1、2、3、5 d取20 g左右大鼠肝组织置于-80 °C冰箱中, 以20 μm 厚度制作冰冻切片, 在激光共聚焦显微镜(Zeiss)下观察肝脏紧密连接蛋白结构的改变情况.

1.2.5 肝再生的测定: 各组分别于肝切除术后1、2、3、5 d取10 g左右大鼠肝组织冻存于液氮罐中, 取0.1 g的肝脏组织加入500 mL的组织蛋白裂解液, 充分研磨后取上清蛋白溶液, Western blot法检测肝脏PCNA的表达水平. 另外, 于术后1、2、3、5 d处死动物, 每组大鼠处死前称其体重, 处死后取出残肝, 生理盐水漂洗后称质量,

计算每组残肝/体质量比.

统计学处理 计量资料用mean \pm SD表示, 多组样本均数比较采用单因素方差分析, 先进行方差齐性检验, 然后采用Student-Newman-Keuls检验进行两两比较, 以双侧 $\alpha = 0.05$ 为检验水准, 全部统计分析采用SPSS16.0软件实现.

2 结果

2.1 肝功能变化 术后1 d和2 d的总胆汁酸、总胆红素和ALT值: 对照组与假手术组比较均增高, 统计学差异显著($P < 0.05$), ω -3PUFA组与对照组比较均降低, 统计学差异显著($P < 0.05$), 大剂量 ω -3PUFA组与小剂量 ω -3PUFA组比较无统计学差异(表1-3). 术后各时间点的白蛋白值各组间比较无统计学差异(表4).

2.2 肝脏紧密连接蛋白的表达 与假手术组比较,

■相关报道

本课题组前期研究中发现, 大鼠肝切除术后应用 ω -3多不饱和脂肪酸可抑制血清中炎症因子的释放, 控制门静脉系统的内毒素血症, 有效保护肝功能.

■创新盘点

本研究通过围手术期应用具有抗炎、抗氧化和保护肝等作用的营养制剂 ω -3多不饱和脂肪酸,采用70%大鼠肝切除模型,初步探索了其对于大鼠部分肝切除术后肝脏紧密连接和肝再生的影响。

表 4 大鼠70%肝切除术后血清白蛋白的变化 ($n = 10$, mean \pm SD)

术后时间	白蛋白(g/L)			
	假手术组	对照组	小剂量 ω -3PUFA组	大剂量 ω -3PUFA组
1 d	35.4 \pm 0.8	30.5 \pm 1.2	27.2 \pm 1.1	29.8 \pm 0.9
2 d	36.1 \pm 1.2	25.7 \pm 0.6	26.8 \pm 0.4	27.7 \pm 1.0
3 d	35.8 \pm 1.1	26.3 \pm 2.0	26.8 \pm 2.3	24.3 \pm 0.7
5 d	36.2 \pm 0.7	26.8 \pm 0.7	27.9 \pm 0.3	29.8 \pm 0.6

术后1、2和5 d的Occludin、Claudin-3和ZO-1蛋白的表达均显著降低($P < 0.05$), 术后3 d的Occludin和Claudin-3蛋白的表达显著降低($P < 0.05$), ZO-1无变化. 与对照组比较, 小剂量 ω -3PUFA组术后1和2 d的Claudin-3和ZO-1蛋白表达显著增加($P < 0.05$), 术后5 d的Occludin、Claudin-3和ZO-1蛋白表达显著增加($P < 0.05$). 与对照组比较, 大剂量 ω -3PUFA组术后1 d和5 d的Occludin、Claudin-3和ZO-1蛋白表达显著增加($P < 0.05$), 术后2 d的Claudin-3和ZO-1蛋白表达显著增加($P < 0.05$, 图1).

2.3 肝脏紧密连接蛋白结构的变化 部分肝切除后, 激光共聚焦显微镜下观察发现, 对照组可见紧密连接蛋白荧光染色强度减低, 排列极度紊乱. 小剂量 ω -3PUFA组可见紧密连接蛋白荧光染色强度增加, 蛋白呈连续性排列, 紊乱程度减轻. 大剂量 ω -3PUFA组可见紧密连接蛋白荧光染色强度增加更为明显, 蛋白排列有序(图2).

2.4 测定 对照组比较, 小剂量 ω -3PUFA组术后2、3和5 d的PCNA表达显著增加($P < 0.05$), 大剂量 ω -3PUFA组术后1、2、3和5 d的PCNA表达显著增加($P < 0.05$, 图1). 与对照组比较, 术后各时间点残肝/体质量比亦增高, 统计学差异显著($P < 0.05$, 图3).

3 讨论

21世纪是微创和精准外科的时代. 作为肝脏外科最主要的治疗手段, 肝切除术也面临着重大变革^[21,22]. 以精确的术前评估、精细的手术操作和精良的术后处理为核心的精准肝脏外科技术日益受到重视^[23,24]. 长期以来的临床实践证明, 对于肝脏肿瘤采用肝切除术有望提高患者的无瘤生存率, 但是病灶切除后的残余肝脏能否维持功能、顺利修复再生将直接影响患者的生存^[25-28]. 临床研究表明: 围手术期采用有针对性的营养支持治疗可使患者肝功能损害明显减轻, 并发症显著降低, 对肝再生有促进作用^[29,30].

ω -3PUFA是临床静脉营养支持中常用的脂肪乳剂^[31], 我们的前期研究证实: 大鼠肝切除术后应用 ω -3PUFA可抑制血清中炎症因子的释放, 控制门静脉系统的内毒素血症, 有效保护肝功能^[32-35]. 不过, 其对于肝脏TJ及肝再生的影响并没有具体的阐述. 因此, 我们选择 ω -3PUFA干预的手段, 初步探讨了其对大鼠肝切除术后肝脏的保护作用.

本实验重点观察了 ω -3PUFA在大鼠70%肝切除术后对肝脏紧密连接有无保护作用及对肝再生有无促进作用. 研究结果显示, 通过肝功能检测发现, ω -3PUFA组术后1 d和2 d的总胆汁酸、总胆红素和ALT值较对照组均显著降低, 而白蛋白值各时间点各组间无显著差异, 提示 ω -3PUFA可以在早期使肝切除术后的肝功能得到有效的改善, 肝损害得到缓解. 而白蛋白的无显著性变化则提示 ω -3PUFA可能对肝脏合成功能的影响不大, 仅对与紧密连接相关的功能如代谢和分泌功能产生保护作用. 肝脏紧密连接蛋白的表达测定发现, ω -3PUFA组在术后1、2和5 d肝脏紧密连接蛋白的表达较对照组显著增加, 而大剂量 ω -3PUFA组肝脏紧密连接蛋白的表达增加更为明显. 鉴于术后3 d紧密连接蛋白表达无显著性差异, 我们又通过激光共聚焦显微镜对术后3 d的肝脏紧密连接蛋白的结构进行观察, 发现对照组可见紧密连接蛋白荧光染色强度减低, 排列极度紊乱. 小剂量 ω -3PUFA组可见紧密连接蛋白荧光染色强度增加, 蛋白呈连续性排列, 紊乱程度减轻. 大剂量 ω -3PUFA组可见紧密连接蛋白荧光染色强度增加更为明显, 蛋白排列有序. 由此可见, ω -3PUFA在一定程度上可以促进肝切除术后肝脏紧密连接蛋白的表达, 保护其结构的完整性. 肝再生的测定发现, ω -3PUFA组在术后各时间点的PCNA表达较对照组显著增加, 而大剂量 ω -3PUFA组术后各时间点的PCNA表达增加更为明显, 这些结果与术后各时间点各组

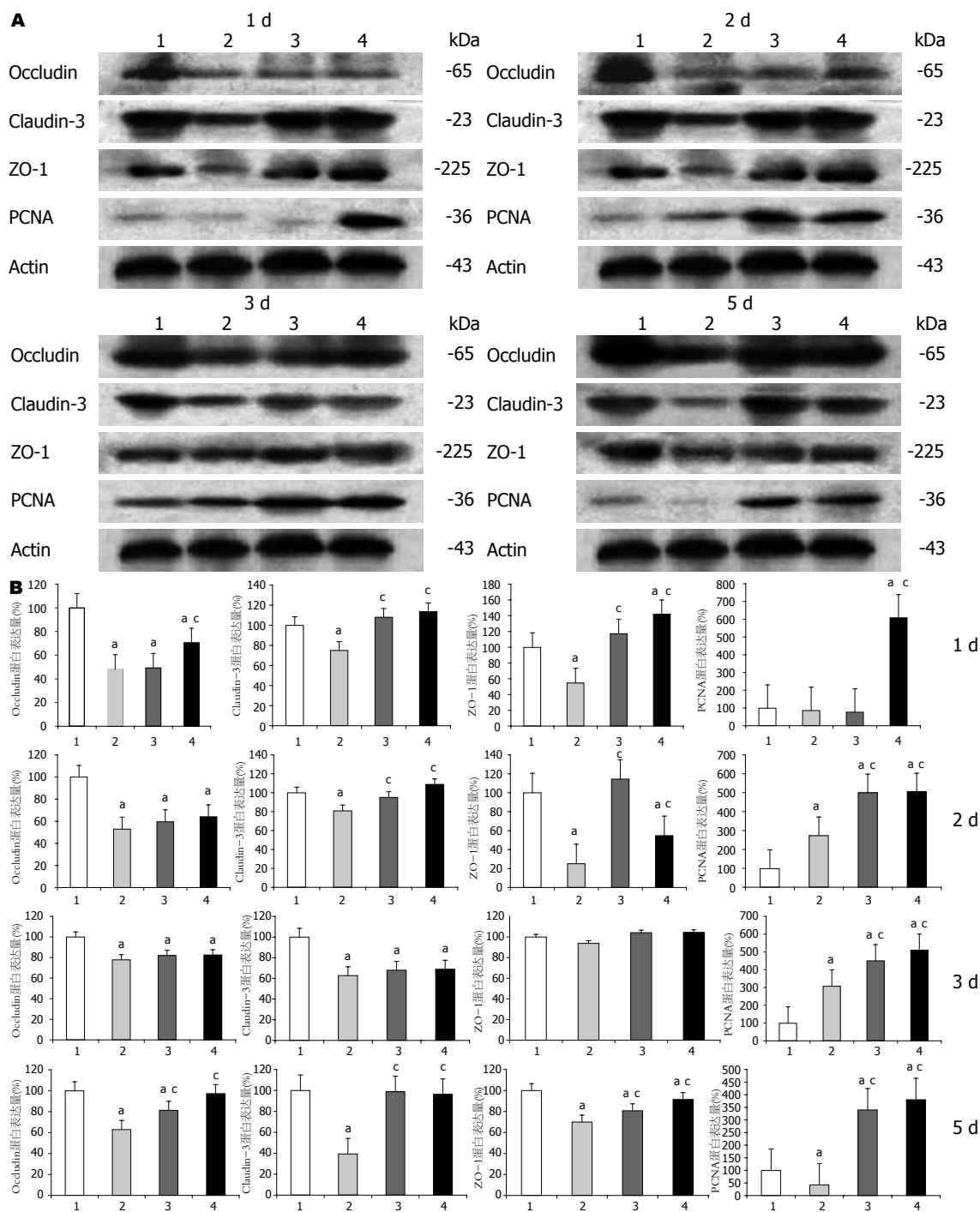


图 1 大鼠70%肝切除术后各时间点肝脏紧密连接蛋白Occludin, Claudin-3, ZO-1及反映肝再生的PCNA蛋白的表达情况. 1: 假手术组; 2: 对照组; 3: 小剂量 ω -3PUFA组; 4: 大剂量 ω -3PUFA组. A: 各蛋白的Western blot结果; B: 各蛋白表达的相对变化; * $P < 0.05$ vs 假手术组; $^c P < 0.05$ vs 对照组.

残肝/体质量比差异一致, 提示 ω -3PUFA可以极大程度的促进肝切除术后肝再生. 我们认为, ω -3PUFA可以促进肝切除术后肝脏紧密连接的表达, 保护其结构, 有效促进术后肝再生, 保护肝功能. 其在一定程度上可以减轻肝内实质组织和非实质组织的损伤, 对肝细胞和肝脏紧密连接有较好的促进和保护作用.

总之, 本实验在大鼠70%肝切除模型的基础

上, 采用围手术期应用 ω -3PUFA的方法, 通过肝脏酶学指标, 肝脏紧密连接蛋白表达水平和肝再生水平的检测以及激光共聚焦显微镜观察肝脏紧密连接的结构变化, 阐明了 ω -3PUFA对于70%肝切除可以保护术后肝脏的紧密连接结构, 加速肝功能的恢复, 并有效的促进肝再生. 实验结果为进一步研究 ω -3PUFA在极限性肝切除中应用奠定了理论基础.

应用要点

本研究为进一步研究 ω -3多不饱和脂肪酸在极限性肝切除中的应用奠定了理论基础.

同行评价

本研究探讨了 ω -3多不饱和脂肪酸对大鼠肝切除术后肝脏紧密连接和肝脏再生的影响,文章选题较新颖,结构紧凑,分析合理,条理分明,参考文献引用恰当,具有一定的临床意义。

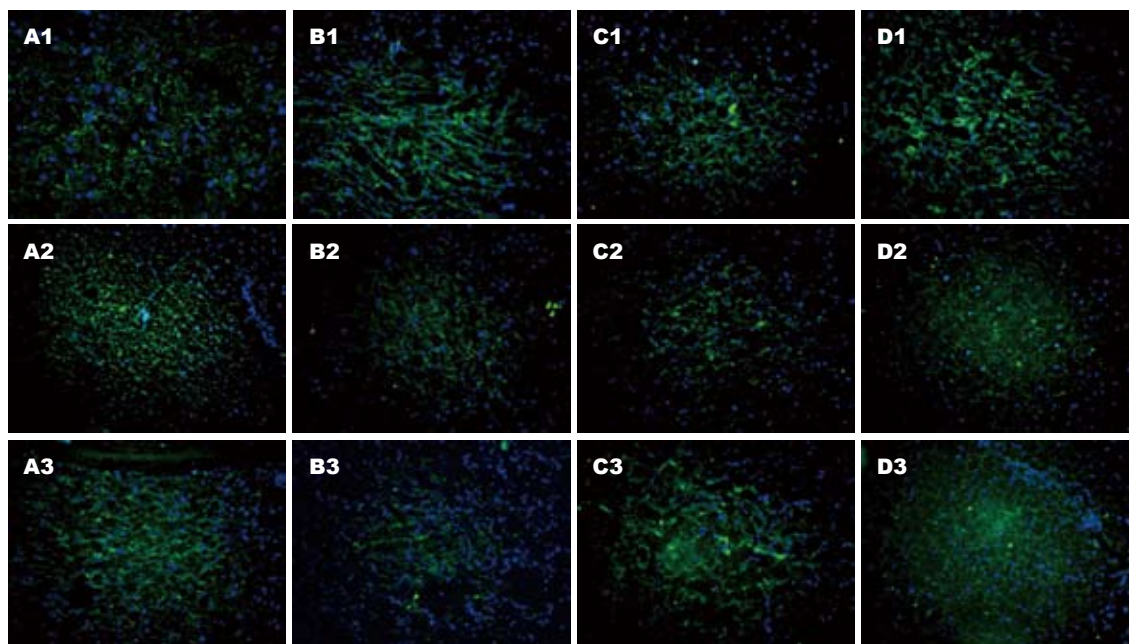


图2 大鼠70%肝切除术后3 d肝脏紧密连接激光共聚焦显微镜观察($\times 1\,000$). A: 假手术组; B: 对照组; C: 小剂量 ω -3PUFA组; D: 大剂量 ω -3PUFA组; 1: Occludin蛋白; 2: Claudin-3蛋白; 3: ZO-1蛋白。

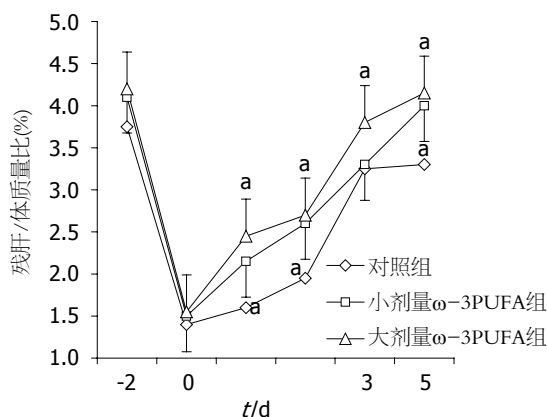


图3 大鼠70%肝切除术后各时间点残肝/体质量比。
* $P < 0.05$ vs 对照组。

4 参考文献

- Kojima T, Murata M, Go M, Spray DC, Sawada N. Connexins induce and maintain tight junctions in epithelial cells. *J Membr Biol* 2007; 217: 13-19
- Lee NP, Luk JM. Hepatic tight junctions: from viral entry to cancer metastasis. *World J Gastroenterol* 2010; 16: 289-295
- Kojima T, Murata M, Yamamoto T, Lan M, Imamura M, Son S, Takano K, Yamaguchi H, Ito T, Tanaka S, Chiba H, Hirata K, Sawada N. Tight junction proteins and signal transduction pathways in hepatocytes. *Histol Histopathol* 2009; 24: 1463-1472
- Powell DW. Barrier function of epithelia. *Am J Physiol* 1981; 241: G275-G288
- Eaton S, Simons K. Apical, basal, and lateral cues for epithelial polarization. *Cell* 1995; 82: 5-8
- Drubin DG, Nelson WJ. Origins of cell polarity. *Cell* 1996; 84: 335-344
- Balda MS, Matter K. Tight junctions. *J Cell Sci* 1998; 111 (Pt 5): 541-547
- Takaki Y, Hirai S, Manabe N, Izumi Y, Hirose T, Nakaya M, Suzuki A, Mizuno K, Akimoto K, Tsukita S, Shuin T, Ohno S. Dynamic changes in protein components of the tight junction during liver regeneration. *Cell Tissue Res* 2001; 305: 399-409
- Yamamoto T, Kojima T, Murata M, Takano K, Go M, Hatakeyama N, Chiba H, Sawada N. p38 MAP-kinase regulates function of gap and tight junctions during regeneration of rat hepatocytes. *J Hepatol* 2005; 42: 707-718
- Green RM, Gollan JL, Hagenbuch B, Meier PJ, Beier DR. Regulation of hepatocyte bile salt transporters during hepatic regeneration. *Am J Physiol* 1997; 273: G621-G627
- Gerloff T, Geier A, Stieger B, Hagenbuch B, Meier PJ, Matern S, Gartung C. Differential expression of basolateral and canalicular organic anion transporters during regeneration of rat liver. *Gastroenterology* 1999; 117: 1408-1415
- Vos TA, Ros JE, Havinga R, Moshage H, Kuipers F, Jansen PL, Müller M. Regulation of hepatic transport systems involved in bile secretion during liver regeneration in rats. *Hepatology* 1999; 29: 1833-1839
- Kojima T, Yamamoto T, Murata M, Chiba H, Kokai Y, Sawada N. Regulation of the blood-biliary barrier: interaction between gap and tight junctions in hepatocytes. *Med Electron Microsc* 2003; 36: 157-164
- Schmöcker C, Weylandt KH, Kahlke L, Wang J, Lobeck H, Tiegs G, Berg T, Kang JX. Omega-3 fatty acids alleviate chemically induced acute hepatitis by suppression of cytokines. *Hepatology* 2007; 45: 864-869
- Willemsen LE, Koetsier MA, Balvers M, Beermann C, Stahl B, van Tol EA. Polyunsaturated fatty acids support epithelial barrier integrity and reduce IL-4 mediated permeability in vitro. *Eur J Nutr* 2008; 47: 183-191
- Bonis PA, Chung M, Tatsioni A, Sun Y, Kupelnick B, Lichtenstein A, Perrone R, Chew P, DeVine D, Lau J.

- Effects of omega-3 fatty acids on organ transplantation. *Evid Rep Technol Assess* (Summ) 2005; 1-11
- 17 Gura KM, Duggan CP, Collier SB, Jennings RW, Folkman J, Bistrian BR, Puder M. Reversal of parenteral nutrition-associated liver disease in two infants with short bowel syndrome using parenteral fish oil: implications for future management. *Pediatrics* 2006; 118: e197-e201
- 18 Qiu Y, Wang M, Tan T, Yuan X, Ding Y. Effects of n-3 polyunsaturated fatty acids on hepatic tight junction after partial hepatectomy in rats. *Transplant Proc* 2011; 43: 1480-1483
- 19 Hao W, Wong OY, Liu X, Lee P, Chen Y, Wong KK. ω -3 fatty acids suppress inflammatory cytokine production by macrophages and hepatocytes. *J Pediatr Surg* 2010; 45: 2412-2418
- 20 Higgins GM, Anderson RM. Experimental pathology of the liver. I. Restoration of the liver of the white rat following partial surgical removal. *Arch Pathol* 1931; 12: 186-202
- 21 Nguyen KT, Gamblin TC, Geller DA. World review of laparoscopic liver resection-2, 804 patients. *Ann Surg* 2009; 250: 831-841
- 22 Fan ST. Precise hepatectomy guided by the middle hepatic vein. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2007; 6: 430-434
- 23 吴孟超. 原发性肝癌的诊断及治疗进展. 中国医学科学院学报 2008; 30: 363-365
- 24 董家鸿, 黄志强. 精准肝切除-21世纪肝脏外科新理念. 中华外科杂志 2009; 47: 1601-1605
- 25 陈孝平, 吴在德. 肝切除治疗巨大肝癌(附65例报告). 中华普通外科杂志 1998; 13: 332-334
- 26 杨甲梅, 阚彤. 特大肝癌的手术切除(附86例报告). 中国实用外科杂志 1999; 19: 43-45
- 27 Lee WM. Acute liver failure. *N Engl J Med* 1993; 329: 1862-1872
- 28 O'Grady JG, Schalm SW, Williams R. Acute liver failure: redefining the syndromes. *Lancet* 1993; 342: 273-275
- 29 朱新华, 仇毓东, 吴亚夫, 周建新, 江春平, 丁义涛. 解剖性肝切除术后营养支持治疗的疗效分析. 肠内肠外营养杂志 2010; 11: 341-344
- 30 吴军, 仇毓东, 朱新华, 吴星宇, 周铁, 周建新. 原发性肝癌精准肝切除术后应用羟乙基淀粉的临床研究. 中国普通外科杂志 2011; 1: 1-5
- 31 Calder PC. Use of fish oil in parenteral nutrition: Rationale and reality. *Proc Nutr Soc* 2006; 65: 264-277
- 32 谈谈, 仇毓东, 王萌, 朱新华, 唐小乔, 丁义涛. ω -3不饱和脂肪酸对大鼠肝切除术后肠屏障的影响. 中华实验外科杂志 2010; 27: 1856-1858
- 33 Simopoulos AP. Omega-3 fatty acids in health and disease and in growth and development. *Am J Clin Nutr* 1991; 54: 438-463
- 34 Richard D, Kefi K, Barbe U, Bausero P, Visioli F. Polyunsaturated fatty acids as antioxidants. *Pharmacol Res* 2008; 57: 451-455
- 35 Calder PC. Polyunsaturated fatty acids and inflammatory processes: New twists in an old tale. *Biochimie* 2009; 91: 791-795

编辑 何基才 电编 何基才

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

• 消息 •

中国科技信息研究所发布《世界华人消化杂志》 影响因子 0.625

本刊讯 一年一度的中国科技论文统计结果11月26日由中国科技信息研究所(简称中信所)在北京发布。《中国科技期刊引证报告(核心版)》统计显示, 2009年《世界华人消化杂志》总被引频次3 009次, 影响因子0.625, 综合评价总分49.4分, 分别位居内科学类48种期刊的第6位、第9位、第6位, 分别位居1 946种中国科技论文统计源期刊(中国科技核心期刊)的第87位、第378位、第351位; 其他指标: 即年指标0.112, 他引率0.79, 引用刊数473种, 扩散因子15.72, 权威因子1 170.03, 被引半衰期4.0, 来源文献量752, 文献选出率0.93, 地区分布数30, 机构分布数30, 基金论文比0.39, 海外论文比0.01。

经过多项学术指标综合评定及同行专家评议推荐, 《世界华人消化杂志》再度被收录为“中国科技论文统计源期刊”(中国科技核心期刊)。(编辑部主任: 李军亮 2010-11-28)

实验性Beagle犬肥胖症并2型糖尿病模型的建立

付峻林, 朱惠明, 郑丽

■背景资料

手术治疗肥胖症并2型糖尿病在西方国家开展十分普及, 疗效明显, 已成为常用方法, 相似原理的内镜手术也已见报道, 但其机制并不清楚。当前相关机制研究多使用大鼠等小动物模型, 不太适合手术的干预研究。

付峻林, 暨南大学临床医学博士后流动站 广东省广州市 510632

朱惠明, 暨南大学第二附属医院消化科 广东省深圳市 518020

郑丽, 南昌大学第三附属医院消化科 江西省南昌市 3300088
付峻林, 医学博士, 副主任医师, 长期从事消化病及消化内镜治疗基础与临床研究。

作者贡献分布: 此课题由付峻林及朱惠明设计; 研究过程由付峻林及郑丽操作完成; 数据分析及本论文写作由付峻林与郑丽完成。

通讯作者: 付峻林, 副主任医师, 518020, 广东省深圳市东门北路1017号, 暨南大学第二附属医院消化科。fusuolin@163.com

收稿日期: 2011-06-16 修回日期: 2011-07-22

接受日期: 2011-08-26 在线出版日期: 2011-08-28

Establishment of a Beagle dog model of obesity and type 2 diabetes

Suo-Lin Fu, Hui-Ming Zhu, Li Zheng

Suo-Lin Fu, Clinical Medical Postdoctoral Research Station, Jinan University, Guangzhou 510632, Guangdong Province, China

Hui-Ming Zhu, Department of Gastroenterology, the Second Affiliated Hospital of Jinan University, Shenzhen 518020, Guangdong Province, China

Li Zheng, Department of Gastroenterology, the Third Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang 330008, Jiangxi Province, China.

Correspondence to: Suo-Lin Fu, Department of Gastroenterology, the Second Affiliated Hospital of Jinan University, 1017 North Dongmeng Road, Shenzhen 518020, Guangdong Province, China. fusuolin@163.com

Received: 2011-06-16 Revised: 2011-07-22

Accepted: 2011-08-26 Published online: 2011-08-28

Abstract

AIM: To establish a big animal model of obesity and type 2 diabetes for further investigation of surgical or endoscopic interventional therapy of this disease.

METHODS: Ten healthy adult male Beagle dogs were randomly and equally divided into two groups: control group and model group. The control group was feed a standard diet during the whole experiment (16 wk), while the model group was feed a high-fat hypercaloric diet. At week 8, the model group was intravenously injected with small dose of streptozotocin (STZ). The body mass, length, fasting blood glucose, intravenous glucose tolerance test (IVGTT), and

lipid were measured regularly.

RESULTS: At week 8, the average body mass ($16.9 \text{ kg} \pm 0.8 \text{ kg}$ vs $14.8 \text{ kg} \pm 1.03 \text{ kg}$, $P < 0.01$), Lee index ($P < 0.05$), serum insulin and c-peptide (both $P < 0.01$) were significantly higher in the model group than in the control group. One week after STZ injection, in the model group, the fast blood glucose was significantly higher than that in the control group ($P < 0.05$), IVGTT-2 h glucose was significantly higher than the pre-injection value ($143 \text{ mg/dL} \pm 7.4 \text{ mg/dL}$ vs $127 \text{ mg/dL} \pm 4.2 \text{ mg/dL}$, $P < 0.05$), and serum insulin and c-peptide decreased significantly ($P < 0.01$). Eight weeks after STZ injection, in the model group, the fast blood glucose was significantly higher than that in the control group ($P < 0.01$), and IVGTT-2h glucose was significantly higher than the pre-injection value ($323 \text{ mg/dL} \pm 12.1 \text{ mg/dL}$ vs $127 \text{ mg/dL} \pm 4.2 \text{ mg/dL}$, $P < 0.01$). All Beagle dogs were confirmed to have type 2 diabetes, and no Beagle dogs died during the experimental period.

CONCLUSION: A high-fat hypercaloric diet combined with intravenous injection of small dose of STZ can induce obesity and type 2 diabetes in Beagle dogs. This animal model mimics the nature history and metabolic characteristics of human type 2 diabetes and can be used for further investigation of surgical or endoscopic interventional therapy of obesity and type 2 diabetes.

Key Words: Type 2 Diabetes; Obesity; Animal model; Beagle dogs

Fu SL, Zhu HM, Zheng L. Establishment of a Beagle dog model of obesity and type 2 diabetes. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(24): 2534-2539

摘要

目的: 为肥胖症和2型糖尿病的手术和内镜介入治疗研究建立一种大型动物实验模型。

方法: 选用10只健康♂成年Beagle犬, 随机分成两组, 对照组5只全程(16 wk)给予标准饲料喂养, 模型组5只全程给予高脂高热量饲料喂

■同行评议者

徐庆, 教授, 桂林医学院药理教研室; 郝建宇, 教授, 首都医科大学附属北京朝阳医院消化内科

养,并于第8周给予小剂量链脲佐菌素(STZ)静脉注射.定时检测动物体质量、体长、空腹血糖、静脉葡萄糖实验(IVGTT)、血脂等与肥胖症及2型糖尿病相关临床指标.

结果:在第8周,模型组平均体质量是 $16.9\text{ kg} \pm 0.8\text{ kg}$,较对照组体质量($14.8\text{ kg} \pm 1.03\text{ kg}$)有显著升高($P<0.01$),Lee指数与对照组比较也有显著差异($P<0.05$);模型组血清胰岛素、C-肽较对照明显上升($P<0.01$).STZ注射后1 wk,模型组空腹血糖明显高于对照组($P<0.05$),IVGTT-2h血糖比注射前增高($143\text{ mg/dL} \pm 7.4\text{ mg/dL}$ vs $127\text{ mg/dL} \pm 4.2\text{ mg/dL}$, $P<0.05$),血清胰岛素、C-肽分泌比注射前明显下降($P<0.01$).STZ注射后8 wk,模型组空腹血糖显著高于对照组($P<0.01$),IVGTT-2 h血糖较注射前显著增高($323\text{ mg/dL} \pm 12.1\text{ mg/dL}$ vs $127\text{ mg/dL} \pm 4.2\text{ mg/dL}$, $P<0.01$).本实验模型组Beagle犬成模率为100%,实验期间Beagle犬未见死亡.

结论:联合高脂高热量喂养和小剂量STZ注射可在Beagle犬上成功建立肥胖症并2型糖尿病动物模型,此模型接近人类2型糖尿病的发病过程和代谢特征,可用于肥胖症和2型糖尿病的手术和内镜介入治疗的研究.

关键词: 2型糖尿病;肥胖症;动物模型;Beagle犬

付峻林, 朱惠明, 郑丽. 实验性Beagle犬肥胖症并2型糖尿病模型的建立. 世界华人消化杂志 2011; 19(24): 2534-2539
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/2534.asp>

0 引言

现代社会肥胖症(obesity)患者越来越多,肥胖症容易引发2型糖尿病(type 2 diabetes mellitus, T2DM)和代谢综合征(metabolic syndrome, MS)^[1].传统方法治疗此类慢性代谢疾病收效甚微,而手术治疗效果显著^[2,3],在国外十分普及,已成为标准的治疗方法,是目前国际上的研究热点^[4].目前手术方式已由传统的开放性手术转为腹腔镜操作^[5,6].随着腹腔镜减肥手术的广泛开展和逐渐成熟,内镜手术治疗代谢疾病已经开始进入各国学者的视野^[7].对减肥手术治疗肥胖症和T2DM的机制研究需要在动物模型上进行,到目前为止,多数研究以大鼠等啮齿类动物建立模型^[8],因其体型小并不能耐受手术及内镜治疗,因此,我们利用Beagle犬建立肥胖症并T2DM大型动物模型,为进一步的内镜减肥手术研究提供合适载体.

1 材料和方法

1.1 材料 纯种成年Beagle犬10只,体质量 $14\text{ kg} \pm 0.5\text{ kg}$,♂,12月龄,经心、肝、肾等常规生化指标检测未见异常,购于广东省康达实验动物中心.恒温恒湿环境条件下分笼饲养,每笼1只,每日定时定量喂食,自由饮水.

1.2 方法

1.2.1 分组及饲养:随机分为对照组和模型组,每组5只.对照组全程给予标准基础饲料($15\ 084\text{ kJ/d}$: 27%蛋白质, 38%碳水化合物, 35%脂肪, 购于北京华埠康生物科技公司).模型组全程给予高脂高热量饲料($21\ 369\text{ kJ/d}$: 20%蛋白质, 27%碳水化合物, 53%脂肪, 购于北京华埠康生物科技公司).本实验动物每日投喂量及饲料热量比较高,实验周期设置16 wk.模型组于第8周注射STZ. STZ注射前禁食12 h,自由饮水.速眠新(军需大学兽医研究所)0.08-0.10 mL/kg肌注麻醉Beagle犬,背位固定手术台,碘伏、750 mL/L酒精消毒表面皮肤,铺无菌单,注射STZ前先行右小隐静脉抽血,用于造模前两组Beagle犬血液指标检测.模型组Beagle犬从右小隐静脉一次性静脉推注 62.5 g/L 的STZ-柠檬酸溶液^[9],推注剂量为 22 mg/kg ,推注时间在3-4 min.正常对照组行0.9%生理盐水静脉注射.注射完毕后2组动物以0.9%生理盐水缓慢静脉滴注30 min.

1.2.2 检测指标及判定标准:每周检测Beagle犬体质量、鼻肛体长计算Lee指数(肥胖评定指数) $= \sqrt[3]{M(\text{g})} \times 10^3 / \text{体长}(\text{cm})$ (M为体质量)^[10].分别于STZ注射前(STZ 0 wk)、STZ注射后1 wk(STZ 1 wk)、4 wk(STZ 4 wk)、8 wk(STZ 8 wk)检测血脂、空腹血糖、IVGTT试验判定Beagle犬肥胖症并T2DM模型的建立.胰岛素抵抗和胰岛β细胞分泌功能不全是T2DM发病的两个重要病理生理基础,故本研究以Beagle犬产生胰岛素抵抗并胰岛B细胞功能下降,体质量大于对照组体质量的20%^[11],Lee指数较对照组显著增高^[10],空腹血糖 $>126\text{ mg/dL}$ (7.0 mmol/L)或者IVGTT试验2 h血糖 $>200\text{ mg/dL}$ (11.1 mmol/L)为模型建立成功.

统计学处理 计量资料以 $\text{mean} \pm \text{SD}$ 表示,采用SPSS13.0中的ANOVA程序进行单因素方差分析,组间比较采用 t 检验, $P<0.05$ 表示差异有统计学意义.

2 结果

2.1 Beagle犬肥胖症模型的建立

2.1.1 两组Beagle犬体质量的比较:随着饲养周

■ 研发前沿

减肥手术治疗肥胖症并2型糖尿病的机制研究成为代谢外科领域的研究热点,在临床应用已观察到其显著疗效,但其机制研究缺乏相应的大型动物模型.

■相关报道

Ionut等首次报道了利用大型动物狗通过高脂肪高热量饲料喂养联合链脲佐菌素化学损伤胰腺的方法成功制造出符合人类自然发病过程的肥胖症合并2型糖尿病模型,为手术或内镜治疗疗效观察及其机制研究提供了良好载体。

表 1 两组Beagle犬体重变化 (mean \pm SD, kg)

分组	4 wk	8 wk	Stz 1 wk	Stz 4 wk	Stz 8 wk
对照组	14.5 \pm 1.11	14.8 \pm 1.03	15.1 \pm 1.01	15.3 \pm 0.96	15.9 \pm 1.13
模型组	15.4 \pm 0.85 ^a	16.9 \pm 0.77 ^b	16.5 \pm 0.76 ^a	17.8 \pm 0.79 ^b	19.9 \pm 0.84 ^b

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs 对照组。

表 2 两组Beagle犬Lee指数变化 (mean \pm SD)

分组	4 wk	8 wk	Stz 1 wk	Stz 4 wk	Stz 8 wk
对照组	358.61 \pm 11.30	355.82 \pm 10.50	358.21 \pm 11.10	353.10 \pm 9.70	359.22 \pm 12.60
模型组	360.81 \pm 10.27	372.16 \pm 11.67 ^a	375.16 \pm 10.45 ^a	385.14 \pm 11.90 ^b	388.26 \pm 10.14 ^b

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs 对照组。

数的延长,模型组的体质量在实验4 wk后已高于对照组($P < 0.05$),这种差异随着时间延长逐渐加大($P < 0.01$)。模型组在8 wk的高脂热量饮食后,平均体质量是16.9 kg \pm 0.8 kg,较对照组体质量(14.8 kg \pm 1.03 kg)高14.2%。模型组在STZ注射后1 wk体质量略有下降,在STZ注射后4 wk、8 wk体质量呈加快增长趋势,至STZ注射后8 wk较对照组(15.9 kg \pm 1.13 kg)体质量高25.1%,提示模型组已发生肥胖(表1,图1)。

2.1.2 两组Beagle犬Lee指数的比较:第8周Lee指数模型组较对照组显著性增高($P < 0.05$)。Lee指数是通常采用的实验动物肥胖评定标准, Lee指数与体内脂肪呈显著正相关^[10],提示高脂高热量饮食后模型组已发生肥胖。STZ注射后4 wk, 8 wk Lee指数模型组较对照组显著性增高($P < 0.01$),表明持续高脂高热量因素使模型组动物仍保持肥胖(表2)。

2.2 Beagle犬T2DM模型的建立

2.2.1 两组Beagle犬空腹血糖变化:两组动物STZ注射前空腹血糖比较差异没有显著意义。STZ注射后1 wk测定两组Beagle犬空腹血糖差异有统计学意义(117 mg/dL \pm 3.6 mg/dL vs 88.2 mg/dL \pm 5.4 mg/dL, $P < 0.05$)。至STZ注射后4 wk两组动物空腹血糖有显著差异(171 mg/dL \pm 9.0 mg/dL vs 68.4 mg/dL \pm 1.8 mg/dL, $P < 0.01$)。模型组Beagle犬空腹血糖由STZ注射后1-8 wk逐渐达到糖尿病标准,并非在几天内全部复制成标准的糖尿病模型。

2.2.2 两组Beagle犬静脉葡萄糖实验结果:(1)STZ注射前两组Beagle犬胰岛素敏感性、

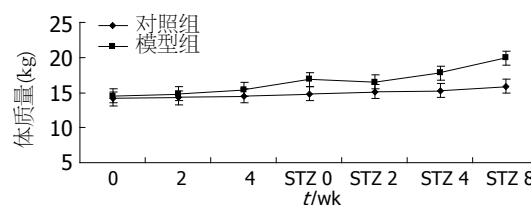


图 1 两组Beagle犬体重变化趋势。

糖耐量状态变化的比较。模型组胰岛素敏感性(insulin sensitivity, SI)[6.1 μ U/(mL \cdot min) \pm 0.8 μ U/(mL \cdot min)]较对照组[4.2 μ U/(mL \cdot min) \pm 0.3 μ U/(mL \cdot min)]下降, $P < 0.05$, 差异有统计学意义。胰岛素分泌(acute insulin response to glucose, AIRg)较对照组增高41.4%、C-肽(C-peptide)较对照组增高55%, 有显著统计学意义($P < 0.01$),可以看出模型组已通过高脂高热饲料诱导出胰岛素抵抗,胰岛素敏感性下降。葡萄糖处置指数(disposition index, DI, 胰岛素敏感度和胰岛素分泌的乘积),美国学者在2010欧洲糖尿病研究学会(EASD)年会上指出葡萄糖处置指数维持失败可导致糖耐量状态的恶化。模型组葡萄糖处置指数(3 024 \pm 487)较对照组(3 105 \pm 525)比较,无统计学意义,提示此阶段模型组动物尚未发生IGT; (2)STZ注射后模型组Beagle犬胰岛B细胞功能、糖耐量状态的变化。模型组Beagle犬在注射STZ前后胰岛素[720 μ U/(mL \cdot min) \pm 19.4 μ U/(mL \cdot min) vs 35 μ U/(mL \cdot min) \pm 3.2 μ U/(mL \cdot min), $P < 0.01$], c-肽(7 068 \pm 1 750 0-10 min, pM \cdot min vs 1 470 \pm 65 0-10 min, pM \cdot min, $P < 0.01$),提示STZ对胰岛B细胞的破坏作用,导致胰岛B细胞功能显著下降。STZ注射后第8周胰岛素[50 μ U/(mL \cdot min) \pm 2.1 μ U/(mL \cdot

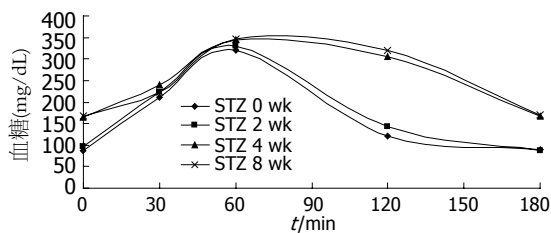


图2 模型组Beagle犬STZ注射前后IVGTT-2 h血糖变化。

min)]与STZ注射后第4周 $[46 \mu\text{U}/(\text{mL}\cdot\text{min})\pm 3.1 \mu\text{U}/(\text{mL}\cdot\text{min})]$ 维持平稳显示STZ对胰岛B细胞的破坏作用的持久性。STZ注射后葡萄糖处置指数 (108 ± 34) 与STZ注射前 $(3\ 024\pm 487)$ 比较有显著统计学差异($P<0.01$),说明Beagle犬在注射STZ后产生了IGT; (3)模型组注射STZ前后IVGTT-2 h血糖变化。模型组Beagle犬在STZ注射后1 wk的IVGTT-2h血糖 $(143\pm 7.4) \text{ mg/dL}$,产生糖耐量受损,在STZ注射后4 wk的IVGTT-2h血糖 $(305\pm 11.3) \text{ mg/dL}$,到STZ第8周与STZ第4周保持大致平稳,提示模型组Beagle犬已达到T2DM标准并维持稳定(图2)。

2.2.3 高脂喂养后Beagle犬血脂变化:至实验结束,模型组的血清总胆固醇(total cholesterol, TC) $(7.85 \text{ mmol/L}\pm 1.42 \text{ mmol/L})$ 、低密度脂蛋白(low-density lipoprotein, LDL) $(1.84 \text{ mmol/L}\pm 0.72 \text{ mmol/L})$ 水平明显高于对照组 $(4.51 \text{ mmol/L}\pm 1.20 \text{ mmol/L}, 0.28 \text{ mmol/L}\pm 0.03 \text{ mmol/L})$,有显著统计学差异($P<0.01$)。高密度脂蛋白(high-density lipoprotein, HDL) $(2.02 \text{ mmol/L}\pm 1.02 \text{ mmol/L})$ 与对照组 $(1.41 \text{ mmol/L}\pm 0.58 \text{ mmol/L})$ 相比无显著性差异,模型组三酰甘油(triglyceride, TG) $(3.04 \text{ mmol/L}\pm 1.12 \text{ mmol/L})$ 高于对照组 $(1.75 \text{ mmol/L}\pm 0.39 \text{ mmol/L})$,差异有统计学意义($P<0.01$)。提示模型组已产生部分代谢综合征特征。

3 讨论

目前,关于糖尿病和代谢综合征发病的确切机制仍不清楚。各项研究表明,主要与遗传和环境因素有关,而环境因素中,最主要的是肥胖。国际糖尿病联盟(IDF)认为肥胖,特别是腹型肥胖是T2DM发病的中心环节,建议将肥胖作为T2DM干预的首要或一级目标。可以推测,相当部分患者是因为肥胖引发胰岛素抵抗,同时高血脂和高血糖也可影响胰腺β细胞功能,造成胰岛素分泌功能障碍,逐渐发展成糖耐量异常,最后发展为糖尿病。临床上,肥胖症、血脂异常、

脂肪肝、高血压、冠心病、IGT或T2DM等疾病常同时或先后发生,并伴高胰岛素血症,目前认为这些均与肥胖及肥胖相关联的胰岛素抵抗有关,称为MS。MS患者常具有多重心血管危险因素,是心血管疾病的高危人群^[12,13]。可以认为肥胖症-T2DM-MS-心脑血管疾病是目前和未来除恶性肿瘤外最危害人类健康的问题,应及早预防和干预。因此,建立肥胖症-T2DM-MS发展模式的动物模型对此类疾病的治疗研究意义重大,而内镜手术治疗的探索则需要大型动物模型作依托。

用于T2DM研究的动物模型很多,包括老鼠、猫、猪、灵长类等动物,制备方式从基因打靶到化学诱导各式各样^[14-16]。然而,这些动物模型中能够模拟重现T2DM自然史及生理病理特点的很少,特别是肥胖相关的T2DM。研究证明,高脂高糖饮食和小剂量STZ破坏胰岛B细胞联合作用建立起来的T2DM动物模型与人类T2DM的发病机制接近,成模率高,稳定,重复性好^[17,18]。我们的研究利用此模式在Beagle犬身上成功的建立起一种类似人类T2DM代谢特征的动物模型,他由早期的肥胖引发的胰岛素抵抗逐渐发展成胰岛B细胞功能缺陷、对胰岛素无法代偿时最终进展成IGT和T2DM。

相关研究证明,狗的肥胖多与饮食模式和热量摄入有关^[19]。在我们的研究中,运用高脂高热量饲料给予实验组动物饲养4 wk后其体质量增长较对照组比较有统计学意义($P<0.05$)。判断人类肥胖的常用指标是体质量指数(body mass index, BMI),但还没有明确的指标用来界定狗的肥胖状况,有研究采用一种基于视觉观察、形态测量等基础上的体况评分(body condition score, BCS)来界定狗的体质量是标准、超重或者肥胖^[20]。相关报道认为,狗的体质量超过正常的15%^[21]或者20%^[11]可界定成肥胖。本研究采用Lee指数及体质量来判断狗肥胖模型的建立,模型组在给予高脂高热量饮食8 wk后, Lee指数与对照组比较有显著差异($P<0.05$),证实高脂高热量饮食可诱导Beagle犬肥胖症的产生。至实验结束模型组平均体质量 $(19.9 \text{ kg}\pm 0.84 \text{ kg})$ 较对照组体质量 $(15.9 \text{ kg}\pm 1.13 \text{ kg})$ 高25.1%,达到狗的肥胖诊断标准。胰岛素抵抗常伴随肥胖而产生,有研究显示狗在高脂高热量喂养1 wk开始出现胰岛素抵抗并持续整个高脂高热量喂养过程^[9],本研究中Beagle犬在高脂高热量饲料喂养8 wk行IVGTT,胰岛素分泌、C-肽显著高于正常对照

■创新盘点

本研究首次在大实验动物Beagle犬制造出肥胖症并2型糖尿病模型,为需要该种模型的研究提供了稳定可靠的来源。

■同行评价

本文设计合理, 数据可靠, 在目前很少大动物糖尿病模型的情况下, 该模型的建立对于糖尿病的研究有一定价值及意义。

组, 而血糖与对照组比较没有统计学差异, 这与文献报道相一致^[22,23], 模拟了人类T2DM早期存在肥胖相关的胰岛素抵抗而胰岛B细胞可代偿性增加胰岛素分泌来维持血糖正常这一重要特征。

本实验的第二阶段是注射小剂量的STZ破坏胰岛B细胞造成胰岛B细胞功能缺陷, 进而最终发展成IGT和T2DM。自从20世纪60年代和70年代开始, 利用STZ诱发动动物糖尿病模型以来^[24-26], STZ已经成为目前广泛采用的糖尿病动物模型化学诱导剂。STZ诱导的糖尿病因剂量不同, 其成模效果也有所差别, 肝肾毒性是其主要缺点^[27], STZ剂量过大对动物肝肾损伤大并且易导致动物死亡, 过小则难以成模或自然阴转率高。国内外尤其国外对STZ诱导的灵长类动物糖尿病模型研究较多, 对造模狗的最适剂量的报道不尽相同, STZ的各种剂量(15-150 mg/kg)均可见报道。有研究显示狗STZ注射的半致死剂量为50 mg/kg, 与致DM的剂量非常接近^[28], 故有重复多次小剂量STZ注射制备DM的报道^[29]。本研究旨在Beagle犬上重现人类T2DM的肥胖-胰岛素抵抗-糖耐量调节受损-T2DM自然发展过程, 故给带有肥胖症伴随胰岛素抵抗的Beagle犬谨慎的采取了22 mg/kg的小剂量的STZ静脉注射量, 使模型组动物逐渐复制成T2DM。模型组动物在注射STZ后的1 wk的静脉葡萄糖耐量试验显示胰岛素分泌量较STZ注射前显著减少, 这表明注射STZ后对胰岛B细胞的破坏作用。本实验在STZ注射后1 wk模型组动物因食欲下降饮食减少体质量曾有一过性下降, 1 wk后所有模型组动物逐渐恢复饮食, 并出现多饮多食多尿症状。有文献报道, 当犬类的随机血糖>200 mg/dL(11.1 mmol/L), 并伴随糖尿病症状时可诊断为DM^[30], 这与人类DM极为一致。本实验STZ注射后1 wk, 模型组动物空腹血糖波动在112-121 mg/dl之间, IVGTT-2 h血糖在142-191 mg/dL之间, 均表现有糖耐量调节受损。注射后8 wk模型组动物空腹血糖波动在164-185 mg/dL之间, IVGTT-2 h血糖在230-320 mg/dL之间, 表明模型组Beagle犬是逐渐全部复制成DM模型而非在几天内全部复制成标准的DM模型。本实验结束时模型组Beagle犬血脂较对照组明显增高, 已具备部分代谢综合征特征。有关研究显示, STZ运用于犬类制备DM动物模型剂量较大^[28], 本实验采取小剂量STZ静脉注射能够成功制备T2DM很可能是因为动物处于肥胖并胰岛素抵抗阶段。

尽管至今还没有一种公认的理想动物模型

与人类T2DM的复杂特征完全吻合, 但本实验建立了一种新的综合了肥胖, 胰岛素抵抗和胰岛B细胞功能缺陷等特征的T2DM大型动物模型, 他有诸多类似人类T2DM的特征: 成人发病, 多数症状较轻, 肥胖, 胰岛素抵抗及首先出现胰岛素抵抗和代偿性高胰岛素血症, 之后出现胰腺功能下降、糖耐量受损这一自然发展过程。这给T2DM的疾病发展模式提供了一定见解。本研究建立的Beagle犬肥胖症并T2DM模型, 模型稳定安全, 肝肾功能损害小, 动物糖尿病症状多较轻, 体质状况良好, 不需要胰岛素治疗, 耐受性较好, 适用于肥胖症和T2DM的手术和内镜介入治疗的研究。

4 参考文献

- 1 卫生部疾病控制司, 中华医学会糖尿病学分会. 《中国糖尿病防治指南》(试行本)(节选). 中国慢性病预防与控制 2004; 12: 283-285
- 2 Pories WJ, MacDonald KG, Flickinger EG, Dohm GL, Sinha MK, Barakat HA, May HJ, Khazanie P, Swanson MS, Morgan E. Is type II diabetes mellitus (NIDDM) a surgical disease? *Ann Surg* 1992; 215: 633-642; discussion 643
- 3 Rubino F, Forgione A, Cummings DE, Vix M, Gnuli D, Mingrone G, Castagneto M, Marescaux J. The mechanism of diabetes control after gastrointestinal bypass surgery reveals a role of the proximal small intestine in the pathophysiology of type 2 diabetes. *Ann Surg* 2006; 244: 741-749
- 4 Rubino F, Marescaux J. Effect of duodenal-jejunal exclusion in a non-obese animal model of type 2 diabetes: a new perspective for an old disease. *Ann Surg* 2004; 239: 1-11
- 5 Higa KD, Boone KB, Ho T, Davies OG. Laparoscopic Roux-en-Y gastric bypass for morbid obesity: technique and preliminary results of our first 400 patients. *Arch Surg* 2000; 135: 1029-1033; discussion 1029-1033
- 6 DeMaria EJ, Sugerman HJ, Kellum JM, Meador JG, Wolfe LG. Results of 281 consecutive total laparoscopic Roux-en-Y gastric bypasses to treat morbid obesity. *Ann Surg* 2002; 235: 640-645; discussion 640-645
- 7 付峻林, 朱惠明. 手术治疗肥胖症并2型糖尿病的现状分析及前景展望. 世界华人消化杂志 2010; 18: 2453-2459
- 8 田婷, 马向华, 沈捷. 2型糖尿病动物模型研究概况. 医学综述 2011; 17: 905-908
- 9 Ionut V, Liu H, Mooradian V, Castro AV, Kabir M, Stefanovski D, Zheng D, Kirkman EL, Bergman RN. Novel canine models of obese prediabetes and mild type 2 diabetes. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2010; 298: E38-E48
- 10 Bernardis LL, Patterson BD. Correlation between 'Lee index' and carcass fat content in weanling and adult female rats with hypothalamic lesions. *J Endocrinol* 1968; 40: 527-528
- 11 German AJ, Holden SL, Bissot T, Morris PJ, Biourge V. Use of starting condition score to estimate changes in body weight and composition during weight loss in obese dogs. *Res Vet Sci* 2009; 87: 249-254

- 12 Gupta S, Gupta BM. Metabolic syndrome: diabetes and cardiovascular disease. *Indian Heart J* 2006; 58: 149-152
- 13 Guize L, Pannier B, Thomas F, Bean K, Jégo B, Benetos A. Recent advances in metabolic syndrome and cardiovascular disease. *Arch Cardiovasc Dis* 2008; 101: 577-583
- 14 Masiello P. Animal models of type 2 diabetes with reduced pancreatic beta-cell mass. *Int J Biochem Cell Biol* 2006; 38: 873-893
- 15 孙兆峰, 王利, 夏作理. 2型糖尿病动物模型研究概要. *中国微循环* 2008; 12: 187-189
- 16 Srinivasan K, Ramarao P. Animal models in type 2 diabetes research: an overview. *Indian J Med Res* 2007; 125: 451-472
- 17 Srinivasan K, Viswanad B, Asrat L, Kaul CL, Ramarao P. Combination of high-fat diet-fed and low-dose streptozotocin-treated rat: a model for type 2 diabetes and pharmacological screening. *Pharmacol Res* 2005; 52: 313-320
- 18 Wang HJ, Jin YX, Shen W, Neng J, Wu T, Li YJ, Fu ZW. Low dose streptozotocin (STZ) combined with high energy intake can effectively induce type 2 diabetes through altering the related gene expression. *Asia Pac J Clin Nutr* 2007; 16 Suppl 1: 412-417
- 19 Heuberger R, Wakshlag J. The relationship of feeding patterns and obesity in dogs. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)* 2011; 95: 98-105
- 20 Mawby DI, Bartges JW, d'Avignon A, Laflamme DP, Moyers TD, Cottrell T. Comparison of various methods for estimating body fat in dogs. *J Am Anim Hosp Assoc* 2004; 40: 109-114
- 21 Colliard L, Ancel J, Benet JJ, Paragon BM, Blanchard G. Risk factors for obesity in dogs in France. *J Nutr* 2006; 136: 1951S-1954S
- 22 Mittelman SD, Van Citters GW, Kim SP, Davis DA, Dea MK, Hamilton-Wessler M, Bergman RN. Longitudinal compensation for fat-induced insulin resistance includes reduced insulin clearance and enhanced beta-cell response. *Diabetes* 2000; 49: 2116-2125
- 23 Verkest KR, Fleeman LM, Rand JS, Morton JM. Evaluation of beta-cell sensitivity to glucose and first-phase insulin secretion in obese dogs. *Am J Vet Res* 2011; 72: 357-366
- 24 Rakieten N, Rakieten ML, Nadkarni MR. Studies on the diabetogenic action of streptozotocin (NSC-37917). *Cancer Chemother Rep* 1963; 29: 91-98
- 25 Erdal N, Gürgül S, Kavak S, Yildiz A, Emre M. Deterioration of bone quality by streptozotocin (STZ)-induced type 2 diabetes mellitus in rats. *Biol Trace Elem Res* 2011; 140: 342-353
- 26 Black HE, Rosenblum IY, Capen CC. Chemically induced (streptozotocin-alloxan) diabetes mellitus in the dog. Biochemical and ultrastructural studies. *Am J Pathol* 1980; 98: 295-310
- 27 Dufrane D, van Steenberghe M, Guiot Y, Goebbels RM, Saliez A, Gianello P. Streptozotocin-induced diabetes in large animals (pigs/primates): role of GLUT2 transporter and beta-cell plasticity. *Transplantation* 2006; 81: 36-45
- 28 Rerup CC. Drugs producing diabetes through damage of the insulin secreting cells. *Pharmacol Rev* 1970; 22: 485-518
- 29 Tobin BL, Finegood DT. Reduced insulin secretion by repeated low doses of STZ impairs glucose effectiveness but does not induce insulin resistance in dogs. *Diabetes* 1993; 42: 474-483
- 30 Stockham SL, Scott MA. Fundamentals of Veterinary Clinical Pathology. Ames, IA: Iowa State Press, A Blackwell Publishing Company, 2000.

