

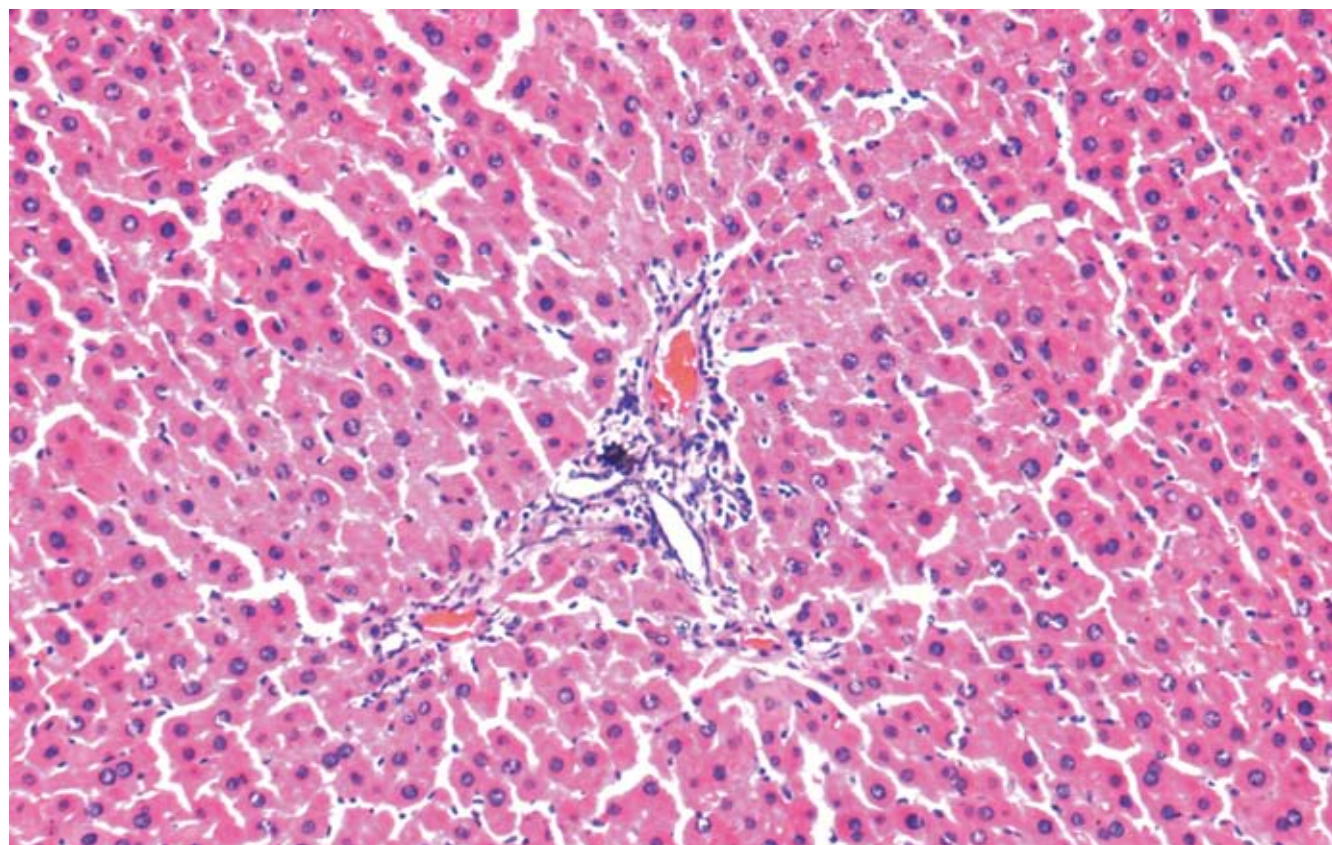
ISSN 1009-3079 (print)  
ISSN 2219-2859 (online)  
CN 14-1260/R

# 世界华人消化杂志®

## WORLD CHINESE JOURNAL OF DIGESTOLOGY

### Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

2011 年 9 月 8 日 第 19 卷 第 25 期 (Volume 19 Number 25)



## 25 / 2011

ISSN 1009-3079



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  
姜卫东教授  
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 9 月 8 日 第 19 卷 第 25 期 (总第357期)

## 述 评

2609 胃癌实验模型建立的研究现况

郭凌云, 刘涛, 李玉民

## 基 础 研 究

2615 疏肝健脾方药对NASH大鼠心脏舒张功能及炎症因子的影响

王文晶, 杨钦河, 冯高飞, 王彦平, 何秀敏, 张玉佩, 杨雪萍, 闫海震, 黄进, 李光秋, 赵亚凤, 杨晓蕾, 沈灿宏

2623 RNAi特异性抑制FoxO3a对软脂酸诱导HepG2.2.15细胞凋亡的影响

熊清芳, 谢玉桃

2629 脱氧胆酸溶液灌肠对大鼠内脏敏感性及脊髓c-fos mRNA表达的影响

王劲松, 余保平, 胡柳丹, 张丽静, 田亭亭

2637 TRAF6 shRNA对LPS/TLR4信号传导通路的体外干预作用

陈锋, 孙继民, 何生松, 庞然, 许娟娟, 董继华

## 临 床 研 究

2644 干细胞标志物Nanog、Oct-4、SOX-2表达与结肠癌术后复发转移关系

李宁, 邓文英, 马懿辉, 陈小兵, 韩黎丽, 吕慧芳, 陈贝贝, 罗素霞

## 文 献 综 述

2649 神经调节在功能性胃肠病发病中的作用及其研究进展

倪敏, 丁义江, 丁曙晴

## 研 究 快 报

2654 金黄益胆颗粒对大鼠重症急性胰腺炎肝损伤的保护作用

赵立新, 马向明, 曹立瀛, 刘四清, 付庆江, 张青松

2660 表达大鼠IL-2、B7-1基因CBRH7919细胞的建立

史瑶平, 郭燕, 李鹤平, 沈俊杰, 杨建勇

## 临 床 经 验

2664 降逆汤治疗反流性食管炎150例

陈昱倩, 刘万里, 李学良

2668 血清可溶性E钙粘蛋白与胃癌生物学行为的关系

赵越, 周永宁, 冉俊涛, 邹邵静, 李强, 陈兆锋

2673 M2-PK和HSP90 $\alpha$ 在胃癌患者血清中的表达及意义

刘志刚, 宋永春, 孙瑞芳, 雷光焰

2679 IHC和FISH检测胃癌Her-2蛋白表达及基因扩增的比较

刘学政, 陈铭, 张家均, 董虹, 柳文菊

2684 精准肝切除巨大肝血管瘤26例

冯伟, 仇毓东

2688 活体肝移植术后受体胆系并发症的影响因素及影像学表现

刘曦娇, 李嘉鑫, 黄子星, 陈光文, 李晨, 宋彬

2693 超声内镜诊断胆管恶性狭窄13例

李大勇, 秦鸣放, 王震宇

附 录	2696 《世界华人消化杂志》投稿须知 2701 2011年国内国际会议预告
志 谢	2702 志谢世界华人消化杂志编委
消 息	2614 《世界华人消化杂志》外文字符标准 2622 《世界华人消化杂志》修回稿须知 2628 《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》 2636 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 2648 WJG总被引频次排名位于第174名 2653 《世界华人消化杂志》参考文献要求 2659 WJG成功通过评审被PMC收录 2667 《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》 2672 《世界华人消化杂志》出版流程 2678 百世登出版集团推出12种开放获取生物医学期刊全部被PubMed和IPMC收录 2683 《世界华人消化杂志》正文要求 2692 招聘生物医学编辑部主任
封面故事	王文晶, 杨钦河, 冯高飞, 王彦平, 何秀敏, 张玉佩, 杨雪萍, 闫海震, 黄进, 李光秋, 赵亚凤, 杨晓蕾, 沈灿宏. 疏肝健脾方药对NASH大鼠心脏舒张功能及炎症因子的影响. 世界华人消化杂志 2011; 19(25): 2615-2622 <a href="http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/2615.asp">http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/2615.asp</a>
本期责任人	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; 形式规范 马连生

<p><b>世界华人消化杂志</b></p> <p><b>Shijie Huaren Xiaohua Zazhi</b></p> <p>吴阶平 题写封面刊名 陈可冀 题写版权刊名 (旬刊)</p> <p>创 刊 1993-01-15 改 刊 1998-01-25 出 版 2011-09-08 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 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><b>编辑</b> 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 <a href="http://www.wjgnet.com">http://www.wjgnet.com</a></p> <p><b>出版</b> 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 <a href="http://www.wjgnet.com">http://www.wjgnet.com</a></p> <p><b>印刷</b> 北京科信印刷厂</p> <p><b>发行</b> 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><b>订购</b> 全国各地邮电局</p> <p><b>邮购</b> 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 <a href="http://www.wjgnet.com">http://www.wjgnet.com</a></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(<a href="http://www.baishideng.com/wcjd/ch/index.aspx">http://www.baishideng.com/wcjd/ch/index.aspx</a>), 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><b>特别声明</b> 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 <b>ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online)</b> 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><a href="http://www.wjgnet.com">www.wjgnet.com</a></p>		

# World Chinese Journal of Digestology

## August 2011 Contents in Brief Volume 19 Number 22

<b>EDITORIAL</b>	2609 Animal models of gastric cancer <i>Guo LY, Liu T, Li YM</i>
<b>BASIC RESEARCH</b>	<p>2615 Effect of Shuganjianpifang on cardiac diastolic function and inflammatory factors in rats with nonalcoholic steatosis hepatitis <i>Wang WJ, Yang QH, Feng GF, Wang YP, He XM, Zhang YP, Yang XP, Yan HZ, Huang J, Li GQ, Zhao YF, Yang XL, Shen CH</i></p> <p>2623 RNA interference-mediated silencing of the FoxO3a gene inhibits palmitate-induced apoptosis in human hepatoma cell line HepG2.2.15 <i>Xiong QF, Xie YT</i></p> <p>2629 Rectal instillation of deoxycholic acid solution enhances visceral hypersensitivity and up-regulates c-fos mRNA expression in the spinal dorsal horn in rats <i>Wang JS, Yu BP, Hu LD, Zhang LJ, Tian TT</i></p> <p>2637 ShRNA-mediated silencing of the TRAF6 gene inhibits LPS/TLR4 signaling <i>in vitro</i> <i>Chen F, Sun JM, He SS, Pang R, Xu JJ, Dong JH</i></p>
<b>CLINICAL RESEARCH</b>	2644 Correlation of expression of Nanog, Oct-4 and SOX-2 with tumor metastasis in colonic cancer <i>Li N, Deng WY, Ma YH, Chen XB, Han LL, Lv HF, Chen BB, Luo SX</i>
<b>REVIEW</b>	2649 Progress in understanding the role of neuromodulation in the pathogenesis of functional gastrointestinal disorders <i>Ni M, Ding YJ, Ding SQ</i>
<b>RAPID COMMUNICATION</b>	<p>2654 Protective effect of Jinhuangyidan Granules on liver injury in rats with severe acute pancreatitis <i>Zhao LX, Ma XM, Cao LY, Liu SQ, Fu QJ, Zhang QS</i></p> <p>2660 Establishment of a CBRH7919 cell line expressing rat IL-2 and B7-1 <i>Shi YP, Guo Y, Li HP, Shen JJ, Yang JY</i></p>
<b>CLINICAL PRACTICE</b>	<p>2664 Treatment of reflux esophagitis with Jiangni decoction: an analysis of 150 cases <i>Chen YQ, Liu WL, Li XL</i></p> <p>2668 Clinical significance of serum levels of soluble E-cadherin in patients with gastric carcinoma <i>Zhao Y, Zhou YN, Ran JT, Zou SJ, Li Q, Chen ZF</i></p> <p>2673 Clinical significance of serum levels of tumor type M2-pyruvate kinase and heat shock protein 90<math>\alpha</math> in patients with gastric cancer <i>Liu ZG, Song YC, Sun RF, Lei GY</i></p> <p>2679 Fluorescence <i>in situ</i> hybridization versus immunohistochemistry in the detection of Her-2 gene amplification and protein expression in gastric cancer <i>Liu XZ, Chen M, Zhang JJ, Dong H, Liu WJ</i></p> <p>2684 Regular hepatic segmentectomy for giant hemangioma of the liver: an analysis of 26 cases <i>Feng W, Qiu YD</i></p> <p>2688 Biliary complications in recipients after living donor liver transplantation: influencing factors and imaging manifestations <i>Liu XJ, Li JX, Huang ZX, Chen GW, Li C, Song B</i></p>

	2693 EUS for diagnosis of malignant biliary stricture: an analysis of 13 cases <i>Li DY, Qin MF, Wang ZY</i>
<b>APPENDIX</b>	2696 Instructions to authors of World Chinese Journal of Digestology 2701 Meeting events calendar in 2011
<b>ACKNOWLEDGMENT</b>	2702 Acknowledgments to reviewers of World Chinese Journal of Digestology
<b>COVER</b>	<i>Wang WJ, Yang QH, Feng GF, Wang YP, He XM, Zhang YP, Yang XP, Yan HZ, Huang J, Li GQ, Zhao YF, Yang XL, Shen CH.</i> Effect of Shuganjianpifang on cardiac diastolic function and inflammatory factors in rats with nonalcoholic steatosis hepatitis. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2011; 19(25): 2615-2622 <a href="http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/2615.asp">http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/2615.asp</a>
<b>RESPONSIBLE EDITORS FOR THIS ISSUE</b>	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** September 8, 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: [wjgd@wjgnet.com](mailto:wjgd@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: [wjgd@wjgnet.com](mailto:wjgd@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](http://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*

# 胃癌实验模型建立的研究现况

郭凌云, 刘涛, 李玉民

郭凌云, 兰州大学第二临床医学院 甘肃省兰州市 730030  
刘涛, 李玉民, 兰州大学第二医院 甘肃省消化系统肿瘤重点实验室 甘肃省兰州市 730030  
国家自然科学基金资助项目, No. 30870364  
兰州大学中央高校基本科研业务费专项资金资助项目, No. lzujbky-2010-207  
兰州大学第二医院院内基金资助项目, No. YJ2010-14  
作者贡献分布: 本文综述由郭凌云和刘涛共同完成; 李玉民审校。  
通讯作者: 李玉民, 教授, 主任医师, 730030, 甘肃省兰州市, 兰州大学第二医院普外科, 甘肃省消化系统肿瘤重点实验室。  
liymin@lzu.edu.cn  
电话: 0931-8942744 传真: 0931-8942744  
收稿日期: 2011-04-27 修回日期: 2011-06-21  
接受日期: 2011-06-28 在线出版日期: 2011-09-08

## Animal models of gastric cancer

Ling-Yun Guo, Tao Liu, Yu-Min Li

Ling-Yun Guo, the Second Clinical Medical College of Lanzhou University, Lanzhou 730030, Gansu Province, China  
Tao Liu, Yu-Min Li, the Second Hospital of Lanzhou University; Key Laboratory of Digestive System Tumors, Lanzhou 730030, Gansu Province, China  
Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30870364; the Fundamental Research Funds for the Central Universities, No. lzujbky-2010-207; and the Fund of the Second Hospital of Lanzhou University, No. YJ2010-14  
Correspondence to: Yu-Min Li, Professor, Department of General Surgery, the Second Hospital of Lanzhou University; Key Laboratory of Digestive System Tumors, Lanzhou 730030, Gansu Province, China. liym@lzu.edu.cn  
Received: 2011-04-27 Revised: 2011-06-21  
Accepted: 2011-06-28 Published online: 2011-09-08

## Abstract

Gastric cancer is the second most common cause of cancer-related mortality (9.7% of the total) worldwide. Gastric carcinogenesis is a multiple-step process that involves multiple factors, such as bacteria, immune response and host factors. Animal models play a crucial role in the research of the biological behavior, diagnosis and treatment of gastric cancer. In this article we will review current advances in the development of animal models of gastric cancer in terms of microorganism-induced models, chemical carcinogen-induced models, tumor cell implantation, genetically modified models and *in silico* models.

**Key Words:** Gastric cancer; Animal models; Genetically modified model; *Helicobacter pylori*

Guo LY, Liu T, Li YM. Animal models of gastric cancer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(25): 2609-2614

## 摘要

胃癌死亡率居全球恶性肿瘤第二位, 占癌症总死亡率的9.7%。胃癌的发生是多步骤、多因素的, 诸如致病细菌、宿主遗传因素和免疫应答等。动物模型在研究胃癌生物学行为和临床诊治过程中占有重要地位。本文将分别从微生物原位诱发、化学致癌剂原位诱发、癌细胞定植、转基因模型和计算机模拟五方面重点阐述胃腺癌模型建立的现况。

**关键词:** 胃癌; 动物模型; 转基因; 幽门螺杆菌

郭凌云, 刘涛, 李玉民. 胃癌实验模型建立的研究现况. 世界华人消化杂志 2011; 19(25): 2609-2614  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/2609.asp>

## 0 引言

胃癌是最常见的恶性肿瘤之一<sup>[1]</sup>。众多实验为胃癌临床诊断治疗的研究提供基础依据, 胃癌模型建立无疑是胃癌实验研究的必要前提。自1902年Fibiger发现“肿瘤螺旋体”慢性刺激大鼠可诱发胃癌之, 后学者发现这种生物并非造成肿瘤的主要原因<sup>[2]</sup>, 1970年Satio等<sup>[3]</sup>用N-甲基-N-硝基-N-亚硝基胍(MNNG)诱发胃癌癌前病变, 1997年Lee等<sup>[4]</sup>鉴定幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *H.pylori*)悉尼菌株(SS1)能长期定植于小鼠并缓慢诱发胃癌, 至21世纪初转基因动物的运用, 展示了胃癌模型建立研究发展的漫长过程。胃癌模型建立使研究胃癌发病机制、致病机制和诊治方法更加便捷与完善。

## 1 微生物原位诱发

自澳大利亚学者Warren和Marshall发现*H.pylori*至今, *H.pylori*与胃癌的关系虽尚未完全阐明<sup>[5,6]</sup>, 但众多研究证明*H.pylori*与慢性胃炎、胃溃疡、

## ■背景资料

胃癌实验模型是胃癌基础与临床研究工作中的前提, 目前尚无一种模型可以完全模拟胃癌的发病过程, 因此在特定的实验研究中, 合理选择实验模型是至关重要的。

## ■同行评议者

王振宁, 教授, 中国医科大学附属第一医院肿瘤外科; 杜雅菊, 主任医师, 哈尔滨医科大学附属第二医院消化内科



## ■ 研发前沿

近年来转基因胃癌模型在国内外发展迅速,成为动物实验研究的热点。计算机模拟,为新型研究方式,有待多学科共同研究发展,同时也为医学研究开辟一条新的道路。

表 1 不同菌株、感染动物及诱发时间胃癌发生率对比

年份	<i>H.pylori</i> 菌株	感染动物	诱发时间(wk)	胃癌发生率(%)	文献来源
1998	ATCC-43504	MGs	72	40.0(2/5)	[13]
1998	TN2GF4	MGs	62	37.0(10/27)	[7]
2003	ATCC-43504	MGs	84	18.2(2/11)	[14]
2003	<i>H.pylori</i> 161(临床株)	MGs	84	16.7(1/6)	[14]
2010	SS-1	C57BL/6 mice	72	22.2(2/9)	[15]

黏膜萎缩、肠化生和胃癌组织学变化有明显相关性。Watanabe等<sup>[7]</sup>使用*H.pylori*单因素诱导出蒙古沙鼠(Mongolian gerbils, MGs)胃腺癌,提供了*H.pylori*感染与胃癌发生的直接证据。该模型可以复制与人类相似的致病过程,符合胃癌形成的病理变化过程,不同时段病理学切片基本遵循Correa提出的“*H.pylori*感染-慢性胃炎-萎缩、肠化-异型增生-分化型腺癌”途径<sup>[8]</sup>,可用于研究和探讨胃癌发生过程中病原体、宿主和环境因素的致癌作用。由于菌株<sup>[9]</sup>、实验动物、实验室环境和操作水平等因素,胃癌诱发率不等(表1),但共同点为均可诱发胃腺癌,其他类型胃肿瘤尚未见报道。也有学者<sup>[10,11]</sup>使用少量致癌剂如MNNG间歇灌胃诱发胃癌发生,不仅缩短了造模时间,而且提高了胃癌发生率。其他实验动物如大鼠、悉生猪、悉生狗、非人类灵长动物、猫、雪貂等也可用于*H.pylori*感染模型,但是存在不易定植,来源少,饲养条件要求高,动物庞大,经费昂贵,技术复杂等问题。限于MGs提供来源,有文献报道<sup>[12]</sup>*H.felis*感染C57BL/6可获得胃癌类似发生的病理过程,但*H.felis*不能完全替代*H.pylori*。

## 2 化学致癌剂原位诱发

化学物质诱发胃癌的研究始于20世纪40年代,1967年Sugimura等<sup>[16]</sup>应用N-甲基-N'-基-N-亚硝基胍(MNNG)诱发Wistar大鼠胃腺癌,1977年胡素坤等<sup>[17]</sup>应用甲基胆蒽(MCA)诱发小鼠胃癌。其致癌机制尚未完全阐明,可能与损伤DNA链、引起DNA甲基化、改变细胞核内蛋白结构或抑制DNA聚合酶和核糖核酸酶有关。

2.1 MNNG 亚硝基化合物及其前体物易渗透胃幽门部和胃底黏膜,由于胃对其转化失活能力差,对诱发胃癌具有特异性。国内外常用对MNNG敏感的Wistar大鼠进行研究,长期饮用溶有MNNG的水溶液或用其灌胃可诱导出胃腺癌。这种方法简便,特异性较高,重复性好,因此

用于阐明化学致癌剂与胃癌的关系,评价药物效果,筛选疫苗的抗原、治疗效果及免疫作用的研究。在应用MNNG基础上,也可多因素诱发,如利于致癌剂溶解渗透作用的吐温20<sup>[18]</sup>,非胃黏膜保护作用的维生素D3<sup>[18]</sup>,高胃泌素血症<sup>[19]</sup>,高血糖<sup>[20]</sup>,刺激胃黏膜作用的高张盐水、乙醇、硝酸/亚硝酸盐、醋酸、胆汁、或胃部分切除等<sup>[11,18]</sup>,使胃癌动物模型与临床胃癌发病机制更为相近,此法具有造模周期短,癌发生率较高的优点,但存在动物死亡率升高的弊端。

2.2 其他致癌剂 用于胃癌模型的致癌剂除MNNG外,常用的还有N-甲基亚硝基胍(MNU)、甲基胆蒽(MCA)、二乙基亚硝胺(DEN)<sup>[21]</sup>等。前者为直接致癌剂,是较强的致畸、致突变和诱癌剂,其致癌机制一般认为与其烷化核酸的程度有关。上述致癌剂所诱发胃癌组织形态与人类胃癌相似,具有周期短的优点。早期浸润癌约2 wk形成,6-8 wk达到诱癌高峰。但是不能排除造模所用的致癌物质对动物机体免疫反应的持续影响,因其对胃腺癌诱发率较低,且手术要求高,如将浸有致癌剂的手术线缝扎固定在胃黏膜上,因此此法较MNNG少采用。

有学者<sup>[10, 22]</sup>在上述胃癌造模过程中加入*H.pylori*,可获得较高胃腺癌发生率。在此研究基础上,Maruta等<sup>[23,24]</sup>研究表明在胃癌发生过程中*H.pylori*仅为“启动子”,而非“引发剂”,其他环境因素(如MNU)则发挥重要作用。

## 3 癌株移植

3.1 原位移植 在各种植入途径中,只有将肿瘤移植于相应受体器官,即原位移植才能诱导类似人类肿瘤的转移过程。Yamaguchi等<sup>[25,26]</sup>将胃癌AZL5G细胞株制成单细胞悬液接种于裸鼠胃壁内,建立人胃癌移植的淋巴转移和肝转移模型,证明受体器官微环境对肿瘤的转移行为起重要作用。Furukawa等<sup>[27]</sup>首先运用原位移植术成功地

表 2 主要胃癌转基因动物模型对比

转基因型	病变出现时间	原位癌	侵袭	转移	胃酸缺乏	高胃泌素血症	文献来源
INS-GAS	24 mo	Y	N	N	N	Y	[35]
TFF1-/-	1 wk	Y	Y	N	N	×	[36]
CEA/SV40 transgenic	50 d	Y	Y	N	×	×	[37]
SMAD4+/-	12 mo	Y	Y	N	×	×	[38]
H/K-ATPase α subunit-/-	3 mo	N	N	N	Y	Y	[42]
MTH1-/-	×	Y	×	×	×	×	[39]

Y: yes; N: not; ×: 未见相关报道.

将胃癌新鲜组织块直接移植于裸鼠的胃壁, 这一模型不仅完整保持人胃癌组织结构和超微结构特征, 而且能完全模拟人类胃癌的发展过程, 使在人体外进行胃癌转移机制的研究成为可能. 前者称为癌细胞悬液原位移植, 后者称为整瘤组织块原位移植, 即胃癌原位移植发展的两个方面.

癌细胞悬液原位移植成瘤率和转移率尚不满意, 可能是肿瘤细胞经酶消化处理后, 细胞表面结构遭到破坏, 导致恶性肿瘤生物学行为和自然属性改变, 对肿瘤细胞的生长与转移有一定影响. 整瘤组织块原位移植又称转移鼠模型, 他既具有原位移植的优点, 又保持癌组织的完整结构, 所以原位移植成功率、转移率、荷瘤鼠中位生存期等指标都优于前两者, 能更好地模拟临床肿瘤发生发展过程. 胃癌主要通过淋巴道转移, 后期通过血道转移, 最能代表胃癌的生长转移特点, 可作为人胃癌转移实验研究的理想模型.

上述实验中实验对象均为BALB/C-nu/nu小鼠, 由于价格昂贵, 近年来有学者改进为替代模型, 如免疫抑制模型<sup>[28]</sup>, 在正常免疫小鼠肾包膜下移植, 手术摘除小鼠胸腺并采用全身放射法, 以及阿糖胞苷预先保护, 无须移植骨髓. 缺点是他只适应于周期较短的实验, 动物若渡过急性期, 免疫功能逐渐恢复, 则成瘤率明显下降.