编辑 李薇 电编 何基才

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

• 消息 •

WJG 成功通过评审被 PMC 收录

本刊讯 PubMed Central(PMC)是由美国国家医学图书馆(NLM)下属国家生物技术信息中心(NCBI)创立的开放存取(Open Access)的生物医学和生命科学全文数据库。此数据库只收录采取国际同行评审制度评议的期刊,并对收录期刊有较高的科学、编辑及数据文件质量要求。

截至目前,我国只有两本期刊被PMC收录。《浙江大学学报B》(英文版)(*Journal of Zhejiang University Science B*)是我国第一本通过PMC评审并于2006-03-15被收录的期刊。《世界胃肠病学杂志》(英文版)(*World Journal of Gastroenterology, WJG*)第二本通过PMC评审并于2009-03-26被收录,全文免费向公众开放,见: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/tocrender.fcgi?journal=818&action=archive> (WJG编辑部主任:程剑侠 2009-03-26)

整合素在胃癌侵袭转移及靶向药物治疗中的研究进展

罗登, 郑梦瑶, 黄华

■背景资料

胃癌是临床上最常见的恶性肿瘤之一, 在世界范围内有很高的发病率和死亡率。侵袭和转移是恶性肿瘤的重要特征, 也是导致胃癌患者死亡的最主要原因。探索整合素在胃癌侵袭和转移过程中的分子作用机制可为胃癌的分子靶向治疗提供潜在的理论基础。

罗登, 郑梦瑶, 黄华, 昆明医学院第二附属医院消化内科 云南省昆明市 650101

作者贡献分布: 本文综述由罗登完成; 文献资料由郑梦瑶收集; 黄华审校。

通讯作者: 黄华, 主任医师, 硕士生导师, 650101, 云南省昆明市西山区麻园1号, 昆明医学院第二附属医院消化内科。hhtrq@163.com

收稿日期: 2011-06-24 修回日期: 2011-08-25

接受日期: 2011-08-26 在线出版日期: 2011-08-28

Role of integrins in invasion and metastasis of gastric cancer: potential therapeutic implications

Deng Luo, Meng-Yao Zheng, Hua Huang

Deng Luo, Meng-Yao Zheng, Hua Huang, Department of Gastroenterology, the Second Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming 650101, Yunnan Province, China

Correspondence to: Professor Hua Huang, Department of Gastroenterology, the Second Affiliated Hospital of Kunming Medical University, 1 Mayuan Road, Xishan District, Kunming 650101, Yunnan Province, China. hhtrq@163.com

Received: 2011-06-24 Revised: 2011-08-25

Accepted: 2011-08-26 Published online: 2011-08-28

Abstract

Integrins are a large family of cell adhesion molecules that are involved in many important cellular and pathological functions including cell survival, growth, differentiation, migration, inflammatory responses, platelet aggregation, tissue repair and tumor invasion. Over the past two decades, several integrin-targeted drugs have made their way into clinical practice, many others are increasing each year in clinical trials and still more are showing promising potential for therapeutic development based on preclinical studies. Additionally, the role of integrins in pathological conditions combined with their druggability by means of cell surface accessibility makes them attractive pharmacological targets in cancer research. As such, the identification of key roles of integrins in gastric cancer has revealed their substantial potential as therapeutic targets. This review summarizes recent progress in the study of correlation between

integrins and invasion and metastasis of gastric cancer and evaluates their values in developing molecularly targeted therapies for this disease.

Key Words: Integrins; Gastric cancer; Molecularly targeted therapy; Invasion; Metastasis

Luo D, Zheng MY, Huang H. Role of integrins in invasion and metastasis of gastric cancer: potential therapeutic implications. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(24): 2540-2545

摘要

整合素作为黏附分子中的一大类家族, 广泛的参与机体的各种病理生理活动, 包括细胞生存、生长、分化、迁移、炎症反应、血小板聚集、组织修复以及肿瘤侵袭转移等多个过程。自整合素发现20多年来, 已有许多整合素介导的靶向药物相继应用于临床, 而且每年有更多新的药物进行临床试验, 其中有些药物显示出广阔的临床应用前景。此外, 基于整合素在肿瘤细胞中的特殊病理作用, 以及作为细胞膜表面药物的可及性和成药性, 使其逐渐成为肿瘤靶向药物治疗中的研究热点。正因如此, 探索整合素在胃癌中的作用可为胃癌的分子靶向治疗提供潜在的理论基础。本文就整合素在胃癌侵袭转移及靶向药物治疗中的相关研究进展作一综述。

关键词: 整合素; 胃癌; 分子靶向治疗; 侵袭; 转移

罗登, 郑梦瑶, 黄华. 整合素在胃癌侵袭转移及靶向药物治疗中的研究进展. *世界华人消化杂志* 2011; 19(24): 2540-2545
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/2540.asp>

0 引言

胃癌(gastric cancer)是起源于胃黏膜上皮细胞的恶性肿瘤, 是临床上最常见的恶性肿瘤之一, 在世界范围内有很高的发病率和死亡率^[1]。侵袭和转移是恶性肿瘤的重要特征, 也是导致胃癌患者死亡的最主要原因。因此, 对胃癌的早期诊断和减少中晚期胃癌转移是当今胃癌治疗的研究热点^[2]。随着分子生物学技术的进步, 在探索细

■同行评议者

邵先玉, 主任医师, 泰山医学院附属医院消化内科

胞分子生命活动中发现, 细胞与细胞、细胞与细胞外基质黏附及相互作用, 是机体构建完整的组织、器官形态结构并行使生理功能最基本的生命现象之一。而深入研究发现, 参与细胞与细胞、细胞与细胞外基质黏附作用的物质是一些在多种细胞上表达、本质上属糖蛋白的细胞黏附分子(cell adhesion molecules, CAMs)^[3]。到目前为止, 根据结构与功能, 细胞黏附分子被分为5大类: 整合素(integrins)、选择素(selectins)、免疫球蛋白超家族(immunoglobulin superfamily)、钙黏附分子(cadherins)以及其他尚未归类的黏附分子(CD15、CD15s、CD44、MA₁、MLA)^[4]。本文就整合素在胃癌侵袭转移及靶向药物治疗中的研究进展作一综述。

1 整合素概述

整合素(integrins, 亦称整联蛋白), 最早发现于1986年, 是表达在细胞表面的一种异构二聚体, 其本质是一种跨膜糖蛋白, 属于黏附分子的范畴, 起到连接细胞骨架与细胞外基质的作用, 维持细胞和组织结构的完整性以及启动细胞内外双向信号的传递作用^[5,6]。研究发现, 整合素是由 α (120-185 kDa)和 β (90-110 kDa)两个亚单位形成的异二聚体。迄今在哺乳类动物中, 已被确认的至少有24种整合素, 分别由18种 α 亚单位和8种 β 亚单位按不同的组合构成。整合素种类较多, 分布广泛, 由其介导的细胞间或细胞与细胞外基质间的黏附作用普遍存在于机体的病理生理过程之中, 包括细胞生存、生长、分化、迁移、炎症反应、血小板聚集、组织修复以及肿瘤的侵袭转移等^[7,8]。基于整合素在血管形成、白细胞功能及肿瘤生长中的作用, 针对整合素的不同亚基而研发的克隆抗体和整合素抑制剂, 结合靶向调节整合素基因表达、整合素介导的溶细胞作用以及肿瘤细胞的整合素疫苗等方法, 全面调节整合素的生物学作用, 促进肿瘤细胞凋亡, 抑制肿瘤血管的生成, 阻断肿瘤细胞的侵袭转移, 从而达到治疗肿瘤的目的^[9]。经过20多年的研究, 在临床应用方面已经取得了举世瞩目的成果。

2 整合素的结构和功能

整合素是由 α 亚单位和 β 亚单位以非共价键的形式连接成的异二聚体。在脊椎动物中, 根据18种 α 亚单位和8种 β 亚单位的连接特点以及组织分布的不同, 构成了至少24种不同的受体。整合素

的每个亚单位都由一个细胞外结构域、一条简单的跨膜螺旋以及较短的胞质尾区构成^[10]。晶体学和电镜研究发现^[11], α 链与 β 链之间结合非常灵活, 在空间排列上呈静息状态下倒置的“V”字型, 部分激活状态下呈延伸位的中间型以及完全激活呈伸展构象的配体结合型三种形态。其中, 整合素亚单位上的I结构域(I domain)是识别配体最重要的区域, 包括 α 亚单位上的 α I结构域和 β 亚单位上的 β I结构域。 α I结构域和 β I结构域上都包含有一个金属离子结合位点(MIDAS), 在与配体结合时发挥重要作用。配体结合后能引起这些结构的变构改变, 从而启动由细胞外向胞内的信号传导。另外, 细胞内的胞质尾区在一些蛋白的调节下也可启动细胞内向胞外的信号传导。因此, 整合素是通过双向信号传导途径来调节细胞的生物学活动的。基于以上结构特点, 整合素具有广泛的生物学作用, 在介导细胞黏附, 炎症反应, 损伤修复, 胚胎发育, 病毒感染, 肿瘤的生长以及侵袭转移等方面发挥着重要作用。

3 整合素与胃癌的关系

迄今为止, 在已经确定的24种整合素中, 发现 α v β 1、 α v β 3、 α v β 5、 α v β 6、 α 2 β 1、 α 3 β 1、 α 4 β 1、 α 5 β 1、 α 6 β 1、 α 6 β 4等可能在肿瘤的生长、新生血管形成以及促进肿瘤侵袭转移中起到关键作用^[12]。其中, 在胃癌研究中较多的主要有以下几种。

3.1 α v β 6与胃癌 整合素 α v β 6是由 α 、 β 亚单位以非共价键结合组成的跨膜异二聚体, 是唯一仅存于恶性上皮肿瘤的特殊整合素亚型。整合素 α v β 6在胚胎发育时处于高表达状态, 成年后的健康组织及良性肿瘤组织中几乎无表达。然而, 在组织发生损伤炎症或肿瘤形成时, α v β 6表达增加, 促进上皮细胞增殖、炎症细胞迁移至损伤部位, 有利于上皮组织的重建或促进肿瘤的发生、发展^[13]。现已确定, 整合素 α v β 6可在乳腺癌、胰腺癌、卵巢癌、胃癌以及结肠癌等多种肿瘤中表达, 也有报道在结肠癌肝转移中也检测到其表达^[14,15]。为探索 α v β 6与胃癌的关系, 2003年, Kawashima等^[16]利用反转录聚合酶链反应技术(reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR)检测整合素 α v亚单位在胃癌中的表达时发现, α v β 6的表达显著高于非肿瘤性的胃黏膜组织。18例胃癌组织中 α v β 6阳性表达17例(94%), 免疫组织化学检测证实伴有淋巴

■ 研发前沿

整合素自1986年发现以来, 已有许多整合素介导的靶向药物相继应用于临床, 在急性冠脉综合征、多发性硬化、克罗恩病、骨质疏松症等疾病的治疗中扮演着重要角色。此外, 基于整合素在肿瘤细胞中的特殊病理作用, 以及作为细胞膜表面药物的可及性和成药性, 使其逐渐成为肿瘤靶向药物治疗中的研究热点。但因种类繁多, 功能错综复杂, 生物学作用确切机制目前还尚未完全清楚, 而且在介导肿瘤的侵袭和转移方面可能存在多种整合素协同或拮抗作用, 具体机制有待进一步阐明。

■创新盘点

本文全面总结了整合素在胃癌侵袭转移中的相关研究, 希望能为胃癌的分子靶向治疗提供潜在的理论基础。此外, 本文还对以整合素为靶点的肿瘤治疗相关策略以及目前的靶向药物研究状况和热点进行了介绍。

结转移的28例胃癌组织中, 23例 $\alpha v \beta 6$ 呈阳性表达(82%); 首次证明了整合素 $\alpha v \beta 6$ 与胃癌淋巴结转移密切相关。2008年, Zhang等^[17]用免疫组织化学检测300例胃癌组织标本 $\alpha v \beta 6$ 的表达, 分析其与临床病理特征及预后的关系, 发现 $\alpha v \beta 6$ 阳性表达率为36.7%, 与肿瘤病理类型、分化程度、淋巴结转移、TNM分期密切相关。Kaplan-Meier生存分析显示 $\alpha v \beta 6$ 阳性表达患者生存期限明显缩短, 可作为胃癌的独立预后指标。同时, Zhang等在研究 $\alpha v \beta 6$ 在结肠癌表达中发现, $\alpha v \beta 6$ 在结肠癌细胞的凋亡中起到重要作用, 阻断 $\alpha v \beta 6$ 功能后发现结肠癌凋亡细胞数明显增加。由此认为可作为结肠癌预后指标, 与胃癌的研究基本一致。2010年, Zhao等^[18]在探索血管内皮生长因子(VEGF)调控胃癌侵袭转移作用的实验中发现, 整合素 $\alpha v \beta 6$ 阳性的胃癌中, 大多VEGF也呈阳性, 并且VEGF可能通过调控 $\alpha v \beta 6$ 的表达以及激活细胞外调节激酶(extracellular signal-related kinase, ERK)通路来促进胃癌的侵袭转移。2010年刘松等^[19]用单克隆抗体10D5封闭胃癌AGS细胞表面的 $\alpha v \beta 6$, 以探索其在细胞增殖和凋亡中的作用。实验发现, $\alpha v \beta 6$ 被10D5封闭后, 与对照组和10D5阴性对照剂IgG2a处理组相比, 胃癌AGS细胞的存活率下降, 而凋亡率和caspase-3蛋白表达水平增加, 再次证明 $\alpha v \beta 6$ 表达可促进肿瘤细胞增殖, 抑制细胞凋亡, 在胃癌细胞恶性生物学行为中发挥重要作用。

3.2 $\alpha 2 \beta 1$ 与胃癌 整合素 $\alpha 2 \beta 1$ 作为基质和非基质配体的特殊受体, 可与胶原蛋白(collagens)、层粘连蛋白(laminins)、饰胶蛋白聚糖(decorin)、E-钙黏蛋白(E-cadherin)、基质金属蛋白酶-1(matrix metalloproteinase-1, MMP-1)、血管生成抑制剂(endorepellin)以及某些病毒结合而调节细胞的生命活动。尽管 $\alpha 2 \beta 1$ 表达于上皮细胞、内皮细胞、成纤维细胞、血小板及白细胞等多种细胞, 但其功能还是较为独特的。之前研究均显示, $\alpha 2 \beta 1$ 在机体免疫过程中发挥着重要作用^[20,21]。不仅如此, $\alpha 2 \beta 1$ 也可在包括胃癌在内的多种肿瘤中表达并参与其中^[22]。1996年, Nishimura等^[23]在研究胃硬癌腹腔种植转移时发现, 在引起腹腔种植转移的细胞系中 $\alpha 2 \beta 1$ 表达明显增强, 并且用 $\alpha 2 \beta 1$ 抗体可明显抑制其腹腔种植发生, 说明 $\alpha 2 \beta 1$ 可能参与侵袭转移的过程。1998年, Ura等^[24]用免疫组织化学法分析110例胃癌中 $\alpha 2 \beta 1$ 的表达, 结果显示27%胃癌组织中表达 $\alpha 2 \beta 1$, 并且与淋巴结及肝转移有相关性

($P < 0.05$)。2001年, Kawamura等^[25]在活体异种移植模型的研究中, 发现具有高度转移性的MKN-45-P胃癌细胞与 $\alpha 2$ 亚单位具有明显相关性; 在活体粘着实验(adhesion assay)中, 用 $\alpha 2$ 或 $\beta 1$ 抗体可抑制MKN-45-P胃癌细胞黏附到I和IV型胶原蛋白; 另外, 在体内注射过MKN-45-P胃癌细胞的裸鼠中, 用 $\beta 1$ 抗体可减少腹膜种植的癌细胞数量。2007年, Lin等^[26]研究发现, Cysteine-rich 61(Cyr61/CCN1)可能通过AP-1途径上调 $\alpha 2 \beta 1$ 在胃癌细胞中的表达和增强肿瘤细胞的黏附力, 从而促进胃癌的腹膜腔种植转移。由此可见, $\alpha 2 \beta 1$ 可作为预防胃癌腹膜腔种植转移的潜在治疗靶点, 具有广泛的临床应用价值。

3.3 $\alpha 3 \beta 1$ 与胃癌 整合素 $\alpha 3 \beta 1$ 是整合素家族中较为特殊的一种, 其功能复杂多样。其在肿瘤的作用也是潜在的研究热点。一些早期的活体和体外研究证实, $\alpha 3 \beta 1$ 在肿瘤中表达可能下调, 尤其在上皮源性肿瘤, 这可能与 $\alpha 3 \beta 1$ 和邻近基膜相互作用抑制上皮细胞的侵袭行为的预测相符合。然而, 最近的一些研究发现, $\alpha 3 \beta 1$ 可能促进某些肿瘤的侵袭性, 尤其在一些非上皮源性的肿瘤, 这些肿瘤可表达层粘连蛋白-5(laminin-5)^[27,28]。Nishimura和Ura等^[23, 24]两个小组研究发现, $\alpha 3 \beta 1$ 和 $\alpha 3 \beta 1$ 与胃癌的肝转移相关, $\alpha 3 \beta 1$ 对胃癌细胞腹膜浸润的深度影响较为明显, 说明 $\alpha 3 \beta 1$ 和 $\alpha 3 \beta 1$ 均参与了肿瘤的侵袭转移, 但功能却各异。2004年, Takatsuki等^[29]研究再次证实, $\alpha 3 \beta 1$ 在胃癌的腹膜转移中起到关键作用。2010年, Saito等^[30]研究显示, $\alpha 3 \beta 1$ 可与laminin-5相互作用, 调节肿瘤细胞分泌基质金属蛋白酶-9(MMP-9)而降解细胞外基质, 增加肿瘤细胞的侵袭性。

3.4 $\alpha 6 \beta 4$ 与胃癌 $\alpha 6 \beta 4$ 是整合素家族中结构和功能较为特殊的一种, 也是由 $\alpha 6$ 和 $\beta 4$ 两个亚单位构成, 属整合素型层粘连蛋白受体, 主要表达于大多数上皮细胞, 也可表达于如胸腺细胞、成纤维细胞、施旺细胞等少数细胞^[31]。研究发现, $\alpha 6 \beta 4$ 的主要功能之一就形成和稳定半桥粒结构, 而后者是维持上皮组织结构完整性重要结构基础。另外, 还证实在侵袭转移的肿瘤细胞表面边缘部位的板状伪足和丝状伪足上呈特异性亚细胞分布, 初步认为这可能与肿瘤细胞的运动、侵袭以及转移密切相关^[32]。迄今, 已发现 $\alpha 6 \beta 4$ 在皮肤癌、头颈部癌、乳腺癌、胃癌、结肠癌、肝细胞癌、胰腺癌、前列腺癌、膀胱癌等肿瘤中表达并在其侵袭转移中发挥重要作用^[33]。1996年, Tani等^[34]在研究胃癌的侵袭转移机制时候

发现, $\alpha 6 \beta 4$ 和层粘连蛋白(laminin-1, laminin-5)可能存在协同定位效应, 两者形成受体-配体结合形式, 其表达的状态的改变在肿瘤细胞向周围组织浸润起到重要作用. 2000年, Ishii等^[35]运用免疫印迹、免疫沉淀反应、流式细胞计量术等多种方法研究胃癌时发现, 在SCID小鼠腹膜腔转移模型中 $\alpha 6 \beta 4$ 的表达可明显抑制人胃癌细胞的转移; 随后, 用免疫组织化学方法证实, 在外科手术切除的120例胃癌标本研究中, $\beta 4$ 亚单位阳性组腹膜腔种植转移率明显低于 $\beta 4$ 亚单位阴性组($P = 0.036$), 淋巴结的转移与 $\beta 4$ 亚单位的表达相关性较小, 无统计学意义($P = 0.316$). 另外, 在84例伴腹膜腔种植转移的胃癌患者中, 70例 $\beta 4$ 亚单位阳性的胃癌患者术后腹膜腔种植转移中间期明显较14例 $\beta 4$ 亚单位阴性病例延长($P < 0.0001$). 可见, 整合素 $\alpha 6 \beta 4$ 可作为胃癌术后复发转移的观察指标, 成为腹膜腔种植转移的抑制和治疗靶点, 具有很大的临床应用前景.

3.5 $\alpha 5 \beta 1$ 、 $\alpha 9 \beta 1$ 、 $\alpha \nu \beta 3$ 与胃癌 除上述整合素成员外, 尚还有少数可能也参与了胃癌的发生、发展及侵袭转移等过程. 2000年, Miyata等^[36]研究发现, 胰蛋白酶(Trypsin)可促进整合素 $\alpha 5 \beta 1$ 与纤维连接蛋白(Fibronectin)相互作用, 激活蛋白酶激活受体-2(protease activated receptor-2, PAR-2)促进胃癌的增殖扩散; 2002年, Su等^[37]研究 $\alpha 5 \beta 1$ 在包括胃癌在内的多种肿瘤中的表达及意义中发现, $\alpha 5 \beta 1$ 在肿瘤组织中的表达较非肿瘤组织中低, 在分化好的肿瘤中表达较低分化肿瘤中高; 另外, 还显示 $\alpha 5 \beta 1$ 的表达与肿瘤的浸润转移关系不密切. 2006年, Gulubova等^[38,39]研究发现, $\alpha 5 \beta 1$ 在原发性胃癌和肝转移中都有表达, 证实 $\alpha 5 \beta 1$ 和 $\alpha 9 \beta 1$ 在细胞的生长和凋亡、侵袭和转移等过程中发挥着不同程度的作用. 2008年, Song等^[40]研究发现, 骨桥蛋白(Osteopontin)可阻碍姜黄素(Curcumin)诱导的细胞凋亡, 并通过 $\alpha 5 \beta 3$ 激活Akt信号途径来延长胃癌细胞的生存时间.

4 整合素介导的靶向治疗

经过20多年的探索, 整合素介导的靶向药物治疗已经取得了很大的进展. 至今, 已有阿昔单抗(Abciximab)^[41]、替罗非班(Tirofiban)^[42]、依替巴肽(Eptifibatide)^[43]、那他珠单抗(Natalizumab)^[44]、西仑吉肽(Cilengitide)^[45]、伊瑞西珠(Etaracizumab)^[46]等药物相继应用于临床, 在急性冠脉综合征、多发性硬化、克罗恩病、骨质

疏松症等疾病的治疗中扮演着重要角色. 另外, 整合素在肿瘤治疗中的作用也逐渐成为研究热点. 目前已知的以整合素为靶点治疗肿瘤的相关策略主要包括: (1)整合素单克隆抗体; (2)整合素肽类抑制剂; (3)环状RGD肽; (4)线性肽类抑制剂; (5)调节整合素基因表达; (6)整合素介导的腺病毒溶细胞作用; (7)整合素疫苗等. 例如, 整合素 $\alpha \nu \beta 3$ 和 $\alpha \nu \beta 5$ 高度表达于破骨细胞、新生毛细血管内皮细胞及某些实体肿瘤细胞表面, 默克公司(Merck)研发的针对这两种整合素拮抗剂—西仑吉肽(cilengitide, EMD-2121974), 可达到预防骨质疏松症、抑制肿瘤的血管形成及诱发肿瘤蜕变的作用, 尤其在 $\alpha \nu \beta 3$ 、 $\alpha \nu \beta 5$ 阳性的神经胶质瘤、乳腺癌、黑色素瘤、非小细胞性肺癌(NSCLC)等肿瘤中显现出较好的治疗效果^[47]. 伏洛昔单抗(Volociximab)作为第一代 $\alpha 5 \beta 1$ 拮抗剂, 因其阻断 $\alpha 5 \beta 1$ 与纤维连接蛋白的连接而抑制新生血管形成和诱导内皮细胞凋亡, 目前主要应用于肿瘤和老年性黄斑变性的治疗^[48].

在胃癌方面, 2004年Li等^[49]通过粘着试验(Adhesion assay)、流式细胞术(Flow Cytometry)、细胞移行能力试验(Migration assay)、酶联免疫吸附试验(ELISA)等多种方法研究发现, 米非司酮(Mifepristone)可能通过下调整合素 $\beta 3$ 的在人胃腺癌细胞系MKN-45中表达, 抑制肿瘤血管的形成而达到阻碍胃癌的侵袭和转移. 2008年, Kawajiri等^[50]研究显示, 新型的转化生长因子- β 受体激酶抑制剂-“A-77”可明显减少肿瘤细胞中整合素mRNA的表达以及阻碍成纤维细胞的生长, 从而有效抑制胃腺癌的腹膜腔种植转移. 2009年, Haley等^[51]发现, 溶瘤性的埃可病毒1(Echovirus 1, EV1)可在整合素 $\alpha 2 \beta 1$ 的介导下感染目标肿瘤细胞并将其溶解, 而 $\alpha 2 \beta 1$ 又是参与胃癌肝转移以及周围淋巴结侵犯的关键因子, 因此通过局部给药, EV1可作为单独的或者辅助性的配合 $\alpha 2 \beta 1$ 拮抗剂治疗胃癌的周围组织侵犯以及腹膜种植转移.

5 结论

整合素作为细胞间及细胞与细胞外基质相互作用的关键桥梁, 对肿瘤生长、侵袭和转移起着重要的调控作用, 对其研究可为恶性肿瘤的诊治提供广阔的应用前景和巨大的商业价值^[52]. 例如, 近年来研发的整合素介导的纳米给药系统, 就是对传统的肿瘤治疗方法极大的补充^[53]. 虽然有关整合素功能的研究不断报道, 创新型的

■同行评价

本文综述整合素在胃癌侵袭转移及靶向药物治疗中的相关研究进展. 内容新颖, 有潜在的临床应用前景.

治疗方式也日益涌现。但因其种类繁多, 功能错综复杂, 生物学作用确切机制还尚未完全清楚, 而且在介导肿瘤的侵袭和转移方面可能存在多种整合素协同或拮抗作用, 具体机制有待进一步阐明^[54]。另外, 在整合素抗肿瘤药物的给药途径、选择性作用靶点、联合应用以及整合素介导多药耐药等方面需要更多的探索, 以最大可能利用其治疗作用, 减少不良反应的发生。总之, 随着研究深入, 相信不久将会有更好的整合素相关药物和肿瘤治疗方法的问世, 届时将为胃癌患者带来更好的治疗选择。

6 参考文献

- Ajani JA, Barthel JS, Bekaii-Saab T, Bentrem DJ, D'Amico TA, Das P, Denlinger C, Fuchs CS, Gerdes H, Hayman JA, Hazard L, Hofstetter WL, Ilson DH, Keswani RN, Kleinberg LR, Korn M, Meredith K, Mulcahy MF, Orringer MB, Osarogiagbon RU, Posey JA, Sasson AR, Scott WJ, Shibata S, Strong VE, Washington MK, Willett C, Wood DE, Wright CD, Yang G. Gastric cancer. *J Natl Compr Canc Netw* 2010; 8: 378-409
- Hyatt BJ, Paull PE, Wassef W. Gastric oncology: an update. *Curr Opin Gastroenterol* 2009; 25: 570-578
- Gibson NJ. Cell adhesion molecules in context: CAM function depends on the neighborhood. *Cell Adh Migr* 2011; 5: 48-51
- Mousa SA. Adhesion molecules: potential therapeutic and diagnostic implications. *Methods Mol Biol* 2010; 663: 261-276
- Tamkun JW, DeSimone DW, Fonda D, Patel RS, Buck C, Horwitz AF, Hynes RO. Structure of integrin, a glycoprotein involved in the transmembrane linkage between fibronectin and actin. *Cell* 1986; 46: 271-282
- Cabodi S, Di Stefano P, Leal Mdel P, Tinnirello A, Bisaro B, Morello V, Damiano L, Aramu S, Repetto D, Tornillo G, Defilippi P. Integrins and signal transduction. *Adv Exp Med Biol* 2010; 674: 43-54
- Becchetti A, Arcangeli A. Integrins and ion channels in cell migration: implications for neuronal development, wound healing and metastatic spread. *Adv Exp Med Biol* 2010; 674: 107-123
- Nieswandt B, Varga-Szabo D, Elvers M. Integrins in platelet activation. *J Thromb Haemost* 2009; 7 Suppl 1: 206-209
- Wang Z, Chui WK, Ho PC. Integrin targeted drug and gene delivery. *Expert Opin Drug Deliv* 2010; 7: 159-171
- Campbell ID, Humphries MJ. Integrin structure, activation, and interactions. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2011; 3: pii: a004994
- Adair BD, Yeager M. Electron microscopy of integrins. *Methods Enzymol* 2007; 426: 337-373
- Niu G, Chen X. Why integrin as a primary target for imaging and therapy. *Theranostics* 2011; 1: 30-47
- Bandyopadhyay A, Raghavan S. Defining the role of integrin alphavbeta6 in cancer. *Curr Drug Targets* 2009; 10: 645-652
- Kong L, Sun JW, Zhang CH. [The expression of integrin α v β 6 and MMP-9 in gastric cancer and the correlation with clinicopathologic characteristic]. *Xibao Yu Fenzi Mianyixue Zazhi* 2011; 27: 92-94
- Bates RC. The alphaVbeta6 integrin as a novel molecular target for colorectal cancer. *Future Oncol* 2005; 1: 821-828
- Kawashima A, Tsugawa S, Boku A, Kobayashi M, Minamoto T, Nakanishi I, Oda Y. Expression of alphav integrin family in gastric carcinomas: increased alphavbeta6 is associated with lymph node metastasis. *Pathol Res Pract* 2003; 199: 57-64
- Zhang ZY, Xu KS, Wang JS, Yang GY, Wang W, Wang JY, Niu WB, Liu EY, Mi YT, Niu J. Integrin alphavbeta6 acts as a prognostic indicator in gastric carcinoma. *Clin Oncol (R Coll Radiol)* 2008; 20: 61-66
- Zhao R, Liu XQ, Wu XP, Liu YF, Zhang ZY, Yang GY, Guo S, Niu J, Wang JY, Xu KS. Vascular endothelial growth factor (VEGF) enhances gastric carcinoma invasiveness via integrin alpha(v)beta6. *Cancer Lett* 2010; 287: 150-156
- 刘松, 刘恩宇, 牛卫博, 王加勇, 彭程, 王健, 牛军. 整合素 α v β 6在胃癌AGS细胞增殖和凋亡中的作用. *中国现代普通外科进展* 2010; 13: 102-104
- Parks WC. What is the alpha2beta1 integrin doing in the epidermis? *J Invest Dermatol* 2007; 127: 264-266
- Veit G, Zwolanek D, Eckes B, Niland S, K p yl  J, Zweers MC, Ishada-Yamamoto A, Krieg T, Heino J, Eble JA, Koch M. Collagen XXIII, Novel Ligand for Integrin {alpha}2{beta}1 in the Epidermis. *J Biol Chem* 2011; 286: 27804-27813
- Matsuoka T, Yashiro M, Nishimura S, Inoue T, Fujihara T, Sawada T, Kato Y, Seki S, Hirakawa-Ys Chung K. Increased expression of alpha2beta1-integrin in the peritoneal dissemination of human gastric carcinoma. *Int J Mol Med* 2000; 5: 21-25
- Nishimura S, Chung YS, Yashiro M, Inoue T, Sowa M. Role of alpha 2 beta 1- and alpha 3 beta 1-integrin in the peritoneal implantation of scirrhous gastric carcinoma. *Br J Cancer* 1996; 74: 1406-1412
- Ura H, Denno R, Hirata K, Yamaguchi K, Yasoshima T. Separate functions of alpha2beta1 and alpha3beta1 integrins in the metastatic process of human gastric carcinoma. *Surg Today* 1998; 28: 1001-1006
- Kawamura T, Endo Y, Yonemura Y, Nojima N, Fujita H, Fujimura T, Obata T, Yamaguchi T, Sasaki T. Significance of integrin alpha2/beta1 in peritoneal dissemination of a human gastric cancer xenograft model. *Int J Oncol* 2001; 18: 809-815
- Lin MT, Chang CC, Lin BR, Yang HY, Chu CY, Wu MH, Kuo ML. Elevated expression of Cyr61 enhances peritoneal dissemination of gastric cancer cells through integrin alpha2beta1. *J Biol Chem* 2007; 282: 34594-34604
- Kreidberg JA. Functions of alpha3beta1 integrin. *Curr Opin Cell Biol* 2000; 12: 548-553
- Giannelli G, Astigiano S, Antonaci S, Morini M, Barbieri O, Noonan DM, Albin A. Role of the alpha3beta1 and alpha6beta4 integrins in tumor invasion. *Clin Exp Metastasis* 2002; 19: 217-223
- Takatsuki H, Komatsu S, Sano R, Takada Y, Tsuji T. Adhesion of gastric carcinoma cells to peritoneum mediated by alpha3beta1 integrin (VLA-3). *Cancer Res* 2004; 64: 6065-6070
- Saito Y, Sekine W, Sano R, Komatsu S, Mizuno H, Katabami K, Shimada K, Oku T, Tsuji T. Potentiation of cell invasion and matrix metalloproteinase production by alpha3beta1 integrin-mediated adhe-

- sion of gastric carcinoma cells to laminin-5. *Clin Exp Metastasis* 2010; 27: 197-205
- 31 Chen M, Sinha M, Luxon BA, Bresnick AR, O'Connor KL. Integrin $\alpha 6 \beta 4$ controls the expression of genes associated with cell motility, invasion, and metastasis, including S100A4/metastasin. *J Biol Chem* 2009; 284: 1484-1494
 - 32 Raymond K, Kreft M, Song JY, Janssen H, Sonnenberg A. Dual Role of $\alpha 6 \beta 4$ integrin in epidermal tumor growth: tumor-suppressive versus tumor-promoting function. *Mol Biol Cell* 2007; 18: 4210-4221
 - 33 Soung YH, Gil HJ, Clifford JL, Chung J. Role of $\alpha 6 \beta 4$ integrin in cell motility, invasion and metastasis of mammary tumors. *Curr Protein Pept Sci* 2011; 12: 23-29
 - 34 Tani T, Karttunen T, Kiviluoto T, Kivilaakso E, Burgeson RE, Sipponen P, Virtanen I. Alpha 6 beta 4 integrin and newly deposited laminin-1 and laminin-5 form the adhesion mechanism of gastric carcinoma. Continuous expression of laminins but not that of collagen VII is preserved in invasive parts of the carcinomas: implications for acquisition of the invading phenotype. *Am J Pathol* 1996; 149: 781-793
 - 35 Ishii Y, Ochiai A, Yamada T, Akimoto S, Yanagihara K, Kitajima M, Hirohashi S. Integrin $\alpha 6 \beta 4$ as a suppressor and a predictive marker for peritoneal dissemination in human gastric cancer. *Gastroenterology* 2000; 118: 497-506
 - 36 Miyata S, Koshikawa N, Yasumitsu H, Miyazaki K. Trypsin stimulates integrin $\alpha (5) \beta (1)$ -dependent adhesion to fibronectin and proliferation of human gastric carcinoma cells through activation of proteinase-activated receptor-2. *J Biol Chem* 2000; 275: 4592-4598
 - 37 Su JM, Gui L, Zhou YP, Zha XL. Expression of focal adhesion kinase and $\alpha 5$ and $\beta 1$ integrins in carcinomas and its clinical significance. *World J Gastroenterol* 2002; 8: 613-618
 - 38 Gulubova M, Vlaykova T. Immunohistochemical assessment of fibronectin and tenascin and their integrin receptors $\alpha 5 \beta 1$ and $\alpha 9 \beta 1$ in gastric and colorectal cancers with lymph node and liver metastases. *Acta Histochem* 2006; 108: 25-35
 - 39 Roy S, Bingle L, Marshall JF, Bass R, Ellis V, Speight PM, Whawell SA. The role of $\alpha 9 \beta 1$ integrin in modulating epithelial cell behaviour. *J Oral Pathol Med* 2011 May 25. [Epub ahead of print]
 - 40 Song G, Ming Y, Mao Y, Bao S, Ouyang G. Osteopontin prevents curcumin-induced apoptosis and promotes survival through Akt activation via $\alpha 5 \beta 3$ integrins in human gastric cancer cells. *Exp Biol Med* (Maywood) 2008; 233: 1537-1545
 - 41 Parikh D, Juergens CP. Abciximab as an adjunctive therapy for patients undergoing percutaneous coronary interventions. *Expert Opin Biol Ther* 2011; 11: 235-246
 - 42 Juwana YB, Suryapranata H, Ottervanger JP, van 't Hof AW. Tirofiban for myocardial infarction. *Expert Opin Pharmacother* 2010; 11: 861-866
 - 43 Zeymer U. The role of eptifibatide in patients undergoing percutaneous coronary intervention. *Expert Opin Pharmacother* 2007; 8: 1147-1154
 - 44 Coyle PK. The role of natalizumab in the treatment of multiple sclerosis. *Am J Manag Care* 2010; 16: S164-S170
 - 45 Reardon DA, Neyns B, Weller M, Tonn JC, Nabors LB, Stupp R. Cilengitide: an RGD pentapeptide $\alpha \beta 3$ and $\alpha \beta 5$ integrin inhibitor in development for glioblastoma and other malignancies. *Future Oncol* 2011; 7: 339-354
 - 46 Delbaldo C, Raymond E, Vera K, Hammershaimb L, Kaucic K, Lozahic S, Marty M, Faivre S. Phase I and pharmacokinetic study of etaracizumab (Abegrin), a humanized monoclonal antibody against $\alpha \text{v} \beta 3$ integrin receptor, in patients with advanced solid tumors. *Invest New Drugs* 2008; 26: 35-43
 - 47 Mas-Moruno C, Rechenmacher F, Kessler H. Cilengitide: the first anti-angiogenic small molecule drug candidate design, synthesis and clinical evaluation. *Anticancer Agents Med Chem* 2010; 10: 753-768
 - 48 Ricart AD, Tolcher AW, Liu G, Holen K, Schwartz G, Albertini M, Weiss G, Yazji S, Ng C, Wilding G. Volociximab, a chimeric monoclonal antibody that specifically binds $\alpha 5 \beta 1$ integrin: a phase I, pharmacokinetic, and biological correlative study. *Clin Cancer Res* 2008; 14: 7924-7929
 - 49 Li DQ, Wang ZB, Bai J, Zhao J, Wang Y, Hu K, Du YH. Effects of mifepristone on invasive and metastatic potential of human gastric adenocarcinoma cell line MKN-45 in vitro and in vivo. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 1726-1729
 - 50 Kawajiri H, Yashiro M, Shinto O, Nakamura K, Tendo M, Takemura S, Node M, Hamashima Y, Kajimoto T, Sawada T, Ohira M, Hirakawa K. A novel transforming growth factor β receptor kinase inhibitor, A-77, prevents the peritoneal dissemination of scirrhous gastric carcinoma. *Clin Cancer Res* 2008; 14: 2850-2860
 - 51 Haley ES, Au GG, Carlton BR, Barry RD, Shafren DR. Regional administration of oncolytic Echovirus 1 as a novel therapy for the peritoneal dissemination of gastric cancer. *J Mol Med (Berl)* 2009; 87: 385-399
 - 52 Cox D, Brennan M, Moran N. Integrins as therapeutic targets: lessons and opportunities. *Nat Rev Drug Discov* 2010; 9: 804-820
 - 53 Tagalakis AD, Grosse SM, Meng QH, Mustapa MF, Kwok A, Salehi SE, Tabor AB, Hailes HC, Hart SL. Integrin-targeted nanocomplexes for tumour specific delivery and therapy by systemic administration. *Biomaterials* 2011; 32: 1370-1376
 - 54 Carter A. Integrins as target: first phase III trial launches, but questions remain. *J Natl Cancer Inst* 2010; 102: 675-677

编辑 曹丽鸥 电编 何基才

5羟色胺与慢性便秘

张卫平, 江滨

张卫平, 南京中医药大学 江苏省南京市 210000
江滨, 南京市中医院全国中医肛肠医疗中心 江苏省南京市 210000

作者贡献分布: 本文综述由张卫平完成; 江滨审校。

通讯作者: 江滨, 副教授, 主任医师, 210000, 江苏省南京市, 南京市中医院全国中医肛肠医疗中心. jbfirsh@yahoo.com.cn

收稿日期: 2011-06-10 修回日期: 2011-07-10

接受日期: 2011-08-23 在线出版日期: 2011-08-28

Role of serotonin in the pathogenesis of chronic constipation

Wei-Ping Zhang, Bin Jiang

Wei-Ping Zhang, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210000, Jiangsu Province, China

Bin Jiang, National Medical Center for Colorectal Disease, Nanjing Hospital of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210000, Jiangsu Province, China

Correspondence to: Associate Professor Bin Jiang, National Medical Center for Colorectal Disease, Nanjing Hospital of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210000, Jiangsu Province, China. jbfirsh@yahoo.com.cn

Received: 2011-06-10 Revised: 2011-07-10

Accepted: 2011-08-23 Published online: 2011-08-28

Abstract

Serotonin (5-hydroxytryptamine, 5-HT) is a monoamine neurotransmitter of profound importance in the enteric nervous system. About 95% of the serotonin in the body is found in the GI tract; 90% is in enterochromaffin cells (EC cells) and the remaining 10% in enteric neurons. It plays a key role in the initiation of peristaltic and secretory reflexes and in the modulation of visceral sensations. There are many reports of serotonin in functional bowel disorders, and most of them mainly focus on irritable bowel syndrome (IBS), but serotonin in constipation is rarely reported. Chronic constipation (CC) is a commonly encountered disease, especially in elderly patients. The role of 5-HT plays in CC has been emphasized, and its effects in physiology, pathology and treatment of CC are continuously being resolved. This article is a review of the progress in understanding the role of 5-HT in the pathogenesis and treatment of chronic constipation.

Key Words: Serotonin; Chronic constipation; 5-HT receptors

Zhang WP, Jiang B. Role of serotonin in the pathogenesis of chronic constipation. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(24): 2551-2554

摘要

5羟色胺(5-hydroxytryptamine, 5-HT)是肠神经系统中一重要的单胺类神经递质。95%来源于消化系统, 其中90%位于肠黏膜的嗜铬细胞(enterochromaffin cells, EC), 10%位于肠道神经元。5-HT在引发胃肠蠕动和分泌反射, 以及调节内脏感觉中起关键作用。有关5-HT在功能性胃肠疾病中的作用研究较多, 主要集中在对肠易激综合征(irritable bowel syndrome, IBS)的研究, 而在便秘中的研究相对较少。慢性便秘(chronic constipation, CC)是消化系统常见病, 老年患者尤其多见。5-HT在便秘中扮演的角色已被重视, 在便秘的生理、病理及治疗中的作用正在不断得到解析, 现将近年来5-HT和便秘的研究作一简要综述。

关键词: 5羟色胺; 慢性便秘; 5羟色胺受体

张卫平, 江滨. 5羟色胺与慢性便秘. 世界华人消化杂志 2011; 19(24): 2551-2554

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/2551.asp>

0 引言

慢性便秘(chronic constipation, CC)是临床常见病, 西方国家中发病率为2%-27%^[1,2], 我国北京地区调查显示^[3], 便秘发病率约6%。有关CC机制的研究主要集中在对肠神经构造和递质、Cajal间质细胞、平滑肌等方面^[4]。肠神经系统(enteric nervous system, ENS)对胃肠道功能的调节主要通过5-HT介导; 5-HT是参与调节胃肠道运动和胃肠分泌的重要神经递质和旁分泌信号分子, 近年来大量人体和动物实验也证实了5-HT与肠道动力及感觉异常有关^[5-7]。但5-HT与CC的因果关系尚不清楚。

■背景资料

慢性便秘是消化系统常见病, 老年患者尤其多见。5羟色胺在该病发生中扮演着重要角色已被重视。但目前有关5羟色胺的研究, 主要集中在对肠易激综合征, 而关于在便秘中的研究相对较少。

■同行评议者

潘秀珍, 教授, 福建省立医院消化内科; 陈敬贤, 教授, 安徽医科大学微生物教研室; 刘宝林, 教授、主任医师, 中国医科大学附属盛京医院普通外科

■研发前沿

5-HT在慢性便秘的生理、病理及治疗中的作用正在不断得到解析。目前的研究还存在相关问题: (1)5-HT信号的改变是慢性便秘的原因还是结果?或是伴随现象? (2)5-HT与其他肠神经递质的作用尚不明确; (3)目前的研究主要集中在5-HT的表达量,对其受体亚型及转运体的调控报道不多; (4)目前上市的针对5-HT信号通路的药物还有一些不确定的因素。

■相关报道

Meagan等研究发现,慢性便秘患者结肠黏膜5-HT含量,5-HT释放及TpH-1的转录均明显高于正常人,但EC细胞的数量及SERT转录水平却无改变,因此推断黏膜内5-HT的合成和释放增加,可能是由于其受体敏感性和反应性下降,而导致便秘,另外,该研究对比了阿片诱导的便秘类型,后者未发现上述改变,表明“便秘”作为一症状,不会导致5-HT的合成、释放及信号传导发生代偿性改变。

1 5-HT、5-HT受体及5-HT转运体

5-HT是ENS中重要的单胺类神经递质,人体中约95%的5-HT来自消化系,其中90%位于肠黏膜的嗜铬细胞(enterochromaffin cells, EC), 10%位于肠道神经元。5-HT由EC细胞通过色氨酸羟化酶1(tryptophan hydroxylase 1, TpH-1)合成,当EC细胞受到肠腔内机械或化学刺激时,5-HT从EC细胞的基底部释放至固有肌的细胞间隙;5-HT可刺激固有肌周围的神经纤维受体活性、分泌及血管舒张反应。根据分子结构、作用机制及功能不同,5-HT家族至少包括25个受体亚型,其中5-HT₃、5-HT₄及5-HT₁受体,在调节胃肠道功能中的作用显著^[8,9]。5-HT_{1A}、5-HT₃、5-HT₄受体,分布于肠神经元上,调控神经递质的释放;5-HT_{2A}、5-HT₄受体,分布于肠平滑肌上,直接调控平滑肌的运动。5-HT释放并作用于靶细胞发挥作用后,必须重吸收至细胞内降解、灭活,终止其作用,该过程即由5-HT转运体(serotonin transporter, SERT)完成;研究发现,胃肠道上皮细胞和肠壁神经丛有SERT的表达;因此,5-HT对胃肠道运动功能的调节不仅需要正常表达的5-HT及其受体,还有赖于SERT的正常表达和功能^[10]。

2 便秘模型动物肠道5-HT的研究

Gershon等^[11]研究了5-HT₄受体基因敲除的大鼠,发现其肠动力明显下降,肠神经元减少,且与年龄相关。提示长期缺少5-HT₄受体刺激可能导致结肠神经元减少。桂林等^[12]通过泻剂大黄灌胃,建立大鼠便秘模型得出,大鼠肠道EC细胞密度及组织匀浆5-HT含量明显增高。认为可能机制为长期服用泻剂,使EC细胞出现“耐受”,5-HT相对不足,不足以维持胃肠道运动和分泌,引起胃肠道蠕动减慢,进而出现“泻剂结肠”型便秘。

3 慢性便秘患者肠道5-HT的变化

5-HT可促进肠蠕动和分泌,因此推测CC患者结肠中可能存在5-HT的不足,导致结肠动力和分泌功能下降。但研究发现^[13,14]CC患者的结肠黏膜5-HT阳性细胞数量和染色强度均明显增加,是否源自肠黏膜的EC细胞,还是源于ENS中的5-HT神经元?实验结果显示^[15],肌间神经丛5-HT神经元无明显异常,推测CC患者肠道5-HT的信息通路可能存在异常。Meagan等^[16]研究发现,CC患者结肠黏膜5-HT含量,5-HT释放及

TpH1的转录均明显高于正常人,但EC细胞的数量及SERT转录水平却无改变,因此推断黏膜内5-HT的合成和释放增加,可能是由于其受体敏感性和反应性下降,而导致便秘。另外该研究对比了阿片诱导的便秘类型,后者未发现上述改变,表明“便秘”作为一症状,不会导致5-HT的合成、释放及信号传导发生代偿性改变。CC与便秘型肠易激综合征(irritable bowel syndrome-constipation, IBS-C)有很大程度的症状重叠,很难鉴别,Frissora等^[18]认为,CC和IBS-C是不同个体表现不同症状的同一种肠道功能紊乱。但有关IBS-C中5-HT的研究结果不一:5-HT含量增加^[17]、减少^[10]或没有改变^[16]。而我们认为CC和IBS-C虽然都有5-HT改变,但其机制不同。

4 5-HT在慢性便秘发病中的机制

5-HT在CC的发病中的主要作用: (1)脑肠轴:近年来认为^[18-20]脑-肠轴异常是引起便秘的重要原因。脑-肠之间的双向调节通过交感神经、副交感神经和ENS而影响内脏感觉及运动。5-HT是肠道重要的神经递质及旁分泌信号分子,在脑-肠信息传递中扮演着重要的角色; (2)胃肠动力及肠分泌^[21]:5-HT及其受体参与调节胃肠道动力和肠分泌,调节肠内容物转运。主要是5-HT₃或5-HT₄受体的激活,可加快胃肠道传输,胃肠道分泌可直接通过5-HT₄受体作用于肠细胞、间接通过5-HT₃受体作用于黏膜腺神经及传入迷走神经而起作用。

5 5-HT在慢性便秘治疗中的应用

5-HT激活其受体而发挥广泛的作用,针对5-HT调节消化系功能的药物,主要集中在5-HT₃受体和5-HT₄受体,前者调节介导胃结肠反射,后者介导了蠕动反射。目前应用于CC治疗的主要药物: (1)5-HT₄受体激动剂,包括替加色罗(tegaserod)、普卢卡必利(prucalopride); (2)联合5-HT₄受体激动剂和5-HT₃受体拮抗剂,西沙比利(cisapride)、伦扎比利(renzapride)等。此外,目前还有一些新型5-HT₄受体激动剂(ATI-7505、TD-5108等)尚在研究中。

5.1 替加色罗 替加色罗是高选择性和特异性的5-HT₄受体部分激动剂。通过触发肠黏膜生理反射,刺激EC释放钙基因相关蛋白、VIP和P物质,调节环形肌松弛和收缩,加快肠内容物传递^[22]。多个研究^[5,23,24]证实,替加色罗在CC和IBS-C中有较好的疗效。鉴于他可能增加心血管事件的

发生率, 该药2007-03在美国FDA要求下暂时退出市场^[25]. 同年7月, FDA重新批准替加色罗的再引入, 但仅用于治疗55岁以下女性严重IBS或CC患者, 且需排除心血管疾病^[26]. 对于替加色罗增加心血管事件的研究, 有学者认为^[14,30], 尚无直接证据显示药物和心血管事件的相关性, 其安全性还需要进一步研究.

5.2 普卢卡必利 普卢卡必利是一新型的, 高选择性5-HT₄受体激动剂, 有较强促蠕动作用^[28]. 半衰期长, 血浆浓度迅速升高, 迅速达峰值等特性, 为该药提供了极好的药物动力学基础. 尽管有动物实验^[29]发现, 普卢卡必利可能存在致癌性及心脏不良反应, 但长期临床研究证实该药耐受性良好, 是安全的, 在欧洲已被批准用于CC的治疗. 近年来多个研究也指出, 其治疗CC^[30-33]及吗啡诱导的便秘^[34]疗效确切.

5.3 西沙比利 西沙比利是苯酰胺类衍生物, 可拮抗5-HT₃受体, 又可激动5-HT₄受体. 他可促进肠肌间丛的乙酰胆碱释放, 加速胃排空和肠运输, 在发展中国家被广泛应用于CC的治疗. 有研究回顾了424例患者的治疗发现^[35]: 与安慰剂相比, 西沙比利在CC总的症状(包括腹痛、腹胀、大便频率、大便性状等)评估上无明显改善, 但其可能有心律失常的副作用, 认为西沙比利不能用于治疗CC或IBS-C.

5.4 伦扎比利 伦扎比利为新型的代替苯甲酰胺类化合物. 与西沙比利相似, 没有心血管事件相关的不良反应报道. 在英国完成的IIb临床试验中发现^[36], 每日4 mg伦扎比利对腹痛或不适缓解率、排便频率和粪便性状的改善情况明显优于安慰组, 且伦扎比利不同剂量组均有良好的耐受性; 但在此后完成的III期临床试验中, 伦扎比利的疗效不尽如人意. Lembo等^[37]研究指出, 伦扎比利可明显改善排便频率和大便性状, 且耐受性良好, 但在长期观察中发现可导致缺血性肠炎的发生, 认为伦扎比利的利弊比率(利/弊)尚不支持进一步的临床研究.

6 结论

5-HT在CC中扮演的重要角色得到公认, 他在CC的生理、病理及治疗中的作用将不断得到解析. 目前的研究还存在以下问题: (1)5-HT信号的改变是CC的原因还是结果? 或是伴随现象? (2)5-HT与其他肠神经递质的作用尚不明确; (3)目前的研究主要集中在5-HT的表达量, 对其受体亚型及转运体的调控报道不多; (4)上市的针

对5-HT信号通路的药物还有一些不确定的因素, 新型的5-HT₄受体激动剂(ATI-7505、TD-5108), 在化学结构上消除了可能引起心血管事件的结构, 在健康志愿者中药动学显示其可加速胃排空, 加快结肠蠕动, 软化大便, 改善生活质量等作用^[38,39], 希望为CC的治疗提供更好的选择.

7 参考文献

- Locke GR, Pemberton JH, Phillips SF. AGA technical review on constipation. American Gastroenterological Association. *Gastroenterology* 2000; 119: 1766-1778
- Higgins PD, Johanson JF. Epidemiology of constipation in North America: a systematic review. *Am J Gastroenterol* 2004; 99: 750-759
- 郭晓峰, 柯美云, 潘国宗, 韩少梅, 方秀才, 鲁素彩, 郭慧平. 北京地区成年人慢性便秘流行病学调查及其相关因素分析. *基础医学与临床* 2001; 106-107
- Lee JI, Park H, Kamm MA, Talbot IC. Decreased density of interstitial cells of Cajal and neuronal cells in patients with slow-transit constipation and acquired megacolon. *J Gastroenterol Hepatol* 2005; 20: 1292-1298
- Kim YS, Choi SC, Park JM, Choi CH, Lee DH, Son HJ, Sung IK, Jeong JJ, Lee JS, Shim KN, Lee KJ, Hong SJ, Choi MG. The effect of tegaserod on symptoms and quality of life in Korean women with irritable bowel syndrome with constipation. *J Neurogastroenterol Motil* 2010; 16: 61-70
- Camilleri M. Serotonin in the gastrointestinal tract. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 2009; 16: 53-59
- 丁健华, 傅传刚, 赵荣华. 5羟色胺在胃肠道功能性疾病中的研究现状. *世界华人消化杂志* 2005; 13: 2405-2408
- Baker DE. Rationale for using serotonergic agents to treat irritable bowel syndrome. *Am J Health Syst Pharm* 2005; 62: 700-711; quiz 712-713
- Gershon MD. Review article: serotonin receptors and transporters -- roles in normal and abnormal gastrointestinal motility. *Aliment Pharmacol Ther* 2004; 20 Suppl 7: 3-14
- Coates MD, Mahoney CR, Linden DR, Sampson JE, Chen J, Blaszyk H, Crowell MD, Sharkey KA, Gershon MD, Mawe GM, Moses PL. Molecular defects in mucosal serotonin content and decreased serotonin reuptake transporter in ulcerative colitis and irritable bowel syndrome. *Gastroenterology* 2004; 126: 1657-1664
- Gershon MD, Liu MT. Serotonin and neuroprotection in functional bowel disorders. *Neurogastroenterol Motil* 2007; 19 Suppl 2: 19-24
- 桂林, 刘云肖, 徐德龙, 赵淑明. “泻剂结肠”大鼠胃肠道黏膜嗜铬细胞及5-HT的变化. *中国老年学杂志* 2010; 12: 1707-1709
- Zhao RH, Baig MK, Thaler KJ, Mack J, Abramson S, Woodhouse S, Tamir H, Wexner SD. Reduced expression of serotonin receptor(s) in the left colon of patients with colonic inertia. *Dis Colon Rectum* 2003; 46: 81-86
- Costedio MM, Coates MD, Brooks EM, Glass LM, Ganguly EK, Blaszyk H, Ciolino AL, Wood MJ, Strader D, Hyman NH, Moses PL, Mawe GM. Mucosal serotonin signaling is altered in chronic constipation but not in opiate-induced constipation.

■创新盘点

5-HT在多种功能性及炎症性胃肠道疾病中的重要地位已经得到证实, 但关于便秘的研究报道不多. 本文就近年来的文献资料, 对5-HT在慢性便秘的发病机制及5-HT₄受体激动剂、联合5-HT₄受体激动剂和5-HT₃受体拮抗剂两种药物对慢性便秘的作用机制和治疗作用作一简要综述.

■应用要点

本文在5羟色胺与慢性便秘发生的关系上作简要综述, 有助于对慢性便秘发生机制的进一步认识和指导临床应用参考.

■同行评价

本文科学性较好, 综述得当, 数据可信, 对临床实践及研究有较好的指导意义。

- 15 Frissora CL, Koch KL. Symptom overlap and comorbidity of irritable bowel syndrome with other conditions. *Curr Gastroenterol Rep* 2005; 7: 264-271
- 16 Dunlop SP, Coleman NS, Blackshaw E, Perkins AC, Singh G, Marsden CA, Spiller RC. Abnormalities of 5-hydroxytryptamine metabolism in irritable bowel syndrome. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2005; 3: 349-357
- 17 Atkinson W, Lockhart S, Whorwell PJ, Keevil B, Houghton LA. Altered 5-hydroxytryptamine signaling in patients with constipation- and diarrhea-predominant irritable bowel syndrome. *Gastroenterology* 2006; 130: 34-43
- 18 Zhou L, Lin Z, Lin L, Wang M, Zhang H. Functional constipation: implications for nursing interventions. *J Clin Nurs* 2010; 19: 1838-1843
- 19 Devanarayana NM, Rajindrajith S. Association between constipation and stressful life events in a cohort of Sri Lankan children and adolescents. *J Trop Pediatr* 2010; 56: 144-148
- 20 Crowell MD, Wessinger SB. 5-HT and the brain-gut axis: opportunities for pharmacologic intervention. *Expert Opin Investig Drugs* 2007; 16: 761-765
- 21 Sikander A, Rana SV, Prasad KK. Role of serotonin in gastrointestinal motility and irritable bowel syndrome. *Clin Chim Acta* 2009; 403: 47-55
- 22 Liu M, Geddis MS, Wen Y, Setlik W, Gershon MD. Expression and function of 5-HT₄ receptors in the mouse enteric nervous system. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2005; 289: G1148-G1163
- 23 Al-Judaibi B, Chande N, Gregor J. Safety and efficacy of tegaserod therapy in patients with irritable bowel syndrome or chronic constipation. *Can J Clin Pharmacol* 2010; 17: e194-e200
- 24 Sabaté JM, Bouhassira D, Poupardin C, Wagner A, Loria Y, Coffin B. Sensory signalling effects of tegaserod in patients with irritable bowel syndrome with constipation. *Neurogastroenterol Motil* 2008; 20: 134-141
- 25 FDA announces discontinued marketing of GI drug, Zelnorm, for safety reasons FDA. FDA.gov Online, 2007-03-30, cited 2009-05-21. Available from: <http://www.fda.gov/bbs/topics/NEWS/2007/NEW01597.html>
- 26 FDA permits restricted use of Zelnorm for qualifying patients. FDA.gov Online, 2007-07-27, cited 2009-05-21. Available from: <http://www.fda.gov/bbs/topics/NEWS/2007/NEW01673.html>
- 27 Loughlin J, Quinn S, Rivero E, Wong J, Huang J, Kralstein J, Earnest DL, Seeger JD. Tegaserod and the risk of cardiovascular ischemic events: an observational cohort study. *J Cardiovasc Pharmacol Ther* 2010; 15: 151-157
- 28 De Maeyer JH, Lefebvre RA, Schuurkes JA. 5-HT₄ receptor agonists: similar but not the same. *Neurogastroenterol Motil* 2008; 20: 99-112
- 29 Kamm MA. Review article: the complexity of drug development for irritable bowel syndrome. *Aliment Pharmacol Ther* 2002; 16: 343-351
- 30 Coremans G. Prucalopride: the evidence for its use in the treatment of chronic constipation. *Core Evid* 2008; 3: 45-54
- 31 Camilleri M, Van Outryve MJ, Beyens G, Kerstens R, Robinson P, Vandeplasse L. Clinical trial: the efficacy of open-label prucalopride treatment in patients with chronic constipation - follow-up of patients from the pivotal studies. *Aliment Pharmacol Ther* 2010; 32: 1113-1123
- 32 Müller-Lissner S, Rykx A, Kerstens R, Vandeplasse L. A double-blind, placebo-controlled study of prucalopride in elderly patients with chronic constipation. *Neurogastroenterol Motil* 2010; 22: 991-98, e255
- 33 Frampton JE. Prucalopride. *Drugs* 2009; 69: 2463-2476
- 34 Sloots CE, Rykx A, Cools M, Kerstens R, De Pauw M. Efficacy and safety of prucalopride in patients with chronic noncancer pain suffering from opioid-induced constipation. *Dig Dis Sci* 2010; 55: 2912-2921
- 35 Aboumarzouk OM, Agarwal T, Antakia R, Shariff U, Nelson RL. Cisapride for intestinal constipation. *Cochrane Database Syst Rev* 2011 : CD007780
- 36 George AM, Meyers NL, Hickling RI. Clinical trial: renzapride therapy for constipation-predominant irritable bowel syndrome--multicentre, randomized, placebo-controlled, double-blind study in primary healthcare setting. *Aliment Pharmacol Ther* 2008; 27: 830-837
- 37 Lembo AJ, Cremonini F, Meyers N, Hickling R. Clinical trial: renzapride treatment of women with irritable bowel syndrome and constipation - a double-blind, randomized, placebo-controlled, study. *Aliment Pharmacol Ther* 2010; 31: 979-990
- 38 Manabe N, Wong BS, Camilleri M. New-generation 5-HT₄ receptor agonists: potential for treatment of gastrointestinal motility disorders. *Expert Opin Investig Drugs* 2010; 19: 765-775
- 39 Goldberg M, Li YP, Johanson JF, Mangel AW, Kitt M, Beattie DT, Kersey K, Daniels O. Clinical trial: the efficacy and tolerability of velusetrag, a selective 5-HT₄ agonist with high intrinsic activity, in chronic idiopathic constipation - a 4-week, randomized, double-blind, placebo-controlled, dose-response study. *Aliment Pharmacol Ther* 2010; 32: 1102-1112

编辑 李军亮 电编 何基才

间充质干细胞联合胰岛细胞治疗1型糖尿病研究进展

朱从元, 李建平

■背景资料

胰岛移植治疗1型糖尿病, 因炎症介导的免疫反应以及营养因子缺乏导致胰岛细胞存活低下, 而间充质干细胞与胰岛细胞联合治疗1型糖尿病, 能发挥免疫调控和营养活性功能促进胰岛细胞活性与功能。

朱从元, 李建平, 南京医科大学附属无锡第二医院肝胆外科
江苏省无锡市 214000

作者贡献分布: 本文由朱从元综述, 李建平审校。

通讯作者: 李建平, 教授, 主任医师, 214002, 江苏省无锡市崇安区中山路68号, 南京医科大学附属无锡第二医院肝胆外科。

wxsyljp@163.com

收稿日期: 2011-06-11 修回日期: 2011-08-25

接受日期: 2011-08-26 在线出版日期: 2011-08-28

Cotransplantation of mesenchymal stem cells and islet in the treatment of type 1 diabetes mellitus: recent progress

Cong-Yuan Zhu, Jian-Ping Li

Cong-Yuan Zhu, Jian-Ping Li, Department of Hepatobiliary Surgery, Wuxi No.2 Hospital of Nanjing Medical University, Wuxi 214041, Jiangsu Province, China

Correspondence to: Jian-Ping Li, Professor, Department of Hepatobiliary Surgery, Wuxi No.2 Hospital of Nanjing Medical University, 68 Zhongshan Road, Chong'an District, Wuxi 214041, Jiangsu Province, China. wxsyljp@163.com
Received: 2011-06-11 Revised: 2011-08-25
Accepted: 2011-08-26 Published online: 2011-08-28

Abstract

Islet transplantation for type 1 diabetes mellitus (T1DM) is limited by the lack of nutrients and presence of transplantation-associated inflammation. Most patients still need to be given a small dose of exogenous insulin in the following 3-5 years after islet transplantation. Cotransplantation of mesenchymal stem cells (MSCs) and islet holds great promise for the treatment of T1DM, because it can regulate the immune responses and overcome the shortage of trophic molecules. However, cotransplantation-associated tumorigenesis and the potential for metastasis *in vivo* should be also taken into consideration. In this review, we focus on the immunomodulatory properties, trophic effect and the potential side effects of cotransplantation of MSC and islet in the treatment of T1DM.

Key Words: Islet transplantation; Mesenchymal stem cells; Type 1 diabetes mellitus

Zhu CY, Li JP. Cotransplantation of mesenchymal stem cells and islet in the treatment of type 1 diabetes mellitus: recent progress. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(24): 2546-2550

摘要

近年来, 国内外兴起的胰岛移植术治疗1型糖尿病, 因炎症介导的免疫反应以及营养因子缺乏而导致移植后3-5年内仍需注射小剂量的胰岛素, 而间充质干细胞与胰岛细胞联合, 不仅具有免疫调节作用还能分泌营养因子促进胰岛细胞活性和功能, 但其在体内的致瘤性以及促进肿瘤细胞转移这些潜在不良反应会一定程度影响其临床应用。本文就间充质干细胞与胰岛细胞联合治疗1型糖尿病的免疫调节与营养活性作用及潜在不良反应方面进行简要综述。

关键词: 胰岛移植; 间充质干细胞; 1型糖尿病

朱从元, 李建平. 间充质干细胞联合胰岛细胞治疗1型糖尿病研究进展. *世界华人消化杂志* 2011; 19(24): 2546-2550
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/2546.asp>

0 引言

1型糖尿病(type 1 diabetes mellitus, T1DM)是一种T细胞介导的, 以胰岛β细胞破坏为特征的自身免疫性疾病, 其主要原因是由于先天性免疫缺陷而导致自身免疫耐受尚失^[1]。目前T1DM已成为一个全球性难题, 全世界至少有1 300万人罹患此病, 而外源性胰岛素注射不能达到时时控制血糖水平稳定的目的, 最终导致心、脑、眼、肾以及末梢神经系统微血管并发症, 给患者带来极大痛苦^[2]。近年来兴起的胰岛移植术, 虽然手术风险小, 移植成功后可暂时脱离外源性胰岛素, 且能时时控制血糖^[3], 但因移植初期炎症介导的免疫反应以及营养因子缺乏, 导致胰岛细胞存活率低下^[4], 使得移植后3-5年内仍需注射小剂量的胰岛素^[5]。而间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSC)与胰岛细胞在体外共培养或体内联合移植, 能分泌多种因子发挥

■同行评议者

高国全, 教授, 中山大学中山医学院生化系; 洪天配, 教授, 主任医师, 北京大学第三医院内分泌科

免疫调控和营养活化功能, 促进胰岛细胞活性和功能^[6,7], 因而成为治疗T1DM的研究热点. 尽管MSC在体内外特定条件下能诱导出胰岛样细胞^[8,9], 且MSC单独移植进链脲佐菌素诱导的T1DM模型小鼠体内能发挥降血糖作用^[10], 但其作用机制及是否由诱导的胰岛样细胞发挥作用尚存在争议^[2], 另外对于MSC与胰岛细胞联合移植治疗T1DM, MSC诱导的胰岛样细胞其功能尚不能令人满意^[11]. 因此, 本文仅就MSC免疫调控及营养活化作用及潜在的不良反应方面进行简要综述.

1 MSC免疫调控作用

T1DM是一种T细胞介导的自身免疫性疾病, 通过 β 细胞自身抗原产生和激活自身反应性CD4⁺和CD8⁺ T细胞, 激活的T细胞侵入胰腺组织, 选择性破坏胰岛 β 细胞^[1,12]. 而体内外研究表明, MSC能通过分泌抗炎因子或减少炎症细胞因子释放来抑制T细胞增殖达到免疫抑制作用^[13], 另外还能通过调控调节性T细胞(regulatory T cells, Tregs)来发挥免疫调控作用^[14].

1.1 抑制自身反应性T细胞增殖 在T1DM发生过程中, β 细胞自身抗原通过激活T细胞, 破坏胰岛 β 细胞最终导致T1DM的发生^[12], MSC能通过多种方式来抑制T细胞的活化与增殖, 如细胞-细胞直接接触, 通过释放可溶性因子或免疫抑制因子来直接或间接调控T细胞相关受体或配体, 达到抑制T细胞的活化与增殖^[13,15-19]. Augello等^[15]研究表明, MSC可通过活化的T细胞分泌的IFN- γ 正性调节MSC分泌的抗炎因子程序性死亡配体-1(programmed death 1, PD-L1), 从而达到抑制T细胞增殖目的. PD-L1是由MSC在炎症条件下分泌的抗炎因子, 可调控自身免疫和耐受, 而非炎症环境下, MSC检测不到PD-L1^[16]. Nauta等^[17]研究认为MSC还能通过促进IL-10分泌和抑制炎症因子IL-12和IFN- α 的产生, 来促进DC的分化进而达到抑制功能效应性T细胞功能的作用. 另外MSC还可以通过分泌基质金属蛋白酶-2(matrix metalloproteinase-2, MMP-2)和金属蛋白酶-9(matrix metalloproteinase-9, MMP-9)来抑制T细胞的增殖^[13]. MMP通过裂解T细胞胞外白介素-2受体 α (IL-2 receptor α , IL-2R α), 从而减少IL-2的生成, 达到抑制T细胞活化的功能^[18]. 但对于MSC释放可溶性细胞因子如转化生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β)等来抑制T细胞增殖尚存争议, Di Nicola等^[19]研究表明中

和MSC释放的TGF- β 可恢复T细胞增殖活性, 然而Le Blanc等^[20]认为中和TGF- β 无此功效. 这种差异可能是由于MSC所处的微环境不同引起^[18], 其作用机制尚需进一步研究论证.

1.2 调控Tregs活性 Tregs是T细胞的一种特殊亚群, 在维持内环境稳定和自我耐受发挥着重要作用, 其通过表达转录因子FOXP3^[21]以及抑制自身反应性T细胞^[22]来降低免疫反应, 从而达到调控自身免疫性疾病的目的. 在糖尿病患者和NOD小鼠动物模型研究表明, 不管是数量还是功能异常的Tregs都与T1DM的发生、发展密切相关^[23]. Madec等^[24]体外研究表明, MSC能通过分泌IL-10诱导产生Tregs, 阻止激活的T细胞对胰岛 β 细胞的损伤, 减少糖尿病的发生. Zhao等^[14]在NOD小鼠动物模型中研究发现, MSC能通过修正功能缺陷的Tregs发挥免疫调控作用, 且这种调控是持续的. Ge等^[25]研究认为, MSC能通过分泌吲哚胺2, 3-双加氧酶(indoleamine 2, 3-dioxygenase, IDO)来促进Tregs生成. IDO是一种与调控T细胞反应与免疫耐受密切相关的酶, 能促进Tregs产生, 另外对胰岛细胞移植存活有重要意义, 但其具体作用机制尚未完全弄清楚. 而体内研究中, Haller等^[1]将15例T1DM患儿注入富含Tregs的自体脐血, 结果14例患儿能1 mo内能完全脱离外源性胰岛素, 也说明Tregs的免疫调控作用. Di等^[26]通过外周血与MSC培养, 发现MSC通过下调能抑制FOXP3表的CD127分子的表达, 从而达到促进FOXP3表达, 进而达到免疫抑制功能.

2 MSC营养活化功能

胰岛细胞移植后凋亡除了炎症介导的免疫反应外, 另外一个很重要的原因就是营养因子的缺乏^[7]. 生理状况下, 胰岛细胞由致密的毛细血管网所包绕, 尽管这些毛细血管网只占整个胰腺组织的1%-2%, 但血流量却占到5%-10%^[27,28]. 足够的血流量对维持胰岛细胞功能有着极为重要的作用, 而胰岛细胞分离是去血管的, 移植后新生血管网再生要14 d^[29], 使得这段时间成为早期胰岛细胞成活的关键. 在与胰岛细胞共培养/联合移植, MSC能分泌多种营养因子, 如: VEGF-A、肝细胞生长因子(hepatocyte growth factor, HGF)等^[7]来促进胰岛细胞活性与功能, 从而提高胰岛细胞移植后存活率. TGF- β 与IL-6也被认为是MSC分泌的营养因子^[7], 但TGF- β 主要是通过诱导FOXP3发挥免疫调控作用^[30], 而IL-6

■ 研发前沿

目前对于间充质干细胞的免疫调控和营养活性方面作用已越来越受到重视和研究.

■创新盘点

本文重点介绍间充质干细胞与胰岛细胞联合治疗1型糖尿病免疫调控和营养活化方面的作用。

也是一种炎症调节因子,主要发挥免疫调控作用^[31],故未列入营养因子范畴。

2.1 VEGF-A VEGF-A作为一种与新生血管生长相关的重要因子,在胰岛新生血管形成过程中通过与VEGF受体-1结合而发挥着重要的作用^[32,33]。不管是在体外与胰岛细胞共培养还是体内联合移植实验研究, MSC都能分泌VEGF-A因子,促进胰岛细胞活性和功能的作用^[34,35]。Jung等^[34]将胰岛细胞与骨髓来源MSC(bone marrow derived mesenchymal stem cells, BM-MSC)体外共培养与胰岛细胞单独培养比较,结果显示共培养组VEGF-A水平更高,而Sakata等^[35]在体内将胰岛细胞与骨髓细胞联合移植,也表明MSC能分泌VEGF-A有效促进胰岛细胞活性与功能,从而提高胰岛细胞移植后存活率。Rackhamt等^[36]不仅从功能学方面阐释MSC联合移植效果相比其他非联合移植组效果更好,更从形态学角度说明MSC更能维持和促进胰岛细胞移植后新生血管形态。MSC与胰岛细胞联合,能有效促进胰岛血管内皮细胞集聚,这点与生理状态下胰岛细胞血管形态相似,而胰岛细胞单独移植,血管内皮细胞则散在分布。Figliuzzi等^[37]则通过RT-PCR技术,从基因表达水平证实出MSC与胰岛细胞联合移植高表达血管生成因子VEGF₁₆₅。但Wu等^[38]通过腺病毒介导的HGF转染MSC与胰岛细胞联合移植,仅检测到少量VEGF-A,并认为此含量不足以促血管生成。因而对于携带HGF基因的腺病毒载体是否影响MSC促VEGF-A生成,尚待进一步研究。

2.2 HGF HGF是MSC分泌的另一种促进胰岛细胞生长的重要因子。HGF最初从成熟肝细胞中分离纯化而来,能促进多种细胞生长,如:肝细胞、肾小管细胞、软骨细胞、成骨细胞等^[39]。对于胰岛β细胞,体外研究表明, HGF在体外能有效促进胎儿和成人β细胞分裂^[40],而体内研究显示, HGF通过上调葡萄糖转运分子-2、葡萄糖激酶、胰岛素基因的表达,从而达到促进β细胞活性和功能的目的^[41]。另外体内外研究还证实, HGF可作保留胰岛细胞生理性葡萄糖应答反应的刺激增殖物^[37],从而达到促进β细胞活性的效果。Park等^[42]通过体外MSC与胰岛细胞共培养,证实MSC能分泌HGF,促进胰岛活性与功能。Berman等^[43]将MSC与胰岛细胞联合移植进灵长类动物体内,也观察到HGF表达明显优于其他非联合移植组。另外HGF也能促进胰岛血管重建功能^[38,44]。

3 不良反应和潜在的风险

虽然MSC与胰岛细胞联合,具有上述多种单纯移植无可比拟的优势,但也同样存在不良反应和潜在的风险。研究表明, MSC对体内外肿瘤细胞发挥着不同的作用^[45-47],在体内MSC可导致肿瘤发生^[45],同时可促进肿瘤细胞转移^[46],其原因可能是由于MSC有潜在分化能力而宿主机体免疫力相对低下^[48],另外也与其促进肿瘤细胞血管生成作用有关^[49],而体外MSC可使肿瘤细胞停留在G₁期从而抑制其生长^[47]。由于体内的致瘤性及可促进肿瘤细胞转移,使得MSC的临床应用蒙上一层阴影,若能进一步研究体内MSC作用的异同点,从中找到突破口,进行预防和干预或许能有效避免或降低其导致肿瘤发生的机率。另外因MSC的潜在分化能力,其在特定条件下能诱导分化为骨、软骨、脂肪组织^[50],若与胰岛细胞联合应用于临床,其是否会诱导出上述细胞以及对机体产生何种影响尚未可知,还有MSC对全身和局部免疫系统的影响也需考虑^[51],因此应用于临床前,应对MSC进行严格筛选和监测,确保其安全性和有效性。

4 结论

尽管MSC联合胰岛细胞治疗T1DM,在免疫方面和营养活性方面显现出良好的作用,但尚处于动物实验研究阶段,其作用机制仍需进一步证实和完善。另外若要应用于临床,还需注意其潜在的不良反应,进一步研究如何避免其致癌作用及促进肿瘤细胞转移等方面,在保证安全有效的前提下,才能被临床所接受。总之, MSC联合胰岛细胞为治疗T1DM提供了一个新方向,也显示出良好的应用前景,若要应用于临床,尚待时日。

5 参考文献

- 1 Haller MJ, Viener HL, Wasserfall C, Brusko T, Atkinson MA, Schatz DA. Autologous umbilical cord blood infusion for type 1 diabetes. *Exp Hematol* 2008; 36: 710-715
- 2 Palma CA, Lindeman R, Tuch BE. Blood into beta-cells: can adult stem cells be used as a therapy for Type 1 diabetes? *Regen Med* 2008; 3: 33-47
- 3 Vardanyan M, Parkin E, Gruessner C, Rodriguez Rilo HL. Pancreas vs. islet transplantation: a call on the future. *Curr Opin Organ Transplant* 2010; 15: 124-130
- 4 Lee BW, Lee M, Chae HY, Lee S, Kang JG, Kim CS, Lee SJ, Yoo HJ, Ihm SH. Effect of hypoxia-inducible VEGF gene expression on revascularization and graft function in mouse islet transplantation. *Transpl Int* 2011; 24: 307-314

- 5 Ryan EA, Paty BW, Senior PA, Bigam D, Alfadhli E, Kneteman NM, Lakey JR, Shapiro AM. Five-year follow-up after clinical islet transplantation. *Diabetes* 2005; 54: 2060-2069
- 6 Zhao Y, Mazzone T. Human cord blood stem cells and the journey to a cure for type 1 diabetes. *Autoimmun Rev* 2010; 10: 103-107
- 7 Park KS, Kim YS, Kim JH, Choi B, Kim SH, Tan AH, Lee MS, Lee MK, Kwon CH, Joh JW, Kim SJ, Kim KW. Trophic molecules derived from human mesenchymal stem cells enhance survival, function, and angiogenesis of isolated islets after transplantation. *Transplantation* 2010; 89: 509-517
- 8 Wang HW, Lin LM, He HY, You F, Li WZ, Huang TH, Ma GX, Ma L. Human umbilical cord mesenchymal stem cells derived from Wharton's jelly differentiate into insulin-producing cells in vitro. *Chin Med J (Engl)* 2011; 124: 1534-1539
- 9 Phadnis SM, Joglekar MV, Dalvi MP, Muthyala S, Nair PD, Ghaskadbi SM, Bhonde RR, Hardikar AA. Human bone marrow-derived mesenchymal cells differentiate and mature into endocrine pancreatic lineage in vivo. *Cytotherapy* 2011; 13: 279-293
- 10 Kang HM, Kim J, Park S, Kim J, Kim H, Kim KS, Lee EJ, Seo SI, Kang SG, Lee JE, Lim H. Insulin-secreting cells from human eyelid-derived stem cells alleviate type I diabetes in immunocompetent mice. *Stem Cells* 2009; 27: 1999-2008
- 11 Karaoz E, Ayhan S, Okçu A, Aksoy A, Bayazit G, Osman Gürol A, Duruksu G. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells co-cultured with pancreatic islets display β cell plasticity. *J Tissue Eng Regen Med* 2011; 5: 491-500
- 12 Chentoufi AA, Binder NR, Berka N, Abunadi T, Polychronakos C. Advances in type I diabetes associated tolerance mechanisms. *Scand J Immunol* 2008; 68: 1-11
- 13 Ding Y, Xu D, Feng G, Bushell A, Muschel RJ, Wood KJ. Mesenchymal stem cells prevent the rejection of fully allogeneic islet grafts by the immunosuppressive activity of matrix metalloproteinase-2 and -9. *Diabetes* 2009; 58: 1797-1806
- 14 Zhao Y, Lin B, Darflinger R, Zhang Y, Holterman MJ, Skidgel RA. Human cord blood stem cell-modulated regulatory T lymphocytes reverse the autoimmune-caused type 1 diabetes in nonobese diabetic (NOD) mice. *PLoS One* 2009; 4: e4226
- 15 Augello A, Tasso R, Negrini SM, Amateis A, Indiveri F, Cancedda R, Pennesi G. Bone marrow mesenchymal progenitor cells inhibit lymphocyte proliferation by activation of the programmed death 1 pathway. *Eur J Immunol* 2005; 35: 1482-1490
- 16 English K, Barry FP, Field-Corbett CP, Mahon BP. IFN-gamma and TNF-alpha differentially regulate immunomodulation by murine mesenchymal stem cells. *Immunol Lett* 2007; 110: 91-100
- 17 Nauta AJ, Kruisselbrink AB, Lurvink E, Willemze R, Fibbe WE. Mesenchymal stem cells inhibit generation and function of both CD34+-derived and monocyte-derived dendritic cells. *J Immunol* 2006; 177: 2080-2087
- 18 Park MJ, Shin JS, Kim YH, Hong SH, Yang SH, Shin JY, Kim SY, Kim B, Kim JS, Park CG. Murine mesenchymal stem cells suppress T lymphocyte activation through IL-2 receptor α (CD25) cleavage by producing matrix metalloproteinases. *Stem Cell Rev* 2011; 7: 381-393
- 19 Di Nicola M, Carlo-Stella C, Magni M, Milanese M, Longoni PD, Matteucci P, Grisanti S, Gianni AM. Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or non-specific mitogenic stimuli. *Blood* 2002; 99: 3838-3843
- 20 Le Blanc K, Rasmusson I, Götherström C, Seidel C, Sundberg B, Sundin M, Rosendahl K, Tammik C, Ringdén O. Mesenchymal stem cells inhibit the expression of CD25 (interleukin-2 receptor) and CD38 on phytohemagglutinin-activated lymphocytes. *Scand J Immunol* 2004; 60: 307-315
- 21 McClymont SA, Putnam AL, Lee MR, Esensten JH, Liu W, Hulme MA, Hoffmüller U, Baron U, Olek S, Bluestone JA, Brusko TM. Plasticity of human regulatory T cells in healthy subjects and patients with type 1 diabetes. *J Immunol* 2011; 186: 3918-3926
- 22 Bluestone JA, Tang Q, Sedwick CE. T regulatory cells in autoimmune diabetes: past challenges, future prospects. *J Clin Immunol* 2008; 28: 677-684
- 23 Alonso N, Soldevila B, Sanmartí A, Pujol-Borrell R, Martínez-Cáceres E. Regulatory T cells in diabetes and gastritis. *Autoimmun Rev* 2009; 8: 659-662
- 24 Madec AM, Mallone R, Afonso G, Abou Mrad E, Mesnier A, Eljaafari A, Thiviolet C. Mesenchymal stem cells protect NOD mice from diabetes by inducing regulatory T cells. *Diabetologia* 2009; 52: 1391-1399
- 25 Ge W, Jiang J, Arp J, Liu W, Garcia B, Wang H. Regulatory T-cell generation and kidney allograft tolerance induced by mesenchymal stem cells associated with indoleamine 2,3-dioxygenase expression. *Transplantation* 2010; 90: 1312-1320
- 26 Di Ianni M, Del Papa B, De Ioanni M, Moretti L, Bonifacio E, Cecchini D, Sportoletti P, Falzetti F, Tabilio A. Mesenchymal cells recruit and regulate T regulatory cells. *Exp Hematol* 2008; 36: 309-318
- 27 Kuroda M, Oka T, Oka Y, Yamochi T, Ohtsubo K, Mori S, Watanabe T, Machinami R, Ohnishi S. Colocalization of vascular endothelial growth factor (vascular permeability factor) and insulin in pancreatic islet cells. *J Clin Endocrinol Metab* 1995; 80: 3196-3200
- 28 Lifson N, Lassa CV, Dixit PK. Relation between blood flow and morphology in islet organ of rat pancreas. *Am J Physiol* 1985; 249: E43-E48
- 29 Menger MD, Yamauchi J, Vollmar B. Revascularization and microcirculation of freely grafted islets of Langerhans. *World J Surg* 2001; 25: 509-515
- 30 Kawamoto K, Pahuja A, Hering BJ, Bansal-Pakala P. Transforming growth factor beta 1 (TGF-beta1) and rapamycin synergize to effectively suppress human T cell responses via upregulation of FoxP3+ Tregs. *Transpl Immunol* 2010; 23: 28-33
- 31 Crop MJ, Baan CC, Korevaar SS, Ijzermans JN, Weimar W, Hoogduijn MJ. Human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells induce explosive T-cell proliferation. *Stem Cells Dev* 2010; 19: 1843-1853
- 32 Cheng Y, Liu YF, Zhang JL, Li TM, Zhao N. Elevation of vascular endothelial growth factor production and its effect on revascularization and function of graft islets in diabetic rats. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 2862-2866
- 33 Watada H. Role of VEGF-A in pancreatic beta cells. *Endocr J* 2010; 57: 185-191
- 34 Jung EJ, Kim SC, Wee YM, Kim YH, Choi MY, Jeong SH, Lee J, Lim DG, Han DJ. Bone marrow-derived

■应用要点

若能解决诸如致瘤及促进肿瘤细胞转移等不良反应, 间充质干细胞联合治疗1型糖尿病有良好的应用前景。

■同行评价

本文在选题上较新,间充质干细胞技术联合治疗糖尿病是近年来较新较热的一个基础研究方向,并具有较强的临床应用价值及前景。

- mesenchymal stromal cells support rat pancreatic islet survival and insulin secretory function in vitro. *Cytotherapy* 2011; 13: 19-29
- 35 Sakata N, Chan NK, Chrisler J, Obenaus A, Hathout E. Bone marrow cell cotransplantation with islets improves their vascularization and function. *Transplantation* 2010; 89: 686-693
- 36 Rackham CL, Chagastelles PC, Nardi NB, Hauge-Evans AC, Jones PM, King AJ. Co-transplantation of mesenchymal stem cells maintains islet organisation and morphology in mice. *Diabetologia* 2011; 54: 1127-1135
- 37 Figliuzzi M, Cornolti R, Perico N, Rota C, Morigi M, Remuzzi G, Remuzzi A, Benigni A. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells improve islet graft function in diabetic rats. *Transplant Proc* 2009; 41: 1797-1800
- 38 Wu H, Lu W, Mahato RI. Mesenchymal stem cells as a gene delivery vehicle for successful islet transplantation. *Pharm Res* 2011; 28: 2098-2109
- 39 Rao P, Cozar-Castellano I, Roccisana J, Vasavada RC, Garcia-Ocaña A. Hepatocyte growth factor gene therapy for islet transplantation. *Expert Opin Biol Ther* 2004; 4: 507-518
- 40 Fiaschi-Taesch NM, Berman DM, Sicari BM, Takane KK, Garcia-Ocaña A, Ricordi C, Kenyon NS, Stewart AF. Hepatocyte growth factor enhances engraftment and function of nonhuman primate islets. *Diabetes* 2008; 57: 2745-2754
- 41 García-Ocaña A, Vasavada RC, Cebrian A, Reddy V, Takane KK, López-Talavera JC, Stewart AF. Transgenic overexpression of hepatocyte growth factor in the beta-cell markedly improves islet function and islet transplant outcomes in mice. *Diabetes* 2001; 50: 2752-2762
- 42 Park KS, Kim YS, Kim JH, Choi BK, Kim SH, Oh SH, Ahn YR, Lee MS, Lee MK, Park JB, Kwon CH, Joh JW, Kim KW, Kim SJ. Influence of human allogenic bone marrow and cord blood-derived mesenchymal stem cell secreting trophic factors on ATP (adenosine-5'-triphosphate)/ADP (adenosine-5'-diphosphate) ratio and insulin secretory function of isolated human islets from cadaveric donor. *Transplant Proc* 2009; 41: 3813-3818
- 43 Berman DM, Willman MA, Han D, Kleiner G, Kenyon NM, Cabrera O, Karl JA, Wiseman RW, O'Connor DH, Bartholomew AM, Kenyon NS. Mesenchymal stem cells enhance allogeneic islet engraftment in nonhuman primates. *Diabetes* 2010; 59: 2558-2568
- 44 Golocheikine A, Tiriveedhi V, Angaswamy N, Benshoff N, Sabarinathan R, Mohanakumar T. Cooperative signaling for angiogenesis and neovascularization by VEGF and HGF following islet transplantation. *Transplantation* 2010; 90: 725-731
- 45 Wang Y, Huso DL, Harrington J, Kellner J, Jeong DK, Turney J, McNiece IK. Outgrowth of a transformed cell population derived from normal human BM mesenchymal stem cell culture. *Cytotherapy* 2005; 7: 509-519
- 46 Miura M, Miura Y, Padilla-Nash HM, Molinolo AA, Fu B, Patel V, Seo BM, Sonoyama W, Zheng JJ, Baker CC, Chen W, Ried T, Shi S. Accumulated chromosomal instability in murine bone marrow mesenchymal stem cells leads to malignant transformation. *Stem Cells* 2006; 24: 1095-1103
- 47 Lu YR, Yuan Y, Wang XJ, Wei LL, Chen YN, Cong C, Li SF, Long D, Tan WD, Mao YQ, Zhang J, Li YP, Cheng JQ. The growth inhibitory effect of mesenchymal stem cells on tumor cells in vitro and in vivo. *Cancer Biol Ther* 2008; 7: 245-251
- 48 McCall MD, Toso C, Baetge EE, Shapiro AM. Are stem cells a cure for diabetes? *Clin Sci (Lond)* 2010; 118: 87-97
- 49 Tian LL, Yue W, Zhu F, Li S, Li W. Human mesenchymal stem cells play a dual role on tumor cell growth in vitro and in vivo. *J Cell Physiol* 2011; 226: 1860-1867
- 50 Gluckman E. History of cord blood transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2009; 44: 621-626
- 51 Vija L, Farge D, Gautier JF, Vexiau P, Dumitrache C, Bourgarit A, Verrecchia F, Larghero J. Mesenchymal stem cells: Stem cell therapy perspectives for type 1 diabetes. *Diabetes Metab* 2009; 35: 85-93

编辑 李军亮 电编 何基才

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

• 消息 •

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

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

肿瘤抗淋巴管生成研究进展

吴而回, 燕敏

吴而回, 燕敏, 上海交通大学医学院附属瑞金医院普外科 上海市 200025

作者贡献分布: 本文由吴而回综述; 燕敏审校。

通讯作者: 燕敏, 主任医师, 教授, 200025, 上海市瑞金二路197号, 上海交通大学医学院附属瑞金医院普外科。

ymrjym@yahoo.com.cn

电话: 021-64370045

收稿日期: 2010-11-02 修回日期: 2011-09-01

接受日期: 2011-08-26 在线出版日期: 2011-08-28

Lymphangiogenesis in cancers: a therapy target

Er-Hui Wu, Min Yan

Er-Hui Wu, Min Yan, Department of General Surgery, Ruijin Hospital Affiliated to Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200025, China

Correspondence to: Professor Min Yan, Department of General Surgery, Ruijin Hospital Affiliated to Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, 197 Ruijin Er Road, Shanghai 200025, China. ymrjym@yahoo.com.cn

Received: 2010-11-02 Revised: 2011-09-01

Accepted: 2011-08-26 Published online: 2011-08-28

Abstract

Tumor metastasis is a major cause of death among cancer patients. The lymphatic vasculature is an important route for the metastatic spread of cancer. Recent research has indicated that vascular endothelial growth factor C (VEGF-C), VEGF-D and VEGF receptor-3 (VEGFR-3) are closely related to tumor-induced lymphangiogenesis, tumor metastasis and prognosis. Numerous studies demonstrate that the VEGF-C/VEGF-D/VEGFR-3 signaling axis plays a leading role in the regulation of tumor lymphangiogenesis and is related to tumor metastasis and prognosis. It has been confirmed that inhibition of the VEGF-C/VEGF-D/VEGFR-3 signaling axis can exert anti-lymphangiogenic effect and thereby prevent tumor metastasis in animal models. In this paper we review the molecular biology of lymphangiogenesis, its relationship with cancer metastasis, and the clinical implications of inhibition of lymphangiogenesis.

Key Words: Lymphatic vasculature; Vascular endothelial growth factor; Molecular biology

Wu EH, Yan M. Lymphangiogenesis in cancers: a therapy target. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2011; 19(24): 2555-2561

摘要

肿瘤转移是癌症患者的主要死因之一, 淋巴管转移是肿瘤转移的重要途径, 研究发现VEGF-C/VEGF-D/VEGFR-3与肿瘤淋巴管生成、肿瘤转移、肿瘤预后密切相关。大量的研究证实VEGF-C/VEGF-D/VEGFR-3信号传导轴在调节肿瘤淋巴管生成中起主导作用, 临床病理研究也显示VEGF-C/VEGF-D/VEGFR-3与某些肿瘤转移、预后相关, 抑制VEGF-C/VEGF-D/VEGFR-3信号传导轴来抗肿瘤淋巴管生成, 从而阻止肿瘤转移已经广泛得在动物模型中得到证实。近年通过抑制VEGF-C/VEGF-D/VEGFR-3信号系统来治疗肿瘤转移的研究已经开展, 本文就淋巴管生成分子生物学、淋巴管与肿瘤转移以及抗淋巴管生成三方面加以综述。

关键词: 淋巴管; 血管内皮生长因子; 分子生物学

吴而回, 燕敏. 肿瘤抗淋巴管生成研究进展. 世界华人消化杂志 2011; 19(24): 2555-2561

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/2555.asp>

0 引言

肿瘤患者多数死于转移, 淋巴管是肿瘤转移的重要途径之一。以前认为肿瘤通过周围既有的淋巴管转移, 通过研究的深入发现肿瘤可以诱导淋巴管生成促进转移, 一系列影响淋巴管生成的调控因子和受体也相继发现, 其中最主要的是血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)-C、VEGF-D及他们的受体血管内皮生长因子受体-3(vascular endothelial growth factor receptor-3), 许多动物模型和临床病理研究都提示其在肿瘤淋巴管生成和转移中起重要作用, 因此, 这些调控因子及其受体有望成为抑制淋巴管生成治疗肿瘤转移的靶向。

■背景资料

肿瘤转移是癌症患者的主要死因之一, 淋巴管转移是肿瘤转移的重要途径, 研究发现VEGF-C/VEGF-D/VEGFR-3与肿瘤淋巴管生成、肿瘤转移、肿瘤预后密切相关, 近年通过抑制VEGF-C/VEGF-D/VEGFR-3信号系统来治疗肿瘤转移的研究已经开展。

■同行评议者

黄志勇, 副教授, 华中科技大学同济医学院附属同济医院肝胆外科中心

■ 研发前沿

抑制 VEGF-C/VEGF-D/VEGFR-3 信号传导轴来抗肿瘤淋巴管生成, 从而阻止肿瘤转移已经广泛得在动物模型中得到证实, 因此抗淋巴管生成有望成为肿瘤治疗手段之一。

1 淋巴管生成的分子生物学

1.1 VEGF-C/VEGF-D/VEGFR-3 信号系统 VEGF-C、VEGF-D 及他们的受体 VEGFR-3 是目前研究最深入的介导淋巴管生成的信号系统。VEGF-C 和 VEGF-D 是分泌型的糖蛋白, 其前蛋白经过丝氨酸蛋白酶纤溶酶^[1]和前蛋白转换酶(proprotein converting enzyme)家族的 PC5、PC7^[2]水解为成熟形式。随着 VEGF-C 和 VEGF-D 的逐渐水解, 其对 VEGFR-3 的亲和力逐渐提高^[3,4], 提示 VEGF-C 和 VEGF-D 的水解程度可能参与影响淋巴管生成的程度。VEGF-C 和 VEGF-D 的成熟形式也能同时结合激活 VEGFR-2 促进血管生成, 但是他们对 VEGFR-3 的活性更强^[3]。

在成人 VEGFR-3 只表达于淋巴管内皮细胞^[5], 作为受体酪氨酸激酶家族的成员, 与 VEGF-C 和 VEGF-D 结合后形成二聚体, 后者胞质的酪氨酸残基发生磷酸转移作用^[6], 磷酸化是受体激酶活性调节和受体相互作用信号传导的重要步骤。将分离培养的人淋巴管内皮细胞用抗体结合后发现 VEGFR-3 激活后可刺激细胞分化增殖^[7], 而一些人类遗传性淋巴水肿疾病则于 VEGFR-3 基因突变有关^[8]。

大量的体内体外实验探索了 VEGF-C 和 VEGF-D 的作用。Makinen 等^[9]发现通过阻断 VEGFR-3 的活化可以阻止胚胎的淋巴管形成。Jeltsch 等^[10]和 Veikkola 等^[11]通过转基因技术使小鼠皮肤表达 VEGF-C 和 VEGF-D, 结果皮肤中出现淋巴管内皮细胞增殖, 而没有新生的血管。Karkkainen 等^[12]剔除小鼠的 VEGF-C 基因导致淋巴管内皮细胞不能出芽形成淋巴管系统, 导致小鼠胚胎时期死于水肿。Szuba 等^[13]在动物模型中用人重组 VEGF-C 治疗淋巴水肿, 结果发现 VEGF-C 促进淋巴管生成, 水肿得到改善。上述研究结果提示, VEGF-C/VEGF-D/VEGFR-3 在影响淋巴管生成中起重要作用, 因而也是抗淋巴管生成研究最多的治疗靶向。

1.2 淋巴管生成的其他影响因素 有研究^[14]发现, VEGF-C 和 VEGF-D 可以结合并激活表达于淋巴管内皮细胞的 $\alpha 9 \beta 1$ 整合素, Huang 等^[15]剔除胚胎的 $\alpha 9$ 亚单位引起淋巴管发育障碍而导致死亡, 提示 $\alpha 9 \beta 1$ 整合素与淋巴管的发育和功能有关。同源异型盒转录因子 Prox1 与淋巴管内皮细胞的表型改变密切相关, 剔除 Prox1 抑制了小鼠胚胎淋巴管出芽和延伸发育^[16], 血管内皮细胞表达 Prox1 后表达了只在淋巴管内皮细胞的基因谱^[17,18]。据报道, 影响淋巴管生

成的调控因子还有 VEGF-A^[19]、成纤维生长因子-2(fibroblast growth factor-2, FGF-2)^[20], 血小板衍生因子(platelet derived growth factor-BB, PDGF-BB)^[21]、促血管生成素受体(the angiopoietin receptor-2)的配体促血管生成素-1(Angiopoietin-1)^[22]和肝细胞生长因子受体(c-Met)^[23]。Schoppmann 等^[24]发现肿瘤相关的巨噬细胞表达 VEGF-C, 与淋巴管生成、淋巴结转移有关。

2 淋巴管生成与肿瘤转移

2.1 淋巴管和肿瘤转移 肿瘤细胞转移至重要器官并继续增殖生长, 破坏器官结构、影响器官功能是肿瘤致死的原因之一。淋巴道是肿瘤转移的重要途径, Sleeman 等^[25]认为, 肿瘤发展早期进入血管的肿瘤细胞因为血液中的血液动力学压力等一些因素而大多数被破坏, 而侵入淋巴道的肿瘤细胞可以继续增殖扩充先造成淋巴结转移, 最终通过胸导管进入血循环而远处转移, 因此淋巴结对于具备转移能力的肿瘤细胞起着选择和放大的作用, 淋巴结转移也可看作是肿瘤远处播散的“桥头堡”。Trarin 等^[26]给29位恶性腹水的患者实施腹腔静脉分流术, 虽然使含有肿瘤细胞的腹水进入了血循环, 但在最终15位患者尸解时却发现他们无一远处转移。这提示我们淋巴管似乎在肿瘤转移中扮演特殊的角色。

2.2 VEGF-C/VEGF-D/VEGFR-3 与肿瘤转移 以前认为肿瘤可以侵入周围既有的淋巴管发生转移, 不必生成新的淋巴管^[27], 肿瘤内部是否存在淋巴管也曾经遭受质疑, 因为肿瘤不断生长扩张, 瘤体压力相对较大, 淋巴管不能延伸进入肿瘤内^[28]。随着研究的深入发现 VEGFR-3 活化后能诱导肿瘤淋巴管生成、促进肿瘤淋巴结转移, 肿瘤表达 VEGF-C 或 VEGF-D 促进淋巴管生成, 新生的淋巴管与周围的淋巴管相互连同, 肿瘤周围淋巴管密度的增加提高了肿瘤淋巴转移的机会。Skobe 等^[29]将人乳腺癌细胞种植到裸鼠体内, 发现 VEGF-C 的表达促进肿瘤内部淋巴管生成、肿瘤淋巴结转移和肺转移。另一个乳腺癌动物模型中, VEGF-C 促进肿瘤相关的淋巴管生长, 淋巴管内充满肿瘤细胞^[30], 同时促进淋巴结转移^[31]。Trojan 等^[32]发现 VEGF-C 在前列腺癌的表达高于良性前列腺增生(benign prostatic hyperplasia, BPH), 有淋巴结转移的前列腺癌高于无淋巴结转移。在 Mandriota 等^[33]建立的转基因小鼠模型中, 胰腺 β 细胞高表达 VEGF-C 的试验组比野生型对照组的胰岛有更广泛的淋巴管

生成, 当肿瘤被引入进胰岛后, 试验组发生了淋巴结转移, 而对照组则没有. 在一个异种移植小鼠模型^[34], 肿瘤细胞VEGF-D的表达促进瘤内淋巴管生成和淋巴结转移, 同时也促进血管生成和肿瘤生长, 提示水解后成熟型的VEGF-D也能结合激活VEGFR-2, 诱导血管生成; 试用中和性VEGF-D抗体封闭VEGFR-2和VEGFR-3能阻断肿瘤淋巴结转移^[34,35], 这也是首个直接的证据表明可以预防肿瘤淋巴转移^[28].