3.2 细胞悬液皮下种植、腹腔种植及脾内种植  
皮下种植目前主要用作癌症药物研究, 但是此种方式破坏了癌组织的原有结构, 改变了肿瘤生物学行为、自然属性以及受体的免疫形式, 使实验结果与人类肿瘤细胞移植生长和转移的自然过程不相吻合, 且几乎不发生远处转移<sup>[29-31]</sup>. 为了模拟肿瘤的转移, 腹膜转移作为一种特殊转移类型, 其机制与远处脏器血行或淋巴道转

移不同. Nishimori等<sup>[32]</sup>采用瘤细胞悬液腹腔内注射建立腹膜转移模型. 脾内种植的方法最初是为模拟远处脏器的血行转移, 但不能模拟胃癌转移的完整过程, 也不能反映癌转移的生物学特性, 与临床实践有较大差距, 故现已很少采用.

#### 4 转基因动物模型

转基因动物模型通过精确地失活某些基因或增强某些基因的表达制作各种人类疾病的动物模型, 对研究基因突变而引起的遗传疾病发病机制十分有效. 由于小鼠个体小, 种类多, 繁殖快, 转基因技术容易等特点, 转基因小鼠得到广泛应用. 小鼠自发瘤在组织学和来源方面与人类肿瘤有相似之处, 因此应用较多. 在没有外界因素刺激的情况下, 关键途径的单个基因改变<sup>[33]</sup>也可使宿主对胃癌产生易感性, 从而发生胃癌. 已有研究证实(表2), INS-GAS转基因小鼠胃泌素循环水平提高, 可自发地发生萎缩性胃炎、肠化生和不典型增生<sup>[34]</sup>, 最终有75%的20个月龄小鼠发生了胃腺癌<sup>[35]</sup>. TFF(trefoil factor)在黏膜损伤修复过程中起重要作用, 该基因被敲除的小鼠在5个月时, 有30%发展为上皮内和黏膜内多点胃癌<sup>[36]</sup>. CEA/SV40T转基因小鼠, 50 d时100%在幽门部发展为多点侵袭胃癌, 100-130 d, 均出现幽门梗阻<sup>[37]</sup>. Smad4是一种细胞内的TGF-β信号转导因子, 该基因被敲除的杂合子小鼠在12-18 mo时发展为具有侵袭性的幽门窦肿瘤<sup>[38]</sup>. MTH1编码8-oxo-dGTP酶, 一种可减少氧化DNA损伤的酶, 缺少此基因的小鼠, 在18 mo时有少数(3%)自然发展为胃癌<sup>[39]</sup>. 转基因胃癌模型是直接调控胃癌的相关基因转染到动物胚胎中而形成肿瘤, 其形成肿瘤的形态特征与人类肿瘤的自然发生极为相似, 且发生于特定组织, 特异性很高<sup>[40]</sup>, 因此转基因动物在胃癌形成、发展机制,

#### ■ 相关报道

Watanabe等首次报道单独用*H. pylori* TN2GF4菌株接种5周龄SPF级♂MGs, 在第62周, 37%的MGs幽门腺区发生高分化肠型腺癌. 证明了*H. pylori*感染后发生肠化生和胃癌发生密切相关, 胃上皮细胞凋亡和增殖增加了细胞变异机会.

## ■应用要点

文章重点从微生物原位诱发、化学致癌剂原位诱发、癌细胞定植、转基因胃癌模型进行叙述,可以为胃癌实验研究动物模型的建立提供参考依据。

表 3 常用胃癌动物模型对比

动物模型	优势	劣势	用途
<i>H.pylori</i> /MGs	MGs自然感染率低,存活时间长,感染后易出现胃部的组织学病变。多菌株均能诱发	诱发时间长,平均60 wk	胃癌发生过程中病原体、宿主和环境因素的致癌作用研究
MNNG/Wistar rat	周期短,癌发生率较高,简便,重复性好	病死率高,实验周期短,不能完整模拟胃癌发病过程	评价药物根除的效果,疫苗的抗原筛选及治疗性免疫学研究
癌细胞悬液原位接种	操作较为简单	恶性肿瘤生物学行为和自然属性改变,影响生长与转移。原位成瘤率和转移率低	诱导类似人类肿瘤的转移过程
完整瘤组织块原位接种	原位移植成功率、转移率、荷瘤鼠中位生存期,能模拟临床肿瘤发生发展过程	手术复杂,成活率低	胃癌生长转移研究
癌细胞悬液皮下接种	简便易行	生物学行为和自然属性改变,几乎不发生远处转移	肿瘤药物疗效判定,可疑致癌因子作用验证,肿瘤发病学、生物学特性研究
转基因法	形态特征与人自然发生的肿瘤极为相似,特异性很高	转移率低、费用高昂、技术复杂	胃癌浸润转移的研究 探讨信号转导通路、Hp在胃癌形成中的相互作用,癌前状态研究

尤其是信号通路研究<sup>[41]</sup>中具有独特的优势。但是转基因动物模型制作成本较高,技术难度较大,此类模型在我国大多数实验室尚难以开展。

## 5 计算机模拟

计算机模拟在癌症研究,尤其胃癌研究领域刚刚起步,尚未见大量相关文献报道。但由于*H.pylori*的完整基因组序列已知<sup>[43]</sup>,相信此类模型在今后有望得到快速发展。

## 6 结论

建立成熟稳定的胃癌动物模型对肿瘤产生的分子机制、发病机制、浸润、转移以及抗癌药物筛选的研究中具有重要作用。理想的胃癌动物模型应具备致癌方法简单易行、快速经济、重复性好,客观指标明确,病理变化周期缩短,诱发胃癌的病理类型、生物学行为、镜下表现及组织化学改变等与人相类似实验动物模型。但目前胃癌模型的建立和检测上均未达到理想的效果,以上所述模型制作方法均各有优劣(表3),在选择胃癌模型建立时,应根据研究目的和具体实验环境而定,建立理想的胃癌实验模型。

## 7 参考文献

- GLOBOCAN 2008 cancer fact sheet. Available from: <http://globocan.iarc.fr/factsheets/cancers/stomach.asp>
- Petithory JC, Théodorides J, Brumpt L. [A challenged Nobel Prize: Johannes Fibiger, 1926]. *Hist Sci*

*Med* 1997; 31: 87-95

- Saito T, Sugimura T. [Progress in studies of experimental stomach cancer induced by nitrosoguanidine]. *Gan No Rinsho* 1970; 16: 503-512
- Lee A, O'Rourke J, De Ungria MC, Robertson B, Daskalopoulos G, Dixon MF. A standardized mouse model of *Helicobacter pylori* infection: introducing the Sydney strain. *Gastroenterology* 1997; 112: 1386-1397
- Malfertheiner P, Bornschein J, Selgrad M. Role of *Helicobacter pylori* infection in gastric cancer pathogenesis: a chance for prevention. *J Dig Dis* 2010; 11: 2-11
- Ding SZ, Goldberg JB, Hatakeyama M. *Helicobacter pylori* infection, oncogenic pathways and epigenetic mechanisms in gastric carcinogenesis. *Future Oncol* 2010; 6: 851-862
- Watanabe T, Tada M, Nagai H, Sasaki S, Nakao M. *Helicobacter pylori* infection induces gastric cancer in mongolian gerbils. *Gastroenterology* 1998; 115: 642-648
- Correa P. Human gastric carcinogenesis: a multistep and multifactorial process--First American Cancer Society Award Lecture on Cancer Epidemiology and Prevention. *Cancer Res* 1992; 52: 6735-6740
- Kawazoe T, Sakagami T, Nakajima K, Hori K, Fukuda Y, Matsumoto T, Miwa H. Role of bacterial strain diversity of *Helicobacter pylori* in gastric carcinogenesis induced by N-methyl-N-nitrosourea in Mongolian gerbils. *Helicobacter* 2007; 12: 213-223
- Sugiyama A, Maruta F, Ikeno T, Ishida K, Kawasaki S, Katsuyama T, Shimizu N, Tatematsu M. *Helicobacter pylori* infection enhances N-methyl-N-nitrosourea-induced stomach carcinogenesis in the Mongolian gerbil. *Cancer Res* 1998; 58: 2067-2069
- Kuroiwa Y, Ishii Y, Umemura T, Kanki K, Mitsumori K, Nishikawa A, Nakazawa H, Hirose M. Combined treatment with green tea catechins and sodium nitrite selectively promotes rat forestomach

- carcinogenesis after initiation with N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine. *Cancer Sci* 2007; 98: 949-957
- 12 Cai X, Carlson J, Stoicov C, Li H, Wang TC, Houghton J. Helicobacter felis eradication restores normal architecture and inhibits gastric cancer progression in C57BL/6 mice. *Gastroenterology* 2005; 128: 1937-1952
- 13 Honda S, Fujioka T, Tokieda M, Satoh R, Nishizono A, Nasu M. Development of Helicobacter pylori-induced gastric carcinoma in Mongolian gerbils. *Cancer Res* 1998; 58: 4255-4259
- 14 郑青, 陈晓宇, 施尧, 萧树东. 幽门螺杆菌长期感染蒙古沙土鼠建立胃癌模型的研究. *中华消化杂志* 2003; 23: 92-96
- 15 李琦, 刘宁宁, 赵成根, 周宁, 王炎, 孙珏, 范忠泽. 幽门螺杆菌长期感染诱发C57BL/6小鼠胃癌模型的建立及对血管新生的影响. *世界华人消化杂志* 2010; 18: 1637-1642
- 16 Sugimura T, Fujimura S. Tumour production in glandular stomach of rat by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine. *Nature* 1967; 216: 943-944
- 17 胡素坤, 张子奕, 吴德林, 王建喜. 用甲基胆蒽诱发小鼠胃癌的研究. *医学研究杂志* 1976: 22-23
- 18 高国林, 杨原, 任彩文, 杨思凤. MNNG加吐温20和维生素D<sub>3</sub>对大鼠前胃的影响. *世界华人消化杂志* 1999; 7: 763-765
- 19 Fossmark R, Qvigstad G, Martinsen TC, Hauso Ø, Waldum HL. Animal models to study the role of long-term hypergastrinemia in gastric carcinogenesis. *J Biomed Biotechnol* 2011; 2011: 975479
- 20 Kodama Y, Ozaki K, Sano T, Matsuura T, Narama I. Enhanced tumorigenesis of forestomach tumors induced by N-Methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine in rats with hypoinsulinemic diabetes. *Cancer Sci* 2010; 101: 1604-1609
- 21 Binato M, Kruehl Schmidt M, Silveira Volkweis B, Behrend Silva Ribeiro G, Isabel Edelweiss M, Ricachenevsky Gurski R. Mouse model of diethyl-nitrosamine-induced gastric cancer. *J Surg Res* 2008; 148: 152-157
- 22 Magari H, Shimizu Y, Inada K, Enomoto S, Tomeki T, Yanaoka K, Tamai H, Arai K, Nakata H, Oka M, Utsunomiya H, Tsutsumi Y, Tsukamoto T, Tatematsu M, Ichinose M. Inhibitory effect of etodolac, a selective cyclooxygenase-2 inhibitor, on stomach carcinogenesis in Helicobacter pylori-infected Mongolian gerbils. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 334: 606-612
- 23 Maruta F, Sugiyama A, Ishida K, Ikeno T, Murakami M, Kawasaki S, Ota H, Tatematsu M, Katsuyama T. Timing of N-methyl-N-nitrosourea administration affects gastric carcinogenesis in Mongolian gerbils infected with Helicobacter pylori. *Cancer Lett* 2000; 160: 99-105
- 24 Tatematsu M, Tsukamoto T, Toyoda T. Effects of eradication of Helicobacter pylori on gastric carcinogenesis in experimental models. *J Gastroenterol* 2007; 42 Suppl 17: 7-9
- 25 Yamaguchi K, Ura H, Yasoshima T, Shishido T, Denno R, Hirata K. Establishment and characterization of a human gastric carcinoma cell line that is highly metastatic to lymph nodes. *J Exp Clin Cancer Res* 2000; 19: 113-120
- 26 Yamaguchi K, Ura H, Yasoshima T, Shishido T, Denno R, Hirata K. Liver metastatic model for human gastric cancer established by orthotopic tumor cell implantation. *World J Surg* 2001; 25: 131-137
- 27 Furukawa T, Kubota T, Watanabe M, Kuo TH, Kitajima M, Hoffman RM. Differential chemosensitivity of local and metastatic human gastric cancer after orthotopic transplantation of histologically intact tumor tissue in nude mice. *Int J Cancer* 1993; 54: 397-401
- 28 王瑜, 田晶, 李科, 李艳, 姚敏捷. 免疫抑制小鼠肾包膜下胃癌移植瘤模型的建立及微血管观察. *第四军医大学学报* 2004; 25: 571-573
- 29 Toller IM, Hitzler I, Sayi A, Mueller A. Prostaglandin E2 prevents Helicobacter-induced gastric preneoplasia and facilitates persistent infection in a mouse model. *Gastroenterology* 2010; 138: 1455-1467
- 30 耿敬妹, 薛英威, 刘秀华, 刘立人, 高晓敏, 赵家宏. 人消化系癌裸鼠移植瘤株及体外细胞系的建立. *实用肿瘤学杂志* 2000; 14: 162-164
- 31 Bhargava S, Hotz B, Buhr HJ, Hotz HG. An orthotopic nude mouse model for preclinical research of gastric cardia cancer. *Int J Colorectal Dis* 2009; 24: 31-39
- 32 Nishimori H, Yasoshima T, Denno R, Shishido T, Hata F, Okada Y, Ura H, Yamaguchi K, Isomura H, Sato N, Hirata K. A novel experimental mouse model of peritoneal dissemination of human gastric cancer cells: different mechanisms in peritoneal dissemination and hematogenous metastasis. *Jpn J Cancer Res* 2000; 91: 715-722
- 33 Shibata W, Takaishi S, Muthupalani S, Pritchard DM, Whary MT, Rogers AB, Fox JG, Betz KS, Kaestner KH, Karin M, Wang TC. Conditional deletion of IkappaB-kinase-beta accelerates helicobacter-dependent gastric apoptosis, proliferation, and preneoplasia. *Gastroenterology* 2010; 138: 1022-1034. e1-e10
- 34 Lee CW, Rickman B, Rogers AB, Muthupalani S, Takaishi S, Yang P, Wang TC, Fox JG. Combination of sulindac and antimicrobial eradication of Helicobacter pylori prevents progression of gastric cancer in hypergastrinemic INS-GAS mice. *Cancer Res* 2009; 69: 8166-8174
- 35 Wang TC, Dangler CA, Chen D, Goldenring JR, Koh T, Raychowdhury R, Coffey RJ, Ito S, Varro A, Dockray GJ, Fox JG. Synergistic interaction between hypergastrinemia and Helicobacter infection in a mouse model of gastric cancer. *Gastroenterology* 2000; 118: 36-47
- 36 Lefebvre O, Chenard MP, Masson R, Linares J, Dierich A, LeMeur M, Wendling C, Tomasetto C, Chambon P, Rio MC. Gastric mucosa abnormalities and tumorigenesis in mice lacking the pS2 trefoil protein. *Science* 1996; 274: 259-262
- 37 Thompson J, Epting T, Schwarzkopf G, Singhofen A, Eades-Perner AM, van Der Putten H, Zimmermann W. A transgenic mouse line that develops early-onset invasive gastric carcinoma provides a model for carcinoembryonic antigen-targeted tumor therapy. *Int J Cancer* 2000; 86: 863-869
- 38 Takaku K, Miyoshi H, Matsunaga A, Oshima M, Sasaki N, Taketo MM. Gastric and duodenal polyps in Smad4 (Dpc4) knockout mice. *Cancer Res* 1999; 59: 6113-6117
- 39 Tsuzuki T, Egashira A, Igarashi H, Iwakuma T, Nakatsuru Y, Tominaga Y, Kawate H, Nakao K, Nakamura K, Ide F, Kura S, Nakabeppu Y, Katsuki M, Ishikawa T, Sekiguchi M. Spontaneous tumorigenesis in mice defective in the MTH1 gene encoding 8-oxo-dGTPase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98: 11456-11461

## 同行评价

本文从多个角度介绍了胃癌实验模型的研究现状,具有一定的参考价值。



- 40 Oshima H, Oshima M. Mouse models of gastric tumors: Wnt activation and PGE2 induction. *Pathol Int* 2010; 60: 599-607
- 41 Oshima H, Oguma K, Du YC, Oshima M. Prostaglandin E2, Wnt, and BMP in gastric tumor mouse models. *Cancer Sci* 2009; 100: 1779-1785
- 42 Spicer Z, Miller ML, Andringa A, Riddle TM, Duffy JJ, Doetschman T, Shull GE. Stomachs of mice lacking the gastric H,K-ATPase alpha -subunit have achlorhydria, abnormal parietal cells, and ciliated metaplasia. *J Biol Chem* 2000; 275: 21555-21565
- 43 Tomb JF, White O, Kerlavage AR, Clayton RA, Sutton GG, Fleischmann RD, Ketchum KA, Klenk HP, Gill S, Dougherty BA, Nelson K, Quackenbush J, Zhou L, Kirkness EF, Peterson S, Loftus B, Richardson D, Dodson R, Khalak HG, Glodek A, McKenney K, Fitzgerald LM, Lee N, Adams MD, Hickey EK, Berg DE, Gocayne JD, Utterback TR, Peterson JD, Kelley JM, Cotton MD, Weidman JM, Fujii C, Bowman C, Watthey L, Wallin E, Hayes WS, Borodovsky M, Karp PD, Smith HO, Fraser CM, Venter JC. The complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature* 1997; 388: 539-547

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》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<sup>H</sup>, *H pylori*不能写成HP, T<sub>1/2</sub>不能写成tl/2或T<sub>1/2</sub>, V<sub>max</sub>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*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*<sub>max</sub>, *C*<sub>max</sub>, *Vd*, *T*<sub>1/2</sub> *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.

# 疏肝健脾方药对NASH大鼠心脏舒张功能及炎症因子的影响

王文晶, 杨钦河, 冯高飞, 王彦平, 何秀敏, 张玉佩, 杨雪萍, 闫海震, 黄进, 李光秋, 赵亚凤, 杨晓蕾, 沈灿宏

王文晶, 杨钦河, 冯高飞, 王彦平, 何秀敏, 张玉佩, 闫海震, 黄进, 李光秋, 赵亚凤, 杨晓蕾, 沈灿宏, 暨南大学医学院 广东省广州市 510632

杨雪萍, 河南省偃师市人民医院消化内科 河南省偃师市 471900

王文晶, 暨南大学医学院中西医结合临床专业在读硕士研究生, 主要从事中西医结合防治慢性肝病的研究。

国家自然科学基金资助项目, No. 30973694

国家大学生创新性实验计划基金资助项目, No. 091055930

**作者贡献分布:** 本课题由杨钦河、张玉佩、王文晶、冯高飞及何秀敏共同设计; 研究过程由杨钦河与张玉佩指导, 王文晶、王彦平、冯高飞、何秀敏、李光秋、赵亚凤、杨晓蕾及沈灿宏操作完成; 研究所用试剂及分析工具由闫海震、黄进及杨雪萍提供; 数据分析由王文晶与王彦平完成; 本论文写作由王文晶完成, 杨钦河修改指导。

**通讯作者:** 杨钦河, 教授, 博士生导师, 510632, 广东省广州市黄埔大道西601号暨南大学医学院中医系. tyangqh@jnu.edu.cn  
电话: 020-85226197

收稿日期: 2011-06-30 修回日期: 2011-08-26

接受日期: 2011-09-01 在线出版日期: 2011-09-08

## Effect of Shuganjianpifang on cardiac diastolic function and inflammatory factors in rats with nonalcoholic steatosis hepatitis

Wen-Jing Wang, Qin-He Yang, Gao-Fei Feng, Yan-Ping Wang, Xiu-Min He, Yu-Pei Zhang, Xue-Ping Yang, Hai-Zhen Yan, Jin Huang, Guang-Qiu Li, Ya-Feng Zhao, Xiao-Lei Yang, Can-Hong Shen

Wen-Jing Wang, Qin-He Yang, Gao-Fei Feng, Yan-Ping Wang, Xiu-Min He, Yu-Pei Zhang, Hai-Zhen Yan, Jin Huang, Guang-Qiu Li, Ya-Feng Zhao, Xiao-Lei Yang, Can-Hong Shen, School of Medicine, Jinan University, Guangzhou 510632, Guangdong Province, China  
Xue-Ping Yang, Department of Gastroenterology, Yanshi City People's Hospital, Yanshi 471900, Henan Province, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30973694; and the National University Student Innovative Program of China, No. 091055930

Correspondence to: Qin-He Yang, Professor, Department of Traditional Chinese Medicine, School of Medicine, Jinan University, Guangzhou 510632, Guangdong Province, China. tyangqh@jnu.edu.cn

Received: 2011-06-30 Revised: 2011-08-26

Accepted: 2011-09-01 Published online: 2011-09-08

## Abstract

**AIM:** To investigate the effect of Shuganjianpi-

fang on cardiac diastolic dysfunction in rats with nonalcoholic steatosis hepatitis (NASH) and to explore the possible mechanisms involved.

**METHODS:** NASH was induced in rats by feeding a high-fat diet. Rats were divided into eight groups: normal control group, model group, high- and low-dose Ganfang, Pifang and Shuganjianpifang groups. After treatment for 16 weeks, stroke volume (SV), left ventricular ejection fraction (LVEF), and left ventricular diameter (LVFS) were measured to evaluate cardiac systolic function, and E/A ratio was calculated to evaluate cardiac diastolic function. Serum levels of TC, TG, HDL, and LDL, as well as TC and TG in the hepatic homogenate were detected using an automatic biochemical analyzer. Histopathological changes were observed after HE staining. Serum TNF- $\alpha$  and IL-6 levels were determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).

**RESULTS:** Compared to the normal group, rats in the model group revealed medium fatty degeneration in hepatocytes, declined cardiac diastolic function ( $1.59 \pm 0.24$  vs  $1.03 \pm 0.13$ ,  $P < 0.01$ ), increased serum levels TNF- $\alpha$  ( $13.57 \pm 4.64$  vs  $28.26 \pm 8.60$ ,  $P < 0.01$ ), IL-6 ( $59.28 \pm 71.53$  vs  $132.81 \pm 74.22$ ,  $P < 0.05$ ), TC ( $1.42 \pm 0.29$  vs  $3.82 \pm 0.91$ ,  $P < 0.01$ ), LDL ( $0.30 \pm 0.11$  vs  $0.81 \pm 0.27$ ,  $P < 0.01$ ) and hepatic levels of TC ( $0.90 \pm 0.14$  vs  $11.86 \pm 1.29$ ,  $P < 0.01$ ) and TG ( $0.75 \pm 0.38$  vs  $6.17 \pm 1.83$ ,  $P < 0.01$ ), and decreased SV, LVEF and LVFS in the model group. Compared to the model group, cardiac diastolic function was significantly improved in rats in each treatment group, especially prominent in the high-dose Shuganjianpifang group ( $1.26 \pm 0.23$  vs  $1.03 \pm 0.13$ ;  $1.35 \pm 0.15$  vs  $1.03 \pm 0.13$ , both  $P < 0.01$ ). In addition, the levels of blood and liver lipids and serum TNF- $\alpha$  and IL-6 decreased in each treatment group, especially in the high-dose Shuganjianpifang group ( $0.45 \pm 0.14$  vs  $0.83 \pm 0.26$ ;  $9.17 \pm 1.02$  vs  $11.86 \pm 1.29$ ;  $2.54 \pm 0.74$  vs  $6.17 \pm 1.83$ ;  $15.07 \pm 6.00$  vs  $28.26 \pm 8.60$ ;  $67.72 \pm 44.24$  vs  $132.81 \pm 74.22$ , all  $P < 0.01$ ).

## ■背景资料

非酒精性脂肪性肝炎是与胰岛素抵抗和遗传易感性密切相关的获性代谢疾病, 属于非酒精性脂肪性肝病的一种病理分型, 也是单纯性脂肪肝向肝纤维化、肝硬化进展的重要中间环节, 近年来非酒精性脂肪性肝炎的发病率及检出率日益增高, 并呈低龄化趋势。

## ■同行评议者

李军祥, 教授, 北京中医药大学附属东方医院消化内科

## ■研究前沿

非酒精性脂肪性肝炎作为非酒精性脂肪肝病的一种重要临床分型,是单纯性脂肪肝向肝纤维化、肝硬化、肝癌进展的重要中间环节。对非酒精性脂肪性肝炎的研究是近些年来国内外医学研究的热点。运用中医药治疗此病也已经逐渐得到广泛的重视。

**CONCLUSION:** Rats with NASH develop cardiac diastolic dysfunction. Shuganjianpifang could improve cardiac diastolic function possibly by decreasing serum levels of TNF- $\alpha$  and IL-6 in rats with NASH.