早期的研究都显示出肿瘤表达VEGF-C和VEGF-D跟淋巴结转移有关^[27], VEGF-C的表达在肺癌、结直肠癌和前列腺癌中与淋巴结转移相关^[36], 尽管到现在多数的研究结果如此, 但也有少数的报道与之不符. 神经母细胞瘤中VEGF-C和淋巴结转移无相关性^[37], 肺癌中VEGF-D与淋巴结转移无相关性^[38]. 早期未分化胃癌VEGF-C表达与淋巴结转移相关, 但在分化型胃癌却无相关性; 分化型胃癌中VEGF-D也显示与淋巴结转移无相关性^[39]. T1和T2期口腔鳞癌VEGF-C表达与淋巴结转移相关, 但T3和T4期肿瘤却没有相关性^[40]. 这些研究结果提示影响肿瘤淋巴管生成的因素可能比早先预料的复杂得多, 正如前文所述, 尚有其他因素同时影响淋巴管的生成, 因此在设计抗淋巴管生成的肿瘤治疗方法时, 这些影响因素也应加以考虑, 同时, 这些因素的影响程度也有待进一步研究.

2.3 VEGF-C/VEGF-D/VEGFR-3与肿瘤预后 回顾过去几年的临床病理研究可以看到VEGF-C、VEGF-D和VEGFR-3的表达跟患者预后相关. VEGF-C可能是卵巢癌和宫颈癌的预后危险因素^[41,42]. RAA Mohammed等^[43]一项对177例乳腺癌患者长达10年的随访研究发现, 肿瘤细胞表达VEGF-C与淋巴管密度、总体生存期和无病生存期相关, 但VEGF-D却未显示上述的相关性. 有两项研究研究显示VEGF-C与肺癌淋巴结转移无相关性, 却与预后差相关^[44,45]. VEGF-D的表达水平与结直肠癌^[46]、胰腺癌^[47]、子宫内膜癌^[48]和卵巢癌^[49]的预后相关. Juttner等^[50]报道同时表达VEGF-D和VEGFR-3是胃癌预后不良的独立危险因素.

然而, 同时也有少数不一致的报道. VEGF-C在神经母细胞瘤^[37]、胰腺癌^[47,51]和结直肠癌^[52]中与预后未显示出相关性.

3 抗淋巴管生成作为肿瘤治疗的研究进展

3.1 动物模型中的抗淋巴管生成研究 从动物模型实验到人类肿瘤临床病理研究, 一系列的研究

结果都显示VEGF-C/VEGF-D/VEGFR-3信号传导轴在肿瘤淋巴管生成和淋巴转移中起主导作用, 因此抑制VEGFR-3的活化, 使得以抑制转移为方法的肿瘤治疗成为可能, 在这点上, 已经有研究人员做了大量的工作. He等^[53]将具有高度转移能力的人肺癌细胞株NCI-H460-LNM35通过转基因表达可溶性的VEGFR-3, 可溶性的VEGFR-3与肿瘤细胞VEGF-C结合, 抑制了内源性VEGFR-3的信号传导, 将处理过的肿瘤细胞种植到试验小鼠, 将未处理的肿瘤细胞种植到对照小鼠, 发现试验组小鼠相比对照组小鼠肿瘤内部少有淋巴管, 淋巴引流液也少有转移的肿瘤细胞, 将对照组小鼠用经过重组表达可溶性VEGFR-3的腺病毒处理后发现, 肿瘤淋巴结转移同样被限制. 在另一个动物模型中^[54], 高度转移能力的乳腺癌细胞株MT-450表达可溶性VEGFR-3后, 小鼠的淋巴结专业和肺转移都被抑制. Lin等^[55]发现小鼠黑色素瘤模型中表达可溶性VEGFR-3的腺病毒能抑制淋巴结转移. 在一个小鼠乳腺癌模型^[56]中siRNA介导的基因沉默抑制了VEGF-C的表达, 继而减少了淋巴管生成、淋巴结转移和肺转移.

3.2 抗淋巴管生成的实现方法 理论上上有几种方法来阻断VEGFR-3依赖的肿瘤淋巴管生成. 应用可溶性的VEGFR-3结合VEGF-C和VEGF-D来抑制内源性VEGFR-3的活化已经在肿瘤动物模型中广泛开展^[30,53-55], 目前还没有相关的临床试验的报道, 尚不清楚可溶性VEGFR-3结合VEGF-C/VEGF-D后是否同样可以抑制内源性VEGFR-2活化从而抑制血管生成. 类似的细胞表面受体可溶性制剂已经有药物用于临床, 比如可溶性肿瘤坏死因子受体p75和免疫球蛋白Fc段的融合蛋白依那西普(Enbrel)已经被FDA批准用于风湿性关节炎治疗.

另一种方法是用VEGF-C/VEGF-D/VEGFR-3的单克隆抗体来结合VEGFR-2/VEGFR-3^[34,35,57,58]. 小鼠肿瘤动物模型中应用VEGF-D的单抗可以抑制血管生成、淋巴管生成和淋巴结转移^[34]. VEGFR-3的单抗可以抑制成人的淋巴管再生^[59], 其对于人类肿瘤的作用尚未见报道. VEGFR-3的单抗不能阻断VEGFR-2的激活, 但已有研究^[60]报道了能同时结合VEGFR-2/VEGFR-3的双特异性抗体. 通过抑制肿瘤血管生成来治疗转移性结直肠癌的VEGF-A单抗贝伐单抗(avastin)既是此类药物.

第3种方法是利用小分子进到细胞内, 抑

■相关报道

近年已有报道通过抑制VEGF-C/VEGF-D/VEGFR-3信号系统来治疗肿瘤转移的研究.

■应用要点

通过抑制 VEGF-C / VEGF-D/VEGFR-3 信号传导轴来抗肿瘤淋巴管生成,从而阻止肿瘤转移已经广泛得在动物模型中得到证实,因此抗淋巴管生成有望成为肿瘤治疗手段之一。

制 VEGFR-3 酪氨酸激酶或抑制信号传导的环节,他们包括 BAY 43-9006^[61]、CEP-7055^[62]、PTK787/ZK222584^[63]、MAE87、MAE106、MAZ51^[64],其中前三者已经进入临床试验。目前尚无类似药物用于临床。

3.3 抗淋巴管生成的临床应用展望 目前掌握的淋巴管生成对于肿瘤转移的重要作用提示可以通过阻断 VEGFR-3 的活化来抑制转移,虽然对于已有的转移可能无效,但可以阻断新的淋巴管生成来抑制新的转移,因此预防性的抑制肿瘤转移对于存在复发风险的肿瘤患者具有一定意义。对于 T1a 期的前列腺癌,外科手术的风险大于患者的获益而往往只是严密随访,一定比例的患者会在期间出现危及生命的肿瘤转移,有 16%-25% 的 T1a 期前列腺癌患者会在 8-10 年内发生上述情况^[65],因此对于类似生长缓慢的肿瘤长期应用预防性的抑制肿瘤转移的药物同样有重要意义。

大多数实体肿瘤的治疗方法采取手术局部切除,然后根据敏感性给予化疗来预防控制复发和转移。近年有研究术前应用化疗使肿瘤缩小易于手术,或通过术前化疗来改善患者预后,此时可应用抗淋巴管生成治疗联合常规化疗来改善预后、预防复发。晚期无法切除的肿瘤仍是治疗的难题,抗淋巴管生成治疗联合其他全身治疗也可用于这种情况。

抗淋巴管生成具有良好的应用前景,为了更安全有效的用于临床治疗, Thiele 等^[66]在 2006 年提出 4 个需要进一步阐明的问题: (1)除 VEGFR-3 外,其他同时参与影响肿瘤淋巴管生成的因素; (2)肿瘤发生发展过程中什么阶段 VEGF-C/VEGF-D 表达上调,肿瘤淋巴管生成是否可逆; (3)抗淋巴管生成可能带来的副作用; (4)淋巴管在肿瘤转移中的作用。

4 结论

大量的研究证实肿瘤淋巴管生成和肿瘤转移相关, VEGF-C/VEGF-D/VEGFR-3 信号传导轴在调节肿瘤淋巴管生成中起主导作用,临床病理研究也显示 VEGF-C/VEGF-D/VEGFR-3 与某些肿瘤转移、预后相关。抑制 VEGF-C/VEGF-D/VEGFR-3 信号传导轴来抗肿瘤淋巴管生成,从而阻止肿瘤转移已经广泛得在动物模型中得到证实,因此抗淋巴管生成有望成为肿瘤治疗手段之一,而在真正实现有效安全的临床应用之前,尚有许多问题有待解决。

5 参考文献

- 1 McColl BK, Baldwin ME, Roufail S, Freeman C, Moritz RL, Simpson RJ, Alitalo K, Stacker SA, Achen MG. Plasmin activates the lymphangiogenic growth factors VEGF-C and VEGF-D. *J Exp Med* 2003; 198: 863-868
- 2 Siegfried G, Basak A, Cromlish JA, Benjannet S, Marcinkiewicz J, Chrétien M, Seidah NG, Khatib AM. The secretory proprotein convertases furin, PC5, and PC7 activate VEGF-C to induce tumorigenesis. *J Clin Invest* 2003; 111: 1723-1732
- 3 Joukov V, Sorsa T, Kumar V, Jeltsch M, Claesson-Welsh L, Cao Y, Saksela O, Kalkkinen N, Alitalo K. Proteolytic processing regulates receptor specificity and activity of VEGF-C. *EMBO J* 1997; 16: 3898-3911
- 4 Stacker SA, Stenvers K, Caesar C, Vitali A, Domagala T, Nice E, Roufail S, Simpson RJ, Moritz R, Karpanen T, Alitalo K, Achen MG. Biosynthesis of vascular endothelial growth factor-D involves proteolytic processing which generates non-covalent homodimers. *J Biol Chem* 1999; 274: 32127-32136
- 5 Lymboussaki A, Partanen TA, Olofsson B, Thomas-Crusells J, Fletcher CD, de Waal RM, Kaipainen A, Alitalo K. Expression of the vascular endothelial growth factor C receptor VEGFR-3 in lymphatic endothelium of the skin and in vascular tumors. *Am J Pathol* 1998; 153: 395-403
- 6 Dixelius J, Makinen T, Wirzenius M, Karkkainen MJ, Wernstedt C, Alitalo K, Claesson-Welsh L. Ligand-induced vascular endothelial growth factor receptor-3 (VEGFR-3) heterodimerization with VEGFR-2 in primary lymphatic endothelial cells regulates tyrosine phosphorylation sites. *J Biol Chem* 2003; 278: 40973-40979
- 7 Mäkinen T, Veikkola T, Mustjoki S, Karpanen T, Catimel B, Nice EC, Wise L, Mercer A, Kowalski H, Kerjaschki D, Stacker SA, Achen MG, Alitalo K. Isolated lymphatic endothelial cells transduce growth, survival and migratory signals via the VEGF-C/D receptor VEGFR-3. *EMBO J* 2001; 20: 4762-4773
- 8 Karkkainen MJ, Saaristo A, Jussila L, Karila KA, Lawrence EC, Pajusola K, Bueler H, Eichmann A, Kauppinen R, Kettunen MI, Ylä-Herttuala S, Finegold DN, Ferrell RE, Alitalo K. A model for gene therapy of human hereditary lymphedema. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98: 12677-12682
- 9 Mäkinen T, Jussila L, Veikkola T, Karpanen T, Kettunen MI, Pulkkanen KJ, Kauppinen R, Jackson DG, Kubo H, Nishikawa S, Ylä-Herttuala S, Alitalo K. Inhibition of lymphangiogenesis with resulting lymphedema in transgenic mice expressing soluble VEGF receptor-3. *Nat Med* 2001; 7: 199-205
- 10 Jeltsch M, Kaipainen A, Joukov V, Meng X, Lakso M, Rauvala H, Swartz M, Fukumura D, Jain RK, Alitalo K. Hyperplasia of lymphatic vessels in VEGF-C transgenic mice. *Science* 1997; 276: 1423-1425
- 11 Veikkola T, Jussila L, Makinen T, Karpanen T, Jeltsch M, Petrova TV, Kubo H, Thurston G, McDonald DM, Achen MG, Stacker SA, Alitalo K. Signalling via vascular endothelial growth factor receptor-3 is sufficient for lymphangiogenesis in transgenic mice. *EMBO J* 2001; 20: 1223-1231
- 12 Karkkainen MJ, Haiko P, Sainio K, Partanen J, Taipale J, Petrova TV, Jeltsch M, Jackson DG, Talikka M, Rauvala H, Betsholtz C, Alitalo K. Vascular endothelial growth factor C is required for sprouting of the first lymphatic vessels from embryonic veins.

- Nat Immunol* 2004; 5: 74-80
- 13 Szuba A, Skobe M, Karkkainen MJ, Shin WS, Beynet DP, Rockson NB, Dakhil N, Spilman S, Goris ML, Strauss HW, Quertermous T, Alitalo K, Rockson SG. Therapeutic lymphangiogenesis with human recombinant VEGF-C. *FASEB J* 2002; 16: 1985-1987
 - 14 Vlahakis NE, Young BA, Atakilit A, Sheppard D. The lymphangiogenic vascular endothelial growth factors VEGF-C and -D are ligands for the integrin $\alpha 9 \beta 1$. *J Biol Chem* 2005; 280: 4544-4552
 - 15 Huang XZ, Wu JF, Ferrando R, Lee JH, Wang YL, Farese RV, Sheppard D. Fatal bilateral chylothorax in mice lacking the integrin $\alpha 9 \beta 1$. *Mol Cell Biol* 2000; 20: 5208-5215
 - 16 Wigle JT, Oliver G. Prox1 function is required for the development of the murine lymphatic system. *Cell* 1999; 98: 769-778
 - 17 Petrova TV, Mäkinen T, Mäkelä TP, Saarela J, Virtanen I, Ferrell RE, Finegold DN, Kerjaschki D, Ylä-Herttuala S, Alitalo K. Lymphatic endothelial reprogramming of vascular endothelial cells by the Prox-1 homeobox transcription factor. *EMBO J* 2002; 21: 4593-4599
 - 18 Hong YK, Harvey N, Noh YH, Schacht V, Hirakawa S, Detmar M, Oliver G. Prox1 is a master control gene in the program specifying lymphatic endothelial cell fate. *Dev Dyn* 2002; 225: 351-357
 - 19 Nagy JA, Vasile E, Feng D, Sundberg C, Brown LF, Detmar MJ, Lawitts JA, Benjamin L, Tan X, Manseau EJ, Dvorak AM, Dvorak HF. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor induces lymphangiogenesis as well as angiogenesis. *J Exp Med* 2002; 196: 1497-1506
 - 20 Kubo H, Cao R, Brakenhielm E, Mäkinen T, Cao Y, Alitalo K. Blockade of vascular endothelial growth factor receptor-3 signaling inhibits fibroblast growth factor-2-induced lymphangiogenesis in mouse cornea. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99: 8868-8873
 - 21 Cao R, Björndahl MA, Religa P, Clasper S, Garvin S, Galter D, Meister B, Ikomi F, Tritsarlis K, Dissing S, Ohhashi T, Jackson DG, Cao Y. PDGF-BB induces intratumoral lymphangiogenesis and promotes lymphatic metastasis. *Cancer Cell* 2004; 6: 333-345
 - 22 Morisada T, Oike Y, Yamada Y, Urano T, Akao M, Kubota Y, Maekawa H, Kimura Y, Ohmura M, Miyamoto T, Nozawa S, Koh GY, Alitalo K, Suda T. Angiopoietin-1 promotes LYVE-1-positive lymphatic vessel formation. *Blood* 2005; 105: 4649-4656
 - 23 Kajiya K, Hirakawa S, Ma B, Drinnenberg I, Detmar M. Hepatocyte growth factor promotes lymphatic vessel formation and function. *EMBO J* 2005; 24: 2885-2895
 - 24 Schoppmann SF, Fenzl A, Nagy K, Unger S, Bayer G, Geleff S, Gnant M, Horvat R, Jakesz R, Birner P. VEGF-C expressing tumor-associated macrophages in lymph node positive breast cancer: impact on lymphangiogenesis and survival. *Surgery* 2006; 139: 839-846
 - 25 Sleeman JP. The lymph node as a bridgehead in the metastatic dissemination of tumors. *Recent Results Cancer Res* 2000; 157: 55-81
 - 26 Tarin D, Price JE, Kettlewell MG, Souter RG, Vass AC, Crossley B. Mechanisms of human tumor metastasis studied in patients with peritoneovenous shunts. *Cancer Res* 1984; 44: 3584-3592
 - 27 Pepper MS. Lymphangiogenesis and tumor metastasis: myth or reality? *Clin Cancer Res* 2001; 7: 462-468
 - 28 Padera TP, Kadambi A, di Tomaso E, Carreira CM, Brown EB, Boucher Y, Choi NC, Mathisen D, Wain J, Mark EJ, Munn LL, Jain RK. Lymphatic metastasis in the absence of functional intratumor lymphatics. *Science* 2002; 296: 1883-1886
 - 29 Skobe M, Hawighorst T, Jackson DG, Prevo R, Janes L, Velasco P, Riccardi L, Alitalo K, Claffey K, Detmar M. Induction of tumor lymphangiogenesis by VEGF-C promotes breast cancer metastasis. *Nat Med* 2001; 7: 192-198
 - 30 Karpanen T, Egeblad M, Karkkainen MJ, Kubo H, Ylä-Herttuala S, Jäättelä M, Alitalo K. Vascular endothelial growth factor C promotes tumor lymphangiogenesis and intralymphatic tumor growth. *Cancer Res* 2001; 61: 1786-1790
 - 31 Mattila MM, Ruohola JK, Karpanen T, Jackson DG, Alitalo K, Härkönen PL. VEGF-C induced lymphangiogenesis is associated with lymph node metastasis in orthotopic MCF-7 tumors. *Int J Cancer* 2002; 98: 946-951
 - 32 Trojan L, Rensch F, Voss M, Grobholz R, Weiss C, Jackson DG, Alken P, Michel MS. The role of the lymphatic system and its specific growth factor, vascular endothelial growth factor C, for lymphogenic metastasis in prostate cancer. *BJU Int* 2006; 98: 903-906
 - 33 Mandriota SJ, Jussila L, Jeltsch M, Compagni A, Baetens D, Prevo R, Banerji S, Huarte J, Montesano R, Jackson DG, Orci L, Alitalo K, Christofori G, Pepper MS. Vascular endothelial growth factor-C-mediated lymphangiogenesis promotes tumour metastasis. *EMBO J* 2001; 20: 672-682
 - 34 Stacker SA, Caesar C, Baldwin ME, Thornton GE, Williams RA, Prevo R, Jackson DG, Nishikawa S, Kubo H, Achen MG. VEGF-D promotes the metastatic spread of tumor cells via the lymphatics. *Nat Med* 2001; 7: 186-191
 - 35 Achen MG, Roufail S, Domagala T, Catimel B, Nice EC, Geleick DM, Murphy R, Scott AM, Caesar C, Mäkinen T, Alitalo K, Stacker SA. Monoclonal antibodies to vascular endothelial growth factor-D block its interactions with both VEGF receptor-2 and VEGF receptor-3. *Eur J Biochem* 2000; 267: 2505-2515
 - 36 Stacker SA, Williams RA, Achen MG. Lymphangiogenic growth factors as markers of tumor metastasis. *APMIS* 2004; 112: 539-549
 - 37 Komuro H, Kaneko S, Kaneko M, Nakanishi Y. Expression of angiogenic factors and tumor progression in human neuroblastoma. *J Cancer Res Clin Oncol* 2001; 127: 739-743
 - 38 Niki T, Iba S, Tokunou M, Yamada T, Matsuno Y, Hirohashi S. Expression of vascular endothelial growth factors A, B, C, and D and their relationships to lymph node status in lung adenocarcinoma. *Clin Cancer Res* 2000; 6: 2431-2439
 - 39 Ishikawa M, Kitayama J, Kazama S, Nagawa H. Expression of vascular endothelial growth factor C and D (VEGF-C and -D) is an important risk factor for lymphatic metastasis in undifferentiated early gastric carcinoma. *Jpn J Clin Oncol* 2003; 33: 21-27
 - 40 Kishimoto K, Sasaki A, Yoshihama Y, Mese H, Tsukamoto G, Matsumura T. Expression of vascular endothelial growth factor-C predicts regional lymph node metastasis in early oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* 2003; 39: 391-396
 - 41 Ueda M, Terai Y, Yamashita Y, Kumagai K, Ueki K,

同行评价

本文选题较好, 具有一定的可读性和科学价值。

- Yamaguchi H, Akise D, Hung YC, Ueki M. Correlation between vascular endothelial growth factor-C expression and invasion phenotype in cervical carcinomas. *Int J Cancer* 2002; 98: 335-343
- 42 Nishida N, Yano H, Komai K, Nishida T, Kamura T, Kojiro M. Vascular endothelial growth factor C and vascular endothelial growth factor receptor 2 are related closely to the prognosis of patients with ovarian carcinoma. *Cancer* 2004; 101: 1364-1374
 - 43 Mohammed RA, Green A, El-Shikh S, Paish EC, Ellis IO, Martin SG. Prognostic significance of vascular endothelial cell growth factors -A, -C and -D in breast cancer and their relationship with angio- and lymphangiogenesis. *Br J Cancer* 2007; 96: 1092-1100
 - 44 Amioka T, Kitadai Y, Tanaka S, Haruma K, Yoshihara M, Yasui W, Chayama K. Vascular endothelial growth factor-C expression predicts lymph node metastasis of human gastric carcinomas invading the submucosa. *Eur J Cancer* 2002; 38: 1413-1419
 - 45 Ogawa E, Takenaka K, Yanagihara K, Kurozumi M, Manabe T, Wada H, Tanaka F. Clinical significance of VEGF-C status in tumour cells and stromal macrophages in non-small cell lung cancer patients. *Br J Cancer* 2004; 91: 498-503
 - 46 White JD, Hewett PW, Kosuge D, McCulloch T, Enholm BC, Carmichael J, Murray JC. Vascular endothelial growth factor-D expression is an independent prognostic marker for survival in colorectal carcinoma. *Cancer Res* 2002; 62: 1669-1675
 - 47 Kurahara H, Takao S, Maemura K, Shintchi H, Natsugoe S, Aikou T. Impact of vascular endothelial growth factor-C and -D expression in human pancreatic cancer: its relationship to lymph node metastasis. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 8413-8420
 - 48 Yokoyama Y, Charnock-Jones DS, Licence D, Yanaihara A, Hastings JM, Holland CM, Emoto M, Sakamoto A, Sakamoto T, Maruyama H, Sato S, Mizunuma H, Smith SK. Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF)-D and its receptor, VEGF receptor 3, as a prognostic factor in endometrial carcinoma. *Clin Cancer Res* 2003; 9: 1361-1369
 - 49 Yokoyama Y, Charnock-Jones DS, Licence D, Yanaihara A, Hastings JM, Holland CM, Emoto M, Umamoto M, Sakamoto T, Sato S, Mizunuma H, Smith SK. Vascular endothelial growth factor-D is an independent prognostic factor in epithelial ovarian carcinoma. *Br J Cancer* 2003; 88: 237-244
 - 50 Jüttner S, Wissmann C, Jöns T, Vieth M, Hertel J, Gretsche S, Schlag PM, Kemmner W, Höcker M. Vascular endothelial growth factor-D and its receptor VEGFR-3: two novel independent prognostic markers in gastric adenocarcinoma. *J Clin Oncol* 2006; 24: 228-240
 - 51 Tang RF, Itakura J, Aikawa T, Matsuda K, Fujii H, Korc M, Matsumoto Y. Overexpression of lymphangiogenic growth factor VEGF-C in human pancreatic cancer. *Pancreas* 2001; 22: 285-292
 - 52 Takeuchi H, Bilchik A, Saha S, Turner R, Wiese D, Tanaka M, Kuo C, Wang HJ, Hoon DS. c-MET expression level in primary colon cancer: a predictor of tumor invasion and lymph node metastases. *Clin Cancer Res* 2003; 9: 1480-1488
 - 53 He Y, Kozaki K, Karpanen T, Koshikawa K, Yla-Herttuala S, Takahashi T, Alitalo K. Suppression of tumor lymphangiogenesis and lymph node metastasis by blocking vascular endothelial growth factor receptor 3 signaling. *J Natl Cancer Inst* 2002; 94: 819-825
 - 54 Krishnan J, Kirkin V, Steffen A, Hegen M, Weih D, Tomarev S, Wilting J, Sleeman JP. Differential in vivo and in vitro expression of vascular endothelial growth factor (VEGF)-C and VEGF-D in tumors and its relationship to lymphatic metastasis in immunocompetent rats. *Cancer Res* 2003; 63: 713-722
 - 55 Lin J, Lalani AS, Harding TC, Gonzalez M, Wu WW, Luan B, Tu GH, Koprivnikar K, VanRoey MJ, He Y, Alitalo K, Jooss K. Inhibition of lymphogenous metastasis using adeno-associated virus-mediated gene transfer of a soluble VEGFR-3 decoy receptor. *Cancer Res* 2005; 65: 6901-6909
 - 56 Chen Z, Varney ML, Backora MW, Cowan K, Solheim JC, Talmadge JE, Singh RK. Down-regulation of vascular endothelial cell growth factor-C expression using small interfering RNA vectors in mammary tumors inhibits tumor lymphangiogenesis and spontaneous metastasis and enhances survival. *Cancer Res* 2005; 65: 9004-9011
 - 57 Kubo H, Fujiwara T, Jussila L, Hashi H, Ogawa M, Shimizu K, Awane M, Sakai Y, Takabayashi A, Alitalo K, Yamaoka Y, Nishikawa SI. Involvement of vascular endothelial growth factor receptor-3 in maintenance of integrity of endothelial cell lining during tumor angiogenesis. *Blood* 2000; 96: 546-553
 - 58 Persaud K, Tille JC, Liu M, Zhu Z, Jimenez X, Pereira DS, Miao HQ, Brennan LA, Witte L, Pepper MS, Pytowski B. Involvement of the VEGF receptor 3 in tubular morphogenesis demonstrated with a human anti-human VEGFR-3 monoclonal antibody that antagonizes receptor activation by VEGF-C. *J Cell Sci* 2004; 117: 2745-2756
 - 59 Pytowski B, Goldman J, Persaud K, Wu Y, Witte L, Hicklin DJ, Skobe M, Boardman KC, Swartz MA. Complete and specific inhibition of adult lymphatic regeneration by a novel VEGFR-3 neutralizing antibody. *J Natl Cancer Inst* 2005; 97: 14-21
 - 60 Jimenez X, Lu D, Brennan L, Persaud K, Liu M, Miao H, Witte L, Zhu Z. A recombinant, fully human, bispecific antibody neutralizes the biological activities mediated by both vascular endothelial growth factor receptors 2 and 3. *Mol Cancer Ther* 2005; 4: 427-434
 - 61 Wilhelm SM, Carter C, Tang L, Wilkie D, McNabola A, Rong H, Chen C, Zhang X, Vincent P, McHugh M, Cao Y, Shujath J, Gawlak S, Eveleigh D, Rowley B, Liu L, Adnane L, Lynch M, Auclair D, Taylor I, Gedrich R, Voznesensky A, Riedl B, Post LE, Bollag G, Trail PA. BAY 43-9006 exhibits broad spectrum oral antitumor activity and targets the RAF/MEK/ERK pathway and receptor tyrosine kinases involved in tumor progression and angiogenesis. *Cancer Res* 2004; 64: 7099-7109
 - 62 Ruggeri B, Singh J, Gingrich D, Angeles T, Albom M, Yang S, Chang H, Robinson C, Hunter K, Dobrzanski P, Jones-Bolin S, Pritchard S, Aimone L, Kleinszanto A, Herbert JM, Bono F, Schaeffer P, Casellas P, Bourie B, Pili R, Isaacs J, Ator M, Hudkins R, Vaught J, Mallamo J, Dionne C. CEP-7055: a novel, orally active pan inhibitor of vascular endothelial growth factor receptor tyrosine kinases with potent antiangiogenic activity and antitumor efficacy in preclinical models. *Cancer Res* 2003; 63: 5978-5991
 - 63 Lin B, Podar K, Gupta D, Tai YT, Li S, Weller E, Hideshima T, Lentzsch S, Davies F, Li C, Weisberg E, Schlossman RL, Richardson PG, Griffin JD, Wood J,

- Munshi NC, Anderson KC. The vascular endothelial growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor PTK787/ZK222584 inhibits growth and migration of multiple myeloma cells in the bone marrow microenvironment. *Cancer Res* 2002; 62: 5019-5026
- 64 Kirkin V, Mazitschek R, Krishnan J, Steffen A, Waltenberger J, Pepper MS, Giannis A, Sleeman JP. Characterization of indolinones which preferentially inhibit VEGF-C- and VEGF-D-induced activation of VEGFR-3 rather than VEGFR-2. *Eur J Biochem* 2001; 268: 5530-5540
- 65 Matzkin H, Patel JP, Altwein JE, Soloway MS. Stage T1A carcinoma of prostate. *Urology* 1994; 43: 11-21
- 66 Thiele W, Sleeman JP. Tumor-induced lymphangiogenesis: a target for cancer therapy? *J Biotechnol* 2006; 124: 224-241

编辑 何基才 电编 何基才

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

• 消息 •

招聘生物医学编辑部主任

本刊讯 百世登出版集团(Baishideng Publishing Group Co., Limited, BPG)已经为各位编辑部主任搭建好整体架构, 希望培养出对编辑与出版行业真正感兴趣甚至愿意将其作为终身事业的专业人才, 成为BPG的核心人物. 欢迎应届毕业生加盟BPG团队, 请将您的简历E-mail发至: j.l.li@wjgnet.com

■ 工作职责

- 1 贯彻执行员工手册、编辑手册、编委手册和作者手册.
- 2 根据作者指南及学科发展动向和读者的需求, 制订期刊的总体发展规划, 负责编辑、出版、发行和经营管理.
- 3 策划年度编委会成员的社论和专题亮点等栏目约稿, 并按照计划负责监督落实.
- 4 负责期刊同行评议和定稿会, 按期编排、加工, 发排稿件, 发排后参与校对或审核校样、核红、签字付印.
- 5 组织期刊印刷版或网络版出版后审读, 发现问题及时修改.

■ 职位要求

硕士及以上学历, 具有生物医学专业学科背景及丰富的写作和发表生物医学文章者优先录用.

■ 薪资待遇面议

■ 培训流程

第一步学习手册; 第二步编务; 第三步排版制作; 第四步编辑; 第五步投稿办公系统操作; 第六步期刊网络系统学习; 第七步期刊管理培训; 第八步BPG管理委员会考核; 第九步考核通过后正式签订劳动合同, 并颁发编辑部主任聘任书.

Trop-2表达下调对食管鳞癌EC9706细胞增殖和细胞迁移的影响

李慎柯, 范天黎, 寇洁, 崔瑶

■背景资料

Trop-2基因是人类肿瘤中高度表达的细胞表面糖蛋白受体, 其在结肠癌、卵巢癌以及食管癌等多种不同的肿瘤中呈现高表达。

李慎柯, 河南省濮阳市油田总医院肿瘤科 河南省濮阳市 457001

范天黎, 郑州大学基础医学院药理学教研室 河南省郑州市 450001

寇洁, 河南省人民医院心血管内科 河南省郑州市 450003

崔瑶, 河南省人民医院肿瘤科 河南省郑州市 450003

作者贡献分布: 李慎柯与范天黎对此文所作贡献均等; 此课题由李慎柯, 范天黎及崔瑶设计; 研究过程由李慎柯, 范天黎, 寇洁及崔瑶操作完成; 研究所用新试剂及分析工具由崔瑶提供; 数据分析由范天黎及崔瑶完成; 本论文写作由李慎柯, 范天黎及崔瑶完成。

通讯作者: 崔瑶, 450003, 河南省郑州市, 河南省人民医院肿瘤科. cuiyao_2010@126.com

收稿日期: 2011-04-27 修回日期: 2011-08-25

接受日期: 2011-08-26 在线出版日期: 2011-08-28

Down-regulation of Trop-2 expression inhibits cell proliferation and migration in human esophageal squamous cell carcinoma cell line EC9706

Shen-Ke Li, Tian-Li Fan, Jie Kou, Yao Cui

Shen-Ke Li, Department of Oncology, General Hospital of Puyang Oil Field, Puyang 457001, Henan Province, China

Tian-Li Fan, Department of Pharmacology, Basic Medical College of Zhengzhou University, Zhengzhou 450001, Henan Province, China

Jie Kou, Department of Cardiovascular Diseases, Henan Provincial People's Hospital, Zhengzhou 450003, Henan Province, China

Yao Cui, Department of Oncology, Henan Provincial People's Hospital, Zhengzhou 450003, Henan Province, China

Correspondence to: Cui Yao, Department of Oncology, Henan Provincial People's Hospital, Zhengzhou 450003, Henan Province, China. cuiyao_2010@126.com

Received: 2011-04-27 Revised: 2011-08-25

Accepted: 2011-08-26 Published online: 2011-08-28

Abstract

AIM: To investigate the effect of down-regulation of tumor-associated calcium signal transducer-2 (Trop-2) expression on cell proliferation and migration in human esophageal squamous cell carcinoma (ESCC) cell line EC9706 and to explore possible molecular mechanisms involved.

METHODS: Trop-2-specific small interfering

RNA (siRNA) and control siRNA were transfected into EC9706 cells, and expression of Trop-2 mRNA and protein was detected by real-time PCR and Western blotting. CCK-8 assay was used to measure cell proliferation, and Boyden chamber assay was utilized to determine cell migration. The expression of cell migration-related MMP-7 protein was detected by Western blotting.

RESULTS: The expression of Trop-2 mRNA and protein in the Trop siRNA group was significantly lower than that in the normal control group or control siRNA group 48 h after transfection. SiRNA-mediated down-regulation of Trop-2 expression obviously inhibited cell proliferation and migration compared to the normal control group and control siRNA group (65.29 ± 4.33 vs 119.27 ± 4.63 , 112.81 ± 5.01 , both $P < 0.05$). Transfection of Trop-2-specific siRNA markedly decreased the expression of MMP-7 protein in EC9706 cells.

CONCLUSION: Down-regulation of Trop-2 expression inhibits the proliferation and migration of EC9706 cells possibly by down-regulating MMP-7 expression. Trop-2 might be used as a molecular target for therapy of ESCC.

Key Words: Tumor-associated calcium signal transducer-2; Esophageal squamous cell carcinoma; Small interfering RNA; Cell proliferation; Cell migration

Li SK, Fan TL, Kou J, Cui Y. Down-regulation of Trop-2 expression inhibits cell proliferation and migration in human esophageal squamous cell carcinoma cell line EC9706. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(24): 2562-2566

摘要

目的: 研究肿瘤相关钙信号传导蛋白2(tumor-associated calcium signal transducer-2, Trop-2)表达下调对食管鳞癌EC9706细胞增殖和细胞迁移的影响, 并探讨其可能的分子机制。

方法: 将Trop-2 siRNA和对照siRNA转染食管

■同行评议者

李淳, 副教授, 汕头大学医学院病理教研室。

鳞癌EC9706细胞, 利用实时荧光定量PCR和Western blotting检测转染Trop-2 siRNA后食管鳞癌EC9706细胞中Trop-2 mRNA和蛋白的表达. 利用CCK-8试剂分析转染Trop-2 siRNA后EC9706细胞的增殖变化, 接着采用Boyden小室研究下调Trop-2对EC9706细胞迁移的影响, 最后利用Western blotting技术与细胞迁移相关基因MMP-7表达的变化.

结果: 转染Trop-2 48 h, Trop-2 siRNA组中Trop-2 mRNA和蛋白的表达显著低于未处理组和对照siRNA组($P<0.05$). Trop-2表达下调能明显抑制食管鳞癌EC9706细胞的增殖($P<0.05$). 此外, Boyden小室结果表明, 与未处理组(119.27 ± 4.63)及对照siRNA组(112.81 ± 5.01)相比, Trop-2 siRNA组中EC9706细胞的穿膜数(65.29 ± 4.33)明显降低. Western blotting结果表明, Trop-2 siRNA能明显降低食管鳞癌EC9706细胞中MMP-7的表达.

结论: Trop-2表达下调能抑制食管鳞癌细胞的增殖和迁移, 其介导的迁移能力的降低可能与MMP-7表达的下调密切相关, 操纵Trop-2有望成为食管鳞癌的分子治疗靶点.

关键词: 肿瘤相关钙信号传导蛋白2; 食管鳞癌; 小干扰RNA; 细胞增殖; 细胞迁移

李慎柯, 范天黎, 寇洁, 崔瑶. Trop-2表达下调对食管鳞癌EC9706细胞增殖和细胞迁移的影响. 世界华人消化杂志 2011; 19(24): 2562-2566

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/2562.asp>

0 引言

食管癌是一种十分常见的恶性程度极高的消化道肿瘤, 食管鳞癌作为食管癌的主要组织学类型, 占有食管癌的90%以上^[1], 而中国林州是全球范围内食管鳞癌发病率最高的地区^[2]. 尽管目前外科手术和辅助的放化疗手段的不断发展, 食管鳞癌五年生存率仍然很低^[3,4], 因此从分子水平探讨食管鳞癌发生发展的分子机制具有十分重要的意义. 肿瘤相关钙信号传导蛋白2(tumor-associated calcium signal transducer-2, Trop-2)基因, 又称为TACSTD2、GA733-1、M1S1或EGP-1, 是人类肿瘤中高度表达的细胞表面糖蛋白受体. 他定位于1号染色体短臂, 是一种单层的I型跨膜磷酸化糖蛋白. 近来, 尽管Trop-2作为细胞表面受体, 但其功能还有待进一步阐明, 研究发现他可能在调控肿瘤细胞的增

殖中发挥重要作用^[5]. 最近, 有报道表明, Trop-2的过表达与多种不同类型的肿瘤的浸润型表型和较差的预后密切相关^[6-9]. 然而其在食管鳞癌中的作用如何尚不得而知, 因此在研究中, 我们利用Trop-2 siRNA干扰食管鳞癌EC9706细胞中Trop-2 mRNA和蛋白的表达, 研究其对食管鳞癌增殖和细胞迁移的影响, 进一步探讨其可能的分子机制, 该研究有望为以Trop-2为靶点的食管鳞癌基因治疗提供理论依据.

1 材料和方法

1.1 材料 RPMI-1640培养基和胰蛋白酶均购自美国Sigma公司; 胎牛血清和小牛血清均购自杭州四季青生物工程材料有限公司; 脂质体2000转染试剂购自美国Invitrogen公司; 兔抗人的Trop-2、MMP-7和 β -actin抗体、Trop-2 siRNA和对照siRNA购自Santa Cruz公司; CCK-8试剂购自中国碧云天生物技术有限公司; Boyden小室购自江苏省海门市麒麟医用仪器厂; Quant一步法RT-PCR试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司; 蛋白裂解液购自宝生物工程(大连)有限公司.

1.2 方法

1.2.1 引物设计: 根据GenBank登录号Trop-2(NM_002353)和 β -actin(NM_001101), 利用Primer Premier 5.0软件设计引物如下: Trop-2F: 5'-GAAGTTCTCCATGAAGCGCCTCACC-3', Trop-2R: 5'-CAAGC TCGGTTCCTTTCTCAACTCCC-3', 产物大小: 172 bp; β -actinF: 5'-CACTGTGCCCATCTACGAGGGGTATG-3', β -actinR: 5'-TCTC CTTAATGTCACGCACGATTCCC-3', 产物大小为: 161 bp. 上述引物由上海生工生物工程技术有限公司合成.

1.2.2 细胞培养及转染: 人食管鳞癌EC9706细胞株购自中国科学院上海细胞研究所细胞库. 将EC9706细胞置于含10%的胎牛血清的RPMI-1640培养基中培养, 当细胞融合度达80%-90%时, 按脂质体2000的说明书将Trop-2 siRNA和对照siRNA进行转染, 转染后的48 h进行后续的实验. 实验中的细胞分为三组: 未处理组(不作任何处理); 对照siRNA组(利用对照siRNA转染); Trop-2 siRNA组(利用Trop-2 siRNA转染).

1.2.3 细胞增殖分析: 分别收集转染后24 h、48 h、72 h及96 h的三组EC9706细胞, 在测定生长速率的时候, 加入含10% CCK-8的等量新鲜培

■研发前沿

近来研究显示, Trop-2的过表达与多种不同类型的肿瘤的浸润型表型和较差的预后密切相关. 然而, 其在食管鳞癌发生发展中的作用国内外尚未见报道. 关于Trop-2与恶性肿瘤关系的研究已成为热点.

■相关报道

研究显示, Trop-2在多种不同的恶性肿瘤的发生、发展中发挥重要的作用, 其异常表达可能与肿瘤的增殖分化及浸润转移关系密切.

■创新盘点

本研究采用Trop-2 siRNA下调食管鳞癌EC9706细胞中Trop-2 mRNA和蛋白的表达, 研究其对食管鳞癌增殖和细胞迁移的影响, 进一步探讨其可能的分子机制。

养基于37 °C培养1-4 h左右, 然后用酶标仪测450 nm的吸光度。

1.2.4 Boyden chamber: 将三组细胞(每组大约105个)分别悬浮在含有0.2%的小牛血清的800 μ l的培养基中, 依次接种至Boyden chamber的上层, 培养6 h。然后收集迁移到滤膜下层的细胞, 用甲醇固定, 并通过HE染色来观察下层细胞的数量, 最后通过计算滤膜下层的细胞数来评估其转移的细胞数(30个视野, $\times 200$)。

1.2.5 实时荧光定量PCR: 收集48 h转染和未转染的三组EC9706细胞, 用Trizol试剂从三组细胞中提取总RNA, 然后按Quant一步法RT-PCR试剂盒的操作说明书进行, 首先配制如下反应液: 10 \times RT-PCR Buffer 2.5 μ l, dNTP Mixture 1 μ l, 5 \times RT-PCR enhancer 5 μ l, RNasin 0.25 μ l, Hotmaster Taq聚合酶1.25 μ l, Quant RTase 0.25 μ l, 上下游特异引物各1.5 μ l, 总RNA模板10 ng-1 μ g, 然后补充水分至25 μ l。PCR反应在ABI 7300仪器上进行, 反应程序为: 反转录反应50 °C 30 min, PCR初始变性94 °C 2 min, 然后35个循环94 °C 30 s, 58 °C 30 s, 65 °C延伸30 s。实验中每个样品重复三次, 基因的相对表达分析采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法进行计算^[10]。

1.2.6 Western blotting: 收集48 h转染和未转染的三组EC9706细胞, 用裂解法提取细胞的总蛋白进行Western blotting分析。首先利用细胞裂解液提取总蛋白, 然后进行SDS-PAGE电泳。电泳结束后, 取下凝胶电转移到硝酸纤维素膜上。用含5%脱脂奶粉的TBST液封闭NC膜2 h, 加入一抗(Trop-2、MMP-7和 β -actin)(1 : 500), 4 °C摇床孵育过夜。加入二抗室温孵育1.5 h。将NC膜置于ECL(增强化学发光试剂)中反应1-3 min, 暗室中经X线片曝光, 常规方法显影定影, 显示特异的蛋白信号。蛋白表达的灰度值利用Image-Pro Plus 5.0软件进行分析, 蛋白相对表达量为目的基因与内参基因的比值, 其中 β -actin作为内参。

统计学处理 应用SPSS13.0统计软件进行统计学处理, 统计学数据用mean \pm SD表示, 两样本均数比较采用 t 检验, 多个样本均数比较应用单因素方差分析(One-way ANOVA), $P < 0.05$ 具有显著性。

2 结果

2.1 食管鳞癌EC9706细胞中Trop-2 mRNA的表达 收集三组食管鳞癌EC9706细胞, 利用Quant一步法RT-PCR试剂盒检测三组细胞中Trop-2

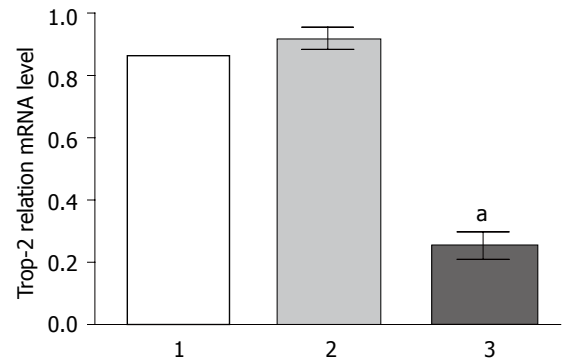


图1 Trop-2 siRNA对食管鳞癌EC9706细胞中Trop-2 mRNA表达的影响。* $P < 0.05$, 与未处理组和对照siRNA组相比。1: 未处理组; 2: 对照siRNA组; 3: Trop-2 siRNA组。

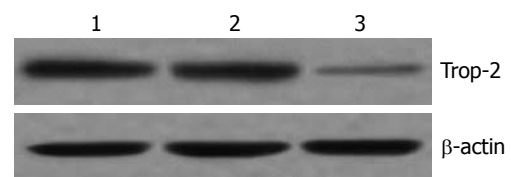


图2 Trop-2 siRNA对食管鳞癌EC9706细胞中Trop-2蛋白表达的影响。1: 未处理组; 2: 对照siRNA组; 3: Trop-2 siRNA组。

mRNA的表达。结果表明, 未处理组和对照siRNA组相比, EC9706细胞中Trop-2 mRNA的表达无差异($P > 0.05$), 然而, 与未处理组和对照siRNA组相比, Trop-2 siRNA组中Trop-2 mRNA的表达显著下降($P < 0.05$, 图1)。

2.2 食管鳞癌EC9706细胞中Trop-2蛋白的表达 Western blotting结果显示, 转染Trop-2 siRNA后, 食管鳞癌EC9706细胞中Trop-2蛋白的表达显著下调, 明显低于未处理组和对照siRNA组($P < 0.05$), 然而未处理组和对照siRNA组中Trop-2蛋白的表达无差异($P > 0.05$, 图2)。

2.3 Trop-2 siRNA介导的食管鳞癌EC9706细胞的增殖抑制 收集转染Trop-2 siRNA和对照siRNA后的24 h、48 h、72 h和96 h食管鳞癌EC9706细胞, 利用CCK-8试剂检测的增殖变化。结果表明, 未处理组和对照siRNA组之间相比, EC9706细胞的增殖能力无差异($P < 0.05$), 然而与未处理组和对照siRNA组相比, 转染Trop-2 siRNA后的24 h、48 h、72 h和96 h, EC9706细胞的增殖在各个时间点均受到明显抑制($P < 0.05$, 图3)。

2.4 Trop-2 siRNA对食管鳞癌EC9706细胞迁移的影响 Boyden小室结果表明, 未处理组(细胞穿膜数为 119.27 ± 4.63)及对照siRNA组(细胞穿膜数为 112.81 ± 5.01)相比, EC9706细胞的穿膜数在统计学上无差异($P > 0.05$), 然而Trop-2 siRNA

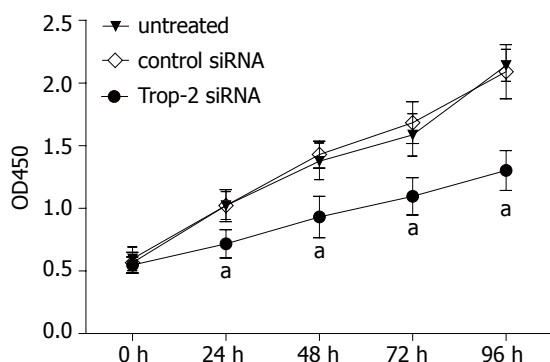


图3 Trop-2表达下调对食管鳞癌EC9706细胞增殖的影响。^a $P<0.05$, 与未处理组和对照siRNA组相比。

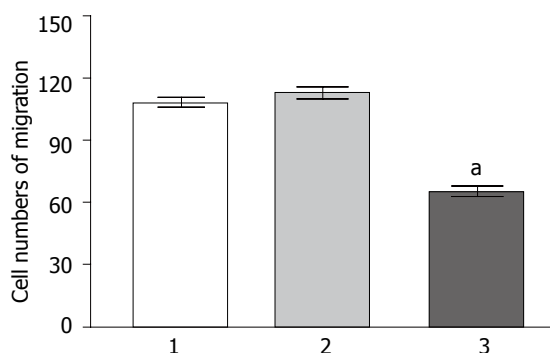


图4 Trop-2表达下调对食管鳞癌EC9706细胞迁移能力的影响。^a $P<0.05$, 与未处理组和对照siRNA组相比。1: 未处理组; 2: 对照siRNA组; 3: Trop-2 siRNA组。

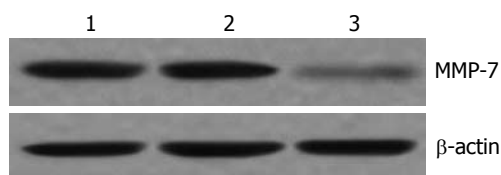


图5 Trop-2 siRNA对食管鳞癌EC9706细胞中MMP-7蛋白表达的影响。1: 未处理组; 2: 对照siRNA组; 3: Trop-2 siRNA组。

组中EC9706细胞的穿膜数(65.29 ± 4.33)明显低于未处理组和对照siRNA组($P<0.05$, 图4), 提示Trop-2表达下调能明显抑制食管鳞癌EC9706细胞的迁移。

2.5 Trop-2 siRNA对食管鳞癌EC9706细胞MMP-7蛋白表达的影响 为了初步阐明Trop-2 siRNA介导的EC9706细胞迁移能力下降的可能的分子机制, 我们采用Western blotting检测与浸润转移密切相关的蛋白MMP-7表达的变化。结果显示, 转染Trop-2 siRNA后, 食管鳞癌EC9706细胞中MMP-7蛋白的表达显著下调, 明显低于未处理组和对照siRNA组($P<0.05$), 然而未处理组和对照siRNA组中MMP-7蛋白的表达无差异

($P>0.05$, 图5)。

3 讨论

Trop-2基因主要定位于人类染色体上的1p32, 是一个单体的细胞表面糖蛋白, 在人类肿瘤中高表达, 但是在大多数正常组织中不表达或表达水平极低^[5]。目前发现, 其在结肠癌、卵巢癌、食管癌等多种不同的肿瘤中呈现高表达^[11-13]。在食管鳞癌的研究中发现, Trop-2蛋白在一些食管癌细胞系(T.Tn、YES-1、YES-2、YES-4、YES-5、YES-6、TE-2和ECGI-10)和食管鳞癌组织标本中过表达^[11]。但是其详细的分子机制还不清楚, 为了进一步证实Trop-2在食管鳞癌中可能的作用, 因此本研究中我们利用RNA干扰技术研究下调食管鳞癌EC9706细胞中Trop-2 mRNA和蛋白的表达, 结果表明, 与未处理组和对照siRNA组相比, Trop-2 siRNA组中Trop-2 mRNA的表达显著下降($P<0.05$), 提示Trop-2 siRNA能有效下调食管鳞癌EC9706细胞中Trop-2的表达, 这为后续进一步研究Trop-2在食管鳞癌中的作用提供新的实验证据。

已有研究表明, Trop-2的表达在一系列结肠癌细胞的增殖中发挥重要作用^[13]。Trop-2在标准的组织培养条件下对于细胞的增殖不是必需的, 但是对于结肠癌细胞的锚定非依赖性的生长和肿瘤发生是必需的^[13]。为了研究是否Trop-2在食管鳞癌细胞增殖中的作用, 我们利用CCK-8试剂检测了三组EC9706细胞增殖的变化, 结果表明, Trop-2 siRNA能明显抑制食管鳞癌EC9706细胞的增殖, 提示Trop-2表达的下调能明显抑制食管鳞癌细胞的增殖, 因而可能为食管鳞癌的分子靶向治疗提供新的靶点。

最为显著的是, Trop-2的表达与一系列具有侵袭性的肿瘤的发生发展密切相关。Trop-2在原发性结肠癌中的表达与肝转移的发生密切相关, 并且在目前的医疗上尚不能治疗^[14]。在乳腺癌中, Trop-2的表达具有预测淋巴结转移的作用^[15], 而且是低生存率中最为有效的预测因子^[16]。在肺癌中, Trop-2对生长因子受体抑制剂具有明显的拮抗作用^[17]。上述这些研究提示了Trop-2与肿瘤的浸润转移密切相关, 是一种很好的转移预测因子。为了证实是否下调Trop-2的表达能影响食管鳞癌EC9706细胞的迁移能力, 我们采用Boyden小室分析了三组细胞转染48 h后的迁移能力的变化。结果表明, Trop-2表达下调能明显降低EC9706细胞的迁移能力。为了

■名词解释

肿瘤相关钙信号传导蛋白2(Trop-2)基因: 又称为TACSTD2、GA733-1、MIS1或EGP-1, 是人类肿瘤中高度表达的细胞表面糖蛋白受体。

■同行评价

本文设计合理, 为进一步研究Trop-2在食管鳞癌中的作用机制提供理论依据。

证实其可能的分子机制, 我们分析了基质金属蛋白酶7的表达, 该基因已经在食管鳞癌中被证实为与转移密切相关的因子^[18]。此外, MMP-7也已经被证实, 在结肠癌的肝转移中持续性的高表达^[19]。在本研究中, 我们检测了MMP-7蛋白的表达, 发现转染Trop-2 siRNA后MMP-7蛋白的表达显著下调, 提示Trop-2表达下调介导的食管鳞癌细胞迁移能力的下降可能与MMP-7表达的下调密切相关, 但其具体的分子作用机制还有待于进一步阐明。

总之, 我们的研究表明, Trop-2 siRNA能有效下调食管鳞癌EC9706细胞中Trop-2 mRNA的表达, 其表达下调能明显抑制食管鳞癌细胞的增殖和降低细胞的迁移能力, 其迁移能力降低的分子机制可能与MMP-7蛋白表达下调密切相关。进一步研究Trop-2在食管鳞癌中的作用机制有望为以Trop-2为靶点的食管鳞癌基因治疗提供理论依据。

4 参考文献

- Parkin DM, Bray FI, Devesa SS. Cancer burden in the year 2000. The global picture. *Eur J Cancer* 2001; 37 Suppl 8: S4-66
- Muñoz N, Buiatti E. Chemoprevention of oesophageal cancer. *IARC Sci Publ* 1996; 27-33
- Shimada H, Hoshino T, Okazumi S, Matsubara H, Funami Y, Nabeya Y, Hayashi H, Takeda A, Shiratori T, Uno T, Ito H, Ochiai T. Expression of angiogenic factors predicts response to chemoradiotherapy and prognosis of oesophageal squamous cell carcinoma. *Br J Cancer* 2002; 86: 552-557
- Shimada H, Nabeya Y, Okazumi S, Matsubara H, Shiratori T, Gunji Y, Kobayashi S, Hayashi H, Ochiai T. Prediction of survival with squamous cell carcinoma antigen in patients with resectable esophageal squamous cell carcinoma. *Surgery* 2003; 133: 486-494
- Fornaro M, Dell'Arciprete R, Stella M, Bucci C, Nutini M, Capri MG, Alberti S. Cloning of the gene encoding Trop-2, a cell-surface glycoprotein expressed by human carcinomas. *Int J Cancer* 1995; 62: 610-618
- Mühlmann G, Spizzo G, Gostner J, Zitt M, Maier H, Moser P, Gastl G, Zitt M, Müller HM, Margreiter R, Ofner D, Fong D. TROP2 expression as prognostic marker for gastric carcinoma. *J Clin Pathol* 2009; 62: 152-158
- Fong D, Moser P, Krammel C, Gostner JM, Margreiter R, Mitterer M, Gastl G, Spizzo G. High expression of TROP2 correlates with poor prognosis in pancreatic cancer. *Br J Cancer* 2008; 99: 1290-1295
- Fong D, Spizzo G, Gostner JM, Gastl G, Moser P, Krammel C, Gerhard S, Rasse M, Laimer K. TROP2: a novel prognostic marker in squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Mod Pathol* 2008; 21: 186-191
- Fang YJ, Lu ZH, Wang GQ, Pan ZZ, Zhou ZW, Yun JP, Zhang MF, Wan DS. Elevated expressions of MMP7, TROP2, and survivin are associated with survival, disease recurrence, and liver metastasis of colon cancer. *Int J Colorectal Dis* 2009; 24: 875-884
- Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 2001; 25: 402-408
- Nakashima K, Shimada H, Ochiai T, Kuboshima M, Kuroiwa N, Okazumi S, Matsubara H, Nomura F, Takiguchi M, Hiwasa T. Serological identification of TROP2 by recombinant cDNA expression cloning using sera of patients with esophageal squamous cell carcinoma. *Int J Cancer* 2004; 112: 1029-1035
- Bignotti E, Todeschini P, Calza S, Falchetti M, Ravanini M, Tassi RA, Ravaggi A, Bandiera E, Romani C, Zanotti L, Tognon G, Odicino FE, Facchetti F, Pecorelli S, Santin AD. Trop-2 overexpression as an independent marker for poor overall survival in ovarian carcinoma patients. *Eur J Cancer* 2010; 46: 944-953
- Wang J, Day R, Dong Y, Weintraub SJ, Michel L. Identification of Trop-2 as an oncogene and an attractive therapeutic target in colon cancers. *Mol Cancer Ther* 2008; 7: 280-285
- Ohmachi T, Tanaka F, Mimori K, Inoue H, Yanaga K, Mori M. Clinical significance of TROP2 expression in colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 2006; 12: 3057-3063
- Huang E, Cheng SH, Dressman H, Pittman J, Tsou MH, Horng CF, Bild A, Iversen ES, Liao M, Chen CM, West M, Nevins JR, Huang AT. Gene expression predictors of breast cancer outcomes. *Lancet* 2003; 361: 1590-1596
- Fisher B, Bauer M, Wickerham DL, Redmond CK, Fisher ER, Cruz AB, Foster R, Gardner B, Lerner H, Margolese R. Relation of number of positive axillary nodes to the prognosis of patients with primary breast cancer. An NSABP update. *Cancer* 1983; 52: 1551-1557
- Coldren CD, Helfrich BA, Witta SE, Sugita M, Lapadat R, Zeng C, Barón A, Franklin WA, Hirsch FR, Geraci MW, Bunn PA. Baseline gene expression predicts sensitivity to gefitinib in non-small cell lung cancer cell lines. *Mol Cancer Res* 2006; 4: 521-528
- Yoshinaga K, Mimori K, Inoue H, Kamohara Y, Yamashita K, Tanaka F, Mori M. Activin A enhances MMP-7 activity via the transcription factor AP-1 in an esophageal squamous cell carcinoma cell line. *Int J Oncol* 2008; 33: 453-459
- Leeman MF, Curran S, Murray GI. New insights into the roles of matrix metalloproteinases in colorectal cancer development and progression. *J Pathol* 2003; 201: 528-534

编辑 李军亮 电编 何基才

血必净对大鼠重症急性胰腺炎的治疗作用

耿小峰, 脱红芳, 彭彦辉, 赵宝川

耿小峰, 脱红芳, 彭彦辉, 赵宝川, 河北省人民医院普外科 河北省石家庄市 050051

河北省中医药管理局资助项目, No. 2009047

作者贡献分布: 此课题由耿小峰、彭彦辉及脱红芳共同设计; 动物模型设计及实验操作由耿小峰与赵宝川完成; 数据分析与论文写作由耿小峰与脱红芳完成。

通讯作者: 脱红芳, 副教授, 050051, 河北省石家庄市, 河北省人民医院普外三科, touhf@yahoo.com.cn

收稿日期: 2011-04-28 修回日期: 2011-05-28

接受日期: 2011-06-28 在线出版日期: 2011-08-28

Therapeutic effect of Xuebijing on experimental severe acute pancreatitis in rats

Xiao-Feng Geng, Hong-Fang Tuo, Yan-Hui Peng, Bao-Chuan Zhao

Xiao-Feng Geng, Hong-Fang Tuo, Yan-Hui Peng, Bao-Chuan Zhao, Department of General Surgery, Hebei General Hospital, Shijiazhuang 050051, Hebei Province, China
Supported by: the Project of Hebei Administration of Traditional Chinese Medicine, No. 2009047

Correspondence to: Associated Professor Hong-Fang Tuo, Department of General Surgery, Hebei General Hospital, Shijiazhuang 050051, Hebei Province, China. touhf@yahoo.com.cn

Received: 2011-04-28 Revised: 2011-05-28

Accepted: 2011-06-28 Published online: 2011-08-28

Abstract

AIM: To study the therapeutic effect of Xuebijing on pancreatic injury in rats with experimental severe acute pancreatitis (SAP).

METHODS: SAP was induced in rats by retrograde injection of 3.5% sodium taurocholate into the biliopancreatic duct. Xuebijing was then intraperitoneally injected in SAP rats. The levels of serum amylase, interleukin-6 (IL-6), malondialdehyde (MDA), superoxide dimutase (SOD), and lipopolysaccharide (LPS) were measured, and pancreatic pathological changes were evaluated.

RESULTS: Compared to normal rats, the levels of serum amylase (U/L), IL-6 (pg/mL), LPS (EU/mL), and MDA (nmol/mL) were significantly higher (all $P < 0.05$) and that of SOD (U/L) was significantly lower ($P < 0.05$) in rats with SAP. Additionally, significant pancreatic pathologi-

cal changes were observed in SAP rats. After treatment with Xuebijing, the above serum parameters were significantly improved (serum amylase: 12 h: $4\,386 \pm 1\,198$ vs $5\,494 \pm 1\,082$, 24 h: $3\,122 \pm 487$ vs $4\,489 \pm 845$; IL-6: 12 h: 174.5 ± 18.2 vs 291.3 ± 21.9 , 24 h: 140.9 ± 25.0 vs 258.7 ± 22.0 ; LPS: 12 h: 0.09 ± 0.02 vs 0.12 ± 0.02 , 24 h: 0.14 ± 0.02 vs 0.19 ± 0.02 ; MDA: 12 h: 8.8 ± 0.3 vs 10.8 ± 0.4 , 24 h: 10.1 ± 0.6 vs 14.7 ± 0.4 ; SOD: 12 h: 266.2 ± 14.6 vs 195.7 ± 14.8 , 24 h: 235.6 ± 12.1 vs 114.8 ± 16.0 ; all $P < 0.05$) and pancreatic pathological changes became milder in rats with SAP.

CONCLUSION: Xuebijing reduces pancreatic tissue damage in rats with SAP by decreasing serum endotoxin and IL-6 and enhancing the oxygen free radical scavenging capacity of the body.

Key Words: Xuebijing; Interleukin-6; Lipopolysaccharide; Malondialdehyde; Superoxide dimutase; Severe acute pancreatitis

Geng XF, Tuo HF, Peng YH, Zhao BC. Therapeutic effect of Xuebijing on experimental severe acute pancreatitis in rats. *Shijie huaren Xiao hua Zazhi* 2011; 19(24): 2567-2571

摘要

目的: 探讨血必净对大鼠重症胰腺炎(severe acute pancreatitis, SAP)的治疗作用。

方法: 经十二指肠乳头逆行胆胰管注射3.5%牛磺胆酸钠建立SAP模型, 给予血必净治疗, 观察血清中淀粉酶含量、白介素-6(interleukin-6, IL-6)、丙二醛(malondialdehyde, MDA)、超氧化物歧化酶(superoxide dimutase, SOD)、内毒素(lipopolysaccharide, LPS)的变化, 并进行胰腺组织病理学检查。

结果: 与空白对照组相比, 模型组中血清淀粉酶(U/L)、IL-6(pg/mL)、LPS(EU/mL)、MDA(nmol/mL)明显增高($P < 0.05$), SOD(U/L)则明显降低($P < 0.05$), 光镜下胰腺组织损伤明显; 血必净治疗后上述检测指标均较模型组明显改善(血清淀粉酶: 12 h: $4\,386 \pm 1\,198$ vs $5\,494 \pm 1\,082$, 24 h: $3\,122 \pm 487$ vs $4\,489 \pm$

■背景资料

急性胰腺炎(AP)是临床常见急腹症之一, 临床表现多变, 以突发腹痛及血清淀粉酶(AMY)升高为主要临床特征。约有20%以上的胰腺炎为重症急性胰腺炎(SAP), 胰酶过度激活、胰腺自身消化、大量细胞因子的释放, 导致全身炎症反应综合征(SIRS)和多器官功能障碍综合征(MODS)。相关研究报道, 血必净注射液能有效拮抗内毒素, 下调促炎介质水平, 调节免疫反应, 避免内毒素攻击所致的组织损伤, 临床多用于急性危重病的治。

■同行评议者

白雪巍, 副教授, 哈尔滨医科大学

■研究前沿

重型胰腺炎死亡率为20%,有并发症者可高达50%。为降低死亡率,与之相应的各项措施被用于SAP的诊断和治疗中,抑制过度的促炎因子、减轻体内氧自由基对腺细胞的损伤和肠源性内毒素血症的形成是目前治疗SAP的热点和难点问题。

845, 均 $P<0.05$; IL-6: 12 h: 174.5 ± 18.2 vs 291.3 ± 21.9 , 24 h: 140.9 ± 25.0 vs 258.7 ± 22.0 , 均 $P<0.05$; LPS: 12 h: 0.09 ± 0.02 vs 0.12 ± 0.02 , 24 h: 0.14 ± 0.02 vs 0.19 ± 0.02 , 均 $P<0.05$; MDA: 12 h: 8.8 ± 0.3 vs 10.8 ± 0.4 , 24 h: 10.1 ± 0.6 vs 14.7 ± 0.4 , 均 $P<0.05$; SOD 12 h: 266.2 ± 14.6 vs 195.7 ± 14.8 , 24 h: 235.6 ± 12.1 vs 114.8 ± 16.0 , 均 $P<0.05$).

结论: 血必净可以拮抗内毒素, 下调IL-6, 提高机体对氧自由基的清除能力, 减轻胰腺组织的损伤。

关键词: 血必净; 白介素-6; 内毒素; 丙二醛; 超氧化物歧化酶; 重症急性胰腺炎

耿小峰, 脱红芳, 彭彦辉, 赵宝川. 血必净对大鼠重症急性胰腺炎的治疗作用. 世界华人消化杂志 2011; 19(24): 2567-2571

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/2567.asp>

0 引言

重症急性胰腺炎(Severe acute pancreatitis, SAP)的临床表现凶险, 并发症多, 病死率高, 其确切病因和发病机制迄今尚未完全阐明, 治疗效果也不够满意。中药用于治疗胰腺炎取得一定效果。研究证明, 血必净注射液能有效拮抗内毒素, 下调促炎介质水平, 调节免疫反应^[1-2], 避免内毒素攻击所致的组织损伤^[3], 同时提高超氧化物歧化酶活性等作用, 临床大多用于治疗急性危重疾病。本实验拟在血必净对SAP的治疗基础上探讨其作用机制, 为临床治疗提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料 SD大鼠54只, 雄雌各半, 体质量250-300 g, 由河北医科大学实验动物中心提供, 编号904245。牛磺胆酸钠原料购自Sigma公司。血必净注射液购自天津红日药业股份有限公司, 编号Z20040033。IL-6试剂盒购自美国ADL公司, MDA和SOD试剂盒购自南京建成生物工程研究所, 内毒素检测试剂盒厦门市鲎试剂实验厂有限公司。

1.2 方法

1.2.1 动物模型及分组: 将实验大鼠随机分为空白对照组($n=18$), 模型组($n=18$), 药物治疗组($n=18$)。各实验组又分12、24 h亚组, 各9只。模型制备参照Aho等^[4]的方法并改良, 大鼠术前12 h禁食不禁水, 3%戊巴比妥钠(1 mL/kg)腹腔麻醉, 固定开腹, 24号套管针经十二指肠乳头对

侧的无血管区穿刺十二指肠肠壁, 进入胆胰管, 穿刺成功时有一定的漏空感, 并有少量淡黄色胆汁流出, 用无创伤动脉夹暂时阻断肝门端胰胆管, 外套管末端连接输液转换器, 微量注射泵注入3.5%牛磺胆酸钠(1 mL/kg), 3分钟注完拔除外套管, 无创伤动脉夹夹闭十二指肠乳头端胰胆管5 min, 生物胶粘合十二指肠肠壁的戳孔, 防止胆漏, 放开两端动脉夹, 关腹。对照组大鼠胆胰管内不注射3.5%牛磺胆酸钠, 只轻翻动胰腺及十二指肠后关腹。模型组及对照组大鼠腹腔给予生理盐水(4 mL/kg), 每隔6 h给1次; 血必净治疗组制备动物模型成功后, 腹腔内注射血必净注射液^[5](4 mL/kg), 每隔6 h给1次。按预定的时间点, 用24号套管针穿刺颈内动脉, 取血4-5 mL, 4℃下3 000 r/min离心10 min, 取血清3 mL于-80℃冰箱冻存待测以上指标, 大鼠开腹, 取胰腺组织制作病理组织切片及参照Schmidt法^[6]对胰腺损伤进行评分。

1.2.2 观测指标及检测方法: 大鼠血清0.5 mL稀释8倍, 于全自动生化分析仪检测淀粉酶含量; 采用酶联免疫吸附检测IL-6; 采用硫代巴比妥酸法检测MDA, 采用盐酸羟胺法检测SOD; 采用基质显色法测定内毒素。

统计学处理 实验各组数据采用SPSS11.5统计学软件处理, 结果以 $\text{mean} \pm \text{SD}$ 表示, 采用单因素方差分析, 当 $P<0.05$ 时认为具有统计学意义。

2 结果

2.1 血清淀粉酶、IL-6、MDA、SOD、内毒素及病理学评分的测定 血清淀粉酶、IL-6、MDA、SOD、内毒素及病理学评分测定结果见表1。

2.2 淀粉酶、IL-6、LPS、MDA的含量 测定模型组血清中的淀粉酶、IL-6、LPS、MDA含量在各时间点与空白对照组比较均明显升高, 差异有显著性($P<0.05$); 模型组血清中淀粉酶、IL-6、LPS、MDA含量在各时间点间随时间延长而增加, 差异有显著性($P<0.05$); 治疗组各时间点的淀粉酶、IL-6、LPS、MDA含量较模型组同时间点均降低, 差异有显著性($P<0.05$)。

2.3 血清SOD的含量 模型组血清SOD含量各时间点较空白对照组均降低, 差异有显著性($P<0.05$); 模型组血清SOD含量各时间点间随时间延长而降低, 差异有显著性($P<0.05$); 治疗组血清SOD含量各时间点较模型组同时间点升高, 差异有显著性($P<0.05$)。

表 1 血清淀粉酶、IL-6、MDA、SOD、内毒素及病理学评分的测定 (mean ± SD)

分组时间	淀粉酶(U/L)	IL-6(ng/L)	MDA(nmol/mL)	SOD(U/L)	LPS(EU/mL)	病理学分
空白						
12 h	1 005 ± 144	97.0 ± 12.6	4.2 ± 0.3	338.3 ± 14.3	0.04 ± 0.02	0.5 ± 0.1
24 h	890 ± 122	90.1 ± 16.8	5.8 ± 0.5	356.8 ± 15.5	0.03 ± 0.08	0.5 ± 0.1
模型						
12 h	5 494 ± 1 082 ^a	291.3 ± 21.9 ^a	10.8 ± 0.4 ^a	195.7 ± 14.8 ^a	0.12 ± 0.02 ^a	11.5 ± 0.7 ^a
24 h	4 489 ± 845 ^{ae}	258.7 ± 22.0 ^{ae}	14.7 ± 0.4 ^{ae}	114.8 ± 16.0 ^{ae}	0.19 ± 0.02 ^{ae}	13.8 ± 1.3 ^{ae}
治疗						
12 h	4 386 ± 1 198 ^c	174.5 ± 18.2 ^c	8.8 ± 0.3 ^c	266.2 ± 14.6 ^c	0.09 ± 0.02 ^c	10.9 ± 0.6 ^c
24 h	3 122 ± 487 ^{cg}	140.9 ± 25.0 ^{cg}	10.1 ± 0.6 ^{cg}	235.6 ± 12.1 ^{cg}	0.14 ± 0.02 ^{cg}	11.5 ± 0.8 ^{cg}

^a*P*<0.05 vs 空白组; ^c*P*<0.05, ^e*P*<0.05 vs 模型组12 h; ^g*P*<0.05 vs 治疗组12 h.

■应用要点

血必净注射液临床大多用于治疗烧伤、手术和感染等导致全身免疫反应综合征. 选用血必净注射液治疗急性胰腺炎大鼠模型, 减轻胰腺病理损伤, 降低死亡率可以为临床治疗提供理论依据.

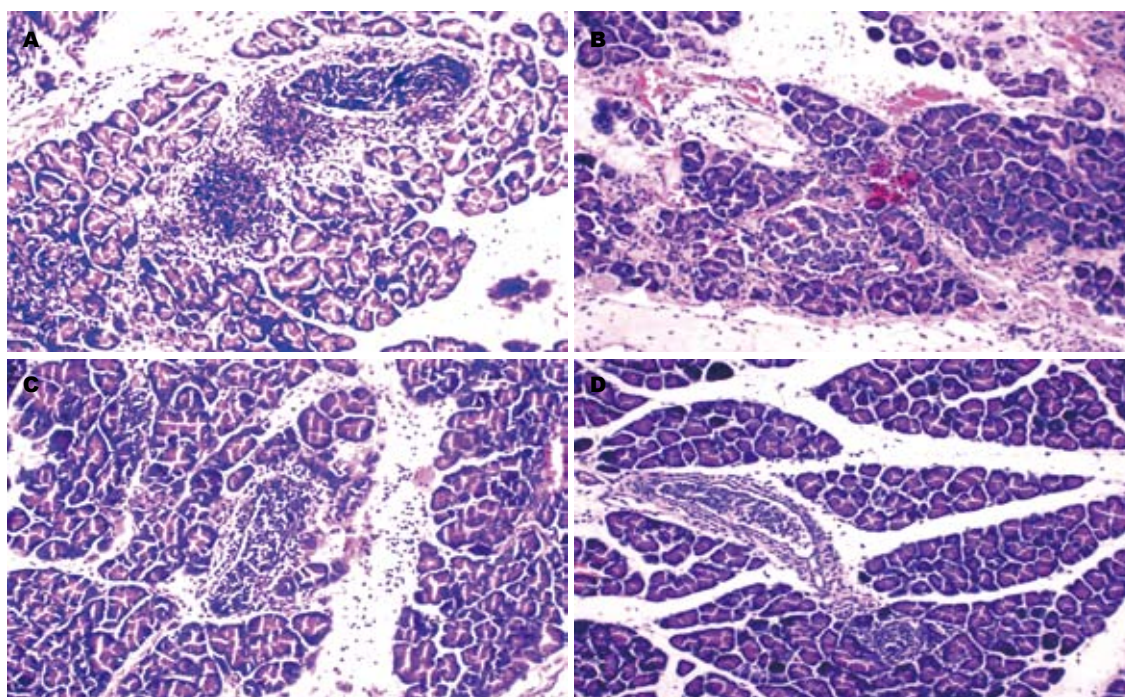


图 1 各组胰腺组织病理(HE × 200). A: 造模12 h; B: 造模24 h; C: 治疗12 h; D: 治疗24 h.

2.4 病理变化 病理模型组12 h可见胰腺小叶排列紊乱, 小叶间充斥大量炎症细胞及红细胞, 胰腺组织坏死; 造模24 h后见胰腺腺泡细胞结构消失, 腺泡细胞萎缩、胞核溶解消失明显, 间质内见大量炎性细胞浸润. 治疗组12 h见胰腺小叶间隙有增宽, 间质内可见红细胞、炎性细胞散在分布; 治疗组24 h胰腺腺泡细胞水肿, 间质内散在炎性细胞浸润(图1).

2.5 胰腺组织病理学评分 模型组随时间延长损伤程度加重, 各时间点间差异有显著性(*P*<0.05), 与空白对照组相比在各时间点损伤程度均加重, 差异有显著性(*P*<0.05); 治疗组胰腺损伤的组织病理学评分在各时间点与模型组相比均降低, 差异有显著性(*P*<0.05).

3 讨论

SAP的发病机制目前仍不甚清楚, 近年来的研究表明, AP重症化与中性粒细胞过度激活、细胞因子的过度释放、肠源性内毒血症等学说有关.

SAP与IL-6: IL-6主要由单核细胞产生. 有研究表明^[7]IL-6升高的程度及持续水平与SAP的严重程度均有关. SAP症状出现数小时IL-6水平就增高, 可以作为评估SAP预后病情发展的指标. 因此本研究选用IL-6作为研究SAP的指标. 实验结果表明: SAP血清IL-6水平呈持续升高, 且与胰腺病理损害程度一致, 各时点与空白对照组相比有明显差异, 结果证实了IL-6升高的程度与SAP的病情严重程度相关, 可以用IL-6作为评价

■同行评价

本研究内容贴近临床, 有较强的实用性。

SAP的炎症程度。

SAP与中性粒细胞(polymorphonuclear, PMN): SAP发生后, 大量的PMN通过循环系统进入组织激活, 激活后的PMN主要通过细胞呼吸爆发, 释放大氧自由基(oxygen free radicals, OFR)和脱颗粒(释放多种蛋白水解酶), 促使组织损伤和炎症迁延, 造成SIRS和MOF^[8]。生理状态下胰腺组织中的OFR处于动态平衡。SAP时, 大量的OFR产生超过了机体清除能力, 动态平衡被打破。Keck等^[9]的研究表明OFR可通过上调内皮ICAM-1表达而加重AP时机体的微循环障碍。Czako等^[10]认为OFR通过损伤腺泡细胞, 引起细胞因子和血管活性物质的释放, 从而吸引炎性细胞聚集和血管内皮的活化表达黏附分子。Tadao等^[11]也认为OFR及其衍生物在AP的发展过程中发挥了重要的作用, 是胰腺损伤过程中的分子扳机。OFR失衡是导致AP重症化的关键因素。过量的OFR与组织内细胞膜多价不饱和脂肪酸结合, 形成多种脂质过氧化物(lipid peroxide, LPO), 使细胞膜通透性增加, Ca^{2+} 大量内流, 线粒体和溶酶体被破坏, 导致细胞死亡; 而且, 致炎因子和氧化应激发挥过协同作用, 触发共同的信号转导通路, 通过MAPK和NF- κ B的激活^[12], 导致了炎症的级联反应。此外, OFR的作用并不局限于胰腺组织, 还参与了AP的全身炎症反应, 特别是在肺、肝和血液中, 这就促使多器官功能障碍(multiple organ dysfunction syndrome, MODS)发生。超氧化物歧化酶(Superoxide Dimutase, SOD)是一种清除氧自由基的重要酶类, 其含量水平可以反映机体清除OFR的能力, SOD的过度含量降低导致OFR的过量, 过量的OFR则参与脂质过氧化反应。丙二醛(malondialdehyde, MDA)是LPO的终产物之一, 测定MDA的含量可以反映机体内LPO的程度, 脂质过氧化程度的升高则提示胰腺组织损伤程度加重。本研究结果显示, 诱发SAP后, 血清MDA含量增高、SOD降低, 且随着时间推移, 血清MDA进行性升高、SOD进行性降低, 二者改变的程度与胰腺的病理改变相吻合。应用血必净后, 血清MDA降低、SOD升高。因此, 降低PMN的过度激活, 平衡OFR的含量, 降低细胞脂质过氧化的程度, 有益于减轻SAP的炎症反应。

SAP与内毒素: 临床统计资料及动物实验研究表明, 多数的胰腺和胰周组织感染是由肠道细菌移位及内毒素所致的肠源性感染, 肠道是引发感染细菌的主要来源^[13,14]。LPS可作为激

活剂, 启动多条信号转导通路激活炎细胞, 导致体内第二次细胞因子与炎症介质的释放高峰, 同时激活补体等途径加速病程, 通过“二次打击”加重胰腺微循环障碍与胰外器官的病理损伤恶化。由此, 本研究从检测大鼠SAP血浆中LPS的含量, 联系SAP严重程度, SAP血浆LPS水平呈持续升高, 且与胰腺病理损害程度一致。应用血必净后, LPS含量明显降低, 减少肠源性感染及细胞因子的释放, 进一步减轻胰腺组织损伤。

SAP与血必净: 血必净注射液是王今达教授在中西医结合治疗大量急性危重病基础上, 以古方血府逐瘀汤为基础, 反复筛选提炼而成。其主要有效成分包括红花黄色素A、川芎嗪、丹参素、阿魏酸、芍药昔、原儿茶醛等, 具有降低LPS, 扩张血管, 改善微循环与组织灌注, 抑制血小板聚集, 促进纤维组织重吸收、胶原纤维的降解及保护血管内皮细胞等作用, 能抑制炎症介质的过度释放, 从而有效地减少损伤因子对机体的损伤^[15]。因此, 我们选用血必净注射液作为SAP大鼠的治疗药物。实验研究结果显示, 经血必净治疗后, 与模型组相比, 血淀粉酶、IL-6、LPS、MDA明显降低($P<0.05$), SOD明显升高($P<0.05$), 光镜下胰腺组织损伤改善, 分析血必净的治疗SAP机制可能为: (1)下调IL-6, 减轻过度炎症反应, 缓解免疫麻痹; (2)平衡OFR含量, 减少脂质过氧化程度, 减轻胰腺组织损伤; (3)拮抗内毒素, 减轻全身炎症反应。

4 参考文献

- 1 王今达, 雪琳. 细菌、内毒素、炎症介质并治—治疗重症脓毒症的新对策. 中国危重病急救医学 1998; 10: 323-325
- 2 曹书华, 王今达. 血必净对感染性多器官功能障碍综合征大鼠组织及内皮损伤保护作用的研究. 中国危重病急救医学 2002; 14: 489-491
- 3 姚咏明, 黎洁良. 脓毒性休克与细胞因子. 中国实用外科杂志 2000; 20: 433-435
- 4 Aho HJ, Nevalainen TJ, Aho AJ. Experimental pancreatitis in the rat. Development of pancreatic necrosis, ischaemia and edema after intraductal sodium taurocholate injection. *Eur Surg Res* 1983; 15: 28-36
- 5 曹书华, 王今达. 血必净对感染性多器官功能障碍综合征大鼠组织及内皮损伤保护作用的研究. 中国危重病急救医学 2002; 14: 489-491
- 6 Schmidt J, Lewandrowski K, Warshaw AL, Compton CC, Rattner DW. Morphometric characteristics and homogeneity of a new model of acute pancreatitis in the rat. *Int J Pancreatol* 1992; 12: 41-51
- 7 王洪禄, 孙家邦. 肥大细胞在重症急性胰腺炎发病机制中的作用. 国际外科学杂志 2007; 34: 313-315
- 8 Chen CC, Wang SS, Lee FY. Action of antiproteases on the inflammatory response in acute pancreatitis. *JOP* 2007; 8: 488-494
- 9 Keck T, Werner J, Banatvala R, Stalman A, Sc

- hneider L, Gebhard MM, Herfarth C, Klar E. Oxygen radicals promote ICAM-1 expression and microcirculatory disturbances in experimental acute pancreatitis. *Pancreatology* 2003; 3: 156-163
- 10 Czako L, Hegyi P, Takacs T, Gog C, Farkas A, Mandy Y, Varga IS, Tiszlavicz L, Lonovics J. Effects of octreotide on acute necrotizing pancreatitis in rabbits. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 2082-2086
- 11 Tadao M, Yuji O. [Role of free radicals in the development of severe acute pancreatitis]. *Nihon Rinsho* 2004; 62: 2015-2020
- 12 Pereda J, Sabater L, Aparisi L, Escobar J, Sandoval J, Viña J, López-Rodas G, Sastre J. Interaction between cytokines and oxidative stress in acute pancreatitis. *Curr Med Chem* 2006; 13: 2775-2787
- 13 Takahashi Y, Fukushima J, Fukusato T, Shiga J, Tanaka F, Imamura T, Fukayama M, Inoue T, Shimizu S, Mori S. Prevalence of ischemic enterocolitis in patients with acute pancreatitis. *J Gastroenterol* 2005; 40: 827-832
- 14 Penalva JC, Martínez J, Laveda R, Esteban A, Muñoz C, Sáez J, Sánchez J, Navarro S, Feu F, Sánchez-Payá J, Pérez-Mateo M. A study of intestinal permeability in relation to the inflammatory response and plasma endocannabinoid levels in patients with acute pancreatitis. *J Clin Gastroenterol* 2004; 38: 512-517
- 15 明自强, 俞林明, 吕银祥, 王黎卫. 血必净对脓毒症患者细胞因子的影响. *现代中西医结合杂志* 2008; 17: 4219-4220

编辑 李薇 电编 何基才

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

• 消息 •

《世界华人消化杂志》正文要求

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

HLA等免疫相关基因及MTHFR在新疆哈萨克族食管癌中的筛检效果评价

蔡金凤, 秦江梅, 廖佩花, 曾同霞, 刘翔, 李锋

■背景资料

近30年来新疆哈萨克族食管癌死亡率无明显下降, 主要原因是很难针对性开展病因预防和缺乏针对新疆哈萨克族食管癌高发区人群有效的筛检方案。

蔡金凤, 秦江梅, 曾同霞, 刘翔, 李锋, 新疆地方病与民族高发疾病省部共建重点实验室 石河子大学医学院预防医学系 新疆维吾尔自治区石河子市 832002

廖佩花, 新疆维吾尔自治区疾病预防控制中心 新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市 830000

国家自然科学基金资助项目, No. 30660161

国家重点基础研究发展规划基金资助项目(973计划), No. 2005CCA03700

2006年教育部科学技术研究重点基金资助项目, No. 206167

国家973计划前期研究专项基金资助项目, No. 2007CB516804

作者贡献分布: 此课题由秦江梅与李锋设计并组织实施; 蔡金凤、刘翔负责问卷调查与标本的收集工作; 蔡金凤、廖佩花、曾同霞及刘翔参与HLA-DRB1*0901、TAP2379、TAP1637及MTHFR C677T基因多态实验与数据分析; 本论文写作由蔡金凤与秦江梅完成。

通讯作者: 秦江梅, 教授, 832002, 新疆维吾尔自治区石河子市北二路, 新疆地方病与民族高发疾病省部共建重点实验室, 石河子大学医学院预防医学系。 qinjiangmei@yahoo.com.cn

收稿日期: 2011-06-09 修回日期: 2011-08-25

接受日期: 2011-08-26 在线出版日期: 2011-08-28

Value of detection of HLA, other immune-related genes and MTHFR in the screening of esophageal cancer in Xinjiang Kazakh population

Jin-Feng Cai, Jiang-Mei Qin, Pei-Hua Liao, Tong-Xia Zeng, Xiang Liu, Feng Li

Jin-Feng Cai, Jiang-Mei Qin, Tong-Xia Zeng, Xiang Liu, Feng Li, Key Laboratory of Xinjiang Endemic and Ethnic Diseases, Department of Preventive Medicine, Shihezi University, Shihezi 832002, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China
Pei-Hua Liao, Center for Disease Control and Prevention of Xinjiang Uygur Autonomous Region, Urumqi 830000, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No.30660161; the Major State Basic Research Development Program of China (973 Program), No. 2005CCA03700; the Foundation for Key Project of Ministry of Education of China. No. 206167; and the Special Foundation for 973 Program of China. No. 2007CB516804

Correspondence to: Jiang-Mei Qin, Professor, Key Laboratory of Xinjiang Endemic and Ethnic Diseases, Department of Preventive Medicine, Shihezi University, North Beier Road, Shihezi 832002, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China. qinjiangmei@yahoo.com.cn

Received: 2011-06-09 Revised: 2011-08-25

Accepted: 2011-08-26 Published online: 2011-08-28

Abstract

AIM: To evaluate the significance of detection of

HLA-DRB1*0901, TAP2379, TAP1637 and MTHFR C677T in the screening of esophageal cancer (EC) in Xinjiang Kazakh population.

METHODS: Blood samples were collected from 125 Kazakh patients with EC and 250 normal controls and used to detect HLA-DRB1*0901, TAP2379, TAP1637 and MTHFR C677T genetic polymorphisms by PCR or PCR-RFLP. The validity and reliability of testing results for HLA-DRB1*0901, TAP2379, TAP1637 and MTHFR C677T were evaluated by epidemiological method.

RESULTS: The sensitivity of detection of HLA-DRB1*0901, TAP2379, TAP1637 and MTHFR C677T alone in the screening of EC was 24.0%, 44.8%, 58.4% and 74.4%, respectively, and the corresponding specificity was 90.8%, 77.2%, 61.6% and 45.6%. Combined detection of HLA-DRB1*0901, TAP2379, TAP1637 and MTHFR C677T had the highest sensitivity (91.2%). Combined detection of MTHFR C677T and TAP1637 had a sensitivity of 88.0%.

CONCLUSION: MTHFR C677T can be used as a parameter for screening of EC in Xinjiang Kazakh population. Combined detection of MTHFR C677T and TAP1637 can increase the sensitivity as compared to detection of either of them alone.

Key Words: Esophageal cancer; Kazakh; Screening; Immune-related gene; Methylenetetrahydrofolate reductase

Cai JF, Qin JM, Liao PH, Zeng TX, Liu X, Li F. Value of detection of HLA, other immune-related genes and MTHFR in the screening of esophageal cancer in Xinjiang Kazakh population. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(24): 2572-2576

摘要

目的: 评价免疫相关基因HLA-DRB1*0901、TAP2379、TAP1637及叶酸代谢基因MTHFR C677T作为新疆哈萨克族(简称哈萨克族)

■同行评议者

王健生, 教授, 西安交通大学医学院第一附属医院肿瘤外科; 赵春玲, 副教授, 潍坊医学院细胞生物学教研室; 何敏, 教授, 广西医科大学医学科学实验中心

食管癌人群筛检指标的作用和意义.

方法: 以胃镜+组织病理学检查为金标准, 确定哈族食管癌125例, 对照250例; 采用PCR或PCR-RFLP技术对所有样本检测HLA-DRB1*0901, TAP2379、TAP1637及MTHFRC677T的基因型及基因频率, 利用筛检实验的评价方法评价上述指标的真实性及可靠性.

结果: HLA-DRB1*0901、TAP2379、TAP1637及MTHFRC677T单独检测哈族食管癌的灵敏度分别为: 24.0%, 44.8%, 58.4%, 74.4%, 特异度分别为: 90.8%, 77.2%, 61.6%, 45.6%; 对这4个基因检测结果进行不同的组合后评价其真实性, 结果显示, 这4个基因联合检测的并联试验的灵敏度最高, 达91.2%; MTHFRC677T及TAP1637联合检测的并联试验, 灵敏度为88.0%.

结论: MTHFRC677T可作为新疆哈族食管癌的筛检指标; 也可采用MTHFRC677T和TAP1637联合检测, 能提高灵敏度13.6%.

关键词: 食管癌; 哈萨克族; 筛检; 免疫相关基因; 亚甲基四氢叶酸还原酶

蔡金凤, 秦江梅, 廖佩花, 曾同霞, 刘翔, 李锋. HLA等免疫相关基因及MTHFR在新疆哈萨克族食管癌中的筛检效果评价. 世界华人消化杂志 2011; 19(24): 2572-2576

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/2572.asp>

0 引言

新疆的哈萨克族(以下简称哈族)是食管癌高发民族. 新疆哈族聚集地新源县1974-1983年10年间哈族食管癌平均死亡率73.2/10万(标化89.1/10万), 与2004-2005年新源县哈族食管癌的死亡率67.60/10万相比, 哈族食管癌死亡率无明显下降, 主要原因是很难针对性开展病因预防和缺乏针对新疆哈族食管癌高发区人群有效的筛检方案. 目前已有学者评价疾病相关基因应用于疾病的早期发现和预防工作中价值, 如2001年刘懿禾等^[1]的研究显示, HLA-DR抗原表达有助于多器官功能障碍综合征的早期诊断; 2003年全林虎等^[2]证实HLA-DQA1*0301等位基因可作为紫癜性肾炎的一个实验室早期诊断指标. 但国内外对食管癌易感基因研究大多从病因学的角度进行探讨, 还缺乏对这些易感基因作为食管癌筛检指标的评价研究. 本研究拟评

价HLA-DRB1*0901、TAP2379、TAP1637及MTHFRC677T作为新疆哈族食管癌筛检指标的真实性和可靠性, 从中筛选出灵敏度和特异度均较高的肿瘤标志物用于哈族食管癌初筛, 同时为新疆哈族食管癌的预警及高危人群筛查模型的建立提供一定的生物学依据.

1 材料和方法

1.1 材料 2006-11/2010-10在新疆北部哈族聚居地区的六所医院门诊经胃镜检查、组织病理学确诊的哈族新发食管癌病例125例, 其中男84例, 女41例; 对照250例, 其中男168例, 女82例. 对照组部分来源于同一所医院门诊胃镜非食管疾病患者, 部分来源于食管癌高发区正常人群, 所有标本均经组织病理学确诊未患食管癌及食管疾病. 基因多态性的检测采用血液样本.

1.2 方法

1.2.1 筛检试验的研究方法: 以胃镜+组织病理学检查为金标准, 按预期灵敏度和特异度均达到70%, $\alpha = 0.05$, 允许误差 δ 为5%-10%, 本研究允许误差 δ 选择8%, 根据公式^[3]计算病例组和对照组例数均各需125例. 本研究最终确定病例125例, 对照250例.

1.2.2 实验室检测技术: 采用PCR或PCR-RFLP方法检测HLA-DRB1*0901、TAP2379、TAP1637及MTHFRC677T多态性. 对所有样本实行统一编号, 参与做实验的人员和判断试验结果的人对于标本是病例还是对照设盲.

统计学处理 使用Epidata建立数据库, 采用SPSS13.0统计软件进行分析, 采用 χ^2 检验分析食管癌的危险因素, 用筛检试验的方法评价相关基因作为哈族食管癌筛检指标单独及联合检测的真实性及可靠性.

2 结果

2.1 一般情况 食管癌组与对照组性别差异无统计学意义($\chi^2 = 0.000$, $P = 1.000$); 年龄差异无统计学意义($t = 0.811$, $P = 0.418$).

2.2 HLA-DRB1*0901、TAP2379、TAP1637及MTHFRC677T基因多态性与哈族食管癌的关系 χ^2 检验显示, HLA-DRB1*0901、TAP2379、TAP1637及MTHFRC677T各基因型频率分布在食管癌组和对照组间比较差异均有统计学意义($\chi^2 = 9.680$, $P = 0.002$; $\chi^2 = 12.355$, $P < 0.001$; $\chi^2 = 8.763$, $P = 0.003$; $\chi^2 = 9.056$, $P = 0.003$, 表1).

2.3 HLA等免疫相关基因及MTHFR的筛检试验

■研究前沿

食管癌病因及发病机制至今尚未完全阐明, 目前国内外对食管癌易感基因研究大多从病因学的角度进行探讨, 还缺乏对这些易感基因作为食管癌筛检指标的评价研究.

■相关报道

刘懿禾等的研究显示,HLA-DR抗原表达有助于多器官功能障碍综合征的早期诊断;全林虎等证实HLA-DQA1*0301等位基因可作为紫癜性肾炎的一个实验室早期诊断指标,其灵敏度为82.4%;特异度为60.5%.

表 1 免疫及代谢等相关基因基因型分布与哈族食管癌的关系

	病例n(%)	对照n(%)	P值	OR(95%CI)
HLA-DR9				
-	95(76.0)	227(90.8)	-	1.000
+	30(24.0)	23(9.2)	0.001	3.117(1.721-5.643)
TAP2379				
G/G	69(55.2)	193(77.2)	-	1.000
G/A	41(32.8)	43(17.2)	0.001	2.667(1.604-4.435)
A/A	15(12.0)	14(5.6)	0.004	2.997(1.376-6.528)
G/G	69(55.2)	193(77.2)	-	1.000
G/A+A/A	56(44.8)	57(22.8)	0.001	2.748(1.735-4.353)
TAP1637				
A/A	52(41.6)	154(61.6)	-	1.000
A/G	56(44.8)	83(33.2)	0.003	1.998(1.259-3.172)
G/G	17(13.6)	13(5.2)	0.001	3.873(1.762-8.513)
A/A	52(41.6)	154(61.6)	-	1.000
A/G+G/G	73(58.4)	96(38.4)	0.001	2.252(1.454-3.488)
MTHFR				
C/C	32(25.6)	114(45.6)	-	1.000
C/T	66(52.8)	95(38.0)	0.001	2.475(1.498-4.090)
T/T	27(21.6)	41(16.4)	0.007	2.346(1.257-4.380)
C/C	32(25.6)	114(45.6)	-	1.000
C/T+ T/T	93(74.4)	136(54.4)	0.001	2.436(1.519-3.908)

表 2 各基因多态单独检测真实性评价结果

分类	阳性数n(%)	灵敏度(%)	特异度(%)	约登指数
HLA-DRB1*0901				
食管癌	30(24.0)	24.0	90.8	0.15
非食管癌	23(9.2)			
TAP2379				
食管癌	56(44.8)	44.8	77.2	0.22
非食管癌	57(22.8)			
TAP1637				
食管癌	73(58.4)	58.4	61.6	0.20
非食管癌	96(38.4)			
MTHFRC66T				
食管癌	93(74.4)	74.4	45.6	0.20
非食管癌	136(54.4)			

以TAP2379G/A+A/A型为阳性, G/G型为阴性; TAP1637A/G+G/G型为阳性, A/A型为阴性; MTHFRC677TC/T+T/T型为阳性, C/C型为阴性.

评价

2.3.1 各基因单独检测的结果评价: 各基因单独检测食管癌, 灵敏度均偏低, MTHFRC66T单独检测灵敏度最高, 为74.4%(表2).

2.3.2 HLA等基因不同组合的检测结果及真实性评价: HLA-DRB1*0901、TAP2379、TAP1637及MTHFRC66T联合检测的灵敏度最高, 达

91.2%; 其次为MTHFRC66T及TAP1637的联合检测, 灵敏度为88.0%(表3).

2.3.3 各指标可靠性的评价: 各指标均抽取部分血样DNA重复PCR实验, 进行一致性符合检验, 平均符合率为97.1%(表4).

3 讨论

食管癌发病隐匿, 病情进展快, 尽管临床上有多种治疗方案, 但中晚期食管癌的5年生存率仅10%-15%, 而早期食管癌5年生存率可高达90%以上^[4]. 能够及时作出早期诊断, 对于哈族食管癌诊断、治疗和预后等方面有很大的意义. 本研究以胃镜+组织病理学检查为金标准, 确定哈族食管癌125例, 对照250例.

各指标单独检测的灵敏度普遍比较低, 分析原因, 本次研究对照为经胃镜+组织病理学确诊无食管癌及食管疾病的人, 因为伦理道德原因, 收集为门诊胃镜检查排除食管癌及食管疾病的患者, 部分对照为浅表性胃炎等消化系统炎症的患者, 这几个基因的多态性与消化系统疾病的发生也有相关性, 从而导致了病例组和对照组之间的基因多态性的差异变小, 使得这4个基因单独检测的灵敏度降低. MTHFRC677T在单独检测中的灵敏度最高, 为74.4%, MTH-

■创新盘点

本研究在前HLA-DRB1*0901、TAP2379、TAP1637及MTHFRC677T基因多态性与新疆哈萨克族人群食管癌关系的研究基础之上, 进一步评价其作为新疆哈萨克族食管癌筛检指标的真实性和可靠性, 从中筛选出灵敏度和特异度均较高的肿瘤标志物用于哈族食管癌初筛, 同时为新疆哈萨克族食管癌的预警及高危人群筛查模型的建立提供一定的生物学依据.

表 3 HLA等基因不同组合联合试验的真实性评价结果

基因组合	食管癌阳性数 n (%)	非食管癌阳性 n (%)	灵敏度(%)	特异度(%)	约登指数
HLA-DR9和TAP2379	71(56.8)	76(30.4)	56.8	69.6	0.26
HLA-DR9和TAP1637	82(65.6)	105(42.0)	65.6	58.0	0.24
TAP2379和TAP1637	98(78.4)	131(52.4)	78.4	47.6	0.26
MTHFRC66T和HLA-DR9	99(79.2)	144(57.6)	79.2	42.4	0.22
MTHFRC66T和TAP2379	100(80.0)	159(63.6)	80.0	36.4	0.16
MTHFRC66T和TAP1637	110(88.0)	170(68.0)	88.0	32.0	0.20
HLA-DR9、TAP2379和TAP1637	104(83.2)	137(54.8)	83.2	45.2	0.28
HLA-DR9、TAP2379、TAP1637和MTHFRC66T	114(91.2)	191(76.4)	91.2	23.6	0.15

HLA-DR9即为HLA-DRB1*0901.

表 4 各指标可靠性评价结果

指标	复核例数 n	符合率(%)
HLA-DRB1*0901	120	99.2
TAP2379	100	96.0
TAP1637	100	95.0
MTHFRC66T	120	98.3

平均符合率为97.1%.

FRC677T多态性还与哈族的饮食有关, 尤其是与少食新鲜蔬菜等危险因素有关^[5], 所以MTHFRC677T不仅可以作为哈族食管癌的筛检指标, 还可以作为危险因素引入哈族食管癌高危人群的筛查模型.

对这4个基因进行不同的组合, 利用并联试验的原理检测食管癌, 不同基因组合的并联试验的灵敏度均较其单独检测的灵敏度高, 但特异度均有所下降. 这4个基因联合检测的并联试验灵敏度最高, 达91.2%; 其次是MTHFRC677T及TAP1637联合检测的并联试验, 灵敏度为88.0%. HLA-DRB1*0901等4个基因的联合检测与MTHFRC677T及TAP1637联合检测的并联试验相比较, 灵敏度虽然有所提高, 但是在增加2个检测指标的情况下, 灵敏度只提高了3.2%, 也就意味着在增加2倍检测成本的情况下, 检测效率提高的幅度并不大. 目前采用的隐血株方法筛查食管癌, 其灵敏度仅为37.5%^[6], 除了HLA-DRB1*0901外, 其余3个基因单独检测的灵敏度均较隐血株筛查食管癌的灵敏度高; 隐血株的检测成本每份约20元, 本研究平均每个基因的检测成本约为8.2元, 所以单独检测时使用MTHFRC677T作为哈族食管癌的筛检指标是可

行的. 在经济水平比较低的地区建议使用MTHFRC677T单独检测作为哈族食管癌的筛检指标; 在经济水平比较高的地区建议MTHFRC677T和TAP1637联合检测的并联试验作为筛检指标, 其灵敏度比MTHFRC677T单独检测提高13.6%.

本研究结果与本课题组前期的研究结果一致^[7-11]; 与Lin等^[12]、Cao等^[13]、Song等^[14]、刘静等^[15]对HLA-DRB1*0901, TAP2379, MTHFR基因多态性与食管癌的相关性研究结果也一致, 说明这些基因与食管癌的发生具有相关性. 但各基因的 OR 值均较本课题组前期的 OR 值低, 分析原因, 本次研究对照为经胃镜+组织病理学确诊无食管癌及食管疾病的人, 因为伦理道德原因, 收集为门诊胃镜检查排除食管癌及食管疾病的患者, 部分对照为浅表性胃炎等消化系统炎症的患者, 这几个基因的多态性与消化系统疾病的发生也有相关性, 从而导致了病例组和对照组之间的基因多态性的差异变小, 使得这4个基因的 OR 值降低.

4 参考文献

- 刘懿禾, 崔克亮, 曹书华. 单核细胞HLA-DR抗原表达在MODS早期诊断中的意义. 中国危重病急救医学 2001; 13: 539-541
- 全林虎, 任少敏, 傅亮, 李维才, 高忠献. 检测HLA-DQA1*0301等位基因作为紫癜性肾炎实验室早期诊断指标的试验研究. 中华实用医学 2003; 5: 1-3
- 傅华, 段广才. 预防医学. 第4版. 北京: 人民卫生出版社, 2004: 319-320
- 邵令方, 高宗人, 卫功铨, 许金良, 陈明耀, 程金华. 食管癌和贲门癌的外科治疗. 中华外科杂志 2001; 39: 44-46
- 秦江梅, 王秀梅, 陈波, 杨磊, 李锋, 何玲, 廖佩花. 新疆哈萨克族食管癌与叶酸摄入水平、亚甲基四氢叶酸还原酶基因多态关系的研究. 中华流行病学杂志 2008; 29: 27-30
- 王国清, 刘韵源, 郝长青. 食管黏膜碘染色图像和浅表食管癌及癌前病变组织学的关系. 中华肿瘤杂志 2004;

■应用要点

本研究评价HLA-DRB1*0901、TAP2379、TAP1637及MTHFRC677T基因多态性作为新疆哈萨克族食管癌初筛指标的真实性和可靠性, 为食管癌的防治提供有价值的参考依据.