**Key Words:** Nonalcoholic steatosis; Cardiac diastolic function; Inflammatory factors; High-resolution *in vivo* image system; Rat

Wang WJ, Yang QH, Feng GF, Wang YP, He XM, Zhang YP, Yang XP, Yan HZ, Huang J, Li GQ, Zhao YF, Yang XL, Shen CH. Effect of Shuganjianpifang on cardiac diastolic function and inflammatory factors in rats with nonalcoholic steatosis hepatitis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(25): 2615-2622

## 摘要

**目的:** 探讨疏肝健脾方药对非酒精性脂肪性肝炎(nonalcoholic steatosis hepatitis, NASH)合并心脏舒张功能不全大鼠干预的作用机制。

**方法:** 采用高脂饲料喂养复制NASH大鼠实验模型,各药物组分别灌服疏肝方、健脾方和综合方(疏肝方和健脾方的合方)进行干预,16 wk后用Visual Sonics Vevo<sup>®</sup>770<sup>TM</sup>高分辨率小动物超声诊断仪检测大鼠心脏每搏输出量(SV)、左心室射血分数(LVEF)、左心室短轴缩短率(LVFS)用以评价大鼠心脏收缩功能,检测E/A比值用以评价大鼠心脏舒张功能。然后处死大鼠,腹主动脉采血,用全自动生化分析仪检测血脂及肝脂的含量;常规HE染色观察肝组织病理变化;ELISA法检测血清TNF- $\alpha$ 和IL-6的水平。

**结果:** 肝组织病理染色提示大鼠NASH造模成功;与正常对照组相比,模型组大鼠心脏舒张功能明显降低( $1.59 \pm 0.24$  vs  $1.03 \pm 0.13$ ,  $P < 0.01$ ),血清TNF- $\alpha$ 和IL-6含量显著升高( $13.57 \pm 4.64$  vs  $28.26 \pm 8.60$ ;  $59.28 \pm 71.53$  vs  $132.81 \pm 74.22$ ,  $P < 0.01$ ,  $0.05$ ),血清TC、LDL及肝组织TC、TG含量也明显升高( $1.42 \pm 0.29$  vs  $3.82 \pm 0.91$ ;  $0.30 \pm 0.11$  vs  $0.81 \pm 0.27$ ;  $0.90 \pm 0.14$  vs  $11.86 \pm 1.29$ ;  $0.75 \pm 0.38$  vs  $6.17 \pm 1.83$ , 均 $P < 0.01$ ),SV、LVEF、LVFS均比正常组有不同程度的下降;各药物组大鼠心脏舒张功能较模型组有显著改善,以健脾高剂量组、综合方高剂量组的E/A比值升高最为明显( $1.26 \pm 0.23$  vs  $1.03 \pm 0.13$ ;  $1.35 \pm 0.15$  vs  $1.03 \pm 0.13$ , 均 $P < 0.01$ );各药物组大鼠血清TNF- $\alpha$ 及IL-6含量与模型组相比明显下降,以综合方高剂量组的血清下降最为明显( $15.07 \pm 6.00$  vs  $28.26 \pm 8.60$ ;  $67.72 \pm 44.24$  vs  $132.81$

$\pm 74.22$ ,  $P < 0.01$ ,  $0.05$ );脂质代谢检测以合方高剂量组的血清TG及肝组织TC、TG下降最为明显( $0.45 \pm 0.14$  vs  $0.83 \pm 0.26$ ;  $9.17 \pm 1.02$  vs  $11.86 \pm 1.29$ ;  $2.54 \pm 0.74$  vs  $6.17 \pm 1.83$ , 均 $P < 0.01$ )。

**结论:** NASH大鼠伴有心脏舒张功能不全,疏肝健脾方药抗NASH及改善NASH大鼠心脏舒张功能可能与其降低血清中炎症因子TNF- $\alpha$ 和IL-6的水平有关。

**关键词:** 非酒精性脂肪性肝炎; 心脏舒张功能; 炎症因子; 高分辨率小动物超声诊断仪; 大鼠

王文晶, 杨钦河, 冯高飞, 王彦平, 何秀敏, 张玉佩, 杨雪萍, 闫海震, 黄进, 李光秋, 赵亚凤, 杨晓蕾, 沈灿宏. 疏肝健脾方药对NASH大鼠心脏舒张功能及炎症因子的影响. *世界华人消化杂志* 2011; 19(25): 2615-2622

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/2615.asp>

## 0 引言

非酒精性脂肪性肝病(non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD)是指除外酒精和其他明确的肝损伤因素所致的,以弥漫性肝细胞大泡性脂肪变为主要特征的临床病理综合征,包括单纯性脂肪肝(simple fatty liver, SFL)以及由其演变的脂肪性肝炎(nonalcoholic steatosis hepatitis, NASH)和肝硬化<sup>[1]</sup>,是临床上的常见病和多发病,正日益严重的影响和威胁着人们的健康。研究表明<sup>[2]</sup>,NAFLD是代谢综合征(metabolic syndrome, MS)在肝脏中的表现,而MS是导致动脉粥样硬化和临床心脑血管事件发生的重要原因。近年来,临床上发现一些严重NAFLD患者出现心脏舒张功能下降,并在随访期部分患者出现冠心病发作<sup>[3]</sup>;Villanova等<sup>[4]</sup>研究表明NAFLD患者,尤其是NASH患者10年后出现心血管疾病(cardiovascular disease, CVD)的可能性较正常人增加。NASH作为NAFLD的一种临床分型,是NAFL向肝纤维化、肝硬化、肝癌进展的重要中间环节<sup>[5,6]</sup>,其与CVD的关系如何值得深入探讨。既往的研究发现<sup>[7-9]</sup>,疏肝健脾方药可以降低肝细胞PI3Kp85 $\alpha$ 蛋白的表达、抑制Kupffer细胞ERK1/2和p38MAPK蛋白的表达及磷酸化、下调肝组织NF- $\kappa$ B p65蛋白的表达及磷酸化发挥抑制炎症、调节脂质代谢的作用从而具有良好的抗NAFLD效果。本研究通过观察NASH大鼠血清中炎症因子TNF- $\alpha$ 、IL-6水平及心功能相关指标在药物干预前后的变化,旨在探讨疏肝

健脾方药抗NASH及改善NASH大鼠心功能的作用机制。

## 1 材料和方法

1.1 材料 SPF级健康♂SD大鼠80只, 体质量(200±20) g, 购于广州中医药大学实验动物中心, 实验动物许可证号: SC×K(粤)2008-0020; 粤监证字: 2008A020。分笼饲养于室温22℃-26℃, 相对湿度60%-80%, 明暗各12 h的动物实验室内。Visual Sonics Vevo®770™高分辨率小动物超声系统: 加拿大VisualSonics公司; TNF-α测定ELISA试剂盒购于北京达科为生物技术有限公司, 其灵敏度为7.8 pg/mL, IL-6测定ELISA试剂盒购于深圳欣博盛生物科技有限公司, 其灵敏度为30 pg/mL。(1)疏肝方(柴胡疏肝散: 柴胡6 g, 川芎5 g, 枳壳5 g, 陈皮6 g, 白芍5 g, 香附5 g, 炙甘草3 g); (2)健脾方(参苓白术散: 人参15 g, 白术15 g, 茯苓15 g, 薏苡仁9 g, 砂仁6 g, 山药15 g, 桔梗6 g, 白扁豆12 g, 莲子9 g, 炙甘草9 g); (3)综合方(柴胡疏肝散与参苓白术散合方)。上述药物均为深圳华润三九医药股份有限公司中药配方颗粒剂, 购自暨南大学附属第一医院中药房。疏肝方及健脾方组成、剂量均参考第6版《方剂学》教材<sup>[10]</sup>, 综合方乃柴胡疏肝散与参苓白术散的合方。每组低剂量组药物为临床常规用量, 高剂量组药物为临床常规用量的3倍。

### 1.2 方法

1.2.1 分组及给药: 用随机数字表法将实验动物随机分为: 正常对照组(灌服生理盐水), 模型组(灌服生理盐水), 疏肝高剂量组[灌服9.6 g/(kg·d)剂量的柴胡疏肝散]、疏肝低剂量组[灌服3.2 g/(kg·d)剂量的柴胡疏肝散], 健脾高剂量组[灌服30.0 g/(kg·d)剂量的参苓白术散], 健脾低剂量组[灌服10.0 g/(kg·d)剂量的参苓白术散], 合方高剂量组[灌服35.7 g/(kg·d)剂量的柴胡疏肝散和参苓白术散合方], 合方低剂量组[灌服11.9 g/(kg·d)剂量的柴胡疏肝散和参苓白术散合方], 每组均10只。

1.2.2 造模: 大鼠NASH模型的建立参照我们以往的方法<sup>[7-9]</sup>, 并加以改进。正常对照组大鼠以基础饲料喂养, 其他各组均以高脂饲料喂养(基础饲料88%, 猪油10%, 胆固醇1.5%, 胆盐0.5%)。在施以造模因素的同时, 按照10 ml/kg·BW分别灌胃给予各组大鼠相应的药物或生理盐水, 每天2次(早晚各1次)。每天上午定时更换大鼠高温消毒饮用水和添加饲料。各组动物自由饮水进食,

分笼饲养于18℃-22℃明暗各12 h的暨南大学病理生理学动物实验室内, 每周定时称体质量1次, 根据体质量调整给药量, 连续16 wk。

1.2.3 指标检测: 各组动物于末次给药后, 禁食不禁水12 h, 所有大鼠用3%戊巴比妥钠腹腔麻醉(1 mL/kg·BW), 腹主动脉采血, 取血后迅速摘取肝脏, 距离肝边缘0.5 cm处取相同部位肝右叶组织, 用于病理检测。(1)心功能检测: 于16 wk从各组大鼠中分别随机抽取6只进行超声检查, 然后常规处死做后续检测。按Visual Sonics Vevo®770™高分辨率小动物超声诊断仪操作要求将大鼠固定于超声操作台上, 在相应超声探头与小鼠接触部位涂抹超声耦合剂, 运用系统配套RMV707B型高频超声探头在小动物超声仪器的心血管模式(cardiovascular mode)下, 设置频率为30 MHz, 对大鼠进行实时心血管超声图像采集, 二维超声指导下的胸骨旁左心室短轴M型超声心动图按标准测量左室收缩末径、左室舒张末径、每搏输出量(SV)、左室缩短分数(LVFS), 左室射血分数(LVEF)的测量于标准心尖四腔观用双平面Simpson's法获得, 利用Doppler技术获得二尖瓣口血流频谱, 并测量出二尖瓣口舒张早期峰值(E峰)与二尖瓣口舒张晚期峰值(A峰)速度, 计算其比值(E/A比值), 测量值均为连续3个心动周期测值取平均获得。以LVEF和LVFS来评价心脏的收缩功能, 以二尖瓣口血流频谱中的E/A比值评价心脏的舒张功能, 当E/A比值小于1, 即认为大鼠心脏舒张功能下降, 为舒张功能不全(DCD); (2)肝组织病理染色: 取距离肝边缘0.5 cm处相同部位肝右叶组织小块, 大小约1 cm×0.5 cm×0.5 cm, 经10%中性甲醛溶液固定标本, 常规脱水、石蜡包埋, 作3μm连续切片, 常规HE染色, 光镜下观察大鼠肝组织病理学改变; (3)脂质的检测: 腹主动脉采血, 用全自动生化分析仪检测血清TC、TG、HDL、LDL的含量。取肝组织0.1 g加入0.9 mL异丙醇中, 匀浆, 离心(4℃, 3 000 r/min, 10 min), 提取上清液, 用全自动生化分析仪检测肝组织匀浆中TC、TG的含量; (4)TNF-α、IL-6检测: 腹主动脉取血5 mL注入试管中, 摇匀4℃3 000转/min离心10 min, 取血清置于-80℃保存, 用双抗体夹心ELISA法检测TNF-α、IL-6的浓度, 具体操作严格按照说明书进行。

**统计学处理** 采用SPSS13.0统计软件进行分析, 计量资料以mean±SD表示, 多个样本间均数比较用单因素方差分析(One-Way ANOVA),  $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

### ■ 相关报道

非酒精性脂肪性肝炎是代谢综合征在肝脏中的表现, 而MS是导致动脉粥样硬化和临床心脑血管事件发生的重要原因。国内外的研究发现, 一些严重的非酒精性脂肪肝病患者的出现心脏舒张功能下降, 并在随访期部分患者出现冠心病发作, 尤其是非酒精性脂肪性肝炎患者10年后出现心血管疾病的可能性较正常人增加。



## ■创新盘点

本文以非酒精性脂肪性肝炎大鼠为研究对象,基于前期较好的研究基础,探讨疏肝健脾治法方药抗非酒精性脂肪性肝炎及改善非酒精性脂肪性肝炎大鼠心功能的作用机制,充分体现了中医药的特色与优势。

表 1 各组大鼠心功能指标的比较( $n=6$ , mean  $\pm$  SD)

分组	E/A比值	LVEF(%)	LVFS(%)
正常组	1.59 $\pm$ 0.24	75.11 $\pm$ 2.78	45.51 $\pm$ 2.65
模型组	1.03 $\pm$ 0.13 <sup>d</sup>	68.91 $\pm$ 4.42	40.20 $\pm$ 3.46
疏肝高剂量组	1.25 $\pm$ 0.11 <sup>a</sup>	74.48 $\pm$ 4.59	44.96 $\pm$ 4.12
疏肝低剂量组	1.24 $\pm$ 0.11 <sup>a</sup>	78.14 $\pm$ 5.46	48.49 $\pm$ 5.62
健脾高剂量组	1.26 $\pm$ 0.23 <sup>b</sup>	74.13 $\pm$ 10.50	45.51 $\pm$ 9.45
健脾低剂量组	1.22 $\pm$ 0.16	73.05 $\pm$ 7.89	43.92 $\pm$ 7.60
合方高剂量组	1.35 $\pm$ 0.15 <sup>b</sup>	74.59 $\pm$ 3.14	45.13 $\pm$ 3.06
合方低剂量组	1.23 $\pm$ 0.17 <sup>a</sup>	72.33 $\pm$ 3.35	42.99 $\pm$ 2.75

<sup>a</sup> $P<0.05$ , <sup>b</sup> $P<0.01$  vs 模型组; <sup>d</sup> $P<0.01$  vs 正常组。

## 2 结果

**2.1 心功能检测** 模型组大鼠的E/A比值为1.03  $\pm$  0.13明显低于正常组1.59  $\pm$  0.24( $P<0.01$ ), LVEF和LVFS也较正常组有不同程度的下降,但无统计学意义;各用药组大鼠E/A比值均较模型组升高,其中各药物组的高剂量组均比相应的低剂量组改善明显,以健脾高剂量组、综合方高剂量组升高最为显著( $P<0.01$ ),其次是合方低剂量组、疏肝高剂量组和疏肝低剂量组( $P<0.05$ )。各用药组大鼠的LVEF和LVFS也较模型组略有不同程度的升高,但均没有统计学意义(表1)。

**2.2 肝组织病理染色** 常规HE染色显示:正常对照组肝小叶结构规则,细胞索排列整齐,以中央静脉为中心成放射状向四周排列,肝窦正常,肝细胞呈多边形,边界清,无明显病变,核圆结构清晰,位于细胞中央,胞浆丰富红染,细胞质均匀,肝细胞内无脂滴沉积。模型组大鼠肝脏脂肪变性明显,肝细胞肿胀,胞浆内脂滴大小不一,以大泡性脂肪滴为主,核被挤向边缘,并可见广泛的气球样肝细胞及点灶状坏死;另可见肝索紊乱,伴肝小叶内、汇管区炎症细胞浸润,难以找到正常的肝细胞。上述改变提示NASH造模成功,呈中重度脂肪变,病理模型稳定。各药物干预组脂滴空泡有所减少,肝小叶、汇管区炎症细胞浸润情况均较模型组有不同程度的改善,其中以综合方高剂量组改善最为明显(图1)。

**2.3 脂质的检测** 与正常组相比,模型组大鼠血清中TC、LDL及肝组织中TC、TG含量均有显著升高( $P<0.01$ );与模型组相比各药物组大鼠的血脂及肝脂均有不同程度的下降,其中各药物组的高剂量组均比相应的低剂量组改变明显,以合方高剂量组的血清TG及肝组织TC、TG下降最为明显( $P<0.01$ ,表2,表3)。

**2.4 TNF- $\alpha$ 、IL-6检测** 与正常对照组相比,模型组大鼠血清TNF- $\alpha$ 、IL-6的含量均有明显升高( $P<0.01$ ,  $P<0.05$ );与模型组相比,各药物组大鼠血清TNF- $\alpha$ 、IL-6的含量有不同程度的下降,其中各药物组的高剂量组均比相应的低剂量组改变明显,以综合方高剂量组的血清TNF- $\alpha$ 、IL-6的含量下降最为明显( $P<0.01$ ,  $P<0.05$ ),综合方低剂量组、健脾方高剂量组和疏肝方高剂量组的血清TNF- $\alpha$ 含量下降较为明显( $P<0.05$ ,表4)。

## 3 讨论

胰岛素抵抗(insulin resistance, IR)是NAFLD发病的始动及中心环节<sup>[11]</sup>, 中央性肥胖是NAFLD的主要发病机制之一<sup>[12]</sup>, 而由此引发的糖脂代谢紊乱、慢性亚临床炎症状态、炎症细胞因子分泌增加、脂联素分泌减少及内皮细胞功能失调等机制使NAFLD与CVD之间相互影响相互作用<sup>[13]</sup>。近年来国内外许多前瞻性的流行病学研究发现NAFLD与CVD关系密切, NAFLD本身就可以导致CVD的发生。Hamaguchi等<sup>[14]</sup>研究发现, NAFLD患者CVD的发生率明显增加, NAFLD是CVD的独立危险因素, 并且在有MS存在的心血管事件中起关键作用。黄群等<sup>[15]</sup>研究在排除了年龄、性别和BMI的影响后发现, NASH患者DCD的发生率显著高于SFL和正常对照组, 而且前者的二尖瓣口血流频谱中E/A比值显著低于后者, 提示DCD与NASH关系密切, 通过了解NASH患者心脏的舒张功能, 或许能预测未来CVD的发生率。DCD的意义主要表现为3种类型: (1)收缩功能异常的早期表现; (2)与收缩功能异常同时存在; (3)单纯性DCD。大部分心力衰竭患者左室舒张功能异常早于收缩功能异常, 其中舒张功能不全的占40%-50%, 即使存在收缩功能障碍, 其症状和预后亦主要取决于舒张功能障碍的程度<sup>[16,17]</sup>。因此早期发现心脏舒张功能不全有十分重要的临床意义。另外, 在排除肥厚性心肌病等特殊病因, 冠状动脉硬化性心脏病是导致DCD的最常见原因<sup>[14]</sup>, 而二尖瓣血流频谱(MVF)是目前评价左室舒张功能最常用的一种方法<sup>[17]</sup>。

炎症细胞因子是NAFLD、胰岛素抵抗和慢性心功能不全之间的重要联结因子, 谢伶俐等<sup>[18]</sup>研究显示, NASH和SFL患者血清TNF- $\alpha$ 、IL-6水平均显著高于正常对照组, 以NASH组水平最高, 表明TNF- $\alpha$ 、IL-6水平升高是NAFLD患者普遍存在的现象, 而NASH患者TNF- $\alpha$ 、



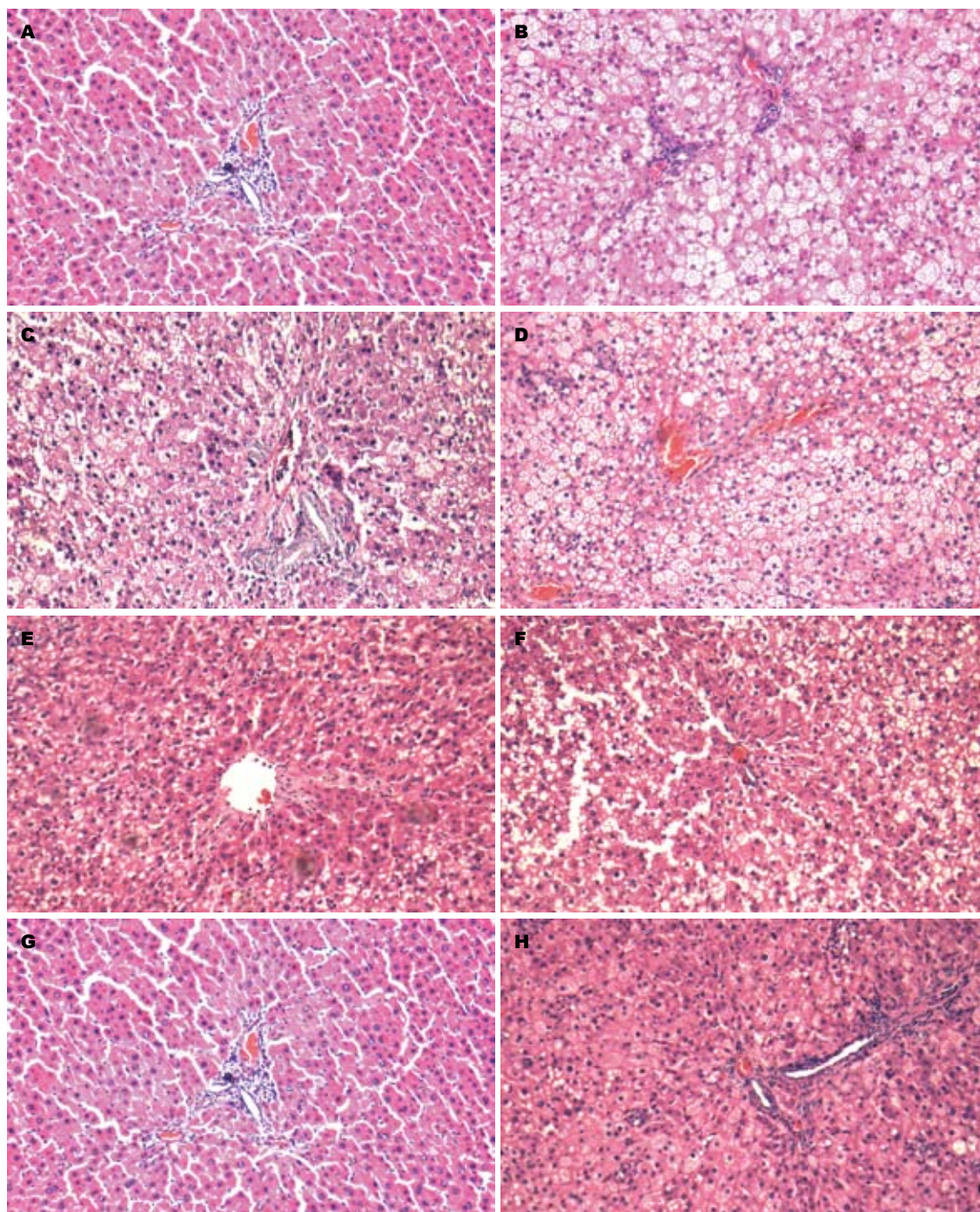


图 1 各组大鼠肝组织病理变化(HE × 200). A: 正常组; B: 模型组; C: 疏肝高剂量组; D: 疏肝低剂量组; E: 健脾高剂量组; F: 健脾低剂量组; G: 合方高剂量组; H: 合方低剂量组.

#### ■应用要点

本研究证实了非酒精性脂肪性肝炎大鼠伴有心脏舒张功能不全, 疏肝健脾方药抗非酒精性脂肪性肝炎及改善非酒精性脂肪性肝炎大鼠心脏舒张功能可能与其降低血清中炎症因子TNF- $\alpha$ 和IL-6的水平有关, 为非酒精性脂肪性肝炎的机制研究及临床治疗提供参考.