■同行评价

本论文提供的病例数充足, 研究目标明确, 实验设计合理, 统计分析方法得当, 具有一定的科学性和可读性。

- 6: 342
- 7 廖佩花, 马彦清, 曾同霞, 陈波, 杨磊, 李锋, 何玲, 秦江梅. HLA-DR9等位基因与哈族食管癌的关系. 中国公共卫生 2009; 25: 798-800
- 8 曾同霞, 张海峰, 雷丽娟, 蔡金凤, 李锋, 廖佩花, 秦江梅. TAP2基因多态及遗传因素与新疆哈族食管癌的病例对照研究. 世界华人消化杂志 2009; 17: 3255-3258
- 9 蔡金凤, 马彦清, 徐莉等, 曾同霞, 李锋, 廖佩花, 秦江梅. HPV16E6、TAP2与新疆哈萨克族食管癌交互作用的1:2病例对照. 世界华人消化杂志 2010; 18: 3359-3365
- 10 陈玲. HPV感染及TAP1基因多态性与新疆哈族食管癌的相关性研究. 新疆: 石河子大学医学院, 2007: 21-22
- 11 王秀梅, 张卫群, 陈波, 何玲, 阿力木太·哈那提, 李锋, 杨磊, 秦江梅. MTHFR基因多态性与哈族食管癌易感性. 中国公共卫生 2007; 23: 937-938
- 12 Lin J, Deng CS, Sun J, Zheng XG, Huang X, Zhou Y, Xiong P, Wang YP. HLA-DRB1 allele polymorphisms in genetic susceptibility to esophageal carcinoma. *World J Gastroenterol* 2003; 9: 412-416
- 13 Cao B, Tian X, Li Y, Jiang P, Ning T, Xing H, Zhao Y, Zhang C, Shi X, Chen D, Shen Y, Ke Y. LMP7/TAP2 gene polymorphisms and HPV infection in esophageal carcinoma patients from a high incidence area in China. *Carcinogenesis* 2005; 26: 1280-1284
- 14 Cao B, Tian X, Li Y, Jiang P, Ning T, Xing H, Zhao Y, Zhang C, Shi X, Chen D, Shen Y, Ke Y. LMP7/TAP2 gene polymorphisms and HPV infection in esophageal carcinoma patients from a high incidence area in China. *Carcinogenesis* 2005; 26: 1280-1284
- 15 Song C, Xing D, Tan W, Wei Q, Lin D. Methylene-tetrahydrofolate reductase polymorphisms increase risk of esophageal squamous cell carcinoma in a Chinese population. *Cancer Res* 2001; 61: 3272-3275
- 15 刘静, 孙业桓, 陈颖, 陈朋, 黑金璇, 耿佼, 孙良. 亚甲基四氢叶酸还原酶基因多态性与中国人食管癌易感性的Meta分析. 肿瘤防治研究 2010; 37: 213-21

编辑 何基才 电编 何基才

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

• 消息 •

《世界华人消化杂志》性质、刊登内容及目标

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

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

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

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

替比夫定对HBeAg+慢性乙型肝炎患者外周血树突状细胞及淋巴细胞亚群的影响

朱斌, 张平, 禹萌, 王天宝, 毛乾国

朱斌, 张平, 禹萌, 王天宝, 毛乾国, 新乡医学院第一附属医院感染疾病科 河南省卫辉市 453100

作者贡献分布: 朱斌与张平对此文所作贡献均等; 此课题由朱斌、张平、禹萌、王天宝及毛乾国共同设计; 禹萌与王天宝完成标本的采集; 朱斌、张平、禹萌及王天宝实验操作完成; 数据分析由朱斌、张平及毛乾国完成; 本论文写作由朱斌与张平完成。

通讯作者: 朱斌, 副主任医师, 副教授, 453100, 河南省卫辉市, 新乡医学院第一附属医院感染疾病科。

qwfyzhubin@yahoo.com.cn

电话: 0373-4404342

收稿日期: 2011-06-09 修回日期: 2011-08-26

接受日期: 2011-08-27 在线出版日期: 2011-08-28

Association of HBeAg negative conversion with the effect of telbivudine on peripheral blood dendritic cells and lymphocyte subsets in patients with HBeAg-positive chronic hepatitis B

Bin Zhu, Ping Zhang, Meng Yu, Tian-Bao Wang, Qian-Guo Mao

Bin Zhu, Ping Zhang, Meng Yu, Tian-Bao Wang, Qian-Guo Mao, Department of Infectious Diseases, the First Affiliated Hospital of Xinxiang Medical University, Weihui 453100, Henan Province, China

Correspondence to: Professor Bin Zhu, Department of Infectious Diseases, the First Affiliated Hospital of Xinxiang Medical University, Weihui 453100, Henan Province, China. qwfyzhubin@yahoo.com.cn

Received: 2011-06-09 Revised: 2011-08-26

Accepted: 2011-08-27 Published online: 2011-08-28

Abstract

AIM: To investigate the association of HBeAg negative conversion with the effect of cellular immunity in patients with HBeAg-positive chronic hepatitis B (CHB) after telbivudine treatment.

METHODS: Thirty HBeAg-positive chronic hepatitis B patients were treated with telbivudine (LDT) for 48 wk, and thirty healthy people were used as controls. DCs were isolated from peripheral blood and cultured in vitro before treatment, 12, 24, and 48 wk after treatment.

Subsequently, surface molecular markers on DCs and lymphocyte subsets were detected and quantified by flow cytometry.

RESULTS: Of 30 patients undergoing telbivudine therapy for 48 wk, 26 (86.7%) had HBV DNA negative conversion (HBV DNA < 500 copies/mL), and 9 (26.7%) had HBeAg negative conversion. The expression of surface molecular markers CD1a, CD40, CD83, and CD86 was not changed at 12 wk, but were up-regulated at 24 and 48 wk compared to pretherapy levels. However, the expression levels of these markers were lower in the treatment group than in the control group. Lymphocyte subsets were not changed significantly at 12 wk. The percentage of CD4⁺ T cells and the CD4⁺/CD8⁺ ratio were increased significantly at 24 and 48 wk, while no significant changes were found in the percentages of CD3⁺ T cells, D8⁺ T cells, and D19⁺ B cells. At 48 wk, compared to patients who did not have HBeAg negative conversion, the expression of CD1a, CD40, CD86 MHC-D, the percentage of CD4⁺, and CD4⁺/CD8⁺ ratio were increased obviously (all $P < 0.01$) in patients who had HBeAg negative conversion.

CONCLUSION: Cellular immunity is enhanced in HBeAg-positive CHB patients after telbivudine therapy. Telbivudine not only restrains virus reproduction but also participates in cellular immunity and promotes HBeAg negative conversion by regulating the function of DCs and lymphocyte subsets.

Key Words: HBeAg-positive chronic hepatitis B; Telbivudine; Dendritic cells; Lymphocyte subsets

Zhu B, Zhang P, Yu M, Wang TB, Mao QG. Association of HBeAg negative conversion with the effect of telbivudine on peripheral blood dendritic cells and lymphocyte subsets in patients with HBeAg-positive chronic hepatitis B. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(24): 2577-2582

摘要

目的: 探讨替比夫定抗病毒治疗对HBeAg阳

■背景资料

替比夫定抗病毒治疗慢性乙型肝炎(CHB), 临床观察及实验研究均显示较其他核苷(酸)类药物有较高的HBeAg阴转或血清转率, 但其机制尚不明确, HBeAg阴转或血清转是在有效抑制或清除HBV的基础上发生的, 而HBV的清除根本上取决于患者的免疫功能, 特别是细胞免疫功能, 树突状细胞在免疫功能调节中起关键性作用, DCs表面分子的表达, 辅助性CD4⁺ T细胞及CD4⁺/CD8⁺比例是反映机体细胞免疫功能的重要标志。

■同行评议者

陈治水, 主任医师, 解放军第211医院中医科; 靳雪源, 副主任医师, 解放军第302医院消化内科; 任浩, 副教授, 第二军医大学微生物学教研室

■ 研究前沿

替比夫定治疗CHB, 高HBeAg血清阴转或转换率, 在辅助性T细胞, CD4⁺, CD8⁺亚群及其分泌的特异性细胞因子或细胞因子特异性受体方面研究的屡见报道, 例如, CD38, PD-1, CD8⁺CD127, 而替比夫定强效抑制HBV复制, 特异性细胞因子的变化, 是通过什么信号途径调节细胞免疫功能, 从而提高HBeAg血清阴转或转换率, 可能是需要进一步研究的问题。

慢性乙型肝炎患者细胞免疫功能的影响与HBeAg阴转的相关性。

方法: 治疗组, 30例HBeAg阳性慢性乙型肝炎患者应用替比夫定抗病毒治疗48 wk, 30例健康体检者为对照组。在治疗前、治疗后12、24、48 wk, 对外周血DCs进行体外培养, 流式细胞仪检测分析DC表面分子及淋巴细胞亚群水平。

结果: 30例患者抗病毒治疗48 wk, 26例HBVDNA阴转(86.7% HBV DNA<500 copies/mL), 有8例发生HBeAg阴转(26.7%)。与治疗前比较, 治疗12 wk时DCs表面分子CD1a、CD40、CD83、CD86、MHC-D的表达无明显变化; 治疗24、48 wk时上调, 与治疗前相比较有显著性差异($P<0.05$), 但均低于健康对照组。淋巴细胞亚群12 wk时无明显变化; 治疗24、48 wk时, CD4⁺及CD4⁺/CD8⁺比值明显提高, 与治疗前比较有显著性差异($P<0.05$); CD3⁺T、CD8⁺T和CD19⁺B细胞未见明显改变。48 wk时, HBeAg阴转患者与HBeAg未阴转患者比较, DCs表面分子CD1a、CD40、CD86、MHC-DR的表达, CD4⁺水平及CD4⁺/CD8⁺比值均明显升高($P<0.01$)。

结论: 替比夫定抗病毒治疗慢性乙型肝炎患者细胞免疫功能增强, 提示替比夫定在抑制HBV DNA复制的同时, 可能通过调节DCs和淋巴细胞亚群的功能, 增强细胞免疫应答, 提高HBeAg阴转率。

关键词: HBeAg阳性慢性乙型肝炎; 替比夫定; 树突状细胞; 淋巴细胞亚群

朱斌, 张平, 禹萌, 王天宝, 毛乾国. 替比夫定对HBeAg+慢性乙型肝炎患者外周血树突状细胞及淋巴细胞亚群的影响. 世界华人消化杂志 2011; 19(24): 2577-2582

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/2577.asp>

0 引言

乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)是引起肝炎的始动因素, 由病毒感染所诱发的免疫损伤是慢性肝炎的主要发病机制, 有效的抑制或清除病毒是慢性乙型肝炎(chronic hepatitis B, CHB)病情稳定或治愈的关键。CHB的免疫机制复杂多样, 宿主的免疫耐受是肝炎慢性化的主要机制。树突状细胞(dendritic cells, DCs)是最强的抗原递呈细胞, 能激活T细胞, 诱导一系列免疫反应, 在免疫调节中起着关键性的作用^[1]。研

究表明^[2,3], CHB患者的外周血中DCs, T、B淋巴细胞表达或功能下降, 从而导致免疫功能受损, 病毒持续复制。替比夫定(telbivudine, LDT)是一种核苷类抗病毒药物, 能有效抑制HBV复制, 临床资料表明LDT抗病毒治疗, 能强效抑制HBV复制, 患者血清HBeAg阴转或血清转换率较其他核苷(酸)类药物高, 推测LDT除强效抑制HBV复制外, 可能具有免疫调节作用, 能上调患者的免疫功能, 提高患者的细胞免疫应答。但有关LDT如何调节患者的免疫功能方面的研究尚少, 本研究通过观察CHB患者应用LDT抗病毒治疗前后外周血DCs表型分子的表达及淋巴细胞亚群的变化, 探讨LDT治疗CHB较高HBeAg阴转或血清转换率的免疫机制。

1 材料和方法

1.1 材料 30例HBeAg阳性CHB患者选自我院2010-01/2011-01住院患者, 应用LDT抗病毒治疗, 作为实验组, 临床诊断标准均符合2005《慢性乙型肝炎防治指南》诊断标准^[4], 入组标准: (1)初治患者, 治疗前没有应用拉米夫定、阿德福韦酯、恩替卡韦及干扰素抗病毒治疗史, 年龄18-55岁; (2)HBsAg(+), HBeAg(+), HBcAb(+), 及HBV DNA $1.0 \times 10^5-7$; (3)ALT升高达正常值上限(ULN)2-5倍; (4)排除HCV、HIV、HDV感染, 均无心、脑、肾、或其他器官并发症。所有入选者均口服LDT 600 mg qd, 并予复方甘草酸制剂护肝治疗。治疗12 wk时检测肝功能、HBV DNA, 24 wk时检测肝功能、HBV DNA, 乙型肝炎五项。抗病毒治疗有效标准: (1)生化指标应答, ALT正常或明显改善; (2)病毒学应答: HBV DNA阴转或HBVDNA滴度下降 $\geq 2\log$ 。另以健康体检者30例为对照组。淋巴细胞分离液(Ficoll, 美国Mediatech产品), 重组人粒细胞巨噬细胞集落刺激因子(rhGM-CSF), 重组人肿瘤坏死因子(rhTNF- α)rhIL-4(PEPRO TECH公司产品), RPMI 1640和胎牛血清(FBS)购置Gibco公司。FITC标记的鼠抗人CD1a、PE标记的鼠抗人CD40、CD83、抗CD86 mAb, 均为Immuno-tech公司产品。FITC-CD45/PE-CD14(A液)、FITC IgG1/PE-IgG2a(B液)、FITC-CD3/PE-CD19(C液)、FITC-CD3/PE-CD4(D液)、FITC-CD3/PE-CD8(E液)、FITC-CD3/PE-CD16+ CD56(F液)双色免疫荧光试剂盒(美国BD公司), 仪器为美国BD公司FACS Calibur流式细胞仪。

1.2 方法

1.2.1 LDT抗病毒治疗前后生化指标、临床病毒学、免疫学指标的动态检测: 分别于抗病毒治疗后、12、24、48 wk检测ALT、乙型肝炎五项、HBV DNA, 12、24、48 wk进行外周血DCs培养和淋巴细胞亚群检测。

1.2.2 DCs的分离、纯化与扩增: 取研究对象抗凝外周血10 mL, 与等量的RPMI 1640液混匀, Ficoll密度梯度离心法分离单个核细胞(PBMC); 用含100 mL/L NCS的RPMI 1640液悬浮PBMC, 将分离的外周血单个核细胞在6孔板上贴壁, 每孔加2 mL, 3 h后吸去悬浮细胞, 并用37℃预温新鲜培养液轻轻洗去未贴壁的细胞, 加入I号营养液: 100 mL/L小牛血清RPMI 1640中含GM-CSF 50 μ g/L, IL-4 10 μ g/L, 在37℃, 50 mL/L CO₂孵箱中培养, 每日半量换液1次, 第3次换液用II号营养液: 100 mL/L小牛血清RPMI 1640中含GM-CSF 50 μ g/L, IL-4 10 μ g/L, TNF- α 20 μ g/L, 仍每日半量换液1次, 细胞培养至10 d左右收集。

1.2.3 树突状细胞的表型分析: 按试剂盒说明FITC标记的CD83、CD40、HLADR、CD86标记DC并用流式细胞仪分析DC的表型, 并拍摄细胞照片。

1.2.4 外周血淋巴细胞亚群的检测: 取研究对象外周血, 分别于A、B、C、D、E、F样品测定管中各加50 μ L抗凝血标本, 然后每管再分别加入A、B、C、D、E、F液20 μ L, 振荡混匀, 室温避光静置20 min, 加入2 mL溶血素, 振荡混匀, 室温避光放置10 min, 1 200 r/min离心5 min, 弃上清, 加入2 mL PBS, 1 200 r/min离心5 min弃上清, 加入400 μ L PBS, 混匀后上机检测, 以Simulset软件分析。

统计学处理 应用SPSS12.0统计软件, 采用单因素方差分析方法, 组间进行*t*检验比较。

2 结果

2.1 LDT抗病毒治疗后CHB患者临床指标变化 30例HBeAg阳性CHB患者应用LDT连续治疗后HBV DNA含量下降、ALT持续改善。治疗12 wk时, 18例CHB患者HBV DNA<500 copies/mL, 22例HBV DNA均下降 ≥ 2 log, ALT逐渐复常。24 wk时, 22例HBV DNA<500 copies/mL, 26例ALT恢复正常, 治疗48 wk时, 30例CHB患者ALT均正常, 26例HBV DNA<500 copies/mL, 其中8例HBeAg发生阴转。1例出现YIDD变异, 对LDT耐药, 2例出现一过性轻度肌酸激酶升高(CK)。

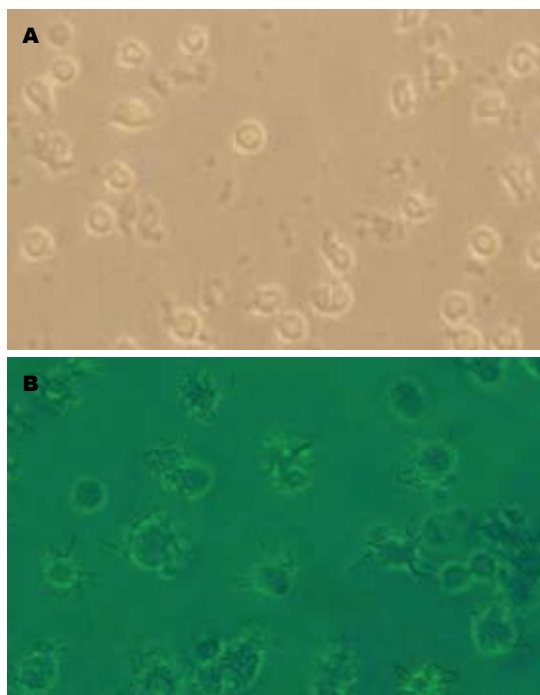


图1 LDT抗病毒治疗后CHB患者各时相DCs的形态及数量. A: 12wk DCs形态; B: 24、48 wk DCs形态

2.2 LDT抗病毒治疗后CHB患者各时相DCs的形态及数量 在倒置显微镜下观察, 与健康对照组比较, LDT抗病毒治疗12 wk时CHB患者DCs形态及数量变化不大, 治疗24和48 wk时, DCs绝大部分呈半悬浮生长, 胞体较大, 可见胞膜向外延伸出异样突起, 簇聚明显, 数量增加(图1)。

2.3 LDT抗病毒治疗前后CHB患者各时相DCs的表型变化 流式细胞仪分析发现, 抗病毒治疗24、48 wk时DCs表面分子CD1a、CD40、CD83、CD86和MHC-DR表达均较治疗前明显提高($P<0.05$), 但均低于健康对照组($P<0.05$), 二时相间比较差异有显著性($P<0.05$), 而治疗12 wk时DC表面分子表达无明显变化(表1)。

2.4 LDT抗病毒治疗前后CHB患者各时相淋巴细胞亚群变化 流式细胞仪检测表明, 抗病毒治疗12 wk时, CHB患者淋巴细胞亚群无明显变化; 治疗24和48 wk时, CD4⁺ T及CD4⁺/CD8⁺ T比值较治疗前显著提高($P<0.05$), NK细胞比例与治疗前比较差异无显著性($P>0.05$), CD3⁺ T、CD8⁺ T和CD19⁺ B细胞未见明显改变(表2)。

2.5 LDT抗病毒治疗48 wk后, HBeAg阴转CHB患者树突状细胞及淋巴细胞亚群的变化 与HBeAg未阴转CHB患者比较, DCs表面分子CD1a、CD40、CD86和MHC-DR表达均明显提高($P<0.01$), CD4⁺及CD4⁺/CD8⁺比值亦明显提高, 均有统计学差异($P<0.01$, 表3, 4)。

■ 相关报道

Tavakoli等研究CHB患者外周血DCs的表型与功能, DCs功能存在缺陷, 与HBV的持续感染有关, 我们的研究结果与其一致, 吕国才等研究显示, LDT抗病毒治疗CHB患者, 高基线ALT水平, 与高HBeAg阴转或血清学转换密切相关; 记忆性CD8T表面IL-7受体 α (CD127)分子表达水平与血清HBV DNA和HBeAg水平有明显负相关性。Evans等研究, 程序性死亡因子(PD-1)影响CHB患者HBeAg血清学转换, 是目前研究的一个热点。

■创新盘点

本文动态观察LDT抗病毒治疗CHB, 不同时相DCs表面分子的表达, CD4⁺水平及CD4⁺/CD8⁺比值的变化, 从细胞免疫功能的变化, 探讨高HBeAg血清转换的免疫基础。

表 1 L-DT抗病毒治疗CHB患者各时相DCs细胞表面分子表达水平 (mean ± SD)

分组	CD1a	CD40	CD83	CD86	MHC-DR
治疗组					
治疗前	21.4 ± 2.6	18.5 ± 3.1	27.3 ± 4.5	38.9 ± 3.7	39.3 ± 3.4
治疗					
12 wk	22.1 ± 2.2	16.9 ± 3.9	28.2 ± 3.4	40.6 ± 4.3	41.2 ± 2.7
24 wk	36.3 ± 5.1 ^{ac}	33.7 ± 2.4 ^{ac}	39.4 ± 4.1 ^{ac}	59.5 ± 3.5 ^{ac}	63.1 ± 4.2 ^{ac}
48 wk	39.1 ± 3.7 ^{ac}	34.8 ± 2.3 ^{ac}	41.4 ± 2.6 ^{ac}	60.3 ± 4.6 ^{ac}	65.5 ± 2.9 ^{ac}
对照组	60.7 ± 2.8	49.2 ± 3.3	56.6 ± 3.5	86.4 ± 2.9	78.6 ± 2.4

^a*P* < 0.05 vs 治疗前; ^c*P* < 0.05 vs 对照组。

表 2 L-DT抗病毒治疗CHB患者各时相淋巴细胞亚群表达水平 (mean ± SD)

分组	CD3 ⁺	CD4 ⁺	CD8 ⁺	CD19 ⁺	CD4 ⁺ /CD8 ⁺	NK
治疗组						
治疗前	65.7 ± 10.6	30.4 ± 5.2	26.3 ± 4.2	17.2 ± 6.7	1.16 ± 0.19	15.2 ± 4.7
治疗						
12 wk	64.2 ± 7.3	31.8 ± 6.1	26.6 ± 5.4	16.6 ± 5.9	1.19 ± 0.23	16.6 ± 3.9
24 wk	65.3 ± 6.1	34.9 ± 7.3 ^{ac}	25.8 ± 6.1	15.9 ± 4.6	1.35 ± 0.28 ^{ac}	17.3 ± 3.1
48 wk	66.4 ± 5.7	35.2 ± 4.7 ^{ac}	25.4 ± 3.6	15.7 ± 3.8	1.39 ± 0.33 ^{ac}	1.7 ± 4.2
对照组	61.6 ± 7.8	43.4 ± 7.2	23.3 ± 3.4	12.4 ± 3.6	1.86 ± 0.34	24.5 ± 2.6

^a*P* < 0.05 vs 治疗前; ^c*P* < 0.05 vs 对照组。

3 讨论

CHB的发病的免疫机制复杂多样, 宿主的免疫耐受是肝炎慢性化的主要机制。DCs是最强的抗原递呈细胞, 能激活T细胞, 诱导一系列免疫反应, 产生CTL, 清除病原体。研究表明, CHB患者由于HBV感染, 引起严重的CD8T细胞功能异常, 分泌低水平的抗病毒细胞因子, 损害细胞毒T淋巴细胞活性(CTL)^[5], 免疫功能受损, 外周血中DCs, T、B淋巴细胞表达或功能下降, 从而导致免疫功能受损, 病毒持续感染。本研究通过观察CHB患者应用LDT抗病毒治疗前后外周血DCs表型的表达及淋巴细胞亚群的动态变化, 观察到, LDT能强力抑制HBV复制, 很高的ALT复常率, 特别是有较高的HBeAg阴转率(26.7%), 高于文献报道拉米夫定抗病毒治疗CHB患者1年的HBeAg阴转率(16%)^[6]。

30例HBeAg⁺ CHB患者, LDT抗病毒治疗24和48 wk时DCs表面分子CD1a、CD40、CD83、CD86和MHC-DR表达均较治疗前明显提高(*P* < 0.05), 但均低于健康对照组(*P* < 0.05), 二时相间比较差异有显著性(*P* < 0.05), 治疗24和48 wk时, CD4⁺ T及CD4⁺/CD8⁺ T比值较治疗前显著提

高(*P* < 0.05), NK细胞比例与治疗前比较无统计学意义(*P* > 0.05), CD3⁺ T、CD8⁺ T和CD19⁺ B细胞未见明显改变, 治疗12 wk时, DC表面分子, CD4⁺ T及CD4⁺/CD8⁺ T比值与治疗前比较均无明显变化, 提示随着LDT抗病毒治疗时间的延长, 患者DCs表面分子的表达上调, CD4⁺ T水平及CD4⁺/CD8⁺ T比值升高, 患者的细胞免疫功能增强, HBeAg阴转CHB患者较未阴转患者, DCs表面分子的表达上调, CD4⁺ T水平及CD4⁺/CD8⁺比值升高更加明显, LDT通过强力抑制HBV的复制, 提高患者的细胞免疫功能, 这可能是LDT有较高HBeAg阴转率的原因之一。

DCs在免疫应答过程中发挥重要的作用, 研究表明, CHB患者外周血DCs的数量少于健康体检者, 并且DCs功能存在缺陷, 这可能与HBV的持续感染有关^[7,8]。DCs分为髓系和浆细胞系DCs, 不同来源及分化阶段的DCs在表面标志物及功能方面有很大的不同, 未成熟的DCs仅表达低水平的MHC分子、协同刺激分子(CD80、CD86)和黏附分子(CD40、CD44、体外激发混合淋巴细胞反应(mixed lymphocyte reaction, MLR)的能力较弱, 但具有极强的摄取和加工

表 3 LDT抗病毒治疗CHB, HBeAg未阴转患者DC表面分子及淋巴细胞亚群表达水平 (mean ± SD)

分组	HBeAg未阴转组					
	CD1a	CD40	CD86	MHC-DR	CD4 ⁺	CD4 ⁺ /CD8 ⁺
治疗组						
治疗前	21.4 ± 2.6	18.5 ± 3.1	38.9 ± 3.7	39.3 ± 3.4	30.4 ± 5.2	1.16 ± 0.19
治疗48 wk	36.2 ± 1.6 ^{ac}	32.1 ± 2.3 ^{ac}	50.8 ± 4.2 ^{ac}	61.4 ± 4.1 ^{ac}	33 ± 2.4 ^{ac}	1.28 ± 0.21 ^{ac}
对照组	61.6 ± 7.8	49.2 ± 3.3	86.4 ± 2.9	78.6 ± 2.4	43.4 ± 7.2	1.86 ± 0.34

^a*P*<0.05 vs 治疗前; ^c*P*<0.05 vs 对照组.

表 4 LDT抗病毒治疗CHB, HBeAg阴转患者DC表面分子及淋巴细胞亚群表达水平 (mean ± SD)

分组	HBeAg阴转组					
	CD1a	CD40	CD86	MHC-DR	CD4 ⁺	CD4 ⁺ /CD8 ⁺
治疗组						
治疗前	21.4 ± 2.6	18.5 ± 3.1	38.9 ± 3.7	39.3 ± 3.4	30.4 ± 5.2	1.16 ± 0.19
治疗48 wk	44.3 ± 3.8 ^c	39.7 ± 3.6 ^c	68.8 ± 7.2 ^c	71.7 ± 5.4 ^c	39.7 ± 3.5 ^c	1.56 ± 0.34 ^c
对照组	61.6 ± 7.8	49.2 ± 3.3	86.4 ± 2.9	78.6 ± 2.4	43.4 ± 7.2	1.86 ± 0.34

^a*P*<0.05 vs 治疗前; ^c*P*<0.05 vs 对照组.

处理抗原的能力. 在摄取抗原后或接受某些刺激因素(如LPS、IL-1 β 、TNF- α)后可以分化成熟. 成熟DCs表达高水平的MHC分子, 特征性标记(CD1a、CD11c、CD83)等, 并能分泌IL-12、IL-21、IL-26、TNF- α 等细胞因子, 同时激发MLR能力很强, 但抗原摄取能力大大下降. DCs在成熟过程中同时发生迁移, 由外周组织进入次级淋巴器官, 在CD40L的作用下, 分泌Th1型细胞因子, 有效地将抗原提呈给初始T细胞并使之激活, 促进细胞介导的免疫应答^[9,10].

HBeAg是HBV复制活跃的重要血清学指标, 在免疫基础上发生的HBeAg血清学阴转或转换是CHB病情好转或稳定的重要标志^[11]. LDT抗病毒治疗HBeAg阳性CHB有较高的HBeAg阴转或血清转化率, 其机制目前尚不明确, 但资料研究表明, 有多个指标可能与LDT抗病毒治疗CHB患者, 血清高HBeAg阴转或转换率密切相关, ALT升高是CHB患者免疫激活, 清除HBV引起免疫损伤所致. Lv等^[11]研究表明, LDT抗病毒治疗HBeAg阳性CHB, 高基线ALT水平可以预测高HBeAg血清转换, CHB患者外周血或肝脏内CD4⁺CD25调节性T细胞(Tregs)增多, 潘秀成等^[12]研究显示, LDT抗病毒治疗CHB过程中能降低外周血Tregs 比例, 解除Tregs对HBV特异性T淋巴细胞功能的抑制作用, 改善

特异性抗HBV免疫应答, 可能是LDT具有较高HBeAg血清阴转或转换率的原因, CHB患者, 记忆CD8TCD127分子表达下降, CD8TCD127分子表达水平上调与CD38和PD-1下调有密切相关性^[13,14]. CD8T细胞CD127分子表达水平与血清HBV DNA和HBeAg水平有明显负相关性, 有效的抗病毒治疗可以提高CD8T细胞CD127分子的表达, 同时也可以增加HBV特异性CD8T细胞水平^[15]. 其机制可能与LDT抗病毒治疗后, 患者免疫功能, 特别是细胞免疫功能增强有关. 替比夫定能强力抑制HBV复制, 外周血CDs表面分子的表达明显提高, Th1辅助T细胞功能上调, CD4⁺/CD8⁺ T比例提高, 这可能与LDT抗病毒治疗CHB, 高HBeAg血清学转换免疫基础, 对于LDT治疗HBeAg阴性CHB患者, 外周血DCs及淋巴细胞亚群的变化有待于今后进一步研究.

4 参考文献

- 1 Banachereau J, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S, Liu YJ, Pulendran B, Palucka K. Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 2000; 18: 767-811
- 2 Beckebaum S, Cicinnati VR, Dworacki G, Müller-Berghaus J, Stolz D, Harnaha J, Whiteside TL, Thomson AW, Lu L, Fung JJ, Bonham CA. Reduction in the circulating pDC1/pDC2 ratio and impaired function of ex vivo-generated DC1 in chronic hepatitis B infection. *Clin Immunol* 2002;

■应用要点

在临床实践中, 通过检测CHB患者CDs表面分子的表达或T细胞亚群变化, 预测LDT抗病毒治疗CHB患者的HBeAg血清转换, 判断LDT抗病毒疗效.

■同行评价

本文探讨了乙型肝炎患者应用替比夫定(LDT)抗病毒治疗前后外周血树突状细胞及淋巴细胞亚群变化,寻求高HBeAg血清转换的原因,为替比夫定的作用机制提供了新的线索,对HBV的临床治疗具有重要的参考价值。

- 104: 138-150
- 3 van der Molen RG, Sprengers D, Biesta PJ, Kusters JG, Janssen HL. Favorable effect of adefovir on the number and functionality of myeloid dendritic cells of patients with chronic HBV. *Hepatology* 2006; 44: 907-914
- 4 中华医学会肝病学会, 感染病学分会. 慢性乙型肝炎防治指南. 中华肝脏病杂志 2005; 12: 881-891
- 5 Bertolotti A, Maini M, Williams R. Role of hepatitis B virus specific cytotoxic T cells in liver damage and viral control. *Antiviral Res* 2003; 60: 61-66
- 6 Lok AS, Lai CL, Leung N, Yao GB, Cui ZY, Schiff ER, Dienstag JL, Heathcote EJ, Little NR, Griffiths DA, Gardner SD, Castiglia M. Long-term safety of lamivudine treatment in patients with chronic hepatitis B. *Gastroenterology* 2003; 125: 1714-1722
- 7 Tavakoli S, Mederacke I, Herzog-Hauff S, Glebe D, Grün S, Strand D, Urban S, Gehring A, Galle PR, Böcher WO. Peripheral blood dendritic cells are phenotypically and functionally intact in chronic hepatitis B virus (HBV) infection. *Clin Exp Immunol* 2008; 151: 61-70
- 8 Op den Brouw ML, Binda RS, van Roosmalen MH, Protzer U, Janssen HL, van der Molen RG, Woltman AM. Hepatitis B virus surface antigen impairs myeloid dendritic cell function: a possible immune escape mechanism of hepatitis B virus. *Immunology* 2009; 126: 280-289
- 9 Kadowaki N, Ho S, Antonenko S, Malefyt RW, Kastelein RA, Bazan F, Liu YJ. Subsets of human dendritic cell precursors express different toll-like receptors and respond to different microbial antigens. *J Exp Med* 2001; 194: 863-869
- 10 Dudziak D, Kamphorst AO, Heidkamp GF, Buchholz VR, Trumpfheller C, Yamazaki S, Cheong C, Liu K, Lee HW, Park CG, Steinman RM, Nussenzweig MC. Differential antigen processing by dendritic cell subsets in vivo. *Science* 2007; 315: 107-111
- 11 Lv GC, Ma WJ, Ying LJ, Jin X, Zheng L, Yang YD. Efficacy of telbivudine in HBeAg-positive chronic hepatitis B patients with high baseline ALT levels. *World J Gastroenterol* 2010; 16: 4095-4099
- 12 潘修成, 杨帆, 陈明, 傅涓涓, 郭忠胜, 张言超, 孙莉莉. 替比夫定对慢性乙型肝炎患者外周血CD4 CD25调节性T细胞动态变化的影响及临床意义. 中华肝脏病杂志 2008; 16: 885-888
- 13 Boettler T, Panther E, Bengsch B, Nazarova N, Spangenberg HC, Blum HE, Thimme R. Expression of the interleukin-7 receptor alpha chain (CD127) on virus-specific CD8+ T cells identifies functionally and phenotypically defined memory T cells during acute resolving hepatitis B virus infection. *J Virol* 2006; 80: 3532-3540
- 14 Evans A, Riva A, Cooksley H, Phillips S, Puranik S, Nathwani A, Brett S, Chokshi S, Naoumov NV. Programmed death 1 expression during antiviral treatment of chronic hepatitis B: Impact of hepatitis B e-antigen seroconversion. *Hepatology* 2008; 48: 759-769
- 15 Lv G, Ying L, Ma WJ, Jin X, Zheng L, Li L, Yang Y. Dynamic analysis of CD127 expression on memory CD8 T cells from patients with chronic hepatitis B during telbivudine treatment. *Virol J* 2010; 7: 207

编辑 何基才 电编 何基才

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

• 消息 •

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

本刊讯 《中文核心期刊要目总览》(2008年版)采用了被索量、被摘量、被引量、他引量、被摘率、影响因子、获国家奖或被国内外重要检索工具收录、基金论文比、Web下载量等9个评价指标, 选作评价指标统计源的数据库及文摘刊物达80余种, 统计文献量达32400余万篇次(2003-2005年), 涉及期刊12400余种. 本版还加大了专家评审力度, 5500多位学科专家参加了核心期刊评审工作. 经过定量评价和定性评审, 从我国正在出版的中文期刊中评选出1980余种核心期刊, 分属七大编73个学科类目. 《世界华人消化杂志》入选本版核心期刊库(见R5内科学类核心期刊表, 第66页). (编辑部主任: 李军亮 2010-01-08)

内镜超声引导下经胃穿刺置管引流治疗胰腺假性囊肿36例

戴其利, 秦鸣放, 王震宇, 王庆, 勾承月, 李宁, 赵宏志, 郑明伟

戴其利, 天津医科大学 天津市 300070
秦鸣放, 王震宇, 王庆, 勾承月, 李宁, 赵宏志, 郑明伟, 天津市南开医院微创外科中心 天津市 300100
作者贡献分布: 戴其利、秦鸣放及王震宇对此文所作贡献均等; 此研究由戴其利、秦鸣放及王震宇设计; 研究过程由秦鸣放、王震宇、王庆、勾承月、李宁、赵宏志、郑明伟及戴其利操作完成; 数据分析由戴其利完成; 本文写作由戴其利、秦鸣放及王震宇完成。
通讯作者: 秦鸣放, 主任医师, 300100, 天津市南开区南开三纬路122号, 天津市南开医院微创外科中心. dqly2008@126.com
收稿日期: 2011-06-02 修回日期: 2011-08-20
接受日期: 2011-08-26 在线出版日期: 2011-08-28

Endoscopic ultrasound-guided transgastric drainage of pancreatic pseudocysts: an analysis of 36 cases

Qi-Li Dai, Ming-Fang Qin, Zhen-Yu Wang, Qing Wang, Cheng-Yue Gou, Ning Li, Hong-Zhi Zhao, Ming-Wei Zheng

Qi-Li Dai, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China
Ming-Fang Qin, Zhen-Yu Wang, Qing Wang, Cheng-Yue Gou, Ning Li, Hong-Zhi Zhao, Ming-Wei Zheng, Minimally Invasive Surgical Centre, Tianjin Nankai Hospital, Tianjin 300100, China
Correspondence to: Professor Ming-Fang Qin, Minimally Invasive Surgical Centre, Tianjin Nankai Hospital, 122 Nankai Sanwei Road, Nankai District, Tianjin 300100, China. dqly2008@126.com
Received: 2011-06-02 Revised: 2011-08-20
Accepted: 2011-08-26 Published online: 2011-08-28

Abstract

AIM: To assess the clinical value of endoscopic ultrasound (EUS)-guided transgastric drainage of pancreatic pseudocysts (PPs).

METHODS: The clinical data for 36 patients who underwent EUS-guided transgastric drainage of PPs at our center between February 2005 and May 2010 were retrospectively analyzed.

RESULTS: EUS-guided puncture of PPs and stent placement were successful in 34 patients, and the success rate was 94.4% (34/36). The rate of complications (infection and stent clogging or migration) was 17.6%. The mean operative time was 50 minutes (range, 40-65 min) and mean postoperative hospital stay was 4.7 d (range, 2-9

d). The mean time between stent implantation and removal was 6.9 mo (range, 4-11 mo). The mean follow-up period was 30 mo (range, 10-60 mo). Endoscopic cure rate was 97.1% (33/34). No recurrences occurred.

CONCLUSION: EUS-guided transgastric drainage is a safe, effective and minimally invasive therapeutic method for PPs.

Key Words: Pancreatic pseudocyst; Endoscopic ultrasound; Drainage; Stent

Dai QL, Qin MF, Wang ZY, Wang Q, Gou CY, Li N, Zhao HZ, Zheng MW. Endoscopic ultrasound-guided transgastric drainage of pancreatic pseudocysts: an analysis of 36 cases. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(24): 2583-2586

摘要

目的: 评价内镜超声(endoscopic ultrasound, EUS)胰腺假性囊肿经胃穿刺置管引流术的价值。

方法: 回顾性分析2005-02/2010-05于我院行EUS引导下经胃穿刺置管引流术的36例胰腺假性囊肿患者的临床资料。

结果: 本组36例患者中, 34例成功完成穿刺和置管, 成功率为94.4%(34/36)。并发症发生率17.6%(6/34), 分别为感染、支架堵塞与移位。平均手术时间为50(40-65) min。置入支架后平均住院时间为4.7(2-9) d。平均支架留存时间为6.9(4-11) mo。平均随访时间为30(10-60) mo。内镜治愈率为97.1%(33/34)。未见囊肿复发。

结论: EUS引导下经胃穿刺置管引流术是一种安全、有效、微创的治疗胰腺假性囊肿的方法。

关键词: 胰腺假性囊肿; 内镜超声; 引流; 支架

戴其利, 秦鸣放, 王震宇, 王庆, 勾承月, 李宁, 赵宏志, 郑明伟。
内镜超声引导下经胃穿刺置管引流治疗胰腺假性囊肿36例。世界华人消化杂志 2011; 19(24): 2583-2586
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/2583.asp>

■背景资料

胰腺假性囊肿是继发于急、慢性胰腺炎或胰腺损伤后的常见并发症, 为胰腺周围包裹性积液, 囊壁由纤维组织和炎性肉芽组织构成。多数可以自愈。其临床表现为腹痛、腹胀、胰腺外分泌功能不足等。随着囊肿的增大可引起各种并发症, 如囊肿破裂、感染、出血及压迫周围临近器官所致的梗阻等。当胰腺假性囊肿不断增大, 出现腹痛等状况或合并出血、感染等并发症时, 假性囊肿必须及时处理。

■同行评议者

薛东波, 教授, 哈尔滨医科大学附属第一医院微创胆道外科; 吴泰璜, 教授, 博士生导师, 主任医师, 山东省立医院肝胆外科

■研究前沿

胰腺假性囊肿的传统治疗方法包括外引流和内引流。先后经历了开腹手术引流、腹腔镜引流、内镜下引流的阶段。近年来技术逐渐趋于成熟,目前EUS引导下经胃穿刺置管引流术已成为治疗胰腺假性囊肿的主要方法之一。

■相关报道

与传统内镜囊肿引流术相比,借助EUS,可以准确确定囊壁与胃壁的距离,可以判断其间是否存在较大的血管、选择最佳穿刺点,可以清楚显示穿刺及置管的全过程,避免意外发生。

0 引言

胰腺假性囊肿(pancreatic pseudocyst, PPs)是急、慢性胰腺炎及胰腺损伤的常见并发症。内镜超声(endoscopic ultrasound, EUS)引导下经胃穿刺置管引流术是目前治疗胰腺假性囊肿的主要方法之一^[1]。本文回顾性分析2005-02/2010-05我中心36例行EUS引导下经胃穿刺置管引流术的胰腺假性囊肿患者的临床资料。

1 材料和方法

1.1 材料 本组男28例,女8例,年龄25-74(平均 41.7 ± 12.5)岁,体质量指数(body mass index, BMI)18-26(平均 22.12 ± 3.76) kg/m²。其中急性胰腺炎29例(80.6%),慢性胰腺炎5例(13.9%),创伤性胰腺炎2例(5.6%)。有上腹胀痛者25例,有恶心及呕吐者12例,黄疸2例。假性囊肿均已存在6 wk以上,囊肿壁已经成熟(囊肿已形成一定厚度的囊壁)。囊肿壁与胃壁之间的距离 ≤ 1 cm。囊肿直径6-26(平均 10.3 ± 4.1) cm;其中11例位于胰头部,25例位于胰体尾部。术前行肿瘤标志物、腹部彩超、CT等检查,明确诊断,除外胰腺囊腺瘤及囊腺癌。

1.2 方法

1.2.1 手术: 采用线阵扫描型EUS(富士能, EG-250US),插入胃腔后,利用EUS明确囊肿的大小、位置及囊肿与胃壁的距离及有无较大的血管,以选择合适的穿刺点, EUS引导下穿刺针穿刺胃壁,穿刺成功后,抽取囊液做化验,行造影检查确认囊肿无误,置入导丝,环形切开刀行柱状水囊扩张,扩张后经导丝置入“双猪尾形”硅胶支架,如果囊液黏稠或者存在感染时可以置入鼻囊肿引流管。

1.2.2 术后处理: 术后预防性使用抗生素、质子泵抑制剂等药物,严密观察临床症状、生命体征及血常规、尿淀粉酶变化等。患者术后24 h下床活动并进食流质,出院前、术后3 mo及6 mo分别复查腹部CT,以监测囊肿变化并决定移除支架时间。出院后定期随访。

1.2.3 疼痛评分: 对术后腹痛症状定期随访,采用国际通用的疼痛数字分级法(Numeric Rating Scale, NRS),对术前术后疼痛程度进行评分,疼痛评分在1-3分,为轻度疼痛;4-6分,为中度疼痛;7-10分,为重度疼痛。

统计学处理 数据用SPSS10.0软件进行计算机处理,使用 t -检验对比分析术前术后的NRS疼痛评分和BMI(以mean \pm SD表示)。 $P < 0.05$ 为有统

计学差异。

2 结果

所有的内镜治疗均由同一个内镜医师团队完成。36例患者中,34例穿刺和置管成功,2例因无法找到理想的穿刺点导致穿刺失败行外科手术治疗。34例患者共置入69个双猪尾支架与4个鼻囊肿引流管。其中23例置入2根双猪尾支架;5例置入1根双猪尾支架;2例置入3根双猪尾支架;4例置入鼻囊肿引流管并双猪尾支架,(其中2例为术中发现囊液黏稠而置入1根鼻囊肿引流管并1根双猪尾支架,生理盐水冲洗5 d后,以1根双猪尾支架替换鼻囊肿引流管,2例因为术后发现囊肿继发感染而置入1根鼻囊肿引流管并1根双猪尾支架,抗生素及生理盐水冲洗1 wk后,以1根双猪尾支架替换鼻囊肿引流管)。对囊液进行检测,28例淀粉酶值增高。

平均手术时间为50 min(40-65 min),置入支架后平均住院时间为4.7 d(2-9 d),平均支架留存时间为6.9 mo(4-11 mo)。成功率为94.4%(34/36),并发症发生率17.6%(6/34),平均随访时间为30 mo(10-60 mo)。2例发生支架堵塞(其中1例在术后4 mo出现腹痛,1例在术后6 mo复查发现囊肿比3 mo时增大,均再次行内镜发现支架堵塞并更换支架。2例发生支架移位,分别在术后2及3 mo出现腹痛,腹部CT发现支架移位,均再次行内镜更换支架)。1例因腹痛等症状缓解不明显且囊肿未见明显缩小,术后4 mo时行外科手术治疗。无出血、穿孔及胰瘘等严重并发症,无死亡病例。内镜治愈率为97.1%(33/34)。未见囊肿复发。支架移除后3 mo时的NRS疼痛评分和BMI较内镜治疗前明显改善(表1)。

3 讨论

胰腺假性囊肿是继发于急、慢性胰腺炎或胰腺损伤后的常见并发症^[2],为胰腺周围包裹性积液,囊壁由纤维组织和炎性肉芽组织构成。多数可以自愈^[3,4]。其临床表现为腹痛、腹胀、胰腺外分泌功能不足等。随着囊肿的增大可引起各种并发症,如囊肿破裂、感染、出血及压迫周围临近器官所致的梗阻等。当胰腺假性囊肿不断增大,出现腹痛等症状或合并出血、感染等并发症时,假性囊肿必须及时处理^[5,6]。近年来技术逐渐趋于成熟,目前EUS引导下经胃穿刺置管引流术已成为治疗胰腺假性囊肿的主要方法之一。EUS引导下胰腺假性囊肿经胃穿刺置管引流术

表 1 内镜治疗前和支架移除后3 mo时的NRS和BMI对比

	内镜治疗前	支架移除后3 mo	值	P值
NRS疼痛评分	5.70 ± 2.70	3.50 ± 1.80	1.000	0.000
BMI (kg/m ²)	22.12 ± 3.76	25.01 ± 3.39	3.279	0.002

的适应症为: 假性囊肿存在6 wk以上, 囊肿壁已经成熟(囊肿已形成一定厚度的囊壁), 囊肿壁与胃壁之间的距离≤1 cm.

与传统内镜囊肿引流术相比, 借助EUS, 可以准确确定囊壁与胃壁的距离, 可以判断其间是否存在较大的血管、选择最佳穿刺点, 可以清楚显示穿刺及置管的全过程, 避免意外发生^[7]. Varadarajulu等^[8]从一项前瞻性的非随机性研究中得出EUS引导下胰腺假性囊肿穿刺置管引流术的成功率要高于传统内镜引流术(100% vs 33%). 近年来, EUS引导下胰腺假性囊肿穿刺置管引流术已经被相当一部分医生当做治疗胰腺假性囊肿的首选方法. 在我们的研究中, 成功率为94.4%(34/36), 并发症发生率17.6%(6/34), 内镜治愈率为97.1%(33/34), 移除支架后未见囊肿复发, 与相关文献报道是相近的^[9,10]. 研究发现移除支架后的NRS疼痛评分较术前明显降低(3.5±1.8 vs 5.7±2.7, $P=0.0003$). 而且患者的营养状况明显改善. 移除支架后的BMI明显高于术前(25.01±3.39 vs 22.12±3.76, $P=0.0017$). 此治疗方法缓解了胰腺高压导致的疼痛和胰腺外分泌不良等症状^[11]. 因此, EUS引导下胰腺假性囊肿经胃穿刺置管引流术是一种微创、安全、有效的治疗方法.

该术式操作的要点是要在EUS引导下选择合适的穿刺点, 置入支架, 保证囊液通畅引流. 研究发现放置多个支架可以起到更好的引流效果, 防止支架阻塞. 根据囊液性质, 可行经胃支架与鼻囊肿引流管联合引流术, 经鼻囊肿引流管冲洗对存在感染或者黏稠囊液的囊肿具有良好效果. 但也有部分研究者对EUS引导下经胃穿刺置管引流术能否应用于感染性胰腺假性囊肿存在异议, 尤其是囊肿腔内有大量坏死组织时, 内镜能否彻底引流并且最终达到治愈是个关键问题^[12]. 近年来, 随着大孔道内镜超声的应用, 胰腺脓肿越来越多的通过内镜来治疗. Giovannini等^[13]在EUS引导下对18例感染性胰腺假性囊肿患者成功放置鼻囊肿引流管, 术后用抗生素冲洗囊腔, 7-10 d后拔管, CT复查发现胰腺脓肿

均明显缩小. 我们认为EUS引导下经胃穿刺置管引流术治疗感染性胰腺假性囊肿是安全、有效的, 但是本组病例较少, 仍需进一步总结临床资料.

在移除支架的时机上, Dohmotom等^[14]认为慢性胰腺炎所致假性囊肿, 多在3 mo的时候拔管. 如果为外伤性假性囊肿, 引流管需长期放置(半年以上), 以减少囊肿复发^[15]. Weckman等^[16]报道胃囊肿引流治疗的成功率达95.6%, 支架移除后复发率为4.8%, 因此他主张胃囊肿支架可不移除. 我们认为适当延长支架留存时间有助于降低胰腺假性囊肿的复发率. 移除支架时须具备以下条件: 囊肿完全消失, 支架留存时间不少于3 mo. 随访期间, 如果出现腹痛、发热等症状, 或复查CT发现囊肿减小不明显甚至增大, 应明确是否发生支架堵塞或移位, 及时更换支架, 必要时采取手术治疗^[11].

总之, 内镜超声引导下经胃穿刺置管引流术是一种安全、有效、微创的治疗胰腺假性囊肿的方法. 相信随着内镜超声技术的不断发展, 此方法将成为治疗胰腺假性囊肿的首选方法.

4 参考文献

- 1 Seewald S, Ang TL, Kida M, Teng KY, Soehendra N. EUS 2008 Working Group document: evaluation of EUS-guided drainage of pancreatic-fluid collections (with video). *Gastrointest Endosc* 2009; 69: S13-S21
- 2 Beekingham IJ, Krige JE, Bornman PC, Terblanche J. Endoscopic management of pancreatic pseudocysts. *Br J Surg* 1997; 84: 1638-1645
- 3 Warshaw AL, Rattner DW. Timing of surgical drainage for pancreatic pseudocyst. Clinical and chemical criteria. *Ann Surg* 1985; 202: 720-724
- 4 Mehta R, Suvana D, Sadasivan S, John A, Raj V, Nair P, Balakrishnan V. Natural course of asymptomatic pancreatic pseudocyst: a prospective study. *Indian J Gastroenterol* 2004; 23: 140-142
- 5 Will U, Wegener C, Graf KI, Wanzar I, Manger T, Meyer F. Differential treatment and early outcome in the interventional endoscopic management of pancreatic pseudocysts in 27 patients. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 4175-4178
- 6 Craig MH, Talton DS, Hauser CJ, Poole GV. Pancreatic injuries from blunt trauma. *Am Surg* 1995; 61: 125-128
- 7 Kitano M, Sakamoto H, Komaki T, Kudo M. Present status and future perspective of EUS-guided drainage. *Dig Endosc* 2009; 21 Suppl 1: S66-S70

■创新盘点

对感染性胰腺假性囊肿及移除支架等问题进行详细讨论, 提供了有价值的科学结论.

■应用要点

内镜超声引导下经胃穿刺置管引流术可改善患者腹痛、腹胀等症状, 提高患者的生存状态, 具有创伤小, 安全性高和疗效确切等优点, 相信随着内镜超声技术的不断发展, 此方法将成为治疗胰腺假性囊肿的首选方法, 具有广阔的应用前景.

■同行评议

本研究病例资料描述详尽, 结果充实可靠, 文章条理清晰, 分析得当, 科学性及可读性较强。

- 8 Varadarajulu S, Christein JD, Tamhane A, Drelichman ER, Wilcox CM. Prospective randomized trial comparing EUS and EGD for transmural drainage of pancreatic pseudocysts (with videos). *Gastrointest Endosc* 2008; 68: 1102-1111
- 9 Antillon MR, Shah RJ, Stiegmann G, Chen YK. Single-step EUS-guided transmural drainage of simple and complicated pancreatic pseudocysts. *Gastrointest Endosc* 2006; 63: 797-803
- 10 Ahn JY, Seo DW, Eum J, Song TJ, Moon SH, Park do H, Lee SS, Lee SK, Kim MH. Single-Step EUS-Guided Transmural Drainage of Pancreatic Pseudocysts: Analysis of Technical Feasibility, Efficacy, and Safety. *Gut Liver* 2010; 4: 524-529
- 11 郑明伟, 秦鸣放, 王庆, 勾承月, 李宁. 内镜在治疗慢性胰腺炎胰管结石中的应用. *中国中西医结合外科杂志* 2011; 17: 27
- 12 李兆申, 杨秀疆, 金震东, 苏军凯, 邹多武, 孙振兴, 麻树人. 内镜超声下胰腺假性囊肿经胃置管引流的临床研究. *中华消化内镜杂志* 2006; 23: 321-324
- 13 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
- 14 Dohmoto M, Akiyama K, Lioka Y. Endoscopic and endosonographic management of pancreatic pseudocyst: a long-term follow-up. *Rev Gastroenterol Peru* 2003; 23: 269-275
- 15 Zheng MW, Qin MF. Endoscopic ultrasound guided transgastric stenting for the treatment of traumatic pancreatic pseudocyst. *Hepatogastroenterol* 2011; 58 [Epub ahead of print]
- 16 Weckman L, Kylänpää ML, Puolakkainen P, Halttunen J. Endoscopic treatment of pancreatic pseudocysts. *Surg Endosc* 2006; 20: 603-607

编辑 曹丽鸥 电编 何基才

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

• 消息 •

《世界华人消化杂志》参考文献要求

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

益生菌制剂治疗轻微型肝性脑病的荟萃分析

汤绍辉, 王旷靖, 吴小娟, 张漫漫

汤绍辉, 王旷靖, 吴小娟, 张漫漫, 暨南大学附属第一医院消化内科 广东省广州市 510632

作者贡献分布: 汤绍辉与王旷靖对此文所作贡献均等; 此课题由汤绍辉与王旷靖设计; 研究过程由汤绍辉、王旷靖、吴小娟、张漫漫完成; 本论文写作由汤绍辉与王旷靖完成。

通讯作者: 汤绍辉, 医学博士, 副教授, 510632, 广东省广州市黄埔大道西601号, 暨南大学附属第一医院。

tangshaohui205@163.com

收稿日期: 2011-06-08 修回日期: 2011-08-23

接受日期: 2011-08-26 在线出版日期: 2011-08-28

Efficacy of probiotics in the treatment of minimal hepatic encephalopathy: a meta-analysis

Shao-Hui Tang, Kuang-Jing Wang, Xiao-Juan Wu, Man-Man Zhang

Shao-Hui Tang, Kuang-Jing Wang, Xiao-Juan Wu, Man-Man Zhang, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Jinan University, Guangzhou 510632, Guangdong Province, China

Correspondence to: Associate Professor Shao-Hui Tang, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Jinan University, 601 Huangpu West Avenue, Guangzhou 510632, Guangdong Province, China. tangshaohui205@163.com

Received: 2011-06-08 Revised: 2011-08-23

Accepted: 2011-08-26 Published online: 2011-08-28

Abstract

AIM: To evaluate the efficacy of probiotics in the treatment of minimal hepatic encephalopathy.

METHODS: PUBMED, EMBASE, Web of Science, The Cochrane Central Register of Controlled Trials, Chinese Journals Full-text Database, Chinese Biomedical Database and Wan Fang Digital Journal Full-text database were searched to retrieve randomized controlled trials evaluating the efficacy of probiotics in the treatment of minimal hepatic encephalopathy. Statistical analysis was performed using Review Manager 4.3.

RESULTS: Nine randomized controlled trials were included. Compared to the control group, probiotics significantly decreased serum ammonia (SMD = 0.98, 95%CI: 0.25-1.71, $P = 0.008$), endotoxin (SMD = 1.03, 95%CI: 0.65-1.42,

$P < 0.00001$) and ALT (WMD = 11.72, 95%CI: 5.57-17.88, $P = 0.0002$), shortened the time of number connection test (NCT) (WMD = 13.60, 95%CI: 1.53-25.66, $P = 0.03$), and reduced morbidity of clinical hepatic encephalopathy (RR = 0.15, 95%CI: 0.05-0.41, $P = 0.0002$).

CONCLUSION: Probiotics can significantly improve some clinical and biochemical parameters in patients with minimal hepatic encephalopathy, decrease the morbidity of clinical hepatic encephalopathy and may become a new choice for the treatment of minimal hepatic encephalopathy.

Key Words: Probiotics; Minimal hepatic encephalopathy; Meta-analysis

Tang SH, Wang KJ, Wu XJ, Zhang MM. Efficacy of probiotics in the treatment of minimal hepatic encephalopathy: a meta-analysis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(24): 2587-2592

摘要

目的: 评价益生菌制剂治疗轻微型肝性脑病(minimal hepatic encephalopathy, MHE)的疗效。

方法: 检索PubMed、EMBASE、Web of Science、The Cochrane Central Register of Controlled Trials、中国期刊全文数据库、中国科技期刊数据库(维普)、万方数字化期刊全文数据库等关于益生菌制剂治疗MHE的临床随机对照试验(RCT), 使用Cochrane图书馆提供的Review Manager 4.3软件对入选试验进行荟萃分析。

结果: 共9项试验满足纳入标准而入选本研究, 荟萃分析表明: 与对照组相比, 益生菌制剂可明显缩短数字连接试验(NCT)反应时间(WMD = 13.60, 95%CI: 1.53-25.66, $P = 0.03$), 有效降低血氨水平(SMD = 0.98, 95%CI: 0.25-1.71, $P = 0.008$), 减轻内毒素血症(SMD = 1.03, 95%CI: 0.65-1.42, $P < 0.00001$), 改善ALT水平(WMD = 11.72, 95%CI: 5.57-17.88, $P = 0.0002$), 并降低临床肝性脑病的发生率(RR =

■背景资料

轻微型肝性脑病(MHE)是肝硬化常见并发症, 易病情加重进展为临床肝性脑病, 死亡率较高。国外有报道显示肝硬化患者MHE的发病率为30%-84%, 国内曾峥等对409例肝硬化患者进行智力测验发现MHE的发病率达51.3%。MHE患者病情较隐蔽, 认知功能障碍, 操作应激能力减低, 存在较大的潜在社会隐患。

■同行评议者

郑鹏远, 教授, 主任医师, 郑州大学第二附属医院消化科; 金瑞, 主任医师, 教授, 北京佑安医院; 黄晓东, 副主任医师, 武汉市中心医院消化内科

■研究前沿

MHE的病因和发病机制目前尚不十分明确,主要有氨中毒、假性神经递质、血浆氨基酸失衡、GABA/苯二氮卓、神经毒物的协同等假说。治疗方面无特异性,临床应用的药物多样,主要有乳果糖、门冬氨酸鸟氨酸、谷氨酰胺、利福昔明等,但临床疗效不明显。

0.15, 95%CI: 0.05-0.41, $P = 0.0002$).

结论: 益生菌制剂可改善MHE患者临床及部分生化指标,降低MHE发展为临床肝性脑病的几率,有可能成为MHE治疗的新选择。

关键词: 益生菌; 轻微型肝性脑病; Meta分析

汤绍辉, 王旷靖, 吴小娟, 张漫漫. 益生菌制剂治疗轻微型肝性脑病的荟萃分析. 世界华人消化杂志 2011; 19(24): 2587-2592
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/2587.asp>

0 引言

轻微型肝性脑病(minimal hepatic encephalopathy, MHE)以前被称为隐性或亚临床型肝性脑病,是指无明显临床表现和生化异常,仅能用精细的智力试验和(或)电生理检测才可作出诊断的肝性脑病^[1]. MHE是肝硬化常见并发症,国外有报道显示肝硬化患者MHE的发病率为30%-84%^[2],国内曾峥等^[3]对409例肝硬化患者进行智力测验发现MHE的发病率达51.3%. MHE患者病情隐蔽性强,神经认知功能存在障碍,操作能力及应激能力减低,尤其对于从事高空作业或机械驾驶者,存在易发生意外的隐患^[4,5]. 因此早期诊断及治疗MHE具有重要意义,并受到国内外学者广泛重视. MHE的病因和发病机制目前尚不十分明确,迄今尚无一种治疗方法或药物对所有患者都有肯定的疗效. 近年来,一些学者开展了应用益生菌制剂进行治疗MHE的临床研究,但各自报道的疗效并不一致,且多数研究样本量较小. 为此,本文通过选择随机对照试验(randomized controlled trial, RCT)进行分析,探讨益生菌制剂对MHE的治疗价值,并为临床应用提供客观依据。

1 材料和方法

1.1 材料 中文检索词包括益生菌、轻微型肝性脑病、亚临床型肝性脑病、治疗,英文检索词包括 probiotics、minimal hepatic encephalopathy、subclinical hepatic encephalopathy、treatment. 采用计算机和手工相结合的方法检索PubMed、EMBase、Web of Science、The Cochrane Central Register of Controlled Trials、CNKI-中国期刊全文数据库、中国科技期刊数据库(维普)、万方数字化期刊全文数据库、中国生物医学文献数据库中于2011-02-28前已发表的关于益生菌制剂治疗轻微型肝性脑病的临床随机对照试验。

1.2 方法

1.2.1 纳入标准: 对所查得的文献进行二次选取,文献纳入标准: (1)公开发表的益生菌与安慰剂、空白对照治疗MHE的临床随机对照试验; (2)研究对象的诊断符合“轻微型肝性脑”或“亚临床型肝性脑病”. 文献排除标准: (1)文献综述; (2)非临床随机对照试验; (3)摘要等非全文文献; (4)重复发表的文献。

1.2.2 资料提取与文献质量评价: 由两名评价员分别单独操作计算机和手工检索,分别选择试验并提取资料,用统一表格记录所有研究的基本数据,包括研究的设计者、年份、国家、样本数、治疗方案、疗程、评价指标等. 纳入研究质量评价采用Jadad评分法^[6]: (1)作者叙述为随机法; (2)随机方法正确或(和)采用分配隐藏; (3)双盲; (4)描述盲法,指出对照和研究干预的不可辨别性; (5)全程随访并指出受试完成情况. 每点1分,总分 ≥ 3 分为高质量研究, ≤ 2 分为低质量研究. 如意见不一,双方讨论协商解决。

统计学处理 采用Cochrane协作网提供的Review Manager 4.3版软件进行统计分析. 连续性变量中采用相同标准计算的结局变量应用均差(mean difference, MD) 和均差标准误(standard error of mean difference, SEMD)对结局变量进行比较,对连续性变量中采用不同标准进行计算的结局变量应用标准均差(standard mean difference, SMD)进行结局变量比较; 对于二分类变量使用相对危险度(relative risk, RR). 两者均采用95%的可信区间(confidence interval, CI)表示, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义. 试验间的异质性采用统计量 I^2 进行检验,若试验结果无异质性选择固定效应模型,有异质性则用随机效应模型。

2 结果

2.1 入选文献基本资料 共检索到文献262篇,阅读文题、摘要甚至全文后,有9篇文献符合纳入标准而入选本研究,英文文献5篇,中文文献4篇. Jadad评分: 5分3篇, 4分1篇, 3分1篇, 2分4篇(表1). 共有429例患者,各组基础资料对比无差异,治疗组使用的益生菌制剂包括单一制剂及复合制剂,对照组使用安慰剂或空白对照. 疗效评价标准为血氨值,数字连接试验(number connection test, NCT), 内毒素血症, 肝功能ALT以及临床肝性脑病发生率等指标. 疗程为4-25 wk.

2.2 统计分析结果

2.2.1 益生菌组与对照组比较对MHE血氨的影响

表 1 纳入的临床试验基本情况及Jadad评分

研究者		受试人数	临床用药		Jadad评分			治疗时间(d)
			益生菌组	对照组	随机方法	盲法	总分	
Liu等 ^[7]	2004	20/15	Synbiotic	安慰剂	随机	双盲	4分	30
Lat等 ^[8]	2006	22/17	Escherichia coli Nissle	安慰剂	随机数字表	双盲	5分	84
刘建生等 ^[9]	2006	30/30	复合乳酸菌+Vit B	Vit B	随机	非双盲	2分	56
Mariano等 ^[10]	2007	30/30	Bifidobacterium+FOS	安慰剂	随机数字表	双盲	5分	90
张思泉等 ^[11]	2007	25/25	贝飞达+ 常规治疗	常规治疗	随机	非双盲	2分	56
Bajaj ^[12]	2008	14/06	Probiotic yogurt	安慰剂	随机数字表	双盲	5分	60
Sharma等 ^[13]	2008	30/31	Probiotics + Lactulose	Lactulose	随机数字表	非双盲	3分	28
刘晚珍 ^[14]	2009	20/20	美常安 + 常规治疗	常规治疗	随机	非双盲	2分	28
乔秀玲 ^[15]	2010	32/32	双歧三联活菌	Vit B	随机	非双盲	2分	175

Synbiotic: 4 freeze-dried non-urease-producing bacteria, *Pediococcus pentosaceus* 5-33:3, *Leuconostoc mesenteroides* 32-77:1, *Lactobacillus paracasei* subspecies *paracasei*19, *Lactobacillus plantarum* 2592; bioactive, + fermentable fibre (beta glucan, 2.5 g; inulin, 2.5 g; pectin, 2.5 g; resistant starch, 2.5 g); FOS: Fructo-Oligosaccharide; 贝飞达: 双歧杆菌、嗜酸乳杆菌、肠球菌; Probiotic yogurt: *S. thermophilus*, *L. bulgaricus*, *L. acidophilus*, *Bifidobacteria* and *L. casei*; Probiotics: a coagulated milk with *Lactobacillus bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus*; 美常安: 枯草杆菌、肠球菌活菌; 双歧三联活菌: 双歧杆菌、乳酸杆菌、嗜热链球菌活菌。

■ 相关报道

益生菌是指一组通过调节宿主肠道微生物群生态平衡而发挥生理作用的活菌制剂, 可直接补充人体正常生理菌, 调节肠道菌群平衡, 抑制肠道中的致病菌, 减少肠源性内毒素的产生, 合成机体所需的维生素, 激发机体免疫力, 从而有效维持肠道黏膜屏障, 减少细菌移位和内毒素产生, 以保护肝脏及神经系统, 减少肝性脑病的发生。基于上述理论, 目前国内外一些学者开展了应用益生菌制剂进行治疗MHE的临床研究, 但各自报道的疗效并不一致, 且多数研究样本量较小。

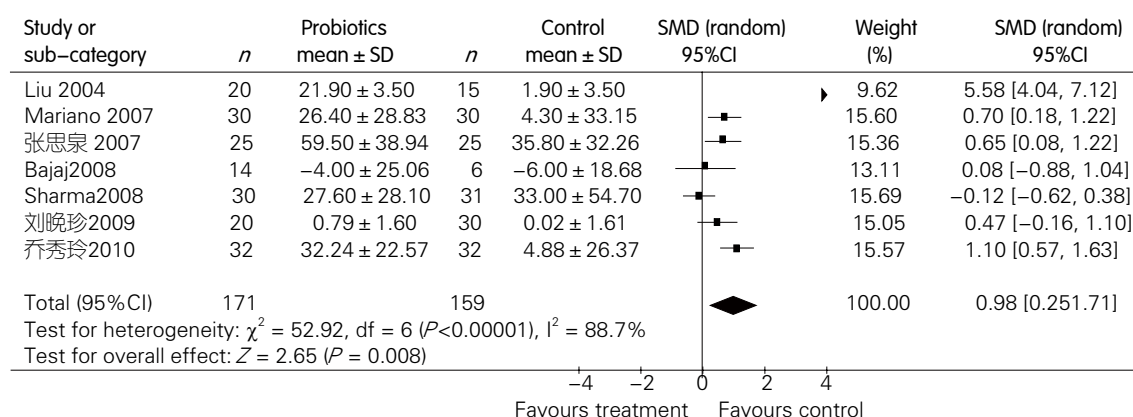


图 1 益生菌制剂组与对照组比较对轻微型肝性脑病血氨的影响。

响: 7项临床试验提供了益生菌组与对照组对MHE血氨影响的数据。各研究采用不同血氨检测方法 & 检测单位, 故采用SMD对血氨指标进行分析。对纳入的7项临床试验进行异质性检验, 结果显示各研究间存在异质性($I^2 = 88.7\%$, $P < 0.00001$), 于是采用随机效应模型合并效应量。Meta分析结果显示, 与对照组相比, 益生菌制剂可以明显降低MHE患者血氨水平($SMD = 0.98$, $95\%CI: 0.25-1.71$, $P = 0.008$, 图1)。

2.2.2 益生菌组与对照组比较对MHE NCT的影响: 对纳入的6项临床试验进行异质性检验, 结果显示各研究间存在异质性($I^2 = 87.1\%$, $P < 0.0001$), 于是采用随机效应模型合并效应量。Meta分析结果显示, 与对照组相比, 益生菌制剂

可以明显缩短MHE患者数字连接试验(NCT)反应时间($WMD = 13.60$, $95\%CI: 1.53-25.66$, $P = 0.03$, 图2)。

2.2.3 益生菌组与对照组比较对MHE内毒素血症的影响: 3项临床试验提供了益生菌组与对照组对MHE内毒素血症影响的数据。各研究采用不同内毒素血症检测单位, 故采用SMD对内毒素血症指标进行分析。对纳入的3项临床试验进行异质性检验, 结果显示各研究间无异质性($I^2 = 49.4\%$, $P = 0.14$), 于是采用固定效应模型合并效应量。Meta分析结果显示, 与对照组相比, 益生菌制剂可以有效降低MHE患者内毒素水平($SMD = 1.03$, $95\%CI: 0.65-1.42$, $P < 0.00001$, 图3)。

2.2.4 益生菌组与对照组比较对MHE ALT的影响

■创新盘点

本文通过全面检索国内外关于益生菌制剂治疗MHE的临床随机对照研究,运用循证医学Meta分析的方法,客观地评价益生菌制剂进行治疗MHE的疗效。研究方法得当,结果结论较可信,具有一定创新性,并反映了我国该领域研究的部分研究结果。

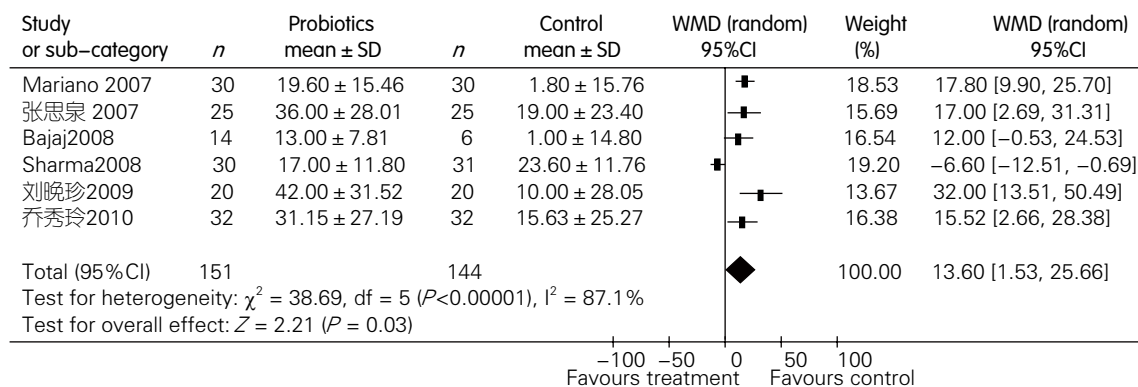


图2 益生菌制剂组与对照组比较对轻微肝性脑病NCT的影响。

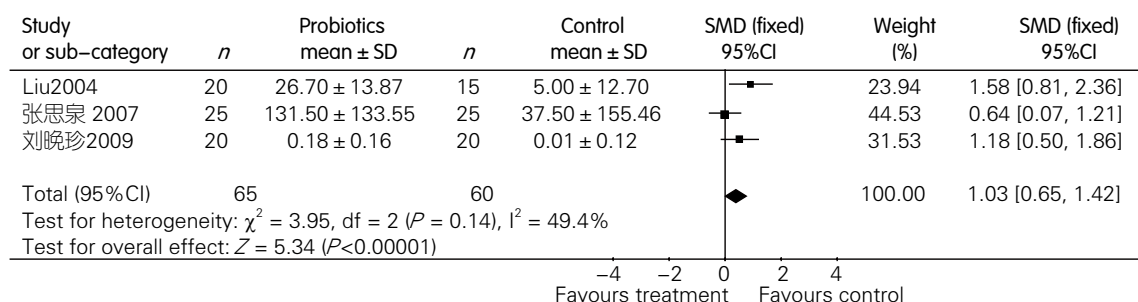


图3 益生菌制剂组与对照组比较对轻微肝性脑病内毒素血症的影响。

响:对纳入的3项临床试验进行异质性检验,结果显示各研究间无异质性($I^2 = 0\%$, $P = 0.51$),于是采用固定效应模型合并效应量。Meta分析结果显示,与对照组相比,益生菌制剂可以改善轻微肝性脑病患者ALT(WMD = 11.72, 95%CI: 5.57-17.88, $P = 0.0002$, 图4)。

2.2.5 益生菌组与对照组比较对临床肝性脑病发生率的影响:对纳入的4项临床试验进行异质性检验,结果显示各研究间无异质性($I^2 = 0\%$, $P = 0.96$),于是采用固定效应模型合并效应量。Meta分析结果显示,益生菌制剂组临床肝性脑病发生率明显低于对照组(RR = 0.15, 95%CI: 0.05-0.41, $P = 0.0002$, 图5)。

3 讨论

肝性脑病是一组连续的病症,根据其严重性分为不同的层次,而MHE是其中最轻微的一类。MHE的病因和发病机制较为复杂,至今尚未完全阐明,主要有氨中毒、假性神经递质、血浆氨基酸失衡、GABA/苯二氮卓、神经毒物的协同等假说,其中高氨血症是各种机制的共同通路^[16],肠源性物质引起的神经毒性作用观点已被普遍接受^[17]。此外有研究显示^[18],在肝硬化合并MHE患者中,小肠细菌过度生长的发生率明

显高于无MHE患者,提示MHE患者可能存在肠道菌群失调及功能紊乱。肝硬化时整个胃肠道瘀血水肿,蠕动减退,分泌失调,容易导致肠道菌群失调,有害细菌过度生长,使肠道内毒素产生增加,局部免疫功能下降;门体分流使肠道内毒素未经肝脏库否细胞的灭活作用直接进入体循环,导致血浆内毒素水平升高;肠道细菌过度繁殖使尿素酶产生增加,尿素酶分解尿素形成氨,使血氨升高^[19,20]。肠源性内毒素血症和血氨升高均是MHE发生的重要原因。

目前临床上治疗MHE常采取去除诱因为基础的综合作用,主要为减少肠道毒素的产生、吸收以及促进肝脏毒性物质代谢,应用的药物有乳果糖、门冬氨酸鸟氨酸、谷氨酰胺、利福昔明等,但临床疗效不明显。而益生菌是指一组通过调节宿主肠道微生物群生态平衡而发挥生理作用的活菌制剂,可直接补充人体正常生理菌,调节肠道菌群平衡,抑制肠道中的致病菌,减少肠源性内毒素的产生,合成机体所需的维生素,激发机体免疫力,从而有效维持肠道黏膜屏障,减少细菌移位和内毒素产生,以保护肝及神经系统,减少肝性脑病的发生^[21]。

近年来国内外一些学者开展了益生菌治疗MHE的临床研究,有些研究显示益生菌制剂可

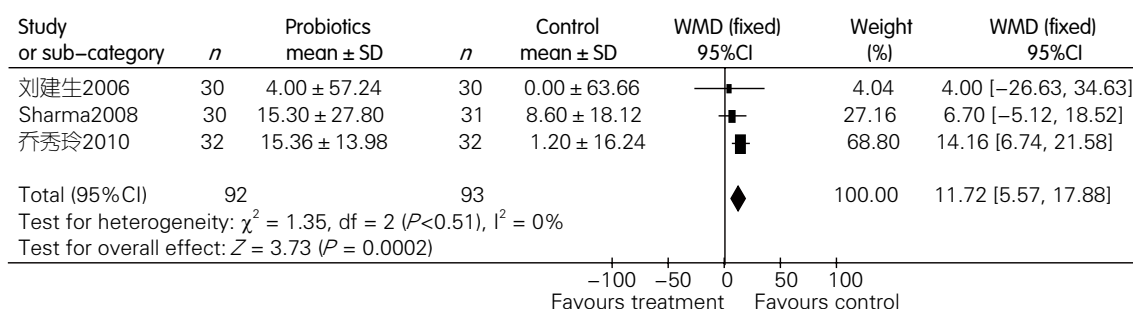


图 4 益生菌制剂组与对照组比较对轻微型肝性脑病ALT的影响.

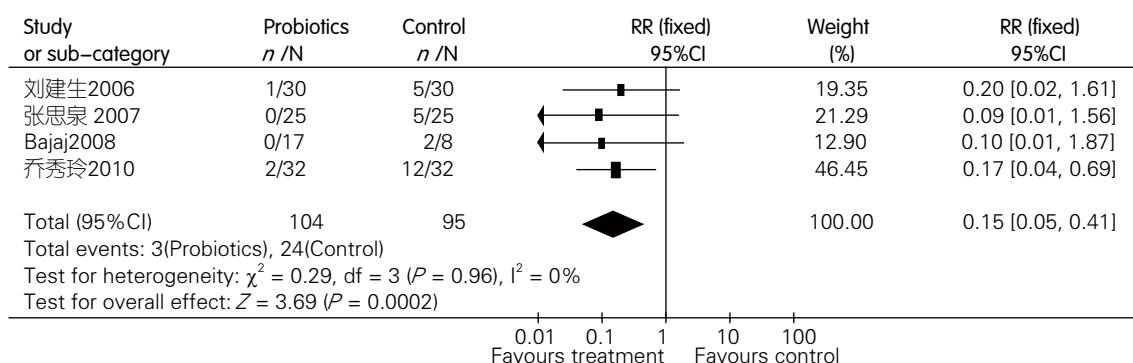


图 5 益生菌制剂组与对照组比较临床肝性脑病发生率的影响.

改善MHE患者血氨水平, 缩短智力测验时间; 但另外有研究认为, 益生菌对MHE的疗效与对照组无显著差异. 于是, Shukla等^[22]采用Meta分析评价了微生态制剂(益生菌、益生元、合生元)对MHE的治疗效果, 结果显示微生态制剂能有效改善MHE患者临床症状. 但该研究不仅纳入益生菌同时还包含益生元等文献, 亚组分析时反映益生菌疗效的文献较少(仅2个RCT). 鉴于此, 本文通过全面检索国内外关于益生菌制剂治疗MHE的临床随机对照研究, 以期更为客观地评价其疗效.

我们的结果显示, 与对照组相比, 益生菌制剂可以明显缩短MHE患者智力测验反应时间, 有效降低血氨水平, 减轻内毒素血症, 改善ALT水平并降低临床肝性脑病的发生率. 这些结果提示, 益生菌制剂可改善MHE患者临床及部分生化指标, 降低MHE发展为临床肝性脑病的几率, 有可能成为MHE治疗的新选择.

然而本研究也存在一些局限性: (1)目前临床研究资料有限, 能够纳入的随机对照试验及其样本数不够多; (2)纳入的文献中使用的益生菌制剂的剂型(单一或复合剂型)、菌株的种类、剂量、疗程等不尽相同, 而造成临床试验之间异质性; (3)纳入的文献的质量有待进一步

提高. 上述不足之处使本文结论的可靠性受到一定程度的影响, 期待有更多大规模、多中心随机双盲安慰剂对照临床试验以全面评价益生菌制剂治疗MHE的有效性与安全性, 为其临床应用取得可靠的循证医学证据.

4 参考文献

- 1 贾林. 建议将亚临床型肝性脑病更名为轻微型肝性脑病. 世界华人消化杂志 2004; 12: 432-433
- 2 Das A, Dhiman RK, Saraswat VA, Verma M, Naik SR. Prevalence and natural history of subclinical hepatic encephalopathy in cirrhosis. *J Gastroenterol Hepatol* 2001; 16: 531-535
- 3 曾峥, 李瑜元, 聂玉强. 亚临床肝性脑病的流行病学调查. 中华肝脏病杂志 2003; 11: 680-682
- 4 Bajaj JS. Minimal hepatic encephalopathy matters in daily life. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 3609-3615
- 5 Montgomery JY, Bajaj JS. Advances in the evaluation and management of minimal hepatic encephalopathy. *Curr Gastroenterol Rep* 2011; 13: 26-33
- 6 Jadad AR, Moore RA, Carroll D, Jenkinson C, Reynolds DJ, Gavaghan DJ, McQuay HJ. Assessing the quality of reports of randomized clinical trials: is blinding necessary? *Control Clin Trials* 1996; 17: 1-12
- 7 Liu Q, Duan ZP, Ha DK, Bengmark S, Kurtovic J, Riordan SM. Synbiotic modulation of gut flora: effect on minimal hepatic encephalopathy in patients with cirrhosis. *Hepatology* 2004; 39: 1441-1449
- 8 Lata J, Juránková J, Příbramská V, Fric P, Senkyřík M, Díte P, Kroupa R. [Effect of administration of *Escherichia coli* Nissle (Mutaflor) on intestinal colonisation, endo-toxemia, liver function and minimal

■应用要点

本次荟萃分析表明益生菌可明显缩短MHE患者数字连接试验反应时间, 有效降低血氨水平, 减轻内毒素血症, 改善ALT水平, 并降低临床肝性脑病的发生率, 可以作为临床治疗MHE药物的一种新选择.

■同行评价

本文内容较新颖, 结论客观, 对临床具有一定的指导意义。

- 9 刘建生, 田怡, 付极, 张晓红, 刘进, 林健. 益生菌治疗亚临床肝性脑病对其转归的影响及机制. 中国医师进修杂志 2006; 29: 12-14
- 10 Malaguarnera M, Greco F, Barone G, Gargante MP, Malaguarnera M, Toscano MA. Bifidobacterium longum with fructo-oligosaccharide (FOS) treatment in minimal hepatic encephalopathy: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Dig Dis Sci* 2007; 52: 3259-3265
- 11 张思泉, 刘翠雪, 叶荣夏, 叶卫江, 王先开. 肠道菌群的共生素调节对肝硬化患者亚临床肝性脑病影响. 医学研究杂志 2007; 36: 48-50
- 12 Bajaj JS, Saeian K, Christensen KM, Hafeezullah M, Varma RR, Franco J, Pleuss JA, Krakower G, Hoffmann RG, Binion DG. Probiotic yogurt for the treatment of minimal hepatic encephalopathy. *Am J Gastroenterol* 2008; 103: 1707-1715
- 13 Sharma P, Sharma BC, Puri V, Sarin SK. An open-label randomized controlled trial of lactulose and probiotics in the treatment of minimal hepatic encephalopathy. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2008; 20: 506-511
- 14 刘晚珍. 美常安对肝硬化内毒素血症及肝性脑病的作用. 中国厂矿医学 2009; 22: 296-297
- 15 乔秀玲. 双歧三联活菌治疗亚临床肝性脑病的临床研究. 临床消化病杂志 2010; 2: 105-106
- 16 王宇明, 晏泽辉. 肝性脑病诊断治疗新认识. 临床肝胆病杂志 2010; 26: 568-574
- 17 Riordan SM, Williams R. Gut flora and hepatic encephalopathy in patients with cirrhosis. *N Engl J Med* 2010; 362: 1140-1142
- 18 Gupta A, Dhiman RK, Kumari S, Rana S, Agarwal R, Duseja A, Chawla Y. Role of small intestinal bacterial overgrowth and delayed gastrointestinal transit time in cirrhotic patients with minimal hepatic encephalopathy. *J Hepatol* 2010; 53: 849-855
- 19 Moriwaki H, Shiraki M, Iwasa J, Terakura Y. Hepatic encephalopathy as a complication of liver cirrhosis: an Asian perspective. *J Gastroenterol Hepatol* 2010; 25: 858-863
- 20 Cesaro C, Tiso A, Del Prete A, Cariello R, Tuccillo C, Cotticelli G, Del Vecchio Blanco C, Loguercio C. Gut microbiota and probiotics in chronic liver diseases. *Dig Liver Dis* 2011; 43: 431-438
- 21 王宇明. 肝衰竭诊疗指南解读. 中华肝病杂志 2007; 15: 633-636
- 22 Shukla S, Shukla A, Mehboob S, Guha S. Meta-analysis: the effects of gut flora modulation using prebiotics, probiotics and synbiotics on minimal hepatic encephalopathy. *Aliment Pharmacol Ther* 2011; 33: 662-671

编辑 何基才 电编 何基才

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

• 消息 •

WJG 总被引频次排名位于第 174 名

本刊讯 *World Journal of Gastroenterology (WJG)* 被 Science Citation Index Expanded (SCIE) 和 MEDLINE 等国际重要检索系统收录, 在国际上享有较高声誉和影响力. *WJG* 在 PubMed Central (PMC) 统计, 单月独立 IP 地址访问 58 257 次, 全文网络版 (HTML Full Text) 下载 94 888 次, 全文 PDF 下载 59 694 次. 另外根据基本科学指标库 (essential science indicators) 统计, 2000-01-01/2010-12-31, SCIE 检索的临床医学 (clinical medicine) 期刊有 1 105 种, 总被引频次排名, *WJG* 位于第 174 名. (2011-05-14 马连生 董事长/总编辑)

内镜下切除结直肠高危腺瘤随访166例

张慧, 曹海龙, 王邦茂

张慧, 曹海龙, 王邦茂, 天津医科大学总医院消化科 天津市 300052

国家自然科学基金资助项目, No. 81070283

作者贡献分布: 张慧进行此课题的数据采集、统计分析、论文撰写; 王邦茂对此课题设计、内容审阅及修改; 曹海龙对此课题实施、总结、修改。

通讯作者: 王邦茂, 主任医师, 教授, 300052, 天津市和平区鞍山道154号, 天津医科大学总医院消化科. gi.tmuh@sohu.com

收稿日期: 2011-07-06 修回日期: 2011-08-03

接受日期: 2011-08-26 在线出版日期: 2011-08-28

A follow-up study of 166 cases of advanced colorectal adenomas after polypectomy

Hui Zhang, Hai-Long Cao, Bang-Mao Wang

Hui Zhang, Hai-Long Cao, Bang-Mao Wang, Department of Gastroenterology, Tianjin Medical University General Hospital, Tianjin 300052, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 81070283

Correspondence to: Professor Bang-Mao Wang, Department of Gastroenterology, Tianjin Medical University General Hospital, 154 Anshan Road, Heping District, Tianjin 300052, China. gi.tmuh@sohu.com

Received: 2011-07-06 Revised: 2011-08-03

Accepted: 2011-08-26 Published online: 2011-08-28

Abstract

AIM: To investigate the characteristics of recurrence of advanced colorectal adenomas after polypectomy.

METHODS: The clinical data for patients with advanced colorectal adenoma who underwent polypectomy from January 2004 to January 2009 were collected and reevaluated. The patients who had follow-up data were included in the study.

RESULTS: A total of 497 patients with diagnosed advanced colorectal adenoma were collected, and follow-up data were available in 166 patients. These patients ranged in age from 32 to 82 years (average, 61.64 ± 11.07 years), and 128 cases had an age of ≥ 55 years (128/166, 77.11%). Ninety-four (94/166, 56.63%) patients were males. The most common initial manifestations of advanced adenomas were hematochezia

(71/166, 46.38%) and lobular changes (75/166, 54.82%). The interval between polypectomy and first reexamination was 1-28 months. There were 102 (102/166, 61.45%) recurrences in all. Advanced colorectal adenomas in the left hemicolon more likely recurred in the left hemicolon, while those in the right hemicolon more likely recurred in the right hemicolon. No pathological differences were found between recurrent adenomas and original ones ($P > 0.05$). The hazard curve of Cox model suggested that the risk of recurrence increased gradually from 6 months after polypectomy.

CONCLUSION: Advanced colorectal adenomas may recur after polypectomy. No pathological differences were found between recurrent adenomas and original ones. Colonoscopy should be performed 6 mo after polypectomy for detection of possible recurrence.

Key Words: Advanced adenoma; Recurrence; Follow-up study

Zhang H, Cao HL, Wang BM. A follow-up study of 166 cases of advanced colorectal adenomas after polypectomy. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(24): 2593-2596

摘要

目的: 探讨结直肠高危腺瘤内镜下切除后的复发特点. 对今后高危腺瘤患者规范筛查和合理随访提出指导.

方法: 收集2004-01/2009-01发现结直肠高危腺瘤并经内镜下切除的患者详细临床资料. 对于腺瘤切除后继续在我院内镜随访的患者进行登记.

结果: 共收集结直肠高危腺瘤497例患者, 其中166例腺瘤切除后继续在我院行内镜随访. 随访的166例患者一般资料分布: 年龄32-82(平均 61.64 ± 11.07)岁, 其中年龄 ≥ 55 岁患者128例(128/166, 77.11%), 男性94例(94/166, 56.63%), 高危腺瘤以便血为首发症状的患者较多见(71/166, 46.38%), 且腺瘤表面易形成分叶(75/166, 54.82%). 首次复查时

■背景资料

结直肠腺瘤性息肉被公认为结直肠癌的癌前病变, 目前公认的腺瘤癌变的高危因素有息肉数目、大小、有无绒毛成分及高级别上皮内瘤变, 而具备以上一项或多项高危因素的高危腺瘤因其高恶变率逐渐引起人们的重视. 目前, 内镜下切除高危腺瘤为防治其癌变的有效方法, 但高危腺瘤切除后的复发特点如何日趋引起消化科医师的关注.

■同行评议者

陈光, 教授, 吉林大学第一医院

■研究前沿

高危腺瘤发病率较高,其复发特点为现如今研究的热点,应根据种族因素、各国国情、环境因素等制备可行的具体随访方案。

间为切除后1-28 mo,共102例患者(102/166, 61.45%)复发。高危腺瘤切除后的复发部位特点:初发于左半结肠的腺瘤易复发于左半结肠,初发于右半结肠的腺瘤易复发于右半结肠($r = 0.440, 0.387$, 均 $P < 0.01$),将高危腺瘤切除前后的病理表现进行比较未见明显相关性。Cox模型的风险量曲线图提示随着时间的延长,从6 mo开始患者息肉复发的风险逐渐增大。

结论:结直肠高危腺瘤切除后存在复发情况,复发前后病理类型无明显关联,为预防复发应在腺瘤切除后6 mo尽早复查。

关键词: 高危腺瘤; 复发; 随访研究

张慧, 曹海龙, 王邦茂. 内镜下切除结直肠高危腺瘤随访166例. 世界华人消化杂志 2011; 19(24): 2593-2596
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/2593.asp>

0 引言

结直肠息肉是一种常见病、多发病,依据病理表现可分为炎性息肉、腺瘤性息肉、增生性息肉和错构性瘤等,其中腺瘤性息肉被公认为结直肠癌的癌前病变。研究认为80%以上的结直肠癌由腺瘤发展而来,腺瘤切除可降低76%-90%的结直肠癌发病率^[1]。目前公认的腺瘤癌变的高危因素有息肉数目、大小、有无绒毛成分及高级别上皮内瘤变^[2]。腺瘤性息肉分为低危和高危腺瘤,其中高危腺瘤因其高恶变率逐渐引起人们的重视,本研究拟对初诊为高危腺瘤并行内镜下切除的患者进行随访,旨在探讨高危腺瘤的复发特点,对今后规范筛查和合理随访提出指导意义。

1 材料和方法

1.1 材料 收集2004-01/2009-01在我院消化内镜中心进行结肠镜检查发现结直肠高危腺瘤并经内镜下切除的患者详细资料。对一般人口学特征、内镜下表现、病理改变等有关变量特征的数据进行摘录、转换。两位评论员独立提取资料,如遇不一致,通过讨论协商解决。

1.2 方法

1.2.1 诊断标准: 2006年美国《结直肠息肉切除术后随访指南》指出高危腺瘤应具备以下条件之一:数目在3个或以上,腺瘤直径 ≥ 1 cm,绒毛状腺瘤或高级别上皮内瘤变。排除标准:除外家族性腺瘤性息肉病、炎症性肠病、结直肠癌病史、Peutz-Jeghers综合征及Cronkhite-Canada综

合征及腺瘤未能切除完全者等。

1.2.2 治疗: 选用德国爱尔博 ICC200型高频电发生器,常规肠道准备。0.5 cm以下息肉采用热活检钳烧灼,0.5-2.0 cm的息肉行高频电圈套加电凝,对于直径 > 2.0 cm以上的息肉,圈套器无法一次全部圈套者可分步摘除或按照ESD步骤进行切除。

统计学处理 对每例患者的临床、内镜及病理等有关变量特征的描述性流行病学资料数据采用Excel统计软件进行分类汇总分析。双变量相关性分析采用Spearman秩和检验。相关因素分析采用Cox回归模型。应用SPSS17.0统计软件包处理,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 结直肠高危腺瘤的一般特征 初次发现结直肠腺瘤患者共1 556例,其中高危腺瘤患者497例(497/1 556, 31.94%)。首次发现结直肠高危腺瘤并行内镜下切除且5年内行1次以上内镜随访患者共166例,年龄32-82(平均 61.64 ± 11.07)岁,首次复查时间1-28(平均 11.55 ± 7.35) mo,共102例患者复发(102/166, 61.45%)。随访的166例患者一般资料分布:男性94例(94/166, 56.63%),年龄 ≥ 55 岁患者128例(128/166, 77.11%),肠道息肉数目 ≥ 3 个的患者52例(52/166, 31.33%),息肉直径 ≥ 1 cm的患者87例(87/166, 46.39%),息肉表面有分叶者91例(91/166, 54.82%),息肉存在高级别上皮内瘤变者11例(11/166, 6.63%),临床症状以便血为主者77例(77/166, 46.38%),以腹痛为主者14例(14/166, 9.44%),其他症状75例(75/166, 45.18%)。

2.2 结直肠高危腺瘤复发部位特点 对102例高危腺瘤复发患者复查前后息肉发生部位进行双变量相关性分析,提示首次发现高危腺瘤患者经内镜下切除后其复发部位特点为:初发于左半结肠的腺瘤易复发于左半结肠,初发于右半结肠的腺瘤易复发于右半结肠($r = 0.440, 0.387$, 均 $P < 0.01$, 图1)。

2.3 结直肠高危腺瘤复发病理表现 102例切除后复查的患者术前病理表现为管状腺瘤31例(30.39%)、绒毛状腺瘤71例(69.61%),腺瘤切除后复查所得病理类型分别为管状腺瘤40例(39.22%)、绒毛状腺瘤45例(44.12%)、炎性息肉10例(9.80%)、增生性息肉2例(1.96%),癌变5例(4.90%),其中1例在原高危腺瘤生长部位癌变,5例癌变患者复查时间分布在12-36 mo。将高

■相关报道

美国及欧洲相关的指南建议低危腺瘤患者应在息肉切除后5-10年内行结肠镜复查,而高危腺瘤患者则应在3年内复查,一项对于我国南方人群的相关调查研究也推荐高危腺瘤患者3年内行结肠镜复查。而另一项研究认为结直肠腺瘤切除后1年内的随访复查最重要。

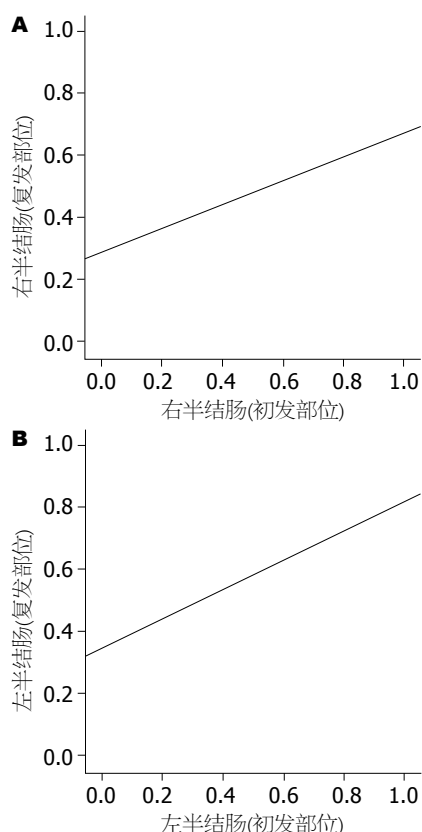


图1 高危腺瘤切除后复发前后部位的相关性. A: 右半结肠(初发部位); B: 左半结肠(初发部位).

危腺瘤切除前后的病理表现进行比较未见明显差异. 若同一患者一次检查结果中包含两种或两种以上病理类型, 取其较为严重的类型进行统计.

2.4 结直肠高危腺瘤切除后复发风险 本研究中166例患者高危腺瘤切除后均进行了1次以上结肠镜复查, 复查时间为术后1-60 mo, 用Cox回归模型对可能影响高危腺瘤切除后复发的性别、年龄、息肉数目、大小、有无分叶、病理表现等进行多因素分析, 可得到风险量曲线图(图2), 从术后6 mo开始随时间的延长, 息肉复发的风险逐渐增大.

3 讨论

高危腺瘤在50-75岁无症状人群中的发生率是9.6%, 内镜检查阴性的患者3年和5年后随访高危腺瘤发生率分别为0.9%和1.1%^[3]. 高危腺瘤因其高发生率及高恶变率逐渐引起人们的重视. 2006年美国《大肠息肉切除术后随访指南》对高危腺瘤进行了定义, 腺瘤大小、数目、有无绒毛组织及高级别上皮内瘤变为构成高危腺瘤的关键因素. 其中腺瘤的大小已在多项研究中列为研究对象, 但并不是体积大的腺瘤一定发

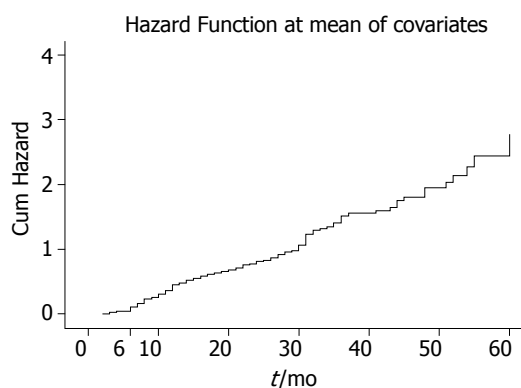


图2 高危腺瘤复发患者Cox模型的风险量曲线图.

展成肿瘤, 进展性结肠癌有时来源于小的管状腺瘤, 腺瘤的大小、绒毛组织及上皮异型程度是密切相关的, 高度异型增生更易发生在绒毛状及体积较大的腺瘤^[4]; 而Toll等^[5]的研究则发现直径大于10 mm且伴有高度异型增生的腺瘤切除后再发高度异型增生或肿瘤的概率很高. Lorenzo-Zúñiga等^[6]认为初发息肉直径较大的患者其息肉切除后更易再发高危腺瘤.

内镜下息肉切除术为防治高危腺瘤的首选方法, 其成功率高, Ahlawat等^[7]发现切除直径>20 mm的息肉术中发生出血和穿孔的概率仅为5%和2%. 有研究称结肠腺瘤随年龄增长其发生部位出现右移^[8], 对于高危腺瘤切除后复发位置国内外尚无相关报道, 本组资料发现初发于左半结肠的腺瘤易复发于左半结肠, 而初发于右半结肠的腺瘤易复发于右半结肠. 当然我们不能完全除外行结肠镜时有漏诊息肉的可能性, 毕竟由于肠道内含有较多皱襞这种解剖结构造成其病变的漏诊率较高, 有研究提出对于≥10 mm及<5 mm的腺瘤漏诊率分别为6%和27%^[9], 这提示内镜操作者行结肠镜时应严谨细致, 尽可能减少人为因素造成的病变漏诊.

高危腺瘤以便血为首发症状的患者较多见, 且腺瘤表面易形成分叶, 这就提示有便血症状的患者应及时就诊以免延误病情. 本研究中高危腺瘤复发患者病理表现主要为管状腺瘤、绒毛状腺瘤、炎性息肉、增生性息肉或癌变, 高危腺瘤复发前后的病理表现无明显差异. 结直肠高危腺瘤切除后, 复查时有5例患者发现癌变, 1例在原生长部位发现癌变, 原因可能为原高危腺瘤未切除完全或再发腺瘤发生癌变, 这也提示高危腺瘤切除后必须定期随访.

息肉切除后规律随访为预防息肉复发和癌变的有效方法, 尤其对于高癌变风险的人群尤为

■创新盘点

本研究对确诊为高危腺瘤并行内镜下切除的患者进行随访研究, 对患者的息肉复发部位、复发时间趋势、癌变情况等进行了详尽的研究.

■应用要点

本研究对初诊为高危腺瘤并行内镜下切除的患者进行随访, 旨在探讨高危腺瘤的复发特点, 对今后规范筛查和合理随访提出指导意义.

同行评价

本组研究结合临床实际, 随访设计先进合理, 所得结论客观, 对临床防治结直肠癌并降低其发生率有实际意义。

重要^[10]。有报道称腺瘤切除后3-4年内其复发率在15%-60%^[11], 本研究发现高危腺瘤切除后初次复查复发率为61.45%。美国及欧洲相关的指南建议低危腺瘤患者应在息肉切除后5-10年内行结肠镜复查, 而高危腺瘤患者则应在3年内复查^[12,13], 一项对于我国南方人群的相关调查研究也推荐高危腺瘤患者3年内行结肠镜复查^[14]。而另一项研究认为结直肠腺瘤切除后1年内的随访复查最重要^[15]。本组资料从Cox模型风险量曲线图我们可以看到, 高危腺瘤随时间延长(从6 mo开始)复发风险逐渐加大, 这提示高危腺瘤患者在息肉切除后6 mo宜尽早行结直肠镜复查, 早于国内外对于普通腺瘤所推荐的3年及1年复查间隔^[12,15], 其原因除了高危腺瘤更易复发外, 还可能受人种、地理位置、生活环境以及依从性等因素的影响。当然, 对于高危腺瘤切除术后患者定期复查结肠镜还需要考虑成本效益分析。

总之, 本研究对高危腺瘤切除后复发的患者进行了随访研究, 发现结直肠高危腺瘤切除后复发率较高, 对比复发前后病理未见明显关联, 建议高危腺瘤患者在息肉切除后6 mo尽早行结肠镜复查。此外, 仍有必要扩大样本且进行更深入的随访研究。

参考文献

- Winawer SJ, Zauber AG, Ho MN, O'Brien MJ, Gottlieb LS, Sternberg SS, Waye JD, Schapiro M, Bond JH, Panish JF. Prevention of colorectal cancer by colonoscopic polypectomy. The National Polyp Study Workgroup. *N Engl J Med* 1993; 329: 1977-1981
- Winawer SJ, Zauber AG, Fletcher RH, Stillman JS, O'Brien MJ, Levin B, Smith RA, Lieberman DA, Burt RW, Levin TR, Bond JH, Brooks D, Byers T, Hyman N, Kirk L, Thorson A, Simmang C, Johnson D, Rex DK. Guidelines for colonoscopy surveillance after polypectomy: a consensus update by the US Multi-Society Task Force on Colorectal Cancer and the American Cancer Society. *Gastroenterology* 2006; 130: 1872-1885
- Strum WB. Incidence of advanced adenomas of the rectosigmoid colon three years and five years after negative flexible sigmoidoscopy in 4010 patients. *Dig Dis Sci* 2003; 48: 2278-2283
- Terry MB, Neugut AI, Bostick RM, Sandler RS, Haile RW, Jacobson JS, Fenoglio-Preiser CM, Potter JD. Risk factors for advanced colorectal adenomas: a pooled analysis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2002; 11: 622-629
- Toll AD, Fabius D, Hyslop T, Pequignot E, Di-Marino AJ, Infantolino A, Palazzo JP. Prognostic significance of high-grade dysplasia in colorectal adenomas. *Colorectal Dis* 2011; 13: 370-373
- Lorenzo-Zúñiga V, Moreno de Vega V, Domènech E, Mañosa M, Cabré E, Planas R, Boix J. High-definition colonoscopy and risk factors for recurrence of advanced adenomas in patients with a personal history of polyps. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2011; 23: 425-430
- Ahlawat SK, Gupta N, Benjamin SB, Al-Kawas FH. Large colorectal polyps: endoscopic management and rate of malignancy: does size matter? *J Clin Gastroenterol* 2011; 45: 347-354
- Yamaji Y, Mitsushima T, Ikuma H, Watabe H, Okamoto M, Yoshida H, Kawabe T, Wada R, Omata M. Right-side shift of colorectal adenomas with aging. *Gastrointest Endosc* 2006; 63: 453-458; quiz 464
- Ratui N, Gelbmann C, Rath HR, Herfarth H, Kullmann F, Schölmerich J, Messmann H. Chromoendoscopy with indigo carmine in flexible sigmoidoscopy screening: does it improve the detection of adenomas in the distal colon and rectum? *J Gastrointest Liver Dis* 2007; 16: 153-156
- Saini SD, Schoenfeld P, Vijan S. Surveillance colonoscopy is cost-effective for patients with adenomas who are at high risk of colorectal cancer. *Gastroenterology* 2010; 138: 2292-2299, 2299.e1
- Martínez ME, Sampliner R, Marshall JR, Bhattacharyya AK, Reid ME, Alberts DS. Adenoma characteristics as risk factors for recurrence of advanced adenomas. *Gastroenterology* 2001; 120: 1077-1083
- Brooks DD, Winawer SJ, Rex DK, Zauber AG, Kahi CJ, Smith RA, Levin B, Wender R. Colonoscopy surveillance after polypectomy and colorectal cancer resection. *Am Fam Physician* 2008; 77: 995-1002
- Arditi C, Gonvers JJ, Burnand B, Minoli G, Oertli D, Lacaine F, Dubois RW, Vader JP, Schussel Fillettaz S, Peytremann-Bridevaux I, Pittet V, Juillerat P, Froehlich F. Appropriateness of colonoscopy in Europe (EPAGE II). Surveillance after polypectomy and after resection of colorectal cancer. *Endoscopy* 2009; 41: 209-217
- Huang Y, Gong W, Su B, Zhi F, Liu S, Bai Y, Jiang B. Recurrence and surveillance of colorectal adenoma after polypectomy in a southern Chinese population. *J Gastroenterol* 2010; 45: 838-845
- Gao QY, Chen HM, Sheng JQ, Zheng P, Yu CG, Jiang B, Fang JY. The first year follow-up after colorectal adenoma polypectomy is important: a multiple-center study in symptomatic hospital-based individuals in China. *Front Med China* 2010; 4: 436-442

编辑 李薇 电编 何基才

TNF- α 在结直肠癌患者血清中的水平及与瘦素及胰岛素抵抗的关系

沈名扬, 陈春生, 丛进春, 王俊江

沈名扬, 中国医科大学附属第四医院胃肠外科 辽宁省沈阳市 110032

陈春生, 丛进春, 中国医科大学附属盛京医院结直肠肿瘤肛
门病外科 辽宁省沈阳市 110004

王俊江, 辽宁中医药大学附属医院肛肠科 辽宁省沈阳市
110032

作者贡献分布: 此课题由沈名扬、李晓霞、陈春生设计; 研究过
程由沈名扬、王俊江及丛进春完成; 数据分析由沈名扬完成; 本
论文写作由沈名扬完成。

通讯作者: 李晓霞, 教授, 硕士生导师, 110032, 辽宁省沈阳市,
中国医科大学附属第四医院胃肠外科。

lx555999@yahoo.com.cn

收稿日期: 2011-03-24 修回日期: 2011-06-21

接受日期: 2011-08-23 在线出版日期: 2011-08-28

Correlation of serum TNF- α with serum leptin and insulin resistance in patients with colorectal cancer

Ming-Yang Shen, Chun-Sheng Chen, Jin-Chun Cong,
Jun-Jiang Wang

Ming-Yang Shen, Department of Gastric-Colorectal Tumor
Surgery, The Fourth Hospital of China Medical University,
Shenyang 110032, Liaoning Province, China

Chun-Sheng Chen, Jin-Chun Cong, Department of
Colorectal Tumor Surgery, Shengjing Hospital of China
Medical University, Shenyang 110004, Liaoning Province,
China

Jun-Jiang Wang, Department of Gastric-Colorectal Tumor
Surgery, Liaoning Chinese Medical University, Shenyang
110032, Liaoning Province, China

Correspondence to: Professor Xiao-Xia Li, Department
of Gastric-Colorectal Tumor Surgery, The Fourth Hospital
of China Medical University, Shenyang 110032, Liaoning
Province, China. lx555999@yahoo.com.cn

Received: 2011-03-24 Revised: 2011-06-21

Accepted: 2011-08-23 Published online: 2011-08-28

Abstract

AIM: To investigate the relationship of serum
TNF- α level with serum leptin and insulin resis-
tance in patients with colorectal carcinoma.