IL-6水平达峰值可能与此期肝细胞内NF- $\kappa$ B等信号通路激活产生大量炎症细胞因子以及肝脏发生Th-1极化有关. Tsujimoto等<sup>[19]</sup>研究显示NASH大鼠伴有多种炎症细胞因子的增多. 于荣波等<sup>[20]</sup>研究发现血清TNF- $\alpha$ 和IL-6水平与心功能的关系密切, 且两者反映心功能的指标发生改变一致, 对评价心脏功能及其严重程度有重要价值. Unal等<sup>[21]</sup>研究结果也显示了高水平TNF- $\alpha$ 和IL-6是心血管疾病的高危险因素. IR引

起肝细胞脂肪变性, 同时释放出的活性氧簇损可以损伤肝细胞, 导致TNF- $\alpha$ 、IL-6等炎症因子的大量释放以及肝内炎症环境的形成, 同时也给动脉粥样硬化的形成提供了炎症环境. 目前已认识到导致心功能下降发生发展的基本机制是心肌重塑<sup>[22]</sup>, 其发生是机体试图通过增加心室壁厚度以减轻室壁应力来实现的; 而TNF- $\alpha$ 和IL-6主要是由激活的单核/巨噬细胞系统分泌的具有多重生物效应的细胞炎症因子, 其活化



## ■名词解释

E/A比值:指血流在二尖瓣口舒张早期峰值速度与二尖瓣口舒张晚期峰值速度的比值,反映的是组织结构运动的变化,具有相对不依赖血流负荷的影响,在二尖瓣血流频谱假性正常化时,具有重要的鉴别价值,临床上用于评价左心室的舒张功能,E/A比值小于1,即认为心脏舒张功能下降。

表 2 各组大鼠血清TC、TG、HDL、LDL含量的比较( $n=10$ , mean  $\pm$  SD, mmol/L)

分组	TC	TG	HDL-C	LDL-C
正常组	1.42 $\pm$ 0.29	0.56 $\pm$ 0.27	0.67 $\pm$ 0.24	0.30 $\pm$ 0.11
模型组	3.82 $\pm$ 0.91 <sup>d</sup>	0.83 $\pm$ 0.26	0.63 $\pm$ 0.16	0.81 $\pm$ 0.27 <sup>a</sup>
疏肝高剂量组	3.40 $\pm$ 0.77	0.54 $\pm$ 0.18	0.53 $\pm$ 0.13	0.72 $\pm$ 0.25
疏肝低剂量组	4.15 $\pm$ 0.67	0.60 $\pm$ 0.19	0.59 $\pm$ 0.08	0.92 $\pm$ 0.17
健脾高剂量组	3.67 $\pm$ 1.24	0.46 $\pm$ 0.13 <sup>a</sup>	0.68 $\pm$ 0.12	0.73 $\pm$ 0.23
健脾低剂量组	3.90 $\pm$ 0.82	0.72 $\pm$ 0.23	0.69 $\pm$ 0.20	0.98 $\pm$ 0.30
合方高剂量组	2.76 $\pm$ 0.48	0.45 $\pm$ 0.14 <sup>b</sup>	0.52 $\pm$ 0.07	0.64 $\pm$ 0.23
合方低剂量组	3.02 $\pm$ 0.47	0.43 $\pm$ 0.09 <sup>b</sup>	0.67 $\pm$ 0.15	0.52 $\pm$ 0.09

<sup>a</sup> $P<0.05$ , <sup>b</sup> $P<0.01$  vs 模型组; <sup>d</sup> $P<0.01$  vs 正常组。

表 3 各组大鼠肝组织TC、TG含量的比较( $n=10$ , mean  $\pm$  SD, mmol/L)

分组	TC	TG
正常组	0.90 $\pm$ 0.14	0.75 $\pm$ 0.38
模型组	11.86 $\pm$ 1.29 <sup>d</sup>	6.17 $\pm$ 1.83 <sup>d</sup>
疏肝高剂量组	10.29 $\pm$ 1.49	5.08 $\pm$ 1.83 <sup>a</sup>
疏肝低剂量组	9.87 $\pm$ 1.88	3.40 $\pm$ 1.12
健脾高剂量组	10.51 $\pm$ 0.96	3.18 $\pm$ 1.96 <sup>a</sup>
健脾低剂量组	10.01 $\pm$ 2.09	3.38 $\pm$ 1.48
合方高剂量组	9.17 $\pm$ 1.02 <sup>b</sup>	2.54 $\pm$ 0.74 <sup>b</sup>
合方低剂量组	10.37 $\pm$ 1.28	2.53 $\pm$ 0.72 <sup>b</sup>

<sup>a</sup> $P<0.05$ , <sup>b</sup> $P<0.01$  vs 模型组; <sup>d</sup> $P<0.01$  vs 正常组。

表 4 各组大鼠血清TNF- $\alpha$ 、IL-6水平变化的比较( $n=8$ , mean  $\pm$  SD)

分组	TNF- $\alpha$ (pg/mL)	IL-6(pg/mL)
正常组	13.57 $\pm$ 4.64	59.28 $\pm$ 71.53
模型组	28.26 $\pm$ 8.60 <sup>b</sup>	132.81 $\pm$ 74.22 <sup>a</sup>
疏肝高剂量组	18.16 $\pm$ 5.86 <sup>c</sup>	85.50 $\pm$ 34.51
疏肝低剂量组	22.49 $\pm$ 13.33	110.90 $\pm$ 72.00
健脾高剂量组	18.43 $\pm$ 5.29 <sup>c</sup>	75.81 $\pm$ 28.88
健脾低剂量组	24.09 $\pm$ 6.59	90.38 $\pm$ 47.21
合方高剂量组	15.07 $\pm$ 6.00 <sup>d</sup>	67.72 $\pm$ 44.24 <sup>c</sup>
合方低剂量组	20.29 $\pm$ 3.57 <sup>c</sup>	83.65 $\pm$ 65.58

<sup>a</sup> $P<0.05$ , <sup>b</sup> $P<0.01$  vs 正常组; <sup>c</sup> $P<0.05$ , <sup>d</sup> $P<0.01$  vs 模型组。

与胰岛素抵抗、心功能的状态有关,二者可通过介导左心室重构、降低心肌收缩力、使肾上腺素受体失耦联等作用引发和加重HF<sup>[23]</sup>,导致左心室功能失调,加重心功能恶化。所以我们认为TNF- $\alpha$ 、IL-6通过诱导胰岛素抵抗,不但对NASH疾病本身的发生与发展起重要作用,还可能参与NAFLD相关疾病代谢综合征的形成,从而对NAFLD的预后产生影响,TNF- $\alpha$ 、IL-6是否可以作为可靠的标志物用于NAFLD严重程度及预后的评估,或成为有潜力的靶点用于疾病治疗,有待进一步研究证实。

在评价CDC功能的影像学参数上,本文采用彩色多普勒超声技术测量二尖瓣口血流频谱中的E/A比值来评价心脏舒张功能,它具有无创、易重复、操作方便的特点,已成为目前应用广泛的心功能检查方法。本实验结果显示模型组大鼠肝细胞脂肪变性明显、血脂及肝脂升高,出现的脂质代谢紊乱血液黏稠度增加皆是NASH的基本病机,同时也可能成为加快动脉粥样硬化形成的重要因素;模型组大鼠的E/A比值

明显下降,与正常组比较有显著统计学意义;而LVEF和LVFS虽然较正常组有所下降,但两者之间差异没有统计学意义,是否大鼠NASH对心功能的影响有一个渐进的过程,最先影响心脏的舒张功能,然后随着病情的加重出现心脏收缩功能的异常甚至全心功能的衰竭,还是存在其他的作用途径,有待进一步研究;另外模型组大鼠血清中TNF- $\alpha$ 、IL-6水平显著高于正常组,且变化趋势与E/A比值相似,提示NASH大鼠出现心脏舒张功能的下降可能与大鼠肝细胞内NF- $\kappa$ B等信号通路激活产生的大量TNF- $\alpha$ 、IL-6等炎症细胞因子密切相关。

中医认为“心主身之血脉”,心脏有推动血液在脉管中运行的作用,而心脏之所以能推动血液的运行全赖于心气的作用,心气、心血的充盈需要脾运化水谷精微的充养及肝藏血功能的正常。脂质属于精微物质的范畴,为人体新陈代谢所必需,而这种精微物质来源于饮食水谷,其输布代谢有赖于脾之运化功能与肝之疏泄功能,二者相互协调、相互为用维持动态平

衡, 即脂质代谢自稳态。当肝失疏泄、脾失健运导致水谷不化、精微不布久则痰瘀互结, 继而出现瘀阻脉络、心气虚弱, 血脉运行无力。研究发现<sup>[24-27]</sup>, 肝郁脾虚是NAFLD发病及迁延反复的主要病机, 其在脂肪肝的发生发展中具有重要的作用和地位, 疏肝健脾治法应贯穿NAFLD治疗的始终。我们在防治脂肪肝的临床研究中发现<sup>[26]</sup>, 从初期到中期的NAFLD患者多为肝郁脾虚证, 以疏肝、健脾法作为基本治法, 运用古代经典方柴胡疏肝散及参苓白术散加减治疗NAFLD收到了较好的效果。本实验采用疏肝健脾治法方药以治其本, 实验结果表明该方药可以改善肝郁、心脾两虚的症状, 减轻肝细胞脂肪变性, 降低血清中脂质含量。与模型组比较, 各药物组大鼠血清中TNF- $\alpha$ 、IL-6水平和心脏E/A比值显著降低, 其中以疏肝健脾综合方高剂量组最为明显, 表明疏肝健脾方药抗NASH和改善心脏舒张功能可能与其降低TNF- $\alpha$ 、IL-6水平有关。NASH是NAFLD向肝纤维化肝硬化进展的重要中间阶段, 病情发展较快, 肝郁脾虚症状较为严重, 所以用疏肝健脾合方的高剂量收到较好效果, 可能存在量效依赖关系。同时提示肝郁脾虚所致的心气虚弱、脉络瘀阻可能是NASH大鼠出现心功能下降的中医病机, 疏肝健脾方药可能发挥抗NASH、改善心功能的作用, 也进一步证明中医药对防治慢性代谢性相关疾病有不容替代的优势, 但其具体详细机制仍需深入细致探讨。

志谢: 衷心感谢中山大学纪桂元博士的热心帮助。

#### 4 参考文献

- 中华医学会肝病学会脂肪肝和酒精性肝病工作组. 非酒精性脂肪性肝病诊疗指南. 中华肝脏病杂志 2006; 16: 161-163
- Kotronen A, Yki-Järvinen H. Fatty liver: a novel component of the metabolic syndrome. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008; 28: 27-38
- 黄群, 陈小珠, 黄健, 徐平如, 何剑琴, 王晓玲, 郑昌京, 李俊达. 非酒精性脂肪性肝病患者心脏舒张功能变化的研究. 胃肠病学和肝病杂志 2010; 19: 75-77
- Villanova N, Moscatiello S, Ramilli S, Bugianesi E, Magalotti D, Vanni E, Zoli M, Marchesini G. Endothelial dysfunction and cardiovascular risk profile in nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2005; 42: 473-480
- 胡迎宾. 非酒精性脂肪性肝炎的发病机制: 病理生理学和分子生物学. 世界华人消化杂志 2009; 17: 1329-1334
- Farrell GC, Larter CZ. Nonalcoholic fatty liver disease: from steatosis to cirrhosis. *Hepatology* 2006; 43: S99-S112
- 杨钦河, 欧健, 孙升云, 乔娜丽, 程少冰, 陈万群, 金玲, 杨环文, 李娜, 纪桂元, 谢维宁, 林秀峰, 张玉佩, 薛川松. 肝健脾方药对非酒精性脂肪性肝病大鼠肝细胞PI3Kp85 $\alpha$ 蛋白表达的影响. 广东药学院学报 2009; 25: 62-67
- 孟民杰, 杨钦河, 王强, 陈雪梅, 王凤珍, 王彦平, 唐海兰, 程少冰, 凌家生, 温承远, 谢芳. 不同治法方药对脂肪肝大鼠kupffer细胞ERK1/2蛋白活性的影响. 中国病理生理杂志 2007; 23: 1551-1555
- 杨钦河, 谢芳, 王凤珍, 凌家生, 王强, 程少冰, 唐海兰, 胡巢凤, 王彦平, 孙升云, 金玲, 周羽竝, 陈万群, 杨环文, 张玉佩. 不同治法方药对脂肪肝大鼠肝组织NF- $\kappa$ B p65及kupffer细胞p38MAPK蛋白表达的影响. 广州中医药大学学报 2009; 27: 141-147
- 段富津. 方剂学. 第1版. 上海: 上海科学技术出版社, 1995: 114-115, 178-179
- 解春静. NAFLD中以胰岛素抵抗为主导的发病机制研究进展. 牡丹江医学院学报 2009; 30: 50-52
- Tarquini R, Lazzeri C, Boddi M, Marra F, Abbate R, Gensini GF. [Non-alcoholic fatty liver disease: a new challenge for cardiologists]. *G Ital Cardiol (Rome)* 2010; 11: 660-669
- Paschos P, Paletas K. Non alcoholic fatty liver disease and metabolic syndrome. *Hippokratia* 2009; 13: 9-19
- Hamaguchi M, Kojima T, Takeda N, Nagata C, Takeda J, Sarui H, Kawahito Y, Yoshida N, Suetugu A, Kato T, Okuda J, Ida K, Yoshikawa T. Nonalcoholic fatty liver disease is a novel predictor of cardiovascular disease. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 1579-1584
- 黄健, 黄群, 陈小珠, 周锋, 陈小华, 何剑琴. 非酒精性脂肪性肝病患者心脏舒张功能变化及其与肝功能的相关性研究. 实用肝脏病杂志 2010; 13: 433-435
- 李毅, 秦俭. 心脏超声技术评价左室舒张功能的研究现状. 重庆医学 2010; 39: 1920-1922
- 刘相飞, 吴强. 心脏舒张功能不全的超声心动图评价. 心血管病学进展 2008; 29: 6512-6513
- 谢伶俐, 周力, 李丽滨, 陈晓琴, 张永宏, 杨杰. TNF- $\alpha$ 和IL-6在非酒精性脂肪性肝病患者血清中的水平及意义. 世界华人消化杂志 2010; 18: 1492-1496
- Tsujimoto T, Kawaratani H, Kitazawa T, Yoshiji H, Fujimoto M, Uemura M, Fukui H. Immunotherapy for nonalcoholic steatohepatitis using the multiple cytokine production modulator Y-40138. *World J Gastroenterol* 2009; 15: 5533-5540
- 于荣波, 徐伟丽, 曹磊. 心力衰竭患者血清炎症因子变化与心功能的关系. 山东医药 2009; 49: 67-68
- Unal S, Gumruk F, Aytac S, Yalnizoglu D, Gurgey A. Interleukin-6 (IL-6), tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) levels and IL-6, TNF-polymorphisms in children with thrombosis. *J Pediatr Hematol Oncol* 2008; 30: 26-31
- 张艳, 庞敏, 宋婷婷, 胡晓红. 益气活血方对慢性心力衰竭大鼠TNF- $\alpha$ 及IL-6的影响. 现代中西医结合杂志 2008; 17: 2277-2279
- Anker SD, von Haehling S. Inflammatory mediators in chronic heart failure: an overview. *Heart* 2004; 90: 464-470
- 杨钦河, 凌家生, 平换换, 温承远. 非酒精性脂肪性肝病的中医药防治思路与对策. 中医杂志 2007; 48: 746-748

#### 同行评价

该论文结构合理, 方法先进, 从另一角度探讨疏肝健脾方药对非酒精性脂肪性肝炎合并心脏舒张功能不全大鼠干预的作用机制, 体现中医的整体观念, 对临床有一定的参考价值。



- 25 谢维宁, 杨钦河, 王强. 从肝脾论治脂肪肝. 时珍国医国药 2007; 18: 328-329
- 26 李玉权, 杨钦河, 谢维宁, 纪桂元. 疏肝健脾治法治疗非酒精性脂肪肝35例. 中医杂志 2007; 48: 824-825
- 27 杨钦河, 陈同炎, 李娜, 张玉佩, 谢维宁, 胡四平, 张汛, 刘海涛. 疏肝健脾方药对非酒精性脂肪性肝病大鼠肝组织UC P2 mRNA及蛋白表达的影响. 安徽中医学院学报 2010; 29: 56-59

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》修回稿须知

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

#### 1 修回稿信件

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

#### 2 稿件修改

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

#### 3 版权

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

# RNAi特异性抑制FoxO3a对软脂酸诱导HepG2.2.15细胞凋亡的影响

熊清芳, 谢玉桃

熊清芳, 谢玉桃, 中南大学湘雅医院传染科 湖南省长沙市 410008

熊清芳, 博士, 副主任医师, 现在在南京市第二医院肝病科工作, 主要从事肝病研究.

湖南省自然科学基金资助项目, No. 09JJ5031

作者贡献分布: 此课题由熊清芳与谢玉桃设计; 研究过程由熊清芳操作完成; 研究所用试剂及分析工具由谢玉桃提供; 数据分析由熊清芳完成; 本论文写作由熊清芳与谢玉桃完成.

通讯作者: 谢玉桃, 教授, 主任医师, 410008, 湖南省长沙市开福区88号, 中南大学湘雅医院传染科. drxieyutao@tom.com

电话: 0731-82346411

收稿日期: 2011-05-22 修回日期: 2011-08-25

接受日期: 2011-09-01 在线出版日期: 2011-09-08

## RNA interference-mediated silencing of the FoxO3a gene inhibits palmitate-induced apoptosis in human hepatoma cell line HepG2.2.15

Qing-Fang Xiong, Yu-Tao Xie

Qing-Fang Xiong, Yu-Tao Xie, Department of Infectious Diseases, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, China

Supported by: the Natural Science Foundation of Hunan Province, No. 09JJ5031

Correspondence to: Yu-Tao Xie, Professor, Department of Infectious Diseases, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, Hunan Province, China. drxieyutao@tom.com

Received: 2011-05-22 Revised: 2011-08-25

Accepted: 2011-09-01 Published online: 2011-09-08

### Abstract

**AIM:** To investigate the impact of small interfering RNA (siRNA)-mediated silencing of the FoxO3a gene on palmitate-induced apoptosis of HepG2.2.15 cells.

**METHODS:** Cultured HepG2.2.15 cells were divided into five groups: mock group (cells cultured in DMEM medium containing Lipofectamine™2000), FoxO3a siRNA group, FoxO3a siRNA+palmitate group, negative siRNA group, and negative siRNA+palmitate group. The protein expression of FoxO3a was detected by Western blot. Cell viability was measured by MTT assay. Apoptosis was evaluated by propidium iodide (PI)

staining and flow cytometry. Caspase-3 activity was measured by colorimetric assay. The mRNA expression of Bim and p27kip was examined by reverse transcription (RT)-PCR. The location of fluorescent protein was examined by fluorescence microscopy.

**RESULTS:** After transfection, the levels of total FoxO3a protein decreased in the FoxO3a siRNA+PA group and FoxO3a siRNA group, while the other groups showed no significant difference. The survival rate was higher, and the apoptosis rate, caspase-3 activity, and mRNA levels of Bim and p27kip were lower in the FoxO3a siRNA+PA group than in the negative siRNA+PA group, while the survival rate was lower, and the apoptosis rate, caspase3 activity, and mRNA levels of Bim and p27kip were higher in the FoxO3a siRNA group than in the FoxO3a siRNA group (all  $P < 0.05$ ). However, these parameters showed no significant changes among the negative siRNA group, FoxO3a siRNA group and mock group (all  $P > 0.05$ ). Stronger green fluorescence was noted in the cytoplasm than in the nucleus in the FoxO3a siRNA group, whereas the nucleus had stronger green fluorescence in the FoxO3a siRNA+PA group.

**CONCLUSION:** FoxO3a siRNA itself does not induce apoptosis of HepG2.2.15 cells. FoxO3a siRNA-mediated knockdown of the FoxO3a gene inhibits palmitate-induced apoptosis of HepG2.2.15 cells by decreasing caspase3 activity and down-regulating Bim and p27Kip expression.

**Key Words:** siRNA; FoxO3a; Palmitate; Apoptosis; Bim; p27Kip; Caspase-3

Xiong QF, Xie YT. RNA interference-mediated silencing of the FoxO3a gene inhibits palmitate-induced apoptosis in human hepatoma cell line HepG2.2.15. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(25): 2623-2628

### 摘要

**目的:** 观察FoxO3a基因干扰对软脂酸诱导

### ■背景资料

高浓度的自由脂肪酸导致肝细胞的凋亡(脂凋亡)是非酒精性脂肪性肝病的特征, 近年研究发现, 脂凋亡主要参与了“第二次打击”过程, 即促进单纯性脂肪肝向脂肪性肝炎的发展, 并且与肝脏的炎症及纤维化程度有着密切的关系.

### ■同行评议者

姚树坤, 教授, 中日友好医院消化内科

## ■ 研究前沿

目前对FoxO3a诱导凋亡的研究多集中在肿瘤形成和免疫调节等领域,对脂紊乱引起的肝细胞凋亡是否有FoxO3a的参与,研究甚少。

HepG2.2.15细胞凋亡的影响。

**方法:** HepG2.2.15细胞分五组: mock组(加脂质体)、FoxO3a siRNA组、FoxO3a siRNA+软脂酸组、阴性siRNA对照组、阴性siRNA+软脂酸组; Western blot法检测细胞的FoxO3a蛋白表达水平; MTT法检测细胞存活率; Annexin FITC/PI双染流式细胞术检测细胞凋亡率; 检测细胞的caspase-3活性; RT-PCR检测细胞Bim、p27kip mRNA表达水平; 荧光显微镜观察荧光蛋白所在位置。

**结果:** FoxO3a siRNA+软脂酸组和FoxO3a siRNA组FoxO3a总蛋白明显减少( $P<0.05$ ),而其他各组基本相同。与阴性siRNA+软脂酸组相比, FoxO3a siRNA+软脂酸组的存活率增加, 凋亡率、Caspase3活性下降, Bim mRNA、p27kip mRNA表达减少( $P<0.05$ ); 与FoxO3a siRNA组相比, FoxO3a siRNA+软脂酸组的存活率减少, 凋亡率、caspase-3活性、Bim mRNA、p27kip mRNA增加( $P<0.05$ ); 阴性siRNA对照组、FoxO3a siRNA组、mock组的存活率、凋亡率、caspase-3活性、Bim mRNA、p27kip mRNA差异无统计学意义( $P>0.05$ ); FoxO3a siRNA组细胞质的绿色荧光比细胞核多; 而FoxO3a siRNA+软脂酸正相反。

**结论:** FoxO3a-siRNA单独不能诱导HepG2.2.15细胞凋亡, 但抑制FoxO3a的表达后能通过降低Caspase3活性、抑制Bim、p27Kip的表达, 从而减少软脂酸诱导的细胞凋亡。并且FoxO3a是通过去磷酸化(失活)即核移位调控这一过程。

**关键词:** 小干扰RNA; FoxO3a; 软脂酸; 凋亡; Bim; p27Kip; caspase-3

熊清芳, 谢玉桃. RNAi特异性抑制FoxO3a对软脂酸诱导HepG2.2.15细胞凋亡的影响. 世界华人消化杂志 2011; 19(25): 2623-2628  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/2623.asp>

## 0 引言

FoxO3a是近年发现的FoxO(Forkhead box-containing protein, class O)家族的蛋白。一般定位在核内, 通过促进下游靶基因的表达, 从而导致细胞凋亡。磷酸化后则进入细胞质, 与蛋白14-3-3结合, 失去其促凋亡活性<sup>[1,2]</sup>。目前对FoxO3a诱导凋亡的研究多集中在肿瘤形成和免疫调节等领域<sup>[3]</sup>, 对脂紊乱引起的肝细胞凋亡是否有FoxO3a的参与, 研究甚少。我们通过小RNA干扰技术,

明确FoxO3a在软脂酸诱导肝细胞凋亡中的作用, 为今后将FoxO3a作为阻断脂肪酸诱导的肝细胞凋亡的靶点奠定基础。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 人肝肿瘤细胞株HepG2.2.15购自美国菌种保藏中心。试剂和仪器: Lipofectamine 2000、Opti-MEM I(美国Invitrogen公司); TRIzol, RT-PCR逆转录试剂盒(美国Invitrogen公司); 兔抗人FoxO3a抗体、兔抗p-FoxO3a(Thr32)抗体、HRP标记的山羊抗兔IgG(美国Santa Cruz公司); 3110 Series II CO<sub>2</sub>培养箱(美国Thermo Forms公司); PowerPac3000型电泳仪、Transblot SD湿转膜仪(美国Bio.Rad公司); Y-20型脱色摇床(江苏其林贝尔仪器制造有限公司); ABI prism 7500半定量PCR仪(美国ABI公司)。

### 1.2 方法

**1.2.1 分组:** (1)mock组(对照组): 先加脂质体Lipofectamine 2000培养6 h, 然后普通培养基培养48 h。 (2)NC组(Negative control, 阴性对照组): 瞬时转染NC-siRNA后培养54 h。 (3)NC+PA组: 瞬时转染NC-siRNA 48 h后加400  $\mu$ mol/L软脂酸(PA)培养6 h。 (4)FoxO3a siRNA组: 瞬时转染FoxO3a siRNA后培养54 h。 (5)FoxO3a siRNA+PA组: 瞬时转染FoxO3a siRNA 48 h后加400  $\mu$ mol/L软脂酸培养6 h。

**1.2.2 细胞培养与转染:** HepG2.2.15人肝肿瘤细胞株常规培养于含100 mL/L胎牛血清、20 g/L谷氨酰胺的DMEM高糖完全培养液中, 置37  $^{\circ}$ C、体积分数为50 mL/L的CO<sub>2</sub>饱和湿度孵箱内孵育。稳定传代后至指数增长期用于本实验。转染前24 h, 将肿瘤细胞接种在6孔培养板上, 每孔约 $5 \times 10^6$ 个细胞, 使每孔细胞饱和度在转染前达到50%-70%以上, 铺板时不使用含抗生素的培养液。按Lipofectamine2000转染试剂说明书方法进行瞬时转染。对于6孔板中的每一孔, 将FoxO3a siRNA(序列Sense 5'-ACUCCGGGUCCAGCUCCACTT-3', Antisense 5'-GUGGAGCUGGACCCGGAGUTT-3')、NC-siRNA(序列Sense 5'-UUCUCCGAACGUGUCACGUTT-3', Antisense 5'-ACGUGACACGUUCGGAGAATT-3')分别和Lipofectamine2000按4:100 mg/L的比例, 用250  $\mu$ L转染专用液Opti-MEMI稀释, 孵育5 min后, 将稀释的siRNA和Lipofectamine2000混匀, 室温孵育20 min, 然后将500  $\mu$ L混合物加入到细胞培养基中, 轻轻混

匀, 于37℃培养6 h后, 将其中的培养基吸出, 加入新鲜的培养基, 继续孵育. siRNA由上海吉玛设计并化学合成.

**1.2.3 四甲基偶氮唑(MTT)法:** 转染前按 $0.5 \times 10^4$ 细胞/L, 种植在96孔板, 转染54 h后, 每孔加入100  $\mu$ L MTT(5 g/L), 继续温育4 h, 然后加入100  $\mu$ L DMSO, 震荡15 min, 酶标仪读取光密度值 $A_{490}$ , 实验结果以细胞存活率表示. 细胞存活率 = 处理组A值/对照组A值 $\times 100\%$ .

**1.2.4 Annexin FITC/碘化丙锭(PI)双染流式细胞术:** 将各组细胞, 用预冷的700 mg/L乙醇固定, 4℃过夜, PI(50 mg/L)染色, 分析亚二倍体峰. 调整细胞密度为 $5 \times 10^6$ /mL, 取1 mL细胞悬液, 1 000 r/min 4℃离心10 min, 重复2次, 将细胞重悬于200  $\mu$ L结合缓冲液, 加入10  $\mu$ L膜连蛋白V(Annexin V2 FITC)和5  $\mu$ L碘化丙锭(PI), 避光室温反应15 min, 加入300  $\mu$ L结合缓冲液, 流式细胞仪检测细胞凋亡情况.

**1.2.5 caspase-3活性检测:** 按试剂盒说明操作, 以6孔板培养HepG2.2.15细胞, 每孔细胞数约 $3-4 \times 10^5$ 个, 细胞贴壁达80%左右后分组实验. 细胞造模后, 首先收集培养液中悬浮与贴壁细胞(0.25%胰蛋白酶进行消化), 并重悬于Lysis Buffer(裂解液)中, 冰上孵育10 min, 离心并收集上清液(胞浆提取液), 加入含DDT的Reaction Buffer, 再加pNA标记的蛋白酶底物多肽37℃孵育2 h, 在酶标仪405 nm处检测光密度值. 结果以实验组光密度值与对照组光密度值的百分比表示.

**1.2.6 RT-PCR法:** 收集各组细胞, 按TRIzol试剂盒(Invitrogen公司)说明书提取细胞的总RNA. 而后按RT-PCR试剂盒说明书采用20  $\mu$ L/L逆转录反应体系操作进行逆转录, 然后进行PCR扩增. RT-PCR扩增Bim、p27Kip1; Bim基因引物序列: 上游引物5'-TAT GAG AAG ATC CTC CCT GC-3', 下游引物5'-ATA TCT GCA GGT TCA GCC TG-3', 扩增片段长430 bp; p27Kip1上游引物5'-CGA GTG GCA AGA GGT GGA GA-3', 下游引物5'-CATTGGGGAACCGTCTGAA-3', 扩增片段长293 bp; 内参 $\beta$ -actin引物序列: 上游引物5'-CTG GCA CCA CAC CTT CTA-3', 下游引物5'-GGGCAC AGT GTG GGT GAC-3', 扩增片段长368 bp. 扩增条件: 94℃变性45 s, 58℃(Bim)、54℃(p27Kip1)、62℃( $\beta$ -actin)退火45 s, 72℃延伸1 min, 30个循环, 最后72℃延伸7 min. PCR产物经2%琼脂糖凝胶电泳(含0.05 g/L溴化乙锭). 以目的基因与相应 $\beta$ -actin mRNA的条带

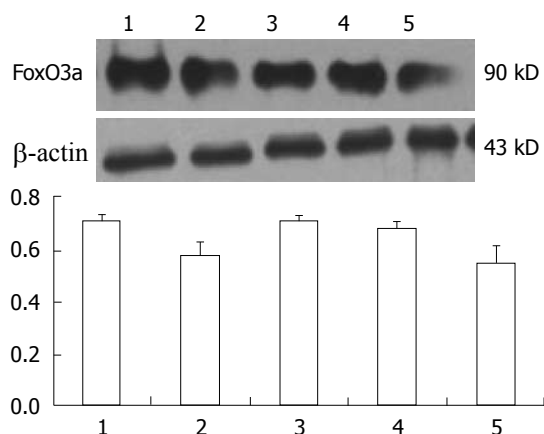


图1 各组FoxO3a总蛋白表达. 1: mock组; 2: FoxO3a siRNA+PA组; 3: NC组; 4: NC+PA组; 5: FoxO3a siRNA组.

密度比值表示目标基因的相对含量.

**1.2.7 Western blot法:** 提取相应各组细胞总蛋白, SDS-PAGE电泳分离蛋白样本: 5%积层胶, 10%分离胶; 电转印法将电泳条带转移到PVDF膜上; 以5%脱脂奶粉/PBST封闭膜, 依次加入兔抗人FoxO3a(1:500)或 $\beta$ -actin(1:700)一抗, 孵育、洗涤, 加入HRP标记的山羊抗兔IgG二抗(1:10 000), 孵育、洗涤, 加入ECL, 封膜. 暗室显影, 冲洗胶片. 凝胶成像分析系统摄像分析, 比较各条带与内参蛋白的光密度值.

**统计学处理** 所有数据以mean $\pm$ SD表示, 多组间均数比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA)及LSD检验,  $P < 0.05$ 为差异有统计学意义. 采用SPSS12.0统计学软件.

## 2 结果

**2.1 FoxO3a siRNA联合软脂酸对细胞内FoxO3a蛋白水平的影响** mock组、NC组、NC+PA组内的FoxO3a蛋白表达基本相同( $F = 0.013$ ,  $P = 0.981$ ), FoxO3a siRNA+PA组和FoxO3a siRNA组明显减少, 与前三组相比有统计学意义( $P < 0.05$ ), 两组间相比无统计学意义( $t = 0.16$ ,  $P = 0.93$ ). 说明FoxO3a siRNA瞬时转染HepG2.2.15细胞成功(图1).

**2.2 FoxO3a siRNA联合软脂酸对细胞存活、凋亡、caspase-3活性的影响** FoxO3a siRNA组、NC组和mock组的细胞存活率、凋亡率和caspase-3活性, 两两相比差异无统计学意义( $F = 1.667$ ,  $P = 0.222$ ;  $F = 0.147$ ,  $P = 0.864$ ;  $F = 0.244$ ,  $P = 0.787$ ); 软脂酸刺激以后, NC+PA组、FoxO3a siRNA+PA组跟前三组相比存活率下降( $P < 0.05$ ), 凋亡率和caspase-3活性上升( $P < 0.05$ ); 但FoxO3a siRNA+PA组与NC+PA组相比存活率增加( $t =$

### ■创新盘点

本研究模拟体外已成熟的肝细胞脂肪变性模型, 通过用软脂酸刺激HepG2.2.15细胞诱导其凋亡, 研究中发现凋亡过程中伴随着caspase-3活性、Bim mRNA、p27kip1 mRNA的增加, 说明caspase-3、Bim、p27kip1等参与了软脂酸诱导的肝细胞凋亡的发生.



## ■应用要点

本文通过特异而有效的抑制FoxO3a的表达,能减少软脂酸诱导的肝细胞凋亡,从分子水平验证了FoxO3a参与了肝细胞的脂凋亡,为今后将FoxO3a作为阻断脂肪酸诱导肝细胞凋亡的靶点奠定基础。

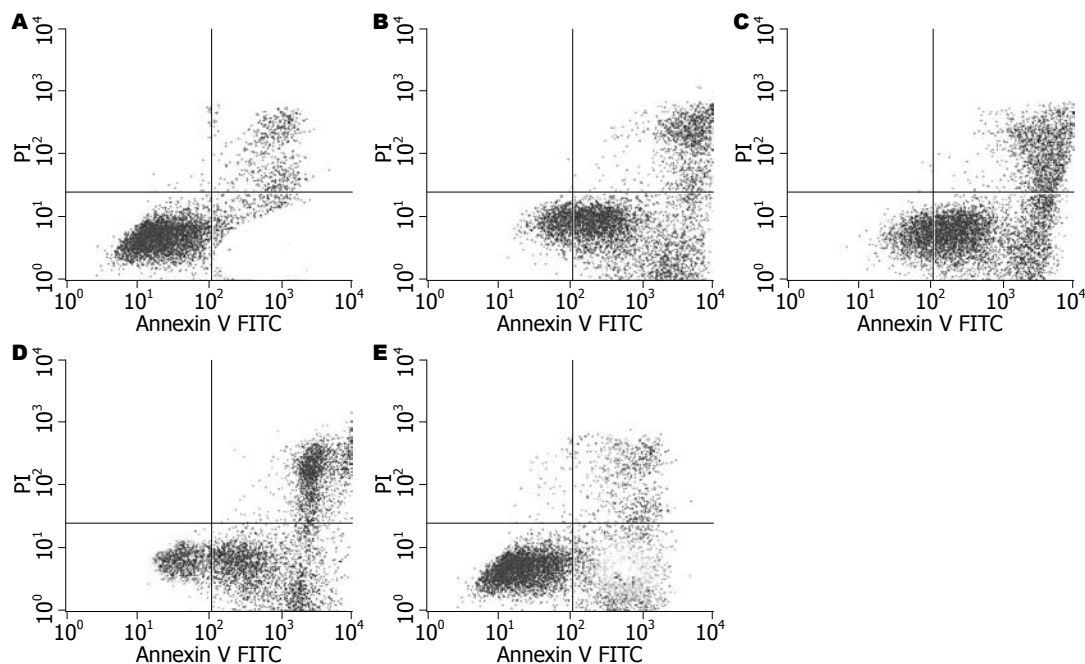


图2 Annexin FITC/PI检测各组凋亡表达。A: mock组; B: NC组; C: FoxO3a siRNA+PA组; D: NC+PA组; E: FoxO3a siRNA

表1 各组细胞的存活率、凋亡率、caspase-3活性变化 (mean  $\pm$  SD,  $n = 6$ )

	存活率(%)	凋亡率(%)	caspase-3活性
mock组	97.440 $\pm$ 0.990	5.010 $\pm$ 0.720	99.330 $\pm$ 0.810
NC组	96.380 $\pm$ 1.310	5.270 $\pm$ 0.860	101.000 $\pm$ 7.930
FoxO3a siRNA 组	96.700 $\pm$ 0.730	5.190 $\pm$ 0.930	102.020 $\pm$ 8.780
FoxO3a siRNA +PA组	85.460 $\pm$ 1.760	12.310 $\pm$ 0.920	150.850 $\pm$ 1.450
NC+PA组	80.140 $\pm$ 1.510	20.430 $\pm$ 1.640	202.000 $\pm$ 3.820
<i>F</i>	220.600	241.880	390.400
<i>P</i>	<0.001	<0.001	<0.001

5.371,  $P < 0.05$ ), 凋亡率、caspase-3活性下降( $t = 10.55$ ,  $P < 0.01$ ;  $t = 30.76$ ,  $P < 0.01$ , 表1); 说明转染FoxO3a siRNA对细胞的存活和凋亡无影响; 但可有效的抑制软脂酸诱导的凋亡和caspase-3活性(图2, 表1)。

2.3 FoxO3a siRNA联合软脂酸对细胞Bim、p27kip1表达的影响 Bim mRNA、p27kip1 mRNA在Mock组、NC组和FoxO3a siRNA组表达最低, 分别在组间无统计学意义( $F = 1.804$ ,  $P = 0.199$ ;  $F = 0.208$ ,  $P = 0.815$ ); FoxO3a siRNA+PA组的表达其次, NC+PA组的表达最高, 两组相比有统计学意义( $t = 32.21$ ,  $P < 0.01$ ;  $t = 17.17$ ,  $P < 0.01$ ); 同时分别与FoxO3a siRNA组相比有统计学意义( $t = 7.0521$ ,  $P < 0.01$ ;  $t = 3.53$ ,  $P < 0.01$ )。说明抑制FoxO3a的表达可有效的抑制软脂酸诱导的凋亡因子Bim和p27kip1的表达(图3)。

2.4 各组FoxO3a siRNA荧光定位 荧光显微镜下

可见: FoxO3a siRNA组细胞质绿色荧光较强, 细胞核荧光较弱, 提示细胞核内FoxO3a表达较低, 细胞质内FOXO3a表达相对较多; 而FoxO3a siRNA+PA组细胞核的绿色荧光有所增加, 细胞质的绿色荧光有所减少; 说明软脂酸能促进FoxO3a在细胞核内的表达(图4)。

### 3 讨论

高浓度的自由脂肪酸导致肝细胞的凋亡(脂凋亡)是非酒精性脂肪性肝病的特征<sup>[4,5]</sup>, 近年研究发现, 脂凋亡主要参与了“第二次打击”过程, 即促进单纯性脂肪肝向脂肪性肝炎的发展, 并且与肝脏的炎症及纤维化程度有着密切的关系<sup>[6,7]</sup>。

FoxO3a蛋白属于Fox超家族中的“O”亚家族, 定位于6号染色体长臂2区1带, 编码673个氨基酸, 分子量97 kD, 含有forkhead DNA结合结构域, NLS, NES和转录活化区<sup>[8]</sup>。活性可受磷

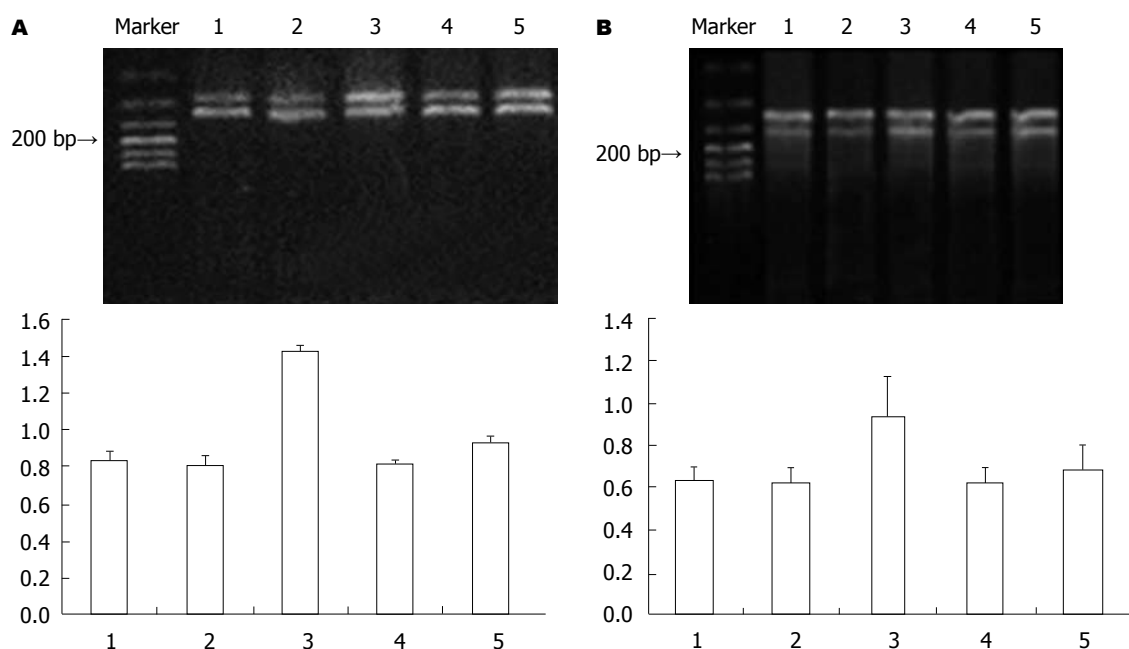


图 3 各组细胞Bim、p27kip1 mRNA的表达. A: Bim mRNA; B: p27kip1 mRNA. 1: mock组; 2: NC组; 3: NC+PA组; 4: FoxO3a siRNA组; 5: FoxO3a siRNA+PA组.

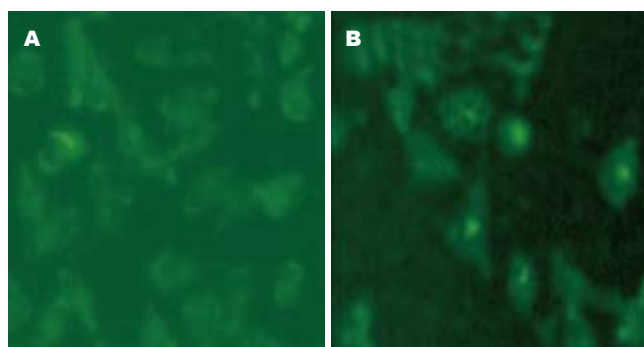


图 4 转染FoxO3asiRNA荧光图( $\times 200$ ). A: FoxO3a siRNA组; B: FoxO3a siRNA+PA组.

#### 同行评价

本研究工作量较大, 设计基本合理, 结果和结论可信, 有一定的参考价值.

酸化、乙酰化和蛋白酶水解等方式调节, 其中磷酸化是最主要的调节方式. 并以AKT促进其磷酸化最为重要<sup>[9]</sup>. 在无抗原刺激和生长因子下, FoxO3a转录因子在细胞核内保持转录活性, 相应的生长因子活化PI3K-AKT(protein kinase B, PKB)信号通路, FoxO3a蛋白磷酸化, 结合于14-3-3而排出核, 失去转录活性<sup>[9]</sup>, 以这种方式, PI3K-AKT-FOXO3a信号通路通过下游的靶基因如GADD45、Cdkn1a/p21、Cdkn1b/p27、cyclin B和Bim<sup>[9-11]</sup>, 可调节多种生物过程, 包括细胞存活, 凋亡, 氧化应激等.

本研究模拟体外已成熟的肝细胞脂肪变性模型<sup>[12-17]</sup>, 通过用软脂酸刺激HepG2.2.15细胞诱导其凋亡, 研究中发现在凋亡过程中伴随着caspase-3活性、Bim mRNA、p27kip1 mRNA的增加, 说明caspase-3、Bim、p27kip1等参与了软脂酸诱导的肝细胞凋亡的发生, 但是是否是转录因子FoxO3a调控了这些靶点, 尚不清楚;

故利用最直接有效的小RNA干扰技术抑制FoxO3a的表达, 结果发现, 软脂酸诱导的凋亡和caspase-3的活性明显下降, Bim mRNA和p27kip1 mRNA表达明显减少, 说明FoxO3a通过调控caspase-3、Bim、p27kip1等参与了软脂酸诱导的肝细胞凋亡. 同时荧光显微镜也直接观察到FoxO3a的胞质和胞核的易位, 进一步从形态学上证实了FoxO3a通过细胞移位(活性的改变)调控了这一过程; 因此, 软脂酸诱导肝细胞凋亡其中的一个机制是通过使FoxO3a在细胞核内保持转录活性, 从而调控下游的Bim、p27kip1和caspase-3而发生. 这与国外学者的研究是一致的<sup>[18-19]</sup>.

总之, 通过特异而有效的抑制FoxO3a的表达, 能减少软脂酸诱导的肝细胞凋亡, 从分子水平验证了FoxO3a参与了肝细胞的脂凋亡. 为今后将FoxO3a作为阻断脂肪酸诱导肝细胞凋亡的靶点奠定基础.

## 4 参考文献

- 1 Tran H, Brunet A, Griffith EC, Greenberg ME. The many forks in FOXO's road. *Sci STKE* 2003; 2003: RE5
- 2 Obsil T, Obsilova V. Structure/function relationships underlying regulation of FOXO transcription factors. *Oncogene* 2008; 27: 2263-2275
- 3 Barthel A, Schmoll D, Unterman TG. FoxO proteins in insulin action and metabolism. *Trends Endocrinol Metab* 2005; 16: 183-189
- 4 Wieckowska A, Zein NN, Yerian LM, Lopez AR, McCullough AJ, Feldstein AE. In vivo assessment of liver cell apoptosis as a novel biomarker of disease severity in nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2006; 44: 27-33
- 5 Wieckowska A, McCullough AJ, Feldstein AE. Non-invasive diagnosis and monitoring of nonalcoholic steatohepatitis: present and future. *Hepatology* 2007; 46: 582-589
- 6 Malhi H, Bronk SF, Werneburg NW, Gores GJ. Free fatty acids induce JNK-dependent hepatocyte lipopapoptosis. *J Biol Chem* 2006; 281: 12093-12101
- 7 Feldstein AE, Canbay A, Angulo P, Taniai M, Burgart LJ, Lindor KD, Gores GJ. Hepatocyte apoptosis and fas expression are prominent features of human nonalcoholic steatohepatitis. *Gastroenterology* 2003; 125: 437-443
- 8 Le Lay J, Kaestner KH. The Fox genes in the liver: from organogenesis to functional integration. *Physiol Rev* 2010; 90: 1-22
- 9 Kwon ES, Narasimhan SD, Yen K, Tissenbaum HA. A new DAF-16 isoform regulates longevity. *Nature* 2010; 466: 498-502
- 10 Park SJ, Sohn HY, Yoon J, Park SI. Down-regulation of FoxO-dependent c-FLIP expression mediates TRAIL-induced apoptosis in activated hepatic stellate cells. *Cell Signal* 2009; 21: 1495-1503
- 11 Kelly-Spratt KS, Philipp-Staheli J, Gurley KE, Hoon-Kim K, Knoblaugh S, Kemp CJ. Inhibition of PI-3K restores nuclear p27Kip1 expression in a mouse model of Kras-driven lung cancer. *Oncogene* 2009; 28: 3652-3662
- 12 Schwarz M, Andrade-Navarro MA, Gross A. Mitochondrial carriers and pores: key regulators of the mitochondrial apoptotic program? *Apoptosis* 2007; 12: 869-876
- 13 Gómez-Lechón MJ, Donato MT, Martínez-Romero A, Jiménez N, Castell JV, O'Connor JE. A human hepatocellular in vitro model to investigate steatosis. *Chem Biol Interact* 2007; 165: 106-116
- 14 Listenberger LL, Han X, Lewis SE, Cases S, Farese RV, Ory DS, Schaffer JE. Triglyceride accumulation protects against fatty acid-induced lipotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100: 3077-3082
- 15 Ricchi M, Odoardi MR, Carulli L, Anzivino C, Ballistri S, Pinetti A, Fantoni LI, Marra F, Bertolotti M, Banni S, Lonardo A, Carulli N, Loria P. Differential effect of oleic and palmitic acid on lipid accumulation and apoptosis in cultured hepatocytes. *J Gastroenterol Hepatol* 2009; 24: 830-840
- 16 Wei Y, Wang D, Topczewski F, Pagliassotti MJ. Saturated fatty acids induce endoplasmic reticulum stress and apoptosis independently of ceramide in liver cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2006; 291: E275-E281
- 17 Pagliassotti MJ, Wei Y, Wang D. Insulin protects liver cells from saturated fatty acid-induced apoptosis via inhibition of c-Jun NH2 terminal kinase activity. *Endocrinology* 2007; 148: 3338-3345
- 18 Maedler K, Spinas GA, Dyntar D, Moritz W, Kaiser N, Donath MY. Distinct effects of saturated and monounsaturated fatty acids on beta-cell turnover and function. *Diabetes* 2001; 50: 69-76
- 19 Hübner A, Barrett T, Flavell RA, Davis RJ. Multisite phosphorylation regulates Bim stability and apoptotic activity. *Mol Cell* 2008; 30: 415-425

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》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)采用了被引量、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)

# 脱氧胆酸溶液灌肠对大鼠内脏敏感性及脊髓c-fos mRNA表达的影响

王劲松, 余保平, 胡柳丹, 张丽静, 田亭亭

王劲松, 余保平, 胡柳丹, 张丽静, 田亭亭, 武汉大学人民医院消化内科 湖北省武汉市 430060

王劲松, 在读硕士, 主要从事消化系统疾病的研究.

中央高校基本科研业务费专项基金资助项目, No. 20103020101000200

作者贡献分布: 王劲松与余保平对此文所作贡献均等; 此课题由王劲松、余保平、胡柳丹、张丽静及田亭亭共同设计; 研究过程由余保平技术指导; 王劲松、胡柳丹、张丽静及田亭亭操作完成; 数据分析由王劲松完成; 本论文写作由王劲松完成.

通讯作者: 余保平, 教授, 主任医师, 430060, 湖北省武汉市, 湖北省武汉大学人民医院消化内科. yubaoping62@yahoo.com.cn  
电话: 027-68759391

收稿日期: 2011-06-17 修回日期: 2011-08-03

接受日期: 2011-09-01 在线出版日期: 2011-09-08

## Rectal instillation of deoxycholic acid solution enhances visceral hypersensitivity and up-regulates c-fos mRNA expression in the spinal dorsal horn in rats

Jing-Song Wang, Bao-Ping Yu, Liu-Dan Hu, Li-Jing Zhang, Ting-Ting Tian

Jing-Song Wang, Bao-Ping Yu, Liu-Dan Hu, Li-Jing Zhang, Ting-Ting Tian, Department of Gastroenterology, Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan 430060, Hubei Province, China

Supported by: the Fundamental Research Funds for the Central Universities, No. 20103020101000200

Correspondence to: Bao-Ping Yu, Professor, Department of Gastroenterology, Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan 430060, Hubei Province, China. yubaoping62@yahoo.com.cn

Received: 2011-06-17 Revised: 2011-08-03

Accepted: 2011-09-01 Published online: 2011-09-08

## Abstract

**AIM:** To investigate the effect of rectal instillation of deoxycholic acid solution (DAS) on colorectal visceral sensitivity and the expression of c-fos mRNA in the spinal dorsal horn in rats.

**METHODS:** Rat models were established by giving a rectal perfusion of DSA for 3 days. Rectal distention test was performed to examine rectal sensitivity using AWR score and pressure threshold before and after treatment (1, 2, 3 and

4 wk). The distal colon was used for myeloperoxidase (MPO) assay, and histological examination and mast cell counting were performed after treatment. L5-S2 dorsal root ganglia (DRG) were taken to examine the expression of c-fos mRNA by RT-PCR.

**RESULTS:** The AWR score of the experiment group was increased in response to noxious intensities of CRD (60 mmHg) compared to the control group (1 wk:  $3.54 \pm 0.17$  vs  $3.31 \pm 0.23$ , 2 wk:  $3.58 \pm 0.17$  vs  $2.96 \pm 0.44$ , 3 wk:  $3.53 \pm 0.14$  vs  $3.07 \pm 0.30$ , 4 wk:  $3.60 \pm 0.13$  vs  $3.03 \pm 0.33$ , all  $P < 0.05$ ), but not to innocuous intensities. DCA treatment significantly decreased pressure threshold of visceral perception at each time point after rectal perfusion in both groups (all  $P < 0.05$ ). MPO activity was increased at weeks 2 and 3 ( $0.39 \pm 0.12$  vs  $0.12 \pm 0.05$ ,  $0.40 \pm 0.08$  vs  $0.12 \pm 0.05$ , both  $P < 0.05$ ), but not at week 1 and week 4. The levels of c-fos mRNA and mast cell number were significantly increased at week 1 in the experimental group compared to the control group (c-fos mRNA:  $0.74 \pm 0.04$  vs  $0.68 \pm 0.02$ ; mast cell number:  $4.20 \pm 1.87$  vs  $1.10 \pm 0.74$ , both  $P < 0.05$ ).

**CONCLUSION:** Repetitive colorectal instillation of DCA induces mild, transient colonic inflammation, results in persistent visceral hyperalgesia and referred pain, and increases spinal c-fos mRNA expression in rats.

**Key Words:** Deoxycholic acid; Post-inflammatory irritable bowel syndrome; Visceral hypersensitivity; C-fos; Colorectal distension; SD rats

Wang JS, Yu BP, Hu LD, Zhang LJ, Tian TT. Rectal instillation of deoxycholic acid solution enhances visceral hypersensitivity and up-regulates c-fos mRNA expression in the spinal dorsal horn in rats. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(25): 2629-2636

## 摘要

**目的:** 研究脱氧胆酸溶液灌肠对大鼠结肠敏感性和脊髓背根神经节上c-fos mRNA表达的

## ■背景资料

肠易激综合征 (IBS)是临床上常见的功能性疾病,其病因尚未完全明了,目前认为炎症与肠易激综合征的发生有一定关系,内脏高敏感是肠易激综合征重要病理生理学基础.

## ■同行评议者

黄培林, 教授, 东南大学; 杜顺达, 副主任医师, 北京协和医院肝外科; 王悦华, 副主任医师, 首都医科大学宣武医院普外科



## ■ 研发前沿

胆盐吸收不良经细菌转变成脱氧胆酸后刺激结肠分泌,可能与IBS的发生有一定关系,其具体机制尚需进一步研究。

影响。

**方法:**以脱氧胆酸溶液连续灌肠3 d建立大鼠炎症后慢性内脏痛觉过敏模型,在灌肠前及灌肠后第1, 2, 3, 4周采用结直肠扩张法(CRD)测定腹壁回缩反射(AWR)评分和内脏感觉压力阈值,然后处死大鼠,取出远端结肠组织,行髓过氧化物酶(MPO)测定、HE染色和肥大细胞计数,取脊髓背根神经节L5-S2用RT-PCR法测定c-fos mRNA的表达量。

**结果:**灌肠后第1, 2, 3, 4周,在20, 40 mmHg压力下,AWR评分实验组与对照组相比差异无统计学意义,而在60 mmHg以上,实验组AWR评分均明显高于对照组(60 mmHg:  $3.54 \pm 0.17$  vs  $3.31 \pm 0.23$ ,  $3.58 \pm 0.17$  vs  $2.96 \pm 0.44$ ,  $3.53 \pm 0.14$  vs  $3.07 \pm 0.30$ ,  $3.60 \pm 0.13$  vs  $3.03 \pm 0.33$ , 均 $P < 0.05$ ),且腹部抬起和骨盆抬起压力阈值实验组均低于对照组( $P < 0.05$ );灌肠后第2, 3周, MPO值实验组高于对照组( $0.39 \pm 0.12$  vs  $0.12 \pm 0.05$ ,  $0.40 \pm 0.08$  vs  $0.12 \pm 0.05$ , 均 $P < 0.05$ ),而第1, 4周,两组间差异无统计学意义。灌肠后1w,实验组肥大细胞计数明显高于对照组( $4.20 \pm 1.87$  vs  $1.10 \pm 0.74$ ,  $P < 0.05$ )。在第1周, c-fos mRNA的表达量实验组明显高于对照组( $0.74 \pm 0.04$  vs  $0.68 \pm 0.02$ ,  $P < 0.05$ )。

**结论:**DCA溶液反复灌肠诱导了大鼠短暂轻微的结肠炎症和持续稳定的内脏痛觉过敏,并且增加了脊髓背根神经节上c-fos mRNA的表达。DCA可能在某些肠易激综合症的痛觉过敏中发生作用。

**关键词:**脱氧胆酸;炎症后肠易激综合征;内脏高敏感; c-fos; 结直肠扩张; SD大鼠

王劲松, 余保平, 胡柳丹, 张丽静, 田亭亭. 脱氧胆酸溶液灌肠对大鼠内脏敏感性 & 脊髓c-fos mRNA表达的影响. 世界华人消化杂志 2011; 19(25): 2629-2636

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/2629.asp>

## 0 引言

肠易激综合征(irritable bowel syndrome, IBS)一组多因素引起的慢性疾病,多种因素可诱发其发作,如饮食改变、生活方式改变、肠道感染、心理因素等<sup>[1]</sup>。通常社会心理因素、胃肠道运动与分泌异常和内脏高敏感可导致IBS患者出现各种症状,目前,内脏高敏感的形成一般被认为是IBS的主要发病机制<sup>[2]</sup>。在IBS的发病过程中,大约有26%的患者在曾患过急性肠胃炎<sup>[3]</sup>。炎症是否也参与了致敏过程也需进一步探索。Bourdu等<sup>[4]</sup>发现丁酸钠溶

液直肠滴注可造成大鼠结肠感觉过敏,但结肠不发生明显炎症反应,不属于炎症后内脏敏感模型。本研究以脱氧胆酸(deoxycholic acid, DCA)溶液灌肠建立大鼠PI-IBS结肠感觉过敏模型,观察其内脏感觉功能和结肠黏膜改变,并进一步研究脊髓背根神经节上c-fos mRNA的表达量。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** DCA购自Sigma公司。髓过氧化物酶(myeloperoxidase, MPO)试剂盒购自南京建成生物工程研究所。Kreb's溶液成分(mmol/L): NaCl, 122; KCl, 3.5; NaHCO<sub>3</sub>, 25; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.2; MgCl<sub>2</sub>, 1.2; 4 mmol/L DCA用Kreb's溶液配制,用HCl调pH至7.4。引物设计参考文献[5], c-fos上游引物: 5'-ATGATGTTCTCGGGTTTCAA-3', 下游引物: 5'-TGACATGGTCTTCACCAC TC-3', 扩增片段348 bp;  $\beta$ -actin上游引物: 5'-TCATGAAGTGTGACGTTGACATCCGT-3', 下游引物: 5'-CCTAGA AGCATTGCGGTGCACGATG-3', 扩增片段285 bp, 引物由英淮捷基(上海)贸易有限公司合成。

### 1.2 方法

**1.2.1 分组及模型制备<sup>[6]</sup>:**成年♂清洁级SD大鼠20只,体质量250-300 g,健康活泼,由武汉大学人民医院动物中心提供,动物使用许可证号: SYXK(鄂)2008-0013。分笼饲养,每笼5只,自由进食和进水。饲养环境:温度20℃-25℃,湿度40%-60%。按完全随机的方法将20只大鼠分成实验组和对照组,每组10只。经大鼠肛门插入导管至距肛门6 cm处,实验组注入1 mL 4 mmol/L的DCA溶液,对照组注入1 mL生理盐水,每天1次(09:00),连续3 d,每次注药后大鼠保持头低位5 min,避免灌肠液从肛门溢出。

**1.2.2 内脏感觉功能测定:**采用结直肠扩张(colorectal distension, CRD)法,以腹壁回缩反射(abdominal withdrawal reflex, AWR)评分<sup>[7]</sup>和内脏感觉压力阈值来反映内脏感觉功能。(1)AWR评分。在灌肠前3 d及灌肠后第1, 2, 3, 4周,用Braun 8F带气囊导尿管外涂石蜡油后经肛门插入经三通管与血压计和注射器相连,将表面涂有石蜡油的带气囊导尿管经肛门插至距肛门6 cm,用胶布固定导尿管于大鼠尾根部,将大鼠置入20 cm×8 cm×7 cm的透明盒内,随机时相快速注气,两名观察者分别在20, 40, 60, 80 mmHg的压力下同步观察AWR并评分,最后取平均值,评分标准:0分,对扩张无反应;1分,仅出现短暂、轻微的头

表 1 实验组与对照组AWR评分的比较(mean ± SD)

时间	n	20 mmHg	40 mmHg	60 mmHg	80 mmHg
灌肠前					
实验组	10	0.31 ± 0.10	2.24 ± 0.39	3.03 ± 0.44	3.34 ± 0.31
对照组	10	0.33 ± 0.14	2.27 ± 0.41	3.13 ± 0.32	3.37 ± 0.18
第1周					
实验组	10	0.39 ± 0.14	2.35 ± 0.53	3.54 ± 0.17 <sup>a</sup>	3.70 ± 0.13 <sup>a</sup>
对照组	10	0.28 ± 0.10	2.18 ± 0.34	3.31 ± 0.23	3.48 ± 0.12
第2周					
实验组	9	0.34 ± 0.13	2.32 ± 0.36	3.58 ± 0.17 <sup>a</sup>	3.72 ± 0.10 <sup>a</sup>
对照组	9	0.36 ± 0.13	2.13 ± 0.41	2.96 ± 0.44	3.41 ± 0.21
第3周					
实验组	8	0.30 ± 0.08	2.45 ± 0.48	3.53 ± 0.14 <sup>a</sup>	3.76 ± 0.09 <sup>a</sup>
对照组	8	0.26 ± 0.13	1.99 ± 0.52	3.07 ± 0.30	3.46 ± 0.23
第4周					
实验组	7	0.27 ± 0.13	2.29 ± 0.20	3.60 ± 0.13 <sup>a</sup>	3.74 ± 0.11 <sup>a</sup>
对照组	7	0.37 ± 0.12	2.02 ± 0.49	3.03 ± 0.33	3.24 ± 0.21

<sup>a</sup>P<0.05 vs 对照组.

部运动; 2分, 腹部肌肉收缩; 3分, 腹部上抬; 4分, 身体呈弓状, 臀部上抬. 每一压力维持30 s, 重复3次, 每次间隔3 min; (2)内脏感觉压力阈值. 缓慢向气囊内注气, 观察大鼠的反应, 记录腹部抬起的压力阈值和骨盆抬起的压力阈值.

1.2.3 结肠黏膜炎症评估: (1)组织学检查. 内脏感觉功能测定完后, 处死大鼠, 取耻骨联合附近新鲜结肠组织, 其近端用4%甲醛固定, 石蜡包埋、切片, 行苏木素-伊红(HE)染色, 光镜下观察结肠黏膜组织学改变; (2)MPO活力测定. 取耻骨联合附近的新鲜结肠组织5 cm, 其远端用生理盐水简单冲洗, 剪成碎片, -80 °C冻存, 48 h后取冻存结肠组织称重, 在4 °C下制成匀浆, 按MPO试剂盒说明书测定灌肠后各周结肠组织MPO活力, 并换算成酶活性单位(MPO单位/g湿片). (3)肥大细胞计数. 结肠组织用4%甲醛固定, 石蜡包埋、切片后采用改良甲苯胺蓝染色法<sup>[8]</sup>计数肥大细胞, 普通光镜下每张切片随机选取3个低倍视野(×100)对黏膜下层肥大细胞进行计数, 取其平均值, 然后在高倍镜下(×400)观察肥大细胞形态.

1.2.4 脊髓背根神经节c-fos mRNA的表达: 取大鼠背根神经节L5-S2节段, 匀浆, 加1 mL TRIzol试剂提取总RNA, 利用RT-PCR法测定c-fos mRNA的表达量, c-fos扩增条件: 94 °C预变性3 min, 然后94 °C 20 s, 65 °C 30 s, 72 °C 1 min, 共33个循环, 72 °C再延伸10 min终止反应. β-actin扩增条件: 94 °C预变性5 min, 然后94 °C 45 s, 56 °C 45 s, 72 °C 45 s, 共30个循环, 72 °C再延伸

7 min终止反应. 产物行琼脂糖凝胶电泳, 密度扫描, 用其灰度值与对应的β-actin灰度值的比值进行比较.

**统计学处理** 计量资料用mean±SD表示, 以Friedman检验对不同压力的AWR评分进行相关性分析, 有统计学意义时采用单因素方差分析分别比较每个组灌肠前后各周AWR评分的差异, 方差齐时进一步采用最小显著差法(LSD)行两两比较, 方差不齐则采用Dunnett's T<sub>3</sub>进行两两比较; 相同时间相同CRD压力下的实验组与对照组的AWR评分、内脏感觉压力阈值和MPO活力、肥大细胞计数及两组间c-fos mRNA相对表达量比较均采用t检验, P<0.05为差异有统计学意义. 所有资料应用SPSS17.0统计软件分析.

## 2 结果

2.1 DCA溶液灌肠对AWR评分的影响 灌肠前3 d, AWR评分随着扩张压力的增大而增高(Friedman检验,  $\chi^2 = 53.82$ ,  $P<0.01$ ), 表明CRD压力与AWR评分间存在相关性, 灌肠前两组大鼠的AWR评分的差异无统计学意义(均 $P>0.05$ ), 灌肠后, 在20, 40 mmHg的扩张压力下, 两组间AWR评分的差异无统计学意义(均 $P>0.05$ ), 而在60, 80 mmHg的压力下, 实验组的AWR评分均比对照组高, 差异有统计学意义(均 $P<0.01$ , 表1). 实验组灌肠后第1, 2, 3, 4周在60, 80mmHg压力下AWR评分均比灌肠前高, 差异有统计学意义(60 mmHg:  $P = 0.044, 0.029, 0.045, 0.022$ , 均 $P<0.05$ ;

## ■相关报道

近年来, 有学者研究报道脱氧胆酸灌肠可建立炎症后内脏痛觉过敏模型, 胆盐吸收不良可引起各型炎症后肠易激综合征.

### ■ 创新盘点

在研究炎症后内脏痛觉过敏的基础上,进一步探讨脱氧胆酸溶液对内脏敏感性及脊髓背根神经节上c-fos mRNA表达的影响。

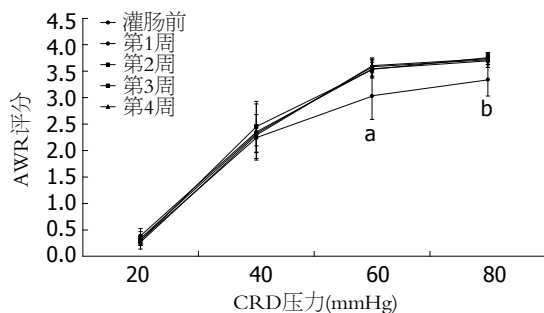


图1 实验组各周AWR评分的比较。<sup>a</sup> $P < 0.05$ , <sup>b</sup> $P < 0.01$  vs灌肠后第1, 2, 3, 4周。

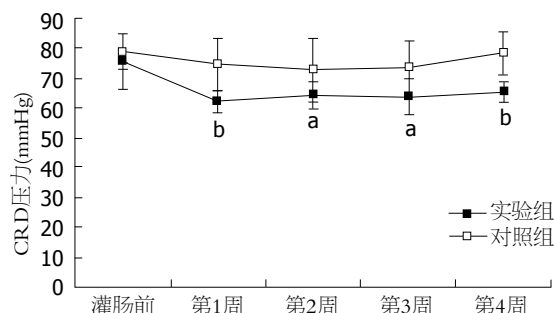


图3 实验组与对照组骨盆抬起压力阈值的比较。<sup>a</sup> $P < 0.05$ , <sup>b</sup> $P < 0.01$  vs对照组。

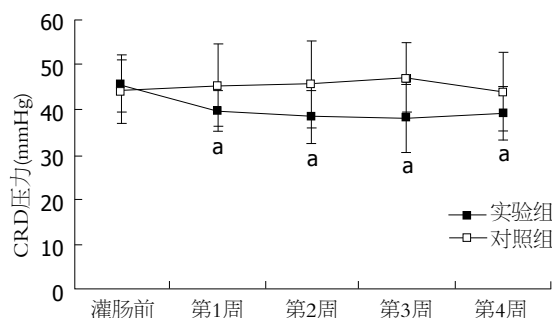


图2 实验组与对照组腹部抬起压力阈值的比较。<sup>a</sup> $P < 0.05$  vs 对照组。

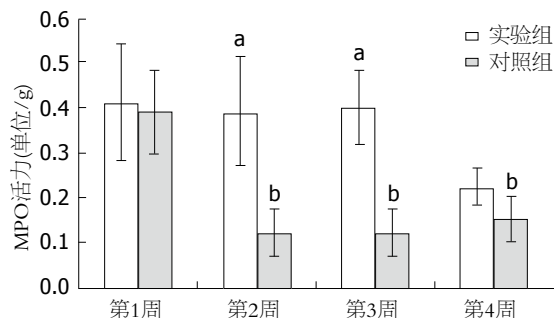


图4 实验组与对照组MPO值比较。<sup>a</sup> $P < 0.01$  vs 对照组; <sup>b</sup> $P < 0.01$  vs 第1周对照组。

80 mmHg:  $P = 0.048, 0.032, 0.017, 0.025$ , 均 $P < 0.05$ ), 而在20, 40 mmHg压力下与灌肠前相比差异无统计学意义(均 $P > 0.05$ , 图1)。

### 2.2 DCA溶液灌肠对内脏感觉压力阈值的影响

灌肠后第1, 2, 3, 4周, 实验组腹部抬起和骨盆抬起的压力阈值均低于对照组, 差异有统计学意义(腹部抬起:  $37.60 \pm 3.78$  vs  $45.40 \pm 8.95$ ,  $38.00 \pm 5.66$  vs  $46.11 \pm 9.03$ ,  $37.25 \pm 6.78$  vs  $47.13 \pm 6.56$ ,  $39.43 \pm 4.89$  vs  $46.14 \pm 6.36$ , 均 $P < 0.05$ ; 骨盆抬起:  $62.40 \pm 3.63$  vs  $74.60 \pm 8.64$ ,  $64.00 \pm 4.36$  vs  $72.89 \pm 9.85$ ,  $63.88 \pm 5.14$  vs  $73.13 \pm 7.70$ ,  $63.86 \pm 3.29$  vs  $76.71 \pm 5.56$ , 均 $P < 0.05$ , 图2, 3)。

2.3 MPO活力测定 灌肠后第2, 3周MPO活性实验组均比对照组高, 差异有统计学意义( $0.39 \pm 0.12$  vs  $0.12 \pm 0.05$ ,  $0.40 \pm 0.08$  vs  $0.12 \pm 0.05$ ,  $n = 4$ , 均 $P < 0.05$ ), 而第1, 4周两组间MPO活性差异无统计学意义( $0.40 \pm 0.13$  vs  $0.39 \pm 0.09$ ,  $0.22 \pm 0.04$  vs  $0.15 \pm 0.05$ ,  $n = 4$ , 均 $P > 0.05$ ), 对照组第1周MPO活性高于第2, 3, 4周, 差异有统计学意义( $0.39 \pm 0.09$  vs  $0.12 \pm 0.05$ ,  $0.12 \pm 0.05$ ,  $0.15 \pm 0.05$ ,  $P < 0.05$ , 图4)。

2.4 结肠黏膜组织学改变 灌肠后前2 wk, 实验组远端结肠组织可见黏膜上皮增生, 黏膜层可见少许炎性细胞浸润, 在后2 wk, 炎症逐渐消退, 未

见明显充血及炎性细胞浸润(图5)。

2.5 肥大细胞计数 高倍镜下( $\times 400$ ), 肥大细胞主要散在分布于黏膜下层, 靠近血管周围, 经改良甲苯胺蓝染色肥大细胞颗粒呈紫红色, 细胞形态多样化, 可呈圆形、梭形或不规则形。灌肠后1 wk, 实验组肥大细胞计数明显高于对照组, 差异有统计学意义( $4.20 \pm 1.87$  vs  $1.10 \pm 0.74$ ,  $P < 0.05$ , 图6)。

2.6 c-fos mRNA的表达量 灌肠后1 wk, 实验组c-fos mRNA的相对表达量为 $0.74 \pm 0.04$ , 对照组相对表达量为 $0.68 \pm 0.02$ , 两组间差异有统计学意义( $n = 4$ ,  $P < 0.05$ , 图7)。

### 3 讨论

IBS是一种临床上常见的功能性肠病, 常伴有腹痛或腹部不适, 目前认为, 内脏高敏感的形成对IBS的病理生理学和症状的发生至关重要, 这种高敏感状态包括对伤害性刺激敏感性的增强和反应阈值的降低(痛觉过敏)和在正常生理状态下不引起痛觉的刺激诱发的疼痛(异常痛觉)。内脏高敏感的出现可能部分与支配胃肠道的初级传入神经纤维致敏有关, 部分可能也存在着中枢致敏, 其产生机制可能部分是由于支配胃肠道的初级传入纤维致敏所致<sup>[9]</sup>。研究发现, 内脏

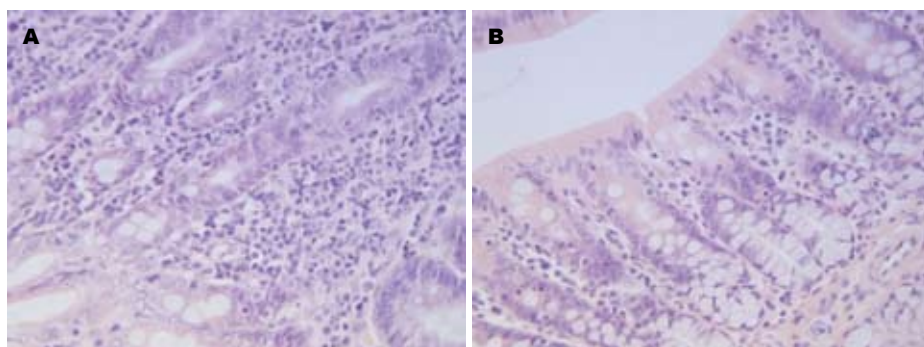


图 5 实验组大鼠各周结肠组织病理改变(HE  $\times 400$ ). A: 实验组第2周; B: 实验组第4周.

#### ■应用要点

脱氧胆酸灌肠诱导了炎症后持续稳定的内脏高敏感状态, 为研究肠易激综合征提供了较好的动物模型, 胆盐吸引不良与肠易激综合征的相关性有待进一步深入研究.

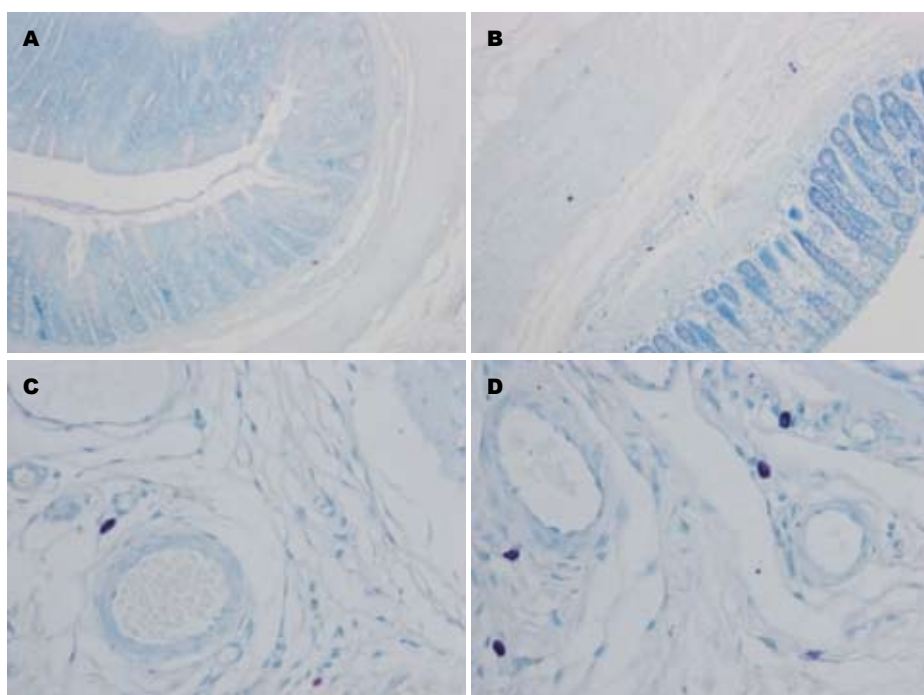


图 6 实验组与对照组第1周结肠组织肥大细胞浸润的比较. A: 对照组( $\times 100$ ); B: 实验组( $\times 100$ ); C: 对照组( $\times 400$ ); D: 实验组( $\times 400$ ).

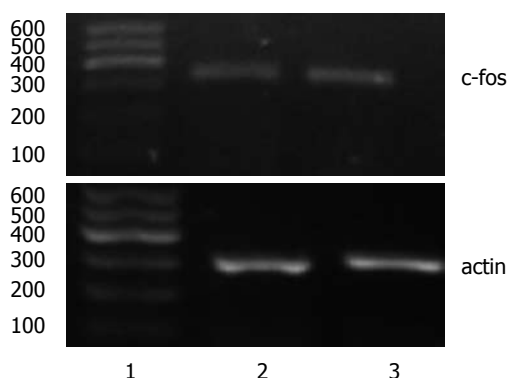


图 7 实验组与对照组第1周脊髓背根神经节上c-fos mRNA的表达的比较. 1: Marker; 2: 对照组; 3: 实验组.

高敏感性与肠道感染或炎症有着一定的关系<sup>[10]</sup>. 目前, 一般认为肥大细胞数量的异常改变以及介质的释放与IBS患者腹痛感觉密切相关<sup>[11]</sup>, 肠

黏膜中的肥大细胞主要位于黏膜血管、淋巴和神经附近, 是肠道主要的抗原感受器, 既具有免疫活性, 又能分泌多种介质<sup>[12]</sup>, 在IBS的发病中可能承担着连接免疫机制和神经机制中间环节的作用.

DCA是一种非结合性次级胆汁酸, 是由甘氨酸和牛磺胆酸在肠道的厌氧菌发酵作用下产生, 他可以促进脂肪分解以利于小肠吸收. 然而高浓度的DCA是一种毒素, 他可以增加结肠黏膜的通透性, 诱导炎症产生<sup>[13]</sup>. 有研究发现, 胆盐吸收不良患者其肠道内胆汁酸浓度增高, 可引起炎症后IBS<sup>[14]</sup>.

本研究参考Traub等<sup>[6]</sup>的方法采用DCA溶液灌肠诱导大鼠炎症后内脏痛觉过敏, 观察DCA溶液灌肠对大鼠结肠黏膜及感觉功能的影响.



# ■同行评议

该动物模型与检测指标的结合,具有新颖性,是有一定可读性的基础研究.

本研究以结肠组织HE染色和MPO活性反应结肠炎症变化,结果显示, DCA灌肠后前2 wk, HE染色高倍镜下可见结肠黏膜组织轻微的炎症改变, 到后2 wk炎症逐渐消退. MPO是与中性粒细胞脱颗粒相关的一种酶, MPO活性的测定被广泛应用于评价肠道的炎症程度, 是一种重要的炎症标志物. 本实验MPO活性测定显示DCA灌肠后前3 wk MPO活性增高, 到第4周又降至对照组水平. 这些表明DCA溶液灌肠诱导了结肠黏膜短暂轻微的炎症. 对照组生理盐水灌肠后, 第1周MPO活力高于第2, 3, 4周, 可能与灌肠针、生理盐水等异物刺激肠道导致轻微短暂炎症有关. 肠道炎症时肠黏膜免疫系统被激活, 各种炎症细胞增加, 主要有肥大细胞、淋巴细胞、内分泌细胞等, 他们活化后分泌出一系列炎症介质, 作用于肠道的神经末梢和内分泌运动感受器, 最终导致肠道分泌功能、运动功能及内脏感知的改变<sup>[15]</sup>. 肠道炎症可促使肥大细胞活化并通过释放各种炎症介质致敏外周传入神经, 肥大细胞可能在初始炎症消退后仍然维持过度反应性.

肠道炎症可促使肥大细胞活化, 并通过释放组胺、前列腺素、肝素、5-HT、白三烯等各种炎症介质, 致敏外周传入神经, 这些物质大多具致痛作用, 可能与IBS患者消化道对痛觉的敏感性增高有关. 肥大细胞可能在初始炎症消退后仍然维持过度反应性. 本实验结果显示, 灌肠后1 wk, 实验组肥大细胞计数明显高于对照组. Ohaskik等<sup>[16]</sup>发现向肥大细胞基因敲除大鼠肠道注射2, 4, 6-三硝基苯磺酸并不像正常大鼠导致内脏敏感性增高, 亦提示了肥大细胞在内脏高敏感性形成中起到关键作用. Rijnierse等<sup>[17]</sup>发现在IBS患者肠道肥大细胞大多分布在黏膜及黏膜下神经附近, 肠道黏膜低度炎症会刺激神经元释放各种神经肽类物质, 并作用于肥大细胞, 使肥大细胞形态发生改变, 同时肥大细胞释放的生物活性因子通过P物质(substance P, SP)、降钙素基因相关肽(calcitonin gene related protein, CGRP)等可能作用肠道神经, 改变内脏感觉. 在肠神经元上已发现存在肥大细胞源性化学物质(如组胺和5-HT)的受体, 而肥大细胞表面也有一些神经肽受体. 一些神经肽如SP、CGRP、血管活性肠肽(vasoactive intestinal polypeptide, VIP)和神经紧张素(neurotensin)等, 可调节肠黏膜内和结缔组织内肥大细胞的活性. 这些都提示肥大细胞可能在脑和肠道之间起桥梁作用,

黏膜中的肥大细胞可能构成了神经-免疫轴和脑-肠轴间的桥梁<sup>[18]</sup>.肥大细胞活化后通过脱颗粒可释放胞内的大量生物活性因子, 如组胺、5-HT、血小板活化因子(platelet activating factor, PAF)、前列腺素(prostaglandin, PG)、白三烯(leukotriene, LT)以及细胞因子等<sup>[19]</sup>, 他们均是伤害感受性分子, 可直接作用于邻近的伤害感受性神经纤维, 直接或间接改变初级传入神经元的感觉阈值. 这些研究提示肥大细胞的浸润和或活性的增加均在内脏高敏发生中起重要作用. 本实验中肥大细胞计数的改变可能是两组大鼠间AWR评分、压力阈值、c-fos mRNA表达差异的基础, 因此肥大细胞数目改变可能是炎症促使IBS症状产生的重要中间环节.

AWR评分及压力阈值的测定可以看出, 灌肠前, 实验组与对照组的AWR评分及压力阈值两组间无明显差异, 灌肠后4 wk内, 在20, 40 mmHg的CRD扩张压力下, 实验组与对照组的AWR评分无明显差异, 然而在60, 80 mmHg的伤害性压力刺激下, AWR评分实验组均比对照组高, 表明DCA灌肠可能增加了结肠组织对伤害性刺激的敏感性, 导致了内脏痛觉过敏. 另外, 灌肠后4 wk内, 实验组腹部抬起和骨盆抬起的压力阈值均比对照组低. 虽然炎症是短暂性的, 但是却出现了持续稳定的内脏痛觉过敏. 与其他模型类似, 向大鼠结肠内注入酵母聚糖<sup>[20]</sup>、醋酸<sup>[21]</sup>、芥子油<sup>[22]</sup>、三硝基苯磺酸<sup>[23]</sup>等炎性化学物质, 均可引起肠道的炎症变化, 增加对伤害性刺激的反应性, 并在炎症消退后较长时间内仍可持续存在, 进一步表明了IBS内脏高敏感性与既往的肠道炎症可能有一定的关系. 肠道炎症可引起多种炎性介质的释放, 如前列腺素、5-HT、缓激肽、神经生长因子等, 可直接作用于初级感觉神经传入纤维, 或间接有肥大细胞启动活化和致敏的级联效应, 使伤害性感受器产生继发性过敏, 并使“睡眠型”受体复活<sup>[24]</sup>. 神经生理学研究表明, 支配胃肠道的内脏初级传入神经纤维很多都属于沉默型或睡眠型纤维, 大约有50%以上的黏膜机械感受器属于此类型. 炎症可恢复其活性, 产生初级传入纤维致敏, 从而增加对伤害刺激的敏感性, 同时使内脏感觉阈值下降. 然而, 肠道炎症导致内脏高敏感的具体机制尚未完全阐明, 有待进一步研究.

激活的初级传入纤维反过来也可以刺激中枢致敏, 传导腹痛症状的感觉神经元胞体位于脊髓背根神经节, 脊髓背角作为脑-肠轴的“中

继站”是内脏敏感性调节的关键部位。c-fos被认为是一种即刻早基因, 机体受到伤害性刺激后诱导表达的c-fos蛋白主要出现在与痛觉传导有关的神经元细胞核内, 机体受到外界伤害性刺激后, 诱导表达的c-fos蛋白主要出现在与痛觉传递有关的神经元细胞核内, 因此表达产物被认为是伤害性感受神经元兴奋的标志物<sup>[25,26]</sup>, 研究表明, 受到伤害性刺激时脊髓背角c-fos的表达增强<sup>[27]</sup>。孙刚等<sup>[28]</sup>研究发现, 脊髓背角5-HT、c-fos的异常表达可能参与便秘型IBS大鼠内脏敏感性异常的调节。还有研究<sup>[29]</sup>显示腹泻型IBS大鼠脊髓c-fos阳性神经元明显升高。这些研究表明脊髓c-fos阳性神经元可能在神经信号传入过程中起放大信号作用。本实验研究显示, 灌肠后1 wk, 给予伤害性CRD扩张压力刺激, 实验组脊髓背根c-fos的mRNA表达量比对照组高, 表明DCA灌肠可能增加了结肠对伤害性机械刺激的敏感性, 这可能与肠道致敏大鼠脊髓背角痛觉神经元接受过多的来自肠神经系统上传的伤害性信号有关, 脊髓背角的c-fos阳性痛觉神经元和来自下行通路的5-HT能神经纤维参与内脏敏感性的调控, 其结构和功能的异常可能是内脏敏感性异常的物质基础之一, DCA诱导的痛觉过敏可能涉及到中枢致敏。这种中枢致敏机制可能与肥大细胞相关, 肥大细胞是胃肠道最主要的内分泌细胞, 被激活后可释放5-HT至黏膜固有层, 5-HT的释放过多可影响正常肠道蠕动和分泌功能, 增加肠黏膜通透性, 且可导致脊髓以及更高级的中枢神经系统对肠道刺激的敏感性增加, 从而产生腹痛、腹泻等症状<sup>[30]</sup>。然而DCA导致的内脏痛觉过敏的具体机制尚不明确, 可能结肠炎症和神经免疫也参与了其中。

总之, 4 mmol/L的DCA溶液持续灌肠3 d, 可诱导结肠一过性轻微的炎症, 出现了持续稳定的内脏痛觉过敏, 在炎症消退后仍可维持这种痛觉过敏状态。模拟了炎症后内脏痛觉过敏现象, 可作为一个模型研究IBS的病理生理机制。另外, 胆汁吸收不良时, 肠道内胆汁酸浓度升高, 这与IBS发生之间是否存在相关性也有待进一步探索。

#### 4 参考文献

- 1 潘国宗, 鲁素彩, 柯美云, 韩少梅, 郭慧平, 方秀才. 北京地区肠易激综合征的流行病学研究: 一个整群、分层、随机的调查. 中华流行病学杂志 2000; 21: 26-29
- 2 Manabe N, Tanaka T, Hata J, Kusunoki H, Haruma K. Pathophysiology underlying irritable bowel

- syndrome--from the viewpoint of dysfunction of autonomic nervous system activity. *J Smooth Muscle Res* 2009; 45: 15-23
- 3 Parry S, Forgacs I. Intestinal infection and irritable bowel syndrome. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2005; 17: 5-9
- 4 Bourdu S, Dapoigny M, Chapuy E, Artigue F, Vasson MP, Dechelotte P, Bommelaer G, Eschaliere A, Ardid D. Rectal instillation of butyrate provides a novel clinically relevant model of noninflammatory colonic hypersensitivity in rats. *Gastroenterology* 2005; 128: 1996-2008
- 5 Xu KD, Liang T, Wang K, Tian DA. Effect of pre-electroacupuncture on p38 and c-Fos expression in the spinal dorsal horn of rats suffering from visceral pain. *Chin Med J (Engl)* 2010; 123: 1176-1181
- 6 Traub RJ, Tang B, Ji Y, Pandya S, Yfantis H, Sun Y. A rat model of chronic postinflammatory visceral pain induced by deoxycholic acid. *Gastroenterology* 2008; 135: 2075-2083
- 7 Ness TJ, Gebhart GF. Colorectal distension as a noxious visceral stimulus: physiology and pharmacologic characterization of pseudoreflexes in the rat. *Brain Res* 1988; 450: 153-169
- 8 龚志锦, 詹铭洲. 病理组织制片和染色技术. 上海: 上海科学技术出版社, 1994: 267-272
- 9 Price DD, Zhou Q, Moshiree B, Robinson ME, Verne GN. Peripheral and central contributions to hyperalgesia in irritable bowel syndrome. *J Pain* 2006; 7: 529-535
- 10 Verma-Gandhu M, Verdu EF, Bercik P, Blennerhassett PA, Al-Mutawaly N, Ghia JE, Collins SM. Visceral pain perception is determined by the duration of colitis and associated neuropeptide expression in the mouse. *Gut* 2007; 56: 358-364
- 11 Guilarte M, Santos J, de Torres I, Alonso C, Vicario M, Ramos L, Martínez C, Casellas F, Saperas E, Malagelada JR. Diarrhoea-predominant IBS patients show mast cell activation and hyperplasia in the jejunum. *Gut* 2007; 56: 203-209
- 12 Barbara G, Cremon C, Pallotti F, De Giorgio R, Stanghellini V, Corinaldesi R. Postinfectious irritable bowel syndrome. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2009; 48 Suppl 2: S95-S97
- 13 Sun Y, Fihn BM, Jodal M, Sjövall H. Inhibition of nitric oxide synthesis potentiates the colonic permeability increase triggered by luminal bile acids. *Acta Physiol Scand* 2004; 180: 167-175
- 14 Spiller RC. Postinfectious irritable bowel syndrome. *Gastroenterology* 2003; 124: 1662-1671
- 15 Róka R, Ait-Belgnaoui A, Salvador-Cartier C, Garcia-Villar R, Fioramonti J, Eutamène H, Bueno L. Dexamethasone prevents visceral hyperalgesia but not colonic permeability increase induced by luminal protease-activated receptor-2 agonist in rats. *Gut* 2007; 56: 1072-1078
- 16 Ohashi K, Sato Y, Kawai M, Kurebayashi Y. Abolishment of TNBS-induced visceral hypersensitivity in mast cell deficient rats. *Life Sci* 2008; 82: 419-423
- 17 Rijnierse A, Nijkamp FP, Kraneveld AD. Mast cells and nerves tickle in the tummy: implications for inflammatory bowel disease and irritable bowel syndrome. *Pharmacol Ther* 2007; 116: 207-235
- 18 Gui XY. Mast cells: a possible link between psychological stress, enteric infection, food allergy and gut hypersensitivity in the irritable bowel syndrome. *J Gastroenterol Hepatol* 1998; 13: 980-989

- 19 Gué M, Del Rio-Lacheze C, Eutamene H, Théodorou V, Fioramonti J, Bueno L. Stress-induced visceral hypersensitivity to rectal distension in rats: role of CRF and mast cells. *Neurogastroenterol Motil* 1997; 9: 271-279
- 20 Honoré P, Kamp EH, Rogers SD, Gebhart GF, Mantyh PW. Activation of lamina I spinal cord neurons that express the substance P receptor in visceral nociception and hyperalgesia. *J Pain* 2002; 3: 3-11
- 21 Kang YM, Lamb K, Gebhart GF, Bielefeldt K. Experimentally induced ulcers and gastric sensory-motor function in rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2005; 288: G284-G291
- 22 Adam B, Liebrechts T, Gschossmann JM, Krippner C, Scholl F, Ruwe M, Holtmann G. Severity of mucosal inflammation as a predictor for alterations of visceral sensory function in a rat model. *Pain* 2006; 123: 179-186
- 23 Zhou Q, Price DD, Caudle RM, Verne GN. Visceral and somatic hypersensitivity in TNBS-induced colitis in rats. *Dig Dis Sci* 2008; 53: 429-435
- 24 Collins SM, Piche T, Rampal P. The putative role of inflammation in the irritable bowel syndrome. *Gut* 2001; 49: 743-745
- 25 Mönnikes H, Rüter J, König M, Grote C, Kobelt P, Klapp BF, Arnold R, Wiedenmann B, Tebbe JJ. Differential induction of c-fos expression in brain nuclei by noxious and non-noxious colonic distension: role of afferent C-fibers and 5-HT<sub>3</sub> receptors. *Brain Res* 2003; 966: 253-264
- 26 Nakagawa T, Katsuya A, Tanimoto S, Yamamoto J, Yamauchi Y, Minami M, Satoh M. Differential patterns of c-fos mRNA expression in the amygdaloid nuclei induced by chemical somatic and visceral noxious stimuli in rats. *Neurosci Lett* 2003; 344: 197-200
- 27 Lee IO, Seo Y. The effects of intrathecal cyclooxygenase-1, cyclooxygenase-2, or nonselective inhibitors on pain behavior and spinal Fos-like immunoreactivity. *Anesth Analg* 2008; 106: 972-977, table of contents
- 28 孙刚, 杨云生, 彭丽华, 王巍峰. 肠易激综合征大鼠内脏敏感性和脊髓背角5-HT和c-fos的表达. *世界华人消化杂志* 2007; 15: 2718-2722
- 29 王运东, 张俊秀, 牛小平, 韩真. C-Fos在腹泻型肠易激综合征大鼠模型脊髓中的表达及意义. *国际消化病杂志* 2010; 30: 51-53
- 30 Wheatcroft J, Wakelin D, Smith A, Mahoney CR, Mawe G, Spiller R. Enterochromaffin cell hyperplasia and decreased serotonin transporter in a mouse model of postinfectious bowel dysfunction. *Neurogastroenterol Motil* 2005; 17: 863-870

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 •

### 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)

# TRAF6 shRNA对LPS/TLR4信号传导通路的体外干预作用

陈 锋, 孙继民, 何生松, 庞 然, 许娟娟, 董继华

陈锋, 孙继民, 武汉市妇女儿童医疗保健中心急救科 湖北省武汉市 430015

何生松, 庞然, 华中科技大学同济医学院附属协和医院感染科 湖北省武汉市 430022

许娟娟, 华中科技大学同济医学院附属协和医院消化内科 湖北省武汉市 430022

董继华, 华中科技大学同济医学院附属协和医院中心实验室 湖北省武汉市 430022

陈锋, 2010年毕业于华中科技大学同济医学院, 获医学博士学位, 主要从事病毒性肝炎及肝衰竭的病因机制研究。

**作者贡献分布:** 孙继民、何生松及陈锋对此文所作贡献均等; 此课题设计由陈锋与何生松设计完成; 研究过程由陈锋、庞然及许娟娟操作完成; 研究所用新试剂及分析工具由董继华、何生松与孙继民提供; 数据分析及本论文写作由陈锋完成; 孙继民与何生松修改校正。

**通讯作者:** 孙继民, 主任医师, 430015, 湖北省武汉市江岸区香港路100号, 武汉市妇女儿童医疗保健中心急救科。

sunjimin@163.com

收稿日期: 2011-08-09 修回日期: 2011-08-19

接受日期: 2011-09-01 在线出版日期: 2011-09-08

## ShRNA-mediated silencing of the TRAF6 gene inhibits LPS/TLR4 signaling *in vitro*

Feng Chen, Ji-Min Sun, Sheng-Song He, Ran Pang, Juan-Juan Xu, Ji-Hua Dong

Feng Chen, Ji-Min Sun, Intensive Care Unit, Wuhan Medical and Care Center for Women and Children, Wuhan 430015, Hubei Province, China

Sheng-Song He, Ran Pang, Department of Infectious Diseases, Union Hospital of Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, Hubei Province, China

Juan-Juan Xu, Department of Gastroenterology, Union Hospital of Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, Hubei Province, China

Ji-Hua Dong, Central Laboratory, Union Hospital of Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, Hubei Province, China

**Correspondence to:** Ji-Min Sun, Professor, Intensive Care Unit, Wuhan Medical and Care Center for Women and Children, 100 Xianggang Road, Jiang'an District, Wuhan 430015, Hubei Province, China. sunjimin@163.com

Received: 2011-08-09 Revised: 2011-08-19

Accepted: 2011-09-01 Published online: 2011-09-08

## Abstract

**AIM:** To investigate the impact of small hairpin RNA (shRNA)-mediated silencing of the tumor necrosis factor receptor-associated factor 6 (TRAF6) gene on the lipopolysaccharide (LPS)/toll-like receptor (TLR) 4 signaling pathway *in*

*vitro*.

**METHODS:** ShRNA sequences targeting the TRAF6 gene were designed, synthesized and used to construct eukaryotic expression plasmids. After transfection of the recombinant plasmids into RAW264.7 cells, cell proliferation was measured by methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) assay. Inflammatory cellular models were established by LPS stimulation. Levels of tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) and transforming growth factor- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1) in the supernatants, mRNA expression of TRAF6, interleukin-6 (IL-6) and cyclooxygenase-2 (COX-2), protein expression of TRAF6, and translocation of NF- $\kappa$ B were assayed by ELISA, real-time quantitative PCR and Western blot, respectively.

**RESULTS:** The mRNA and protein expression of TRAF6 was lower in cells transfected with TRAF6-shRNA1 or TRAF6-shRNA2 (79.17% and 68.74%, respectively) compared to other groups. Therefore, cells transfected with pGCsi-TRAF6-shRNA1 or 2 were used for subsequent experiments. TRAF6 knockdown significantly inhibited the proliferation of RAW264.7 cells within 72 h after transfection, reduced the production of pro-inflammatory cytokines and mediators including TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 and COX-2, and inhibited NF- $\kappa$ B nuclear translocation. Moreover, TRAF6 knockdown could suppress the release of TGF- $\beta$ 1 at the protein level.

**CONCLUSION:** TRAF6 knockdown can, to some extent, inhibit early inflammatory response stimulated by LPS. TRAF6 may become a potential therapeutic target for many inflammation-related diseases.

**Key Words:** Tumor necrosis factor receptor-associated factor 6; RNA interference; Lipopolysaccharide; Toll-like receptor 4; Nuclear factor- $\kappa$ B

Chen F, Sun JM, He SS, Pang R, Xu JJ, Dong JH. ShRNA-mediated silencing of the TRAF6 gene inhibits LPS/TLR4 signaling *in vitro*. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(25): 2637-2643

## ■背景资料

TRAF6作为介导NF- $\kappa$ B信号转导的一个关键衔接蛋白, 在内毒素信号转导通路中起重要作用, 如果能减少TRAF6合成, 就可以减少炎症因子的释放, 既能一定程度上有效阻断内毒素炎症反应, 又不干扰机体防御细菌感染的正常功能。RNAi技术能高效、特异地抑制细胞内源或外源性靶基因的表达, 已应用于基因功能、肿瘤等的研究。

## ■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



## ■研究前沿

多种信号通路参与炎症反应,其分子机制复杂,TRAF6是否是LPS/TLR4信号传导通路中的关键靶点有待进一步的研究.

## 摘要

**目的:** 体外研究shRNA(short hairpin RNA)沉默基因TRAF6的表达对RAW264.7细胞增殖的影响,初步探讨TRAF6-shRNA对LPS/TLR4胞内信号转导的影响.

**方法:** 构建靶向抑制小鼠TRAF6的shRNA的真核表达载体,转染RAW264.7细胞后培养48 h,予以终浓度为100 ng/mL的LPS刺激,0、4、8 h和16 h后收集细胞上清,同时设空白对照及地塞米松阳性对照组,ELISA法测定上清液中TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、TGF- $\beta$ 1, Real-time PCR方法检测TRAF6、IL-6、COX-2 mRNA, Western blot检测细胞核内NF- $\kappa$ B p65.

**结果:** 转染TRAF6-shRNA 48 h后, TRAF6 mRNA及蛋白表达明显受到抑制,其抑制率分别为79.17%、68.74%. MTT法检测结果显示,重组质粒转染72 h内对细胞增殖无明显的抑制. LPS刺激后, TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、TGF- $\beta$ 1表达量都有明显变化( $P<0.01$ ),其中TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 在8 h达高峰, TGF- $\beta$ 1在16 h达高峰, TRAF6基因沉默后,以上细胞因子增长率明显都显下降( $P<0.01$ ). 实验结果显示, TRAF6基因沉默明显能下调IL-6、COX-2 mRNA表达,并能抑制LPS激活的NF- $\kappa$ B核转位.

**结论:** 重组质粒TRAF6-shRNA能有效降低RAW264.7细胞中基因TRAF6 mRNA及蛋白的表达,并对内毒素炎症反应具有明显的抑制效应.

**关键词:** 肿瘤坏死因子受体相关因子6; RNA干扰; 细菌脂多糖; Toll样受体4信号通路; 核因子- $\kappa$ B

陈锋, 孙继民, 何生松, 庞然, 许娟娟, 董继华. TRAF6 shRNA对LPS/TLR4信号传导通路的体外干预作用. 世界华人消化杂志 2011; 19(25): 2637-2643  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/2637.asp>

## 0 引言

肿瘤坏死因子受体相关因子(tumour necrosis factor-receptor-associated factors, TRAFs)家族成员是一类多功能的胞内衔接蛋白, TRAFs蛋白交织于一系列信号传导网络中,从而影响细胞的生存、增殖、分化和死亡,参与多个生物学过程的调控. 在细菌脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)激活的信号核因子 $\kappa$ B(nuclear factor- $\kappa$ B, NF- $\kappa$ B)通路中,肿瘤坏死因子受体相关因子6(tumour necrosis factor-receptor-associated

factor-6, TRAF6)作为LPS/TLR4下游信号通路的调节子,可介导多条信号通路(TNF- $\alpha$ 、IL-1和RANKL通路)<sup>[1]</sup>,最终激活转录因子NF- $\kappa$ B、AP-1、PKB/Akt等,介导病原体相关分子模式(pathogen-associated molecular pattern, PAMP)引起的天然和获得性免疫及炎症反应<sup>[2,3]</sup>. 近年来研究证明,单核巨噬细胞通过分泌表达多种炎症相关因子,在急性肝衰竭炎症反应中占有重要地位. 在医学实验中,RAW264.7巨噬细胞经内毒素刺激被广泛用作炎症细胞模型,用于抗炎药物效果研究<sup>[4]</sup>. 因此,本实验设计构建重组质粒pGCsi-TRAF6-shRNA,利用RNA干扰(RNA interference, RNAi)技术,以小鼠RAW264.7单核巨噬细胞系为研究对象,研究体外抑制TRAF6表达和功能对逆转或减慢内毒素炎症反应的影响.

## 1 材料和方法

**1.1 材料** RAW264.7细胞由华中科技大学同济医学院附属协和医院中心实验室董继华主任惠赠;重组质粒pGCsi-TRAF6-shRNA由本实验室前期构建;质粒中提试剂盒购自Omega公司;胎牛血清(FCS)购自杭州四季青生物公司;DMEM高糖培养基购自美国Gibco公司;脂质体TransFectin购自美国Bio-Rad公司;TRIzol、MTT、DMSO、LPS购自美国Invitrogen公司;逆转录试剂盒、SYBR Green realtime PCR试剂盒购自ToYoBo公司;ELISA试剂盒(TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、TGF- $\beta$ 1)购自美国Cusabio公司;TRAF6多克隆抗体购自Santa Cruz公司.

### 1.2 方法

**1.2.1 pGCsi-TRAF6-shRNA真核表达载体的构建及鉴定:** 以GenBank已公布的小鼠TRAF6 mRNA序列(NM009424)为参考序列,用美国Invitrogen公司的在线设计软件BLOCK-iT<sup>TM</sup> RNAi Designer,筛选出4条理论上最佳siRNA序列: shRNA1(900-920)、shRNA2(1303-1323)、shRNA3(2324-2344)、shRNA4(3285-3305). LOOP结构选用了TCAA GAG,末端以polyT作为RNA聚合酶III终止信号,两端设计有BamH I和Hind III酶切位点. shRNA寡核苷酸序列及Negative-shRNA表达载体由北京毅新业科技有限公司合成提供. 构建的真核表达载体进行酶切和测序鉴定完全正确<sup>[5]</sup>.

**1.2.2 细胞培养及转染:** 用高糖DMEM培养基(含100 mL/L FCS, 100 kU/L的青霉素/链霉素)在50 mL/L CO<sub>2</sub>, 37 °C, 饱和湿度的条件下培养

表 1 荧光定量PCR引物序列

基因	引物序列	退火温度(°C)
TRAF6	forward 5'-AAGATTGGCAACTTTGGGATG-3'	59
	reverse 5'-GTGGGATTGTGGGTCGCTG-3'	
IL-6	forward 5'-CCACGGCCTTCCCTACTTC-3'	58
	reverse 5'-CTCATTCCACGATTTCCAG-3'	
COX-2	forward 5'-GAAGTCTTTGGTCTGGTGCCTG-3'	58
	reverse 5'-GTCTGCTGGTTGGAATAGTTGC-3'	
$\beta$ -actin	forward 5'-CCGTGAAAAGATGACCCAG-3'	60
	reverse 5'-TAGCCACGCTCGGTCAGG-3'	

RAW264.7细胞. 转染前24 h, 胰酶消化细胞, 将细胞接种于6孔板, 当细胞汇合度约70%-90%时进行转染. 分别用250  $\mu$ L无血清培养基稀释DNA和Trans Fectin, 将DNA(g)/Trans Fectin(L)按2:5比例混合, 室温孵育20 min后, 将500  $\mu$ L混合物加入到含血清培养基的细胞中, 转染4 h后更换培养基, 第2天重复转染1次. 实验分为正常对照组(C组)、阴性对照组(转染Negative-shRNA表达载体的细胞, 即Ni组)和重组质粒转染组(转染pGCsi-TRAF6-shRNA-1, 2, 3, 4表达载体, 即T6i-1, 2, 3, 4组), 每组均设3个复孔. 在第2次转染48 h后在荧光显微镜下观察表达绿色荧光的细胞, 以Western blot检测TRAF6(抗体1:200)蛋白的表达, 通过预实验发现重组表达载体pGCsi-TRAF6-shRNA1, 2的干扰作用较强, 故选择pGCsi-TRAF6-shRNA1, 2进行后续实验.

1.2.3 MTT法检测: 将处于对数生长期的RAW264.7细胞以 $3 \times 10^4$ 个/孔的密度接种于96孔培养板, 37 °C、50 mL/L CO<sub>2</sub>条件下培养24 h后进行转染, 分别于第二次转染后0、24、48、72 h, 每孔加入MTT(5 g/L)20  $\mu$ L, 4 h后吸弃孔内培养上清, 每孔再加入二甲基亚砷(DMSO)150  $\mu$ L, 振荡10 min, 在酶联免疫检测仪上用490 nm波长检测吸光度(A), 每组设6个复孔, 用只含培养液无细胞的空白孔调零, 计算抑制率, 比较各组细胞的存活情况, 抑制率(%) = (1-A实验组/A对照组)  $\times$  100%.

1.2.4 实验分组及处理: 将细胞接种于培养板上培养24 h后, 转染质粒pGCsi-TRAF6-shRNA1、2, 第2次转染48 h后, 予100  $\mu$ g/L LPS刺激, 同时设4个对照组: (1)阳性对照组: 用LPS处理的同时加用地塞米松(DM)0.5 mg/L干预; (2)阴性对照组: 转染Negative-shRNA质粒后用LPS处理; (3)空白对照组: 用100  $\mu$ g/L LPS处理而不用质粒转

染; (4)正常对照组: 不用质粒转染也不用LPS处理. 每组3个复孔.

1.2.5 细胞因子TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、TGF- $\beta$ 1检测: LPS刺激0、4、8、16 h后, 分别收集各组细胞上清, -70 °C贮存待检, 酶联免疫吸附法测定TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 及TGF- $\beta$ 1, 按试剂盒说明书要求操作.

1.2.6 荧光定量PCR检测TRAF6、IL-6、COX-2 mRNA表达: LPS刺激24 h后, 分别收集各组细胞, 提取总RNA, 测定 $A_{260}/A_{280}$ 为1.75-1.95. 取2  $\mu$ g RNA, 应用逆转录试剂盒按20  $\mu$ L逆转录体系合成cDNA. PCR引物由应用软件Prima5.0设计(表1), 由上海生工合成. 荧光定量PCR反应体系为25  $\mu$ L, 内含500 ng cDNA模板, 终浓度为250 nmol/L的上下游引物及SYBR Green Realtime PCR Master Mix 12.5  $\mu$ L. 反应条件为95 °C 60 s; 95 °C 15 s; 退火 15 s; 72 °C 45 s, 荧光收集, 40个循环. 每个样本重复3次. 以相对CT值(即 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ )表示目的基因的相对表达量<sup>[6]</sup>, 以空白细胞为对照.

1.2.7 Western blot检测细胞核内NF- $\kappa$ B p65的表达: LPS刺激24 h后, 4 °C PBS溶液洗涤细胞3次, 按试剂盒说明提取核蛋白, -70 °C保存, 考马斯亮蓝法检测样品蛋白浓度. 取20  $\mu$ g总蛋白, 上样于10% SDS-聚丙烯酰胺凝胶, 电泳后转膜, 5%脱脂奶粉封闭液室温孵育45 min, 分别加入NF- $\kappa$ B p65抗体(1:500)和 $\beta$ -actin蛋白抗体, 4 °C过夜, 辣根过氧化物酶二抗(1:3 000)室温孵育1 h, 显色后以 $\beta$ -actin为内参照, 用AlphaEaseFC 4.0图像分析软件进行灰度分析.

统计学处理 数据整理后, 所有计量资料均用mean  $\pm$  SD表示, 应用SPSS15.0统计软件处理数据, 两组数据间比较采用配对资料t检验, 多组数据间比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA),  $P < 0.05$ 为差异有统计学意义.

#### ■ 相关报道

近年研究表明, TRAF6不仅是LPS信号转导的关键调控分子, 还在TLR/IL-1R介导炎症反应和天然免疫信号通路中起重要作用, 2008年Yang等研究发现TRAF6缺失的肥大细胞IL-6、CCL-9、IL-13合成障碍并且细胞表面的Fc $\epsilon$ R I型聚集障碍, NF- $\kappa$ B p65合成减少, 从而抑制炎症反应.

## ■创新盘点

本研究通过构建靶向抑制小鼠 TRAF6 shRNA 的真核表达载体, 转染 RAW264.7 细胞, 采用分子生物学方法检测 RAW264.7 细胞增殖及 LPS/TLR4 信号传导通路中相关炎症因子和 NF- $\kappa$ B p65 蛋白和/或 mRNA 表达变化, 表明抑制 TRAF6 功能, 能够显著降低炎症刺激反应, 具有重要的理论参考价值。

表 2 特异性 shRNA 重组质粒对细胞增殖的影响 (mean  $\pm$  SD,  $n = 6$ )

时间 (h)	正常对照(C)组	阴性对照(Ni)组		T6i-1组		T6i-2组	
	( $A_{490}$ 值)	$A_{490}$ 值	抑制率	$A_{490}$ 值	抑制率(%)	$A_{490}$ 值	抑制率(%)
0	0.23 $\pm$ 0.06	0.22 $\pm$ 0.02	4.35 $\pm$ 0.06	0.23 $\pm$ 0.11	1.53 $\pm$ 0.57	0.21 $\pm$ 0.13	8.69 $\pm$ 0.72
24	0.39 $\pm$ 0.02	0.40 $\pm$ 0.08	2.26 $\pm$ 0.05	0.38 $\pm$ 0.06	2.56 $\pm$ 0.14	0.40 $\pm$ 0.10	2.08 $\pm$ 0.56
48	0.61 $\pm$ 0.07	0.57 $\pm$ 0.03	6.56 $\pm$ 0.13	0.58 $\pm$ 0.07	4.92 $\pm$ 0.55	0.58 $\pm$ 0.04	4.71 $\pm$ 0.17
72	0.98 $\pm$ 0.04	0.96 $\pm$ 0.03	2.04 $\pm$ 0.07	0.94 $\pm$ 0.05	4.08 $\pm$ 0.23	0.97 $\pm$ 0.08	1.02 $\pm$ 0.23

## 2 结果

**2.1 不同质粒转染细胞 TRAF6 蛋白表达** T6i-1, 2 组与 C 组、Ni 组相比, TRAF6 蛋白表达均显著下降 ( $P < 0.01$ ), 实验结果表明 pGCsi-TRAF6-shRNA1, 2 在蛋白水平上显著地抑制 TRAF6 的表达 (图 1A, B), 其抑制率 (以空白对照组的 AVG 值为 100%) 分别为 79.17%、68.74%。T6i-3, 4 组与 C 组、Ni 组之间的差异均无显著性意义 ( $P > 0.05$ )。

**2.2 MTT 法检测重组质粒对细胞增殖的影响** 转染特异性 shRNA 重组质粒 0、24、48 和 72 h 后, 同时点 Ni 组与 C 组比较, 差异无显著性意义, 同时点 T6i-1, 2 组与 Ni 组比较, 差异也无统计学意义, 表明抑制 TRAF6 表达的 shRNA 对体外培养的 RAW 264.7 的增殖无明显抑制作用 (表 2, 图 1D)。

**2.4 TRAF6 siRNA 对 LPS 诱导的促炎细胞因子的影响** LPS 刺激后, TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  分泌量显著增高, 二者均于 8 h 达高峰。由于各组细胞在 LPS 刺激时存在细胞数不同, 数据经转换成增长率后, 即增长率 = (样品含量/对照组含量 - 1)  $\times$  100%, 可见 T6i-1, 2 组经 LPS 刺激后, 其 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  的增长速度明显低于空白对照 (LPS) 组 ( $P < 0.01$ , 增长率数据未显示), 说明重组质粒 pGCsi-TRAF6-shRNA-1, 2 转染入 RAW264.7 细胞后可明显抑制促炎细胞因子 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  的分泌 (图 2)。

**2.5 TRAF6 siRNA 对 LPS 诱导的 TGF- $\beta$ 1 的影响** LPS 刺激后, 各组细胞 TGF- $\beta$ 1 表达变化呈上调趋势, 8 h 内与 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  比较, 其表达变化趋势相对较缓, 并且 TGF- $\beta$ 1 表达量于 16 h 达高峰, 迟于 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 。Ni 组和 LPS 组的增长率在 8 h 和 16 h 时明显高于 T6i-1, 2 组 (均  $P < 0.01$ , 增长率数据未显示), 说明 TRAF6-shRNA 也可明显抑制 TGF- $\beta$ 1 的分泌 (图 3)。

**2.6 TRAF6 基因沉默对 TRAF6、IL-6、COX-2 mRNA 的影响** 野生型 RAW264.7 细胞中 TRAF6 mRNA 的表达量相对较低, 以 LPS 刺激后 TRAF6 mRNA 的表达明显增加 ( $P < 0.01$ ), T6i-1 组转染后

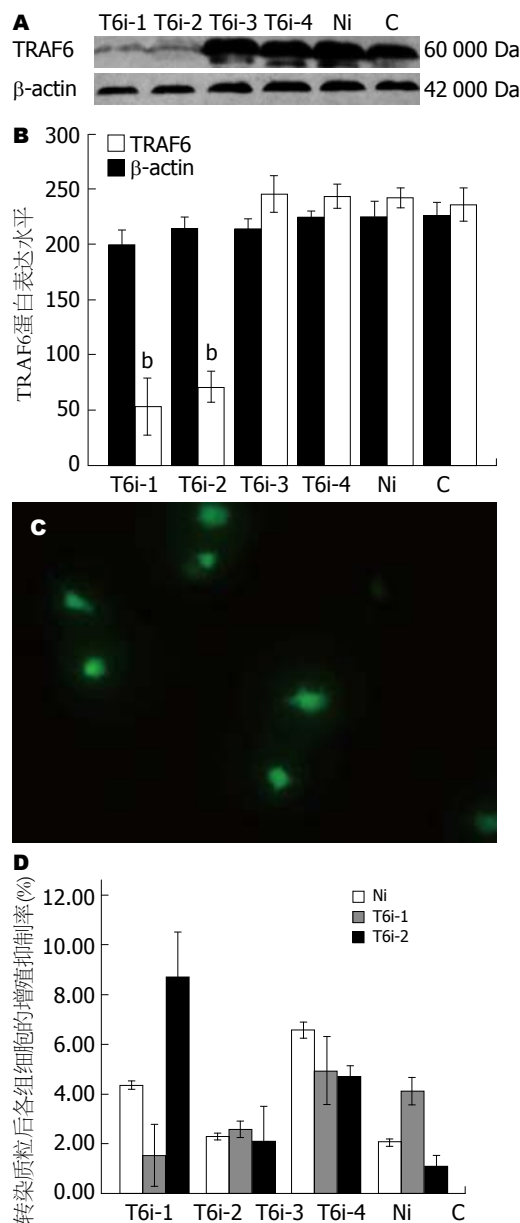


图 1 不同质粒转染细胞 TRAF6 蛋白表达。A: Western blot 检测 pGCsi-TRAF6-shRNA 对 TRAF6 蛋白表达的影响; B: pGCsi-TRAF6-shRNA 对 TRAF6 蛋白抑制率比较 ( $P < 0.01$  vs C 组、Ni 组); C: pGCsi-TRAF6-shRNA 质粒转染 48 h 后荧光显微镜观察 RAW264.7 细胞 ( $\times 400$ ); D: MTT 法检测特异性 shRNA 重组质粒转染后各组细胞的增殖抑制率。

细胞, 其 TRAF6 mRNA 表达与正常对照组比较明显下降, 证明 TRAF6-shRNA1 的沉默效应最为

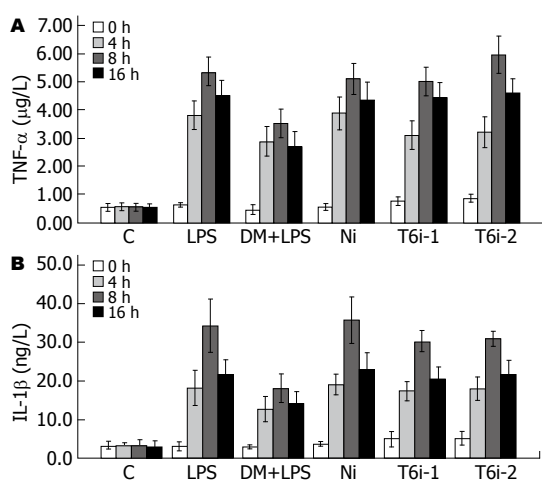


图 2 TRAF6 siRNA对LPS诱导的促炎细胞因子的影响. A: TRAF6 siRNA对LPS诱导的TNF- $\alpha$ 的影响; B: TRAF6 siRNA对LPS诱导的IL-1 $\beta$ 的影响.

显著, 与其蛋白检测结果相似(图1A, B). TRAF6基因沉默可明显下调LPS刺激后IL-6和COX-2 mRNA的表达( $P < 0.05$ 或 $0.01$ , 图4).

**2.7 TRAF6基因沉默对细胞核内NF- $\kappa$ B p65的表达影响** RAW264.7细胞在无LPS刺激时, 细胞核NF- $\kappa$ B p65表达量很少, LPS刺激后NF- $\kappa$ B p65表达显著增高, 阴性对照组和空白对照组的NF- $\kappa$ B p65表达条带明显大于T6i-1和T6i-2组(图5), 提示转染TRAF6-shRNA后, 能明显降低NF- $\kappa$ B p65核转位.

### 3 讨论

LPS是革兰氏阴性杆菌生长时释放或死亡时裂解出来的细胞壁脂多糖成分, 是最常见的炎症反应激活因子, 主要通过单核-巨噬细胞系统的TLR4相结合而诱导相应的生物效应. LPS信号首先经TLR4胞内段与髓性分化蛋白88(myeloid differentiation factor 88, MyD88)的TLR结构域相作用<sup>[7]</sup>, 进而寡聚白介素-1受体相关激酶(interleukin-1 receptor associated kinase, IRAK), 导致IRAK-1磷酸化, 活化后的IRAK-1与TRAF6形成复合物, 最终激活NF- $\kappa$ B和AP-1, 导致TNF- $\alpha$ 、IL-1、IL-6等一系列炎症细胞因子的大量表达, 引起组织损伤<sup>[8-10]</sup>. 从LPS导致炎症反应的多条途径看, 阻断MyD88到TRAF6段, 既能一定程度上有效阻断内毒素效应, 又不干扰机体防御细菌感染的正常功能.

TRAF6是LPS/TLR4信号传导通路中的重要衔接蛋白, 他既可激活NF- $\kappa$ B诱导激酶(NF- $\kappa$ B-inducing kinase, NIK), 又可激活Toll信号进化保守中介分子进而激活丝裂素活化蛋白激酶/ERK

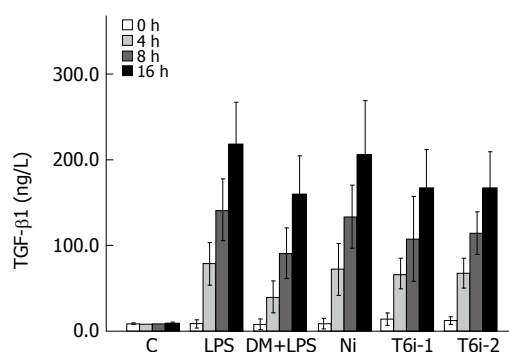


图 3 TRAF6 siRNA对LPS诱导的TGF- $\beta$ 1的影响.

激酶激酶(mitogen-activated protein kinase/ERK kinase kinase-1, MEKK-1), 是MyD88依赖性信号转导途径主要蛋白分子<sup>[11]</sup>. Loniewski等<sup>[12]</sup>发现TRAF6基因沉默显著降低LPS诱导的c-Jun氨基末端激酶(c-Jun amino terminal kinase, JNK)和I- $\kappa$ B磷酸化. Yang等<sup>[13]</sup>研究发现TRAF6缺失的肥大细胞IL-6、CCL-9、IL-13合成障碍并且细胞表面的Fc $\epsilon$ R I型聚集障碍, 从而抑制炎症反应以及肥大细胞脱颗粒释放活性介质. Machado等<sup>[14]</sup>研究证实脂氧素介导的TRAF6降解可显著抑制树突状细胞产生炎症因子. 因此, TRAF6作为一种重要的NF- $\kappa$ B调节因素, 是LPS信号转导的关键调控分子.

本实验结果显示, 重组质粒pGCsi-TRAF6-shRNA-1, 2能有效抑制TRAF6 mRNA和蛋白表达, 说明重组质粒有效地抑制了TRAF6基因的表达. 有研究发现, TRAF6基因敲除可导致多种组织器官生理功能紊乱, 甚至早亡, Lomaga等<sup>[15]</sup>发现TRAF6<sup>-/-</sup>小鼠常在胚胎期或出生后立即死亡, 因此, 分析研究TRAF6基因敲除小鼠存在一定困难. 从本实验MTT检测来看, 重组质粒转染72h内对细胞增殖无明显的抑制, 说明TRAF6沉默基因在短时间内对细胞生存无明显影响.

RNAi是通过双链RNA(dsRNA)在细胞内特异性地诱导与同源互补的mRNA降解, 从而引发基因转录后水平沉默的现象<sup>[16]</sup>. RNAi技术可以快速, 方便, 廉价地提供相关基因的作用功能<sup>[17-20]</sup>. 因此, 本实验利用RNAi技术, 观察TRAF6 siRNA对炎症反应的干预作用. 实验发现, 正常RAW264.7细胞中TRAF6 mRNA表达的量相对较低, LPS刺激后, TRAF6 mRNA的表达量明显增加, 说明TRAF6 mRNA表达与LPS刺激存在明确的量效关系.

近年来研究证明, TNF- $\alpha$ 作为早期炎症细胞因子, 可通过其他炎症细胞因子(IL-1 $\beta$ 、IL-6

#### ■应用要点

在LPS/TLR4信号传导通路中, TRAF6基因沉默明显下调炎症细胞因子(TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、TGF- $\beta$ 1、IL-6、COX-2)和NF- $\kappa$ B p65蛋白和/或mRNA表达, 从而抑制内毒素炎症反应, 为临床治疗多种全身炎症反应性疾病, 寻求更为合适的作用靶点提供新的实验佐证.



### ■同行评价

本研究通过抑制小鼠TRAF6基因表达,揭示给予炎症刺激因子LPS刺激后,能够显著降低炎症刺激反应,为临床防治炎症性因子刺激所致的炎症反应,具有重要的理论参考价值。

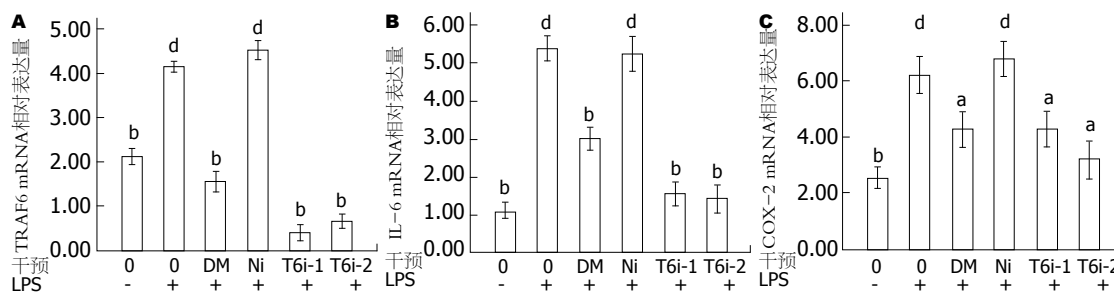


图4 LPS刺激24 h后,各组细胞TRAF6、IL-6、COX-2 mRNA的表达变化。<sup>a</sup> $P < 0.05$ , <sup>b</sup> $P < 0.01$  vs 空白对照组比较; <sup>d</sup> $P < 0.01$  vs 正常对照组。

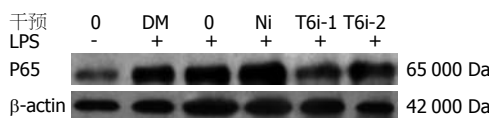


图5 各组细胞核内NF- $\kappa$ B P65蛋白表达变化。

等)扩大其生物学作用<sup>[21]</sup>, IL-1 $\beta$ 和IL-6自分泌或旁分泌方式影响其他细胞因子和炎症介质的分泌,诱导抗原递呈细胞表面免疫分子的表达,从而作为T细胞和B细胞的激活和分化因子,可介导免疫球蛋白的分泌,激活补体、杀伤细胞和吞噬细胞,增强免疫反应介导的组织损伤<sup>[22]</sup>。虽然,上调这些细胞因子是机体防御细菌感染的主要机制,但其过度表达可以造成机体免疫紊乱和炎症损伤。实验结果显示,炎症发生过程中, TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 表达量都有明显变化,并在短时间内达高峰。阻断TRAF6后, TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 表达量明显减少,其增长率也明显下降,并且LPS刺激后IL-6 mRNA的表达量明显下调。

TGF- $\beta$ 1是重要的免疫调节性细胞因子,能抑制巨噬细胞激活,参与炎症组织修复、免疫抑制等<sup>[23,24]</sup>。因此,为了证实阻断TRAF6具有对致炎和抗炎细胞因子的双重调节作用,本实验选择同时检测TGF- $\beta$ 1水平。研究发现,细胞上清中,正常细胞TGF- $\beta$ 1表达量极少,随着LPS刺激时间延长,其分泌量升高,但升高趋势较缓。TRAF6基因沉默后, TGF- $\beta$ 1增长率明显下降。结果表明,部分阻断LPS/TLR4信号通路不仅能抑制促炎症细胞因子(TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6)增长,也能抑制抗炎细胞因子(TGF- $\beta$ 1)的分泌。

NF- $\kappa$ B是参与炎症反应的一类重要转录因子,在炎症反应中起重要的枢纽作用,参与调控一系列介导炎症反应的基因表达<sup>[25-27]</sup>,其中包括诱导型COX-2基因的表达<sup>[28,29]</sup>。作为调节前列腺素合成的关键酶, COX-2是病理状态下过度炎症反应的诱导酶类之一<sup>[30,31]</sup>。实验结果显示,

TRAF6基因沉默能抑制LPS激活的NF- $\kappa$ B核转位,并能明显下调LPS刺激后COX-2 mRNA的表达,可见TRAF6可调控炎症反应中的限速酶,对炎症起控制作用。

由此可见, TRAF6 siRNA对内毒素炎症反应的初始阶段具有明显的抑制效应。但实验结果显示TRAF6 siRNA对细胞因子(TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ )的抑制效应低于地塞米松,其机制还需进一步探讨,以期进一步揭示细胞自身对抗炎症反应的调控机制。下一步实验拟在动物体内证实TRAF6 siRNA对内毒素炎症反应的治疗作用,为深化炎症相关研究提供新思路。

### 4 参考文献

- Doyle SL, O'Neill LA. Toll-like receptors: from the discovery of NF $\kappa$ B to new insights into transcriptional regulations in innate immunity. *Biochem Pharmacol* 2006; 72: 1102-1113
- Wu H, Arron JR. TRAF6, a molecular bridge spanning adaptive immunity, innate immunity and osteoimmunology. *Bioessays* 2003; 25: 1096-1105
- Asagiri M, Takayanagi H. The molecular understanding of osteoclast differentiation. *Bone* 2007; 40: 251-264
- Kim KM, Kwon YG, Chung HT, Yun YG, Pae HO, Han JA, Ha KS, Kim TW, Kim YM. Methanol extract of Cordyceps pruinosa inhibits in vitro and in vivo inflammatory mediators by suppressing NF- $\kappa$ B activation. *Toxicol Appl Pharmacol* 2003; 190: 1-8
- 陈锋, 何生松, 邱荣元, 庞然, 许娟娟, 董继华. 小鼠TRAF6基因shRNA真核表达载体的构建与表达. *世界华人消化杂志* 2009; 17: 1406-1411
- 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
- Hwang TH, Yoon BC, Jeong JS, Seo SY, Lee HJ. A single administration of adenoviral-mediated HGF cDNA permits survival of mice from acute hepatic failure. *Life Sci* 2003; 72: 851-861
- Qiu L, Song L, Yu Y, Zhao J, Wang L, Zhang Q. Identification and expression of TRAF6 (TNF receptor-associated factor 6) gene in Zhikong scallop Chlamys farreri. *Fish Shellfish Immunol* 2009; 26: 359-367

- 9 Belladonna ML, Vacca C, Volpi C, Giampietri A, Fioretti MC, Puccetti P, Grohmann U, Campanile F. IL-23 neutralization protects mice from Gram-negative endotoxic shock. *Cytokine* 2006; 34: 161-169
- 10 Triantafilou M, Brandenburg K, Kusumoto S, Fukase K, Mackie A, Seydel U, Triantafilou K. Combinational clustering of receptors following stimulation by bacterial products determines lipopolysaccharide responses. *Biochem J* 2004; 381: 527-536
- 11 Kobayashi T, Kim TS, Jacob A, Walsh MC, Kadono Y, Fuentes-Pananá E, Yoshioka T, Yoshimura A, Yamamoto M, Kaisho T, Akira S, Monroe JG, Choi Y. TRAF6 is required for generation of the B-1a B cell compartment as well as T cell-dependent and -independent humoral immune responses. *PLoS One* 2009; 4: e4736
- 12 Loniewski KJ, Patial S, Parameswaran N. Sensitivity of TLR4- and -7-induced NF kappa B1 p105-TPL2-ERK pathway to TNF-receptor-associated-factor-6 revealed by RNAi in mouse macrophages. *Mol Immunol* 2007; 44: 3715-3723
- 13 Yang YJ, Chen W, Carrigan SO, Chen WM, Roth K, Akiyama T, Inoue J, Marshall JS, Berman JN, Lin TJ. TRAF6 specifically contributes to FcepsilonRI-mediated cytokine production but not mast