METHODS: ELISA was used to detect serum
levels of leptin and TNF- α in 100 patients with
colorectal carcinoma and 80 normal controls.
Fasting plasma glucose (FPG) and fasting serum
insulin (FIns) were measured to calculate the ho-

meostasis model assessment of insulin resistance
(HOMA-IR). The clinicopathological features
were also recorded and analyzed.

RESULTS: Serum TNF- α levels in patients with
colorectal carcinoma were significantly higher
than in normal controls (125.68 pg/L vs 53.57
pg/L, $P < 0.05$). There was a significant differ-
ence in serum TNF- α levels among patients with
tumors of different stages (TNM) ($P < 0.001$). A
significant correlation was noted among serum
leptin, serum TNF- α and HOMA-IR in patients
with colorectal carcinoma ($P < 0.001$).

CONCLUSION: Serum TNF- α levels in patients
with colorectal carcinoma were significantly
higher than in normal persons. Tumor stage is
associated with serum TNF- α levels in patients
with colorectal carcinoma. There is a significant
correlation among serum TNF- α , HOMA-IR and
serum leptin in patients with colorectal carci-
noma.

Key Words: Colorectal carcinoma; Leptin; Tumor
necrosis factor- α ; Homeostasis model assessment
of insulin resistance

Shen MY, Chen CS, Cong JC, Wang JJ. Correlation of
serum TNF- α with serum leptin and insulin resistance
in patients with colorectal cancer. *Shijie Huaren Xiaohua
Zazhi* 2011; 19(24): 2597-2601

摘要

目的: 探讨结直肠癌患者血清中TNF- α 水平与
瘦素表达和肿瘤临床表现型、胰岛素抵抗之
间的关系。

方法: 肿瘤组选择100名结直肠癌患者, 选择
80名健康成年人作为对照组。采用用双抗体夹
心ABC-ELISA法测定血清TNF- α 及瘦素水平。

结果: 肿瘤组血清TNF- α 水平为(125.68pg/L),
明显高于正常对照组(53.57pg/L) $P = 0.008$ 。
TNF- α 的表达与TNM分期相关, 随着临床分期
(TNM)增高而升高 $P < 0.001$ 。与组织学分级无

■背景资料

早在100多年前, 人们就发现糖耐
量异常与恶性肿
瘤有关。TNF- α 是
一种由巨噬细胞
和活化T淋巴细胞
产生的多功能细
胞因子。已经研究
被证实与肿瘤的
发生及演进相关。
近来发现TNF- α
在胰岛素抵抗代
谢综合症中也有
作用。

■同行评议者

刘宝林, 教授, 主
任医师, 中国医科
大学附属盛京医
院

■ 研究前沿

很多研究证实了TNF- α 与各种肿瘤的相关性。近来瘦素与各种肿瘤的相关性也成为研究热点。在胰岛素抵抗方面的研究也报道了TNF- α 及瘦素与胰岛素抵抗引起的代谢综合征有关。并且有人提出胰岛素抵抗结直肠癌假说,但对其具体作用机制尚不清楚。

明显关系($P = 0.13$)。血清TNF- α 水平与瘦素表达呈正相关($P = 0.11 < 0.05$),与HOMA-IR也呈明显正相关($P < 0.001$)。

结论: 结直肠癌患者的血清中的TNF- α 水平明显升高,并随着TNM分期的增加而升高,而与组织学分级无关。血清中TNF- α 的水平与瘦素表达及HOMA-IR明显相关。

关键词: 结直肠癌; 瘦素; 肿瘤坏死因子 α ; 胰岛素抵抗指数

沈名扬, 陈春生, 丛进春, 王俊江. TNF- α 在结直肠癌患者血清中的水平及与瘦素及胰岛素抵抗的关系. 世界华人消化杂志 2011; 19(24): 2597-2601

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/2597.asp>

0 引言

肥胖人群中的结直肠癌患病风险明显增加^[1],近期研究发现^[1,2],与肥胖密切相关的糖尿病及胰岛素抵抗均与结直肠癌的发病有关,Will在美国癌症预防中报告了糖尿病与直肠癌的关系,这是一个长时间大样本(100万人以上)的纵向流行病学研究^[3],结果采用比例危险分析,在调查年龄因素后患病密度比中度升高为1.45,显示胰岛素抵抗是一种独立的肿瘤危险因素。TNF- α 是由巨噬细胞和活化T细胞产生的一种功能细胞因子。文献报道, TNF- α 对肿瘤的作用具有双向性,一方面抑制某些肿瘤的生长,而另一方面他又可以促进癌转移^[4]。相关研究提示TNF- α 与胰岛素抵抗相关。另一种机制认为是与脂源性因子例如瘦素的促进生长作用有关^[5]。瘦素是一种脂源性激素。瘦素与体质量指数高度相关^[6,7],并参与食欲及代谢的调节^[8]。研究提示血清瘦素水平与胰岛素抵抗相关。瘦素与细胞增殖、血管生成以及凋亡抑制密切相关^[9-12]。已经有流行病学研究发现瘦素与乳腺癌^[13,14]和前列腺癌^[15,16]的高度相关,最近的研究显示瘦素与结直肠癌有密切关系^[17]。本实验应用酶联免疫方法测定结直肠癌肿瘤患者血清中的瘦素及肿瘤坏死因子TNF- α 水平,通过研究血清瘦素浓度及肿瘤坏死因子水平与结直肠癌各种临床病理改变,胰岛素抵抗的相关性探讨肿瘤坏死因子,瘦素及胰岛素抵抗与结直肠癌发生发展关系。

1 材料和方法

1.1 材料 实验所用的标本均来自中国医科大学附属盛京医院,所有病历资料及标本采集均经

表 1 研究对象的基本情况

	肿瘤组	对照组
性别n(%)		
男	60(60)	40(50)
女	40(40)	40(50)
年龄(mean \pm SD)	66.4 \pm 18.7	55.3 \pm 21.4
II型糖尿病n(%)	15(15)	0(0)

表 2 肿瘤组与对照组TNF- α 水平

性别	肿瘤组	对照组	P值
男	130.60(99.33-161.87)	37.53(26.29-48.77)	<0.001
女	118.32(96.58-140.06)	55.58(40.22-70.94)	<0.001
合计	125.68(98.35-153.01)	53.57(39.42-67.22)	0.008
P值	0.24	0.07	

患者知情同意,并经过院伦理委员会批准。肿瘤组为100例于结直肠肿瘤病房住院结直肠癌患者,对照组选择80名健康体检者(表1)。所有的血清采自术前清晨空腹时,所有试验组患者均未接受过化疗、放疗或其他针对肿瘤的手术治疗,所有的肿瘤标本均为手术中的新鲜标本,采取后放置入液氮罐中,后转入-80℃冰箱保存。

1.2 方法

1.2.1 TNF- α 和瘦素的检测: 分别应用美国R&P公司的人TNF- α 和人瘦素酶联免疫试剂。TNF- α 的测定敏感度为0.18 μ g/L,批内CV<6%。瘦素测定为7.8 ng/L,批内CV<5%。

1.2.2 胰岛素抵抗的检测: 胰岛素抵抗应用(英文全称)HOMA稳态模型评估, (HOMA-IR = FPG \times FIns/22.5, FPG: 空腹胰岛素; FIns: 空腹血糖)。

1.2.3 结果判定瘦素及TNF- α 测定: (1)所有A值都应减去空白值后计算; (2)以标准品8 000、4 000、2 000、1 000、500、250、0、ng/L之A值在半对数轴纸上作图,画标准曲线。浓度作为X轴(对数轴),A值为Y轴。曲线为一光滑曲线; (3)根据样品A值在该曲线图上查出相应人瘦素及TNF- α 含量。

统计学处理 应用SPSS(16.0版)软件,对各个不同距离资料进行t检验及回归性分析 $\alpha = 0.05$ (双侧)进行统计检验, $P < 0.05$ 被认为有统计学意义。

2 结果

结直肠癌患者的血清TNF- α 水平高与对照组,抛开性别差异实验组血清TNF- α 水平高与对照

表 3 肿瘤组不同TNM分期及组织学分级之间的血清TNF- α 水平差异

	<i>n</i> (%)	TNF- α (pg/L)	95%CI	<i>P</i> 值
肿瘤TNM分期				
I 期	15(15)	90.55	84.53–96.58	<0.05
II 期	41(41)	104.73	98.26–111.21	
III 期	29(29)	144.40	127.48–161.47	
IV 期	15(15)	181.70	153.30–210.13	
组织学分级				
高分化	17(17)	108.49	91.60–125.38	0.13
中分化	57(57)	125.50	114.51–136.48	
低分化	26(26)	136.80	114.02–159.74	

组<0.05. 无论肿瘤组及对照组男女之间TNF- α 水平没有统计学差异(肿瘤组 $P=0.24$, 对照组 $P=0.07$, 表2). TNF- α 水平随着临床分期的增高升高($P<0.05$), 各病理组织分级之间(分化程度)没有统计学差异($P>0.05$, 表3). 结直肠癌患者的血清TNF- α , 血清瘦素水平及HOMA-IR均高于对照组(表4). 血清瘦素水平与胰岛素抵抗HOMA-IR的相关性研究结果显示, 血清TNF- α 水平与胰岛素抵抗HOMA-IR呈正相关性, 回归系数为0.42($P<0.001$). 血清瘦素水平与TNF- α 水平呈正相关, 回归系数为0.31($P<0.001$).

3 讨论

流行病学调查数据已经提示肥胖是结直肠癌的高危因素^[18,19], 前瞻性、流行病学的队列和病例对照也提供了关于糖尿病(主要是2型糖尿病)有增加肿瘤的危险性的可靠证据. Mckeown等^[20,21]也发现胰岛素抵抗与结直肠癌相关. 最近的研究表明, 与肥胖关系密切的瘦素与结直肠癌的发生和演化也有关. 瘦素与乳腺癌的研究中发现, 瘦素可以通过自分泌和旁分泌机制来影响肿瘤细胞^[22-24]. TNF- α 是由巨噬细胞和活化T淋巴细胞产生的一种功能细胞因子, 是一种碱性多肽, 是参与多种生理和免疫过程的重要介质. 在正常情况下这些细胞对机体具有免疫应答的作用, 但如果持续释放过多或与其他细胞因子关系失调, 又会引起机体发热, 恶液质, 参与疾病的发生和发展. 该研究结果^[25]表明高水平TNF- α 可能作用于脂肪细胞调节瘦素的释放. 胰岛素分子与其靶组织的特异性受体 α 亚单位结合后, 引起一系列复杂的生理反应, 实现其生理功能. TNF- α 通过作用于胰岛素信号通路来调节胰岛素作用, 抑制胰岛素信号. 这一细胞因子针对胰

岛素刺激, 制胰岛素受体自动磷酸化, 抑制IRS-1磷酸化, 通过丝氨酸磷酸化IRS-1而损害胰岛素信号.

在人类的脂肪细胞中, TNF- α 可能是一个重要的局部因子, 控制胰岛素刺激的葡萄糖转运能力. 肥胖妇女局部脂肪组织中产生的TNF- α 在调节脂肪细胞中胰岛素刺激的葡萄糖转运方面发挥重要作用. 脂肪组织分泌的TNF- α 与基础葡萄糖转运无关, 但与胰岛素刺激的葡萄糖最大转运能力密切相关, 并且脂肪细胞体积与胰岛素刺激下葡萄糖转运的最大值相关. 脂肪组织是产生内源性TNF- α 的主要来源, 已证实^[26]大多数肥胖的啮齿动物模型和人类脂肪组织TNF- α mRNA表达增加, 而当体重减轻时TNF- α mRNA表达减少. 脂肪组织中的TNF- α 的含量增高, TNF- α mRNA和蛋白质水平分别升高2.5倍和2.0倍, 循环中的TNF- α 水平增高3.5倍, 但周围组织中的TNF- α 含量并不高, 提示TNF- α 可能通过自分泌和旁分泌途径刺激脂肪细胞分解, 减少脂肪细胞生成, 加速脂肪细胞、前脂肪细胞凋亡, 以此控制脂肪细胞的分化和脂肪组织体积的扩大, 即TNF- α 有限制脂肪量增长的作用但由于TNF- α 抑制了脂肪细胞的分化过程, 且TNF- α 可直接抑制脂肪细胞胰岛素受体的依赖传导过程, 这势必将进一步导致IR的发生, 并引起多种代谢紊乱. 有研究表明^[27]糖尿病患者的肌肉组织TNF- α mRNA表达水平及TNF- α 蛋白水平均明显高于对照组, 而且细胞对葡萄糖的摄取能力大大降低. 近年研究表明^[4], 升高的TNF- α 可增加或减少许多涉及能量代谢的酶, 从而允许恶性细胞逃逸免疫监视, 故认为TNF- α 是连接糖尿病和恶性肿瘤的根本点. 现研究表明TNF- α 既可协调IL、IFN等杀伤多种肿瘤细胞, 增强机体抗肿瘤作用; 可促进某些肿瘤的生长和转移^[28,29]. TNF- α 既可导致炎症、细胞坏死, 干扰素等杀伤肿瘤细胞, 抑制肿瘤生长, 提高机体抗肿瘤能力. 适量TNF- α 对机体有保护作用, 而过量TNF- α 则会对机体产生损伤^[28].

我们的实验观察到肿瘤组TNF- α 水平高与对照组, 这种差别与性别无关. 随着临床分期的增高患者TNF- α 水平明显增高. 分析其原因可能是随着肿瘤负荷的增加, 使体内分泌TNF- α 的细胞激活, 从而过分释放TNF- α , 高水平的TNF- α 通过各种途径刺激细胞产生血管生成因子, 从而促进肿瘤的生长、转移. TNF- α 与血清瘦素水平及胰岛素抵抗HOMA-IR显著正相关. TNF- α

■ 相关报道

TNF- α 被认为与抑制胰岛素刺激的葡萄糖摄取相平行. 实验研究表明TNF- α 既可协调IL、IFN等杀伤多种肿瘤细胞, 增强机体抗肿瘤作用; 过多的TNF- α 则会对机体产生损伤, 可促进某些肿瘤的生长和转移.

■应用要点

本研究通过对不同肿瘤分期及病理分级的结直肠癌患者及对照组血清TNF- α 的比较, 结直肠癌患者血清TNF- α 与瘦素水平及胰岛素抵抗指数相关性揭示TNF- α 在胰岛素抵抗与结直肠癌中的作用。

表 4 肿瘤组与对照组TNF- α 、血清瘦素浓度与HOMA指数

	瘦素	TNF- α	HOM-IR
肿瘤组	3.54(2.08-5.01)	125.68(98.35-153.01)	3.53(2.63-4.43)
对照组	2.27(1.28-3.26)	53.57(39.42-67.22)	1.48(0.77-2.19)
P值	0.021	0.008	0.014

与瘦素可协同诱导胰岛素高分泌, 引起胰岛素抵抗。血TNF- α 能抑制胰岛素受体信号传导和胰岛 β 细胞相对于血糖分泌胰岛素功能障碍。我们本实验发现血清瘦素水平与胰岛素抵抗HOMA-IR的相关性研究结果显示, 血清瘦素水平与胰岛素抵抗HOMA-IR呈正相关性($P<0.05$)。血清TNF- α 与血清瘦素水平呈正相关($P<0.05$)。有相关实验^[25]报道TNF- α 与瘦素可能在胰岛素抵抗中起协同作用。

目前胰岛素抵抗与肿瘤发生相关被人们普遍接受。因其具体分子学机制尚不明确, 近来人相继研究了高胰岛素血症、胰岛素样生长因子, 核因子抑制因子激酶信号通路、过氧化物酶体增殖物激活受体(PPARs)、脂联素、瘦素与结直肠癌的关系。本研究结果证实了TNF- α 作为细胞因子的核心成员与结直肠癌肿瘤存在相关性, 一方面随着瘤体负荷的增加激活体内巨噬细胞及T淋巴细胞释放TNF- α , 另一方面肿瘤细胞通过自分泌方式释放TNF- α , 所以我们观察到TNF- α 随着临床分期的进展升高。TNF- α 直接抑制了脂肪细胞胰岛素受体依赖的传导过程导致胰岛素抵抗。再者瘦素与胰岛素抵抗引起的肥胖糖尿病的关系明确, 本实验观察到血清TNF- α 与瘦素水平以及胰岛素抵抗呈正相关性从而以TNF- α 为桥梁构建胰岛素抵抗促进肿瘤发生及演化的分子学机制。对TNF- α 引发胰岛素抵抗及肿瘤的发生及分化中具体机制的则有待进一步研究。

4 参考文献

- 1 Frezza EE, Wachtel MS, Chiriva-Internati M. Influence of obesity on the risk of developing colon cancer. *Gut* 2006; 55: 285-291
- 2 Garofalo C, Surmacz E. Leptin and cancer. *J Cell Physiol* 2006; 207: 12-22
- 3 Will JC, Galuska DA, Vinicor F, Calle EE. Colorectal cancer: another complication of diabetes mellitus? *Am J Epidemiol* 1998; 147: 816-825
- 4 Wu GX, Wu ZS, He BL. [Epidemiological characteristics of stroke in 16 provinces of China]. *Zhonghua Yixue Zazhi* 1994; 74: 281-283, 325
- 5 Mantzoros CS. The role of leptin in human obesity and disease: a review of current evidence. *Ann Intern Med* 1999; 130: 671-680

- 6 Seck T, Englaro P, Blum WF, Scheidt-Nave C, Rascher W, Ziegler R, Pfeilschifter J. Leptin concentrations in serum from a randomly recruited sample of 50- to 80-year-old men and women: positive association with plasma insulin-like growth factors (IGFs) and IGF-binding protein-3 in lean, but not in obese, individuals. *Eur J Endocrinol* 1998; 138: 70-75
- 7 Weigle DS, Ganter SL, Kuijper JL, Leonetti DL, Boyko EJ, Fujimoto WY. Effect of regional fat distribution and Prader-Willi syndrome on plasma leptin levels. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82: 566-570
- 8 van Rossum CT, Hoebee B, van Baak MA, Mars M, Saris WH, Seidell JC. Genetic variation in the leptin receptor gene, leptin, and weight gain in young Dutch adults. *Obes Res* 2003; 11: 377-386
- 9 Considine RV, Caro JF. Leptin: genes, concepts and clinical perspective. *Horm Res* 1996; 46: 249-256
- 10 Hardwick JC, Van Den Brink GR, Offerhaus GJ, Van Deventer SJ, Peppelenbosch MP. Leptin is a growth factor for colonic epithelial cells. *Gastroenterology* 2001; 121: 79-90
- 11 Ogunwobi OO, Beales IL. The anti-apoptotic and growth stimulatory actions of leptin in human colon cancer cells involves activation of JNK mitogen activated protein kinase, JAK2 and PI3 kinase/Akt. *Int J Colorectal Dis* 2007; 22: 401-409
- 12 Sierra-Honigsmann MR, Nath AK, Murakami C, García-Cardena G, Papapetropoulos A, Sessa WC, Madge LA, Schechner JS, Schwabb MB, Polverini PJ, Flores-Riveros JR. Biological action of leptin as an angiogenic factor. *Science* 1998; 281: 1683-1686
- 13 Hirose Y, Hata K, Kuno T, Yoshida K, Sakata K, Yamada Y, Tanaka T, Reddy BS, Mori H. Enhancement of development of azoxymethane-induced colonic premalignant lesions in C57BL/KsJ-db/db mice. *Carcinogenesis* 2004; 25: 821-825
- 14 Falk RT, Brinton LA, Madigan MP, Potischman N, Sturgeon SR, Malone KE, Daling JR. Interrelationships between serum leptin, IGF-1, IGFBP3, C-peptide and prolactin and breast cancer risk in young women. *Breast Cancer Res Treat* 2006; 98: 157-165
- 15 Stattin P, Söderberg S, Biessy C, Lenner P, Hallmans G, Kaaks R, Olsson T. Plasma leptin and breast cancer risk: a prospective study in northern Sweden. *Breast Cancer Res Treat* 2004; 86: 191-196
- 16 Stattin P, Söderberg S, Hallmans G, Bylund A, Kaaks R, Stenman UH, Bergh A, Olsson T. Leptin is associated with increased prostate cancer risk: a nested case-referent study. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86: 1341-1345
- 17 Baillargeon J, Platz EA, Rose DP, Pollock BH, Ankerst DP, Haffner S, Higgins B, Lokshin A, Troyer D, Hernandez J, Lynch S, Leach RJ, Thompson IM. Obesity, adipokines, and prostate cancer in a prospective population-based study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2006; 15: 1331-1335
- 18 Chia VM, Newcomb PA, Lampe JW, White E,

- Mandelson MT, McTiernan A, Potter JD. Leptin concentrations, leptin receptor polymorphisms, and colorectal adenoma risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2007; 16: 2697-2703
- 19 Liu Z, Uesaka T, Watanabe H, Kato N. High fat diet enhances colonic cell proliferation and carcinogenesis in rats by elevating serum leptin. *Int J Oncol* 2001; 19: 1009-1014
- 20 Stattin P, Lukanova A, Biessy C, Söderberg S, Palmqvist R, Kaaks R, Olsson T, Jellum E. Obesity and colon cancer: does leptin provide a link? *Int J Cancer* 2004; 109: 149-152
- 21 McKeown-Eyssen G. Epidemiology of colorectal cancer revisited: are serum triglycerides and/or plasma glucose associated with risk? *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1994; 3: 687-695
- 22 Ishikawa M, Kitayama J, Nagawa H. Enhanced expression of leptin and leptin receptor (OB-R) in human breast cancer. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 4325-4331
- 23 Frankenberry KA, Skinner H, Somasundar P, McFadden DW, Vona-Davis LC. Leptin receptor expression and cell signaling in breast cancer. *Int J Oncol* 2006; 28: 985-993
- 24 Garofalo C, Koda M, Cascio S, Sulkowska M, Kanczuga-Koda L, Golaszewska J, Russo A, Sulkowski S, Surmacz E. Increased expression of leptin and the leptin receptor as a marker of breast cancer progression: possible role of obesity-related stimuli. *Clin Cancer Res* 2006; 12: 1447-1453
- 25 Finck BN, Johnson RW. Tumor necrosis factor- α regulates secretion of the adipocyte-derived cytokine, leptin. *Microsc Res Tech* 2000; 50: 209-215
- 26 Löfgren P, van Harmelen V, Reynisdottir S, Näslund E, Rydén M, Rössner S, Arner P. Secretion of tumor necrosis factor- α shows a strong relationship to insulin-stimulated glucose transport in human adipose tissue. *Diabetes* 2000; 49: 688-692
- 27 Miles PD, Romeo OM, Higo K, Cohen A, Rafaat K, Olefsky JM. TNF- α -induced insulin resistance in vivo and its prevention by troglitazone. *Diabetes* 1997; 46: 1678-1683
- 28 Giraudo E, Primo L, Audero E, Gerber HP, Koolwijk P, Soker S, Klagsbrun M, Ferrara N, Bussolino F. Tumor necrosis factor- α regulates expression of vascular endothelial growth factor receptor-2 and of its co-receptor neuropilin-1 in human vascular endothelial cells. *J Biol Chem* 1998; 273: 22128-22135
- 29 Cordingley FT, Bianchi A, Hoffbrand AV, Reittie JE, Heslop HE, Vyakarnam A, Turner M, Meager A, Brenner MK. Tumour necrosis factor as an autocrine tumour growth factor for chronic B-cell malignancies. *Lancet* 1988; 1: 969-971

■同行评价

本文设计合理, 统计分析得当, 结论可信, 对临床有一定指导意义。

编辑 李薇 电编 何基才

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

●消息●

《世界华人消化杂志》2011年开始不再收取审稿费

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

《世界华人消化杂志》投稿须知

《世界华人消化杂志》为保证期刊的学术质量, 对所有来稿均进行同行评议, 是一份被中国科技论文统计源核心期刊、中文核心期刊要目总览收录的学术类期刊。

1 投稿总则

1.1 性质 《世界华人消化杂志》[ISSN 1009-3079 (print), ISSN 2219-2859 (online), CN 14-1260/R]是一份同行评议性和开放获取(open access, OA)的旬刊。OA最大的优点是面向全国本领域专家及公众开放无需注册, 免费获取PDF等格式的全文, 切实破除了传统性期刊阻碍科学研究成果快速传播的障碍。OA是一项真正意义上的公益性科学传播工具, 编委、作者和读者利益的最大化的目标, 努力推进本学科的繁荣和发展。

《世界华人消化杂志》定价56.00元, 全年2016.00元, 邮发代号82-262, 由世界华人消化杂志编辑部出版。《世界华人消化杂志》主要报道胃肠病学、肝胆病学、胰腺病学、内镜介入与消化外科等多学科的评论及基础研究和临床实践等各类文章, 具体内容涉及: 食管疾病, 如反流性食管炎、Barret's食管、食管静脉曲张和食管癌等; 胃部疾病, 胃食管反流性疾病、胃炎、胃动力障碍、胃出血、胃癌和幽门螺杆菌感染等; 肠道疾病, 如肠道出血、肠穿孔、肠梗阻、肠道炎症(如IBD/CD等)、肠道感染、大肠癌和大肠腺瘤等; 肝胆部疾病如病毒性肝炎、肝硬化、脂肪肝、肝纤维化、肝衰竭、胆石病、胆汁郁积、梗阻性黄疸、肝癌、胆囊癌、胆管癌和门静脉高压等; 胰腺疾病, 如胰腺炎和胰腺癌等; 全身性疾病涉及消化系统, 如自身免疫性及瘀胆性疾病、腹腔疾病、消化不良和代谢性疾病等; 以及与以上疾病相关的基因及基因组学、微生物及分子生物学、病因学、流行病学、免疫学、临床内外科诊断与治疗(如影像、化疗、移植、营养等); 除以上外, 本刊也报道诊断与筛选、内窥镜检查法、影像及先进技术。

《世界华人消化杂志》被国际检索系统美国《化学文摘》(Chemical Abstracts, CA)、荷兰《医学文摘库/医学文摘(EMBASE/Excerpta Medica, EM)》和俄罗斯《文摘杂志(Abstract Journal, AJ)》收录。国内为中国科技论文统计与分析期刊(科技部选为中国科技论文统计源期刊)、《中文核心期刊要目总览》(2008年版)内科学类的核心期刊、《中国学术期刊评价研究报告-RCES权威、核心期刊排行榜与指南》和

中国知识资源总库收录。2009年《世界华人消化杂志》总被引频次3 009次, 影响因子0.625, 综合评价总分49.4分, 分别位居内科学类48种期刊的第6位、第9位、第6位, 分别位居1 946种中国科技论文统计源期刊(中国科技核心期刊)的第87位、第378位、第351位; 其他指标: 即年指标0.112, 他引率0.79, 引用刊数473种, 扩散因子15.72, 权威因子1 170.03, 被引半衰期4.0, 来源文献量752, 文献选出率0.93, 地区分布数30, 机构分布数30, 基金论文比0.39, 海外论文比0.01。

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

2 撰稿要求

2.1 总体标准 文稿撰写应遵照国家标准GB7713科学技术报告、学位论文和学术论文的编写格式, GB6447文摘编写规则, GB7714文后参考文献著录规则, GB/T 3179科学技术期刊编排格式等要求; 同时遵照国际医学期刊编辑委员会(International Committee of Medical Journal Editors)制定的《生物医学期刊投稿的统一要求(第5版)》(Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals). 见: *Ann Intern Med* 1997; 126: 36-47。

2.2 名词术语 应标准化, 前后统一, 如原词过长且多次出现者, 可于首次出现时写出全称加括号内注简称, 以后直接用简称。医学名词以全国自然科学名词审定委员会公布的《生理学名词》、《生物化学名词与生物物理学名词》、《化学名词》、《植物学名词》、《人体解剖学名词》、《细胞生物学名词》及《医学名词》系列为准, 药名以《中华人民共和国药典》和卫生部药典委员会编的《药名词汇》为准, 国家食品药品监督管理局批准的新药, 采用批准的药名; 创新性新药, 请参照我国药典委员会的“命名原则”, 新译名词应附外文。公认习用缩略语可直接应用(建议第一次也写出全称), 如ALT, AST, mAb, WBC, RBC, Hb, T, P, R, BP, PU, GU, DU, ACTH, DNA, LD50, HBsAg, HCV

RNA, AFP, CEA, ECG, IgG, IgA, IgM, TCM, RIA, ELISA, PCR, CT, MRI等. 为减少排印错误, 外文、阿拉伯数字、标点符号必须正确打印在A4纸上. 中医药名词英译要遵循以下原则: (1)有对等词者, 直接采用原有英语词, 如中风stroke, 发热fever; (2)有对应词者应根据上下文合理选用原英语词, 如八法eight principal methods; (3)英语中没有对等词或相应词者, 宜用汉语拼音, 如阴yin, 阳yang, 阴阳学说yinyangology, 人中renzhong, 气功qigong; 汉语拼音要以词为单位分写, 如weixibao nizhuanwan(胃细胞逆转丸), guizhitang(桂枝汤). 通常应小写.

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

2.4 计量单位 采用国际单位制并遵照有关国家

标准, GB3100-3102-93量和单位. 原来的“分子量”应改为物质的相对分子质量. 如30 kD改为 M_r 30 000或30 kDa(M大写斜体, r小写正体, 下角标); “原子量”应改为相对原子质量, 即 A_r (A大写斜体, r小写正体, 下角标); 也可采用原子质量, 其单位是u(小写正体). 计量单位在+、-及-后列出. 在±前后均要列出, 如37.6 °C ± 1.2 °C, 45.6岁 ± 24岁, 56.4 d ± 0.5 d. 3.56 ± 0.27 pg/ml应为3.56 ng/L ± 0.27 ng/L. BP用kPa(mmHg), RBC数用 1×10^{12} /L, WBC数用 1×10^9 /L, WBC构成比用0.00表示, Hb用g/L. M_r 明确的体内物质以nmol/L或mmol/L表示, 不明确者用g/L表示. 1 M硫酸, 改为1 mol/L硫酸, 1 N硫酸, 改为0.5 mol/L硫酸. 长10 cm, 宽6 cm, 高4 cm, 应写成10 cm × 6 cm × 4 cm. 生化指标一律采用法定计量单位表示, 例如, 血液中的总蛋白、清蛋白、球蛋白、脂蛋白、血红蛋白、总脂用g/L, 免疫球蛋白用mg/L; 葡萄糖、钾、尿素、尿素氮、CO₂结合力、乳酸、磷酸、胆固醇、胆固醇酯、三酰甘油、钠、钙、镁、非蛋白氮、氯化物; 胆红素、蛋白结合碘、肌酸、肌酐、铁、铅、抗坏血酸、尿胆元、氨、维生素A、维生素E、维生素B1、维生素B2、维生素B6、尿酸; 氢化可的松(皮质醇)、肾上腺素、汞、孕酮、甲状腺素、睾酮、叶酸用nmol/L; 胰岛素、雌二醇、促肾上腺皮质激素、维生素B12用pmol/L. 年龄的单位有日龄、周龄、月龄和岁. 例如, 1秒, 1 s; 2分钟, 2 min; 3小时, 3 h; 4天, 4 d; 5周, 5 wk; 6月, 6 mo; 雌性♀, 雄性♂, 酶活性国际单位IU = 16.67 nkat, 对数log, 紫外uv, 百分比%, 升L, 尽量把 1×10^{-3} g与 5×10^{-7} g之类改成1 mg与0.5 mg, hr改成h, 重量γ改成mg, 长度m改成mm. 国际代号不用于无数字的文句中, 例如每天不写每d, 但每天8 mg可写8 mg/d. 在一个组合单位符号内不得有1条以上的斜线, 例如不能写成mg/kg/d, 而应写成mg/(kg·d), 且在整篇文章内应统一. 单位符号没有单、复数的区分, 例如, 2 min不是2 mins, 3 h不是3 hs, 4 d不是4 ds, 8 mg不是8 mgs. 半个月, 15 d; 15克, 15 g; 10%福尔马林, 40 g/L甲醛; 95%酒精, 950 mL/L乙醇; 5% CO₂, 50 mL/L CO₂; 1 : 1 000肾上腺素, 1 g/L肾上腺素; 胃黏膜含促胃液素36.8 pg/mg, 改为胃黏膜蛋白含促胃液素36.8 ng/g; 10%葡萄糖改为560 mmol/L或100 g/L葡萄糖; 45 ppm = 45×10^{-6} ; 离心的旋转频率(原称转速)用r/min, 超速者用g; 药物剂量若按体质量计算, 一律以“/kg”表示.

《世界华人消化杂志》为中国科技论文统计源核心期刊(2010年)和中文核心期刊要目总览(北京大学图书馆, 2008年版)收录的学术期刊.

《世界华人消化杂志》编辑部, 100025, 北京市朝阳区, 东四环中路62号, 远洋国际中心D座903室, 电话: 010-5908-0035, 传真: 010-8538-1893, Email: wjcd@wjgnet.com; http://www.wjgnet.com

2.5 统计学符号 (1) t 检验用小写 t ; (2) F 检验用英文大写 F ; (3)卡方检验用希文小写 χ^2 ; (4)样本的相关系数用英文小写 r ; (5)自由度用希文小写 ν ; (6)样本数用英文小写 n ; (7)概率用英文斜体大写 P . 在统计学处理中在文字叙述时平均数 \pm 标准差表示为 $\text{mean} \pm \text{SD}$, 平均数 \pm 标准误为 $\text{mean} \pm \text{SE}$. 统计学显著性用 $^aP < 0.05$, $^bP < 0.01$ ($P > 0.05$ 不注). 如同一表中另有一套 P 值, 则 $^cP < 0.05$, $^dP < 0.01$; 第三套为 $^eP < 0.05$, $^fP < 0.01$ 等.

2.6 数字用法 遵照国家标准GB/T 15835-1995出版物上数字用法的规定, 作为汉语词素者采用汉字数字, 如二氧化碳、十二指肠、三倍体、四联球菌、五四运动、星期六等. 统计学数字采用阿拉伯数字, 如1000-1500 kg, 3.5 mmol/L \pm 0.5 mmol/L等. 测量的数据不能超过其测量仪器的精密度, 例如6347意指6000分之一的精密度. 任何一个数字, 只允许最后一位有误差, 前面的位数不应有误差. 在一组数字中的 $\text{mean} \pm \text{SD}$ 应考虑到个体的变差, 一般以SD的1/3来定位数, 例如3614.5 g \pm 420.8 g, SD的1/3达一百多g, 平均数波动在百位数, 故应写成3.6 kg \pm 0.4 kg, 过多的位数并无意义. 又如8.4 cm \pm 0.27 cm, 其SD/3 = 0.09 cm, 达小数点后第2位, 故平均数也应补到小数点后第2位. 有效位数以后的数字是无效的, 应该舍. 末尾数字, 小于5则舍, 大于5则进, 如恰等于5, 则前一位数逢奇则进, 逢偶(包括“0”)且5之后全为0则舍. 末尾时只可1次完成, 不得多次完成. 例如23.48, 若不要小数点, 则应成23, 而不应该23.48 \rightarrow 23.5 \rightarrow 24. 年月日采用全数字表达法, 请按国家标准GB/T 7408-94书写. 如1985年4月12日, 可写作1985-04-12; 1985年4月, 写作1985-04; 从1985年4月12日23时20分50秒起至1985年6月25日10时30分止, 写作1985-04-12 T23:20:50/1985-06-25 T10:30:00; 从1985年4月12日起至1985年6月15日止, 写作1985-04-12/06-16, 上午8时写作08:00, 下午4时半写作16:30. 百分数的有效位数根据分母来定: 分母 ≤ 100 , 百分数到个位; $101 \leq$ 分母 ≤ 1000 , 百分数到小数点后1位; 余类推. 小数点前后的阿拉伯数字, 每3位间空1/4阿拉伯数字距离, 如1486800.475 65. 完整的阿拉伯数字不移行!

2.7 标点符号 遵照国家标准GB/T 15834-1995标点符号用法的要求, 本刊论文中的句号都采用黑圆点; 数字间的起止号采用“-”字线, 并列的汉语词间用顿号分开, 而并列的外文词、阿拉伯数字、外文缩略词及汉语拼音字母拼写词间改用逗号分开, 参考文献中作者间一律用逗号

分开; 表示终了的标点符号, 如句号、逗号、顿号、分号、括号及书名号的后一半, 通常不用于一行之首; 而表示开头的标点符号, 如括号及书名号的前一半, 不宜用于一行之末. 标点符号通常占一格, 如顿号、逗号、分号、句号等; 破折号应占两格; 英文连字符只占一个英文字符的宽度, 不宜过长, 如5-FU. 外文字符下划一横线表示用斜体, 两横线表示用小写, 三横线表示用大写, 波纹线表示用黑体.

3 稿件格式

3.1 题名 简明确切地反映论文的特定内容, 鲜明而有特色, 阿拉伯数字不宜开头, 不用副题名, 一般20个字. 避免用“的研究”或“的观察”等非特定词.

3.2 作者 论文作者的署名, 按照国际医学杂志编辑委员会(ICMJE, International Committee of Medical Journal Editors)作者资格标准执行. 作者标准为: (1)对研究的理念和设计、数据的获得、分析和解读做出重大贡献; (2)起草文章, 并对文章的重要的知识内容进行批评性修改; (3)接受对准备发表文章的最后一稿. 作者应符合条件1, 2, 3, 对研究工作有贡献的其他人可放入致谢中. 作者署名的次序按贡献大小排列, 多作者时姓名间用逗号, 如是单名, 则在姓与名之间空1格(正文和参考文献中不空格). 《世界华人消化杂志》要求所有署名人写清楚自己对文章的贡献. 世界华人消化杂志不设置共同第一作者和共同通信作者.

3.3 单位 作者后写单位的全称空1格后再写省市及邮政编码. 格式如: 张旭晨, 梅立新, 承德医学院病理教研室 河北省承德市 067000

3.4 第一作者简介 格式如: 张旭晨, 1994年北京中医药大学硕士, 讲师. 主要从事消化系统疾病的病理研究.

3.5 作者贡献分布 格式如: 陈湘川与庞丽娟对此文所作贡献两均等; 此课题由陈湘川、庞丽娟、陈玲、杨兰、张金芳、齐妍及李洪安设计; 研究过程由陈玲、杨兰、张金芳、蒋金芳、杨磊、李锋及曹秀峰操作完成; 研究所用新试剂及分析工具由曹秀峰提供; 数据分析由陈湘川、杨兰及庞丽娟完成; 本论文写作由陈湘川、庞丽娟及李洪安完成.

3.6 同行评议者 为了确保刊出文章的质量, 本刊即将开始实行接受稿件的同行评议公开策略, 将同行评议者姓名, 职称, 机构的名称与文章一同在脚注出版. 格式如: 房静远, 教授, 上海交通

大学医学院附属医院仁济医院,上海市消化疾病研究所.

3.7 基金资助项目 格式如: 国家自然科学基金资助项目, No. 30224801

3.8 通讯作者 格式如: 通讯作者: 黄缘, 教授, 330006, 江西省南昌市民德路1号, 南昌大学第二附属医院消化内科, 江西省分子医学重点实验室. huang9815@yahoo.com

电话: 0351-4078656 传真: 0351-4086337

收稿日期: 修回日期:

3.9 英文摘要

题名 文章的题名应言简意赅, 方便检索, 英文题名以不超过10个实词为宜, 应与中文题名一致.

作者 作者姓名汉语拼音拼写法规定为: 先名, 后姓; 首字母大写, 双名之间用半字线“-”分开, 多作者时姓名间加逗号. 格式如: “潘伯荣”的汉语拼写法为“Bo-Rong Pan”.

单位 先写作者, 后写单位的全称及省市邮政编码. 例如: Xu-Chen Zhang, Li-Xin Mei, Department of Pathology, Chengde Medical College, Chengde 067000, Hebei Province, China

基金资助项目 格式如: Supported by National Natural Science Foundation of China, No.30224801

通讯作者 格式如: Correspondence to: Dr. Lian-Sheng Ma, Taiyuan Research and Treatment Center for Digestive Diseases, 77 Shuangta Xijie, Taiyuan 030001, Shanxi Province, China. wcjd@wjgnet.com

收稿及修回日期 格式如: Received: Revised:

摘要 包括目的、方法、结果、结论, 书写要求与中文摘要一致.

3.10 中文摘要 必须在300字左右, 内容应包括目的(应阐明研究的背景和设想、目的), 方法(必须包括材料或对象. 应描述课题的基本设计, 双盲、单盲还是开放性, 使用什么方法, 如何进行分组和对照, 数据的精确程度. 研究对象选择条件与标准是否遵循随机化、齐同化的原则, 对照组匹配的特征. 如研究对象是患者, 应阐明其临床表现, 诊断标准. 如何筛选分组, 有多少例进行过随访, 有多少例因出现不良反应而中途停止研究), 结果(应列出主要结果, 包括主要数据, 有什么新发现, 说明其价值和局限, 叙述要真实、准确、具体, 所列数据经用何种统计学方法处理; 应给出结果的置信区间和统计学显著性检验的确切值; 概率写 P , 后应写出相应显著性检验值), 结论(全文总结, 准确无误的观点及价值).

3.11 正文标题层次 0 引言; 1 材料和方法, 1.1 材

料, 1.2 方法; 2 结果; 3 讨论; 4 参考文献. 序号一律左顶格写, 后空1格写标题; 2级标题后空1格接正文. 正文内序号连排用(1), (2), (3). 以下逐条陈述.

0 引言 应包括该研究的目的和该研究与其他相关研究的关系.

1 材料和方法 应尽量简短, 但应让其他有经验的研究者能够重复该实验. 对新的方法应该详细描述, 以前发表过的方法引用参考文献即可, 有关文献中或试剂手册中的方法的改进仅描述改进之处即可.

2 结果 实验结果应合理采用图表和文字表示, 在结果中应避免讨论.

3 讨论 要简明, 应集中对所得的结果做出解释而不是重复叙述, 也不应是大量文献的回顾.

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

志谢 后加冒号, 排在讨论后及参考文献前, 左齐.

4 参考文献 本刊采用“顺序编码制”的著录方法, 即以文中出现顺序用阿拉伯数字编号排序. 提倡对国内同行近年已发表的相关研究论文给予充分的反映, 并在文内引用处右上角加方括号注明角码. 文中如列作者姓名, 则需在“Pang等”的右上角注角码号; 若正文中仅引用某文献中的论述, 则在该论述的句末右上角注码号. 如马连生^[1]报告……, 潘伯荣等^[2-5]认

《世界华人消化杂志》自2006-01-01起改为旬刊发行, 每月8、18、28日出版. 北京报刊发行局发行, 邮发代号: 82-262.

2010年,《世界华人消化杂志》将坚持开放获取(open access, OA)的出版模式,编辑出版高质量文章,努力实现编委、作者和读者利益的最大化,努力推进本学科的繁荣和发展,向专业化、特色化和品牌化方向迈进。

为……; PCR方法敏感性高^[6-7]。文献序号作正文叙述时,用与正文同号的数字并排,如本实验方法见文献[8]。所引参考文献必须以近2-3年SCIE, PubMed,《中国科技论文统计源期刊》和《中文核心期刊要目总览》收录的学术类期刊为准,通常应只引用与其观点或数据密切相关的国内外期刊中的最新文献。期刊: 序号, 作者(列出全体作者), 文题, 刊名, 年, 卷, 起页-止页, PMID和DOI编号; 书籍: 序号, 作者(列出全部), 书名, 卷次, 版次, 出版地, 出版社, 年, 起页-止页。

5 网络版的发表前链接 本刊即将开始实行网络版的每篇文章上都有该文发表前纪录的链接, 包括首次提交的稿件, 同行评议人报告, 作者给审稿人回信和作者修回稿, 以PDF格式上传。读者可以针对论文、审稿意见和作者的修改情况发表意见, 指出问题与不足; 作者也可以随时修改完善自己发表的论文, 使文章的发表成为一个编者、同行评议者、读者、作者互动的动态过程。

4 写作格式实例

4.1 述评写作格式实例

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

4.2 研究原著写作格式实例

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

4.3 焦点论坛写作格式实例

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

4.4 文献综述写作格式实例

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

4.5 研究快报写作格式实例

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

4.6 临床经验写作格式实例

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

4.7 病例报告写作格式实例

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

5 投稿方式

接受在线投稿, 不接受其他方式的投稿, 如E-mail、打印稿。在线投稿网址: <http://www.baishideng.com/wcjd/ch/index.aspx>。无法在线提交的通过submission@wjgnet.com, 电话: 010-8538-1892, 传真: 010-8538-1893寻求帮助。投稿须知下载网址<http://www.wjgnet.com/1009-3079/tgxz.pdf>。审稿过程平均时间需要14-28 d。所有的来

稿均经2-3位同行专家严格评审, 2位或以上通过为录用, 否则将退稿或修改后再审。接受后的稿件作者需缴纳稿件发表费, 文章发表后可获得1本样刊及10套单行本(稿酬)。

6 修回稿须知

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

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

6.3 版权 本论文发表后作者享有非专有权, 文责由作者自负。作者可在本单位或本人著作集中汇编出版以及用于宣讲和交流, 但应注明发表于《世界华人消化杂志》××年; 卷(期): 起止页码。如有国内外其他单位和个人复制、翻译出版等商业活动, 须征得《世界华人消化杂志》编辑部书面同意, 其编辑版权属本刊所有。

《世界华人消化杂志》编辑部

北京百世登生物医学科技有限公司
100025, 北京市朝阳区东四环中路62号
远洋国际中心D座903室
电话: 010-5908-0035
传真: 010-8538-1893
E-mail: wcjd@wjgnet.com
<http://www.wjgnet.com>

2011年国内国际会议预告

2011-08-20/22

第十五次全国中西医结合儿科学术会议

会议地点: 兰州市

联系方式: zxyek@sina.com

2011-08-26/27

第四届福瑞肝纤维化论坛

会议地点: 上海市

联系方式: bstract@cosoman.com

2011-08-31/09-02

腹腔间室综合征的护理进展

会议地点: 延吉市

联系方式: qiyan68@126.com

2011-09

中华医学会超声医学分会第十一次全国超声医学学术会议

会议地点: 青岛市

联系方式: <http://www.nccsum.org/>

2011-09-14/17

第六届全国疑难及重症肝病大会

会议地点: 兰州市

联系方式: office@cnsld.org

2011-09-14/18

第十四届全国临床肿瘤学大会暨2011年CSCO学术年会

会议地点: 福州市

联系方式: 010-67726451

2011-09-16/18

第七届全国消化系统中晚期恶性肿瘤学术年会

会议地点: 济南市

联系方式: xiaohuahuiyi@126.com

2011-09-24

2011中国消化病学大会

会议地点: 北京市

联系方式: 010-51292005-105

2011-09-25/26

2011北京消化内镜节

会议地点: 北京市

联系方式: 010-51292005-105

2011-10-07/09

第八届亚太肝病学会主题会议

会议地点: 北京市

联系方式: info@apaslstc.org

2011-10-13/16

2011年亚太地区国际肿瘤生物学和医学学术会议

会议地点: 上海市

联系方式: clinimmunchina@yahoo.com

2011-10-14/16

中华医学会第五次全国艾滋病、病毒性丙型肝炎暨全国

热带病学术会议

会议地点: 重庆市

联系方式: www.nccsid.org

2011-10-21/23

中华医学会病理学分会第十七次学术会议

会议地点: 杭州市

联系方式: leighdai@cma.org.cn

2011-10-22/26

第19届欧洲肠胃病学联合组织(UEG)会议周

会议地点: 斯德哥尔摩

联系方式: uegw2011@cpo-hanser.de

2011-10-28/11-02

2011美国胃肠病学会年度科学会议

会议地点: 华盛顿

联系方式: annualmeeting@acg.gi.org

2011-11-04/08

第62届美国肝病研究学会(AASLD)年会

会议地点: 旧金山

联系方式: medical_conference@263.net

2011-11-18/23

第十一届全国消化道恶性病变介入诊疗研讨会暨2011全

国内镜/介入/放疗新技术国际论坛

会议地点: 北京市

联系方式: doctor302@163.com

2011-11-25/27

2011年全国消化道静脉曲张及其伴发消化疾病内镜诊治研讨会

会议地点: 西安市

联系方式: 2011varices@sina.com

2011-12-08/11

第11次全国消化系疾病学术会议

会议地点: 杭州市

联系方式: csgdabstract@126.com

2011-12-09/11

江苏省第四次胃肠外科学术会议

会议地点: 南京市

联系方式: jswwk@yahoo.com.cn

志谢世界华人消化杂志编委

本期文章审稿中(包括退稿), 我刊编委付出了宝贵的时间和大量的精力, 提高了《世界华人消化杂志》的学术质量, 在此表示衷心感谢!

陈国凤 主任医师
第302医院感染七科

陈建杰 主任医师
上海中医药大学附属曙光医院(东部)肝病科

陈敬贤 教授
安徽医科大学微生物教研室

陈汝福 教授
中山大学孙逸仙纪念医院肝胆外科

杜奕奇 副教授
中国人民解放军第二军医大学长海医院消化内科

范小玲 主任医师
北京地坛医院综合科

高英堂 研究员
天津市第三中心医院 天津市肝胆疾病研究所分子细胞室

关玉盘 教授
首都医科大学附属北京朝阳医院消化科

管冬元 副教授
上海中医药大学基础医学院实验中医教研室

何松 教授
重庆医科大学附属第二医院消化内科

洪天配 教授
北京大学第三医院内分泌科

黄志勇 教授
华中科技大学同济医院普外科

姜春萌 教授
大连医科大学附属第二医院消化科

李胜 研究员
山东省肿瘤防治研究院肝胆外科

李晓波 教授
上海交通大学药学院

李瑜元 教授
广州市第一人民医院内科

刘成海 研究员
上海中医药大学附属曙光医院(东部)肝病研究所

刘改芳 主任医师
河北医科大学第三医院消化内科

倪润洲 教授
南通大学附属医院消化内科

潘兴华 副主任医师
中国人民解放军成都军区昆明总医院病理实验科

邱伟华 副主任医师
上海交通大学医学院附属瑞金医院普外科

孙诚谊 教授
贵阳医学院附属医院 院长办

王德盛 副教授
中国人民解放军第四军医大学西京医院肝胆外科

王鲁平 主任医师
中国人民解放军北京军区总医院病理科

王悦华 副主任医师
首都医科大学宣武医院普外科

徐泱 副教授
上海复旦大学附属中山医院肝肿瘤外科

杨江华 副教授
安徽省芜湖市皖南医学院弋矶山医院感染科

周南进 研究员
江西省医学科学研究所

朱传武 教授
苏州大学附属传染病医院肝病科

邹小明 教授
哈尔滨医科大学附属第二医院普外二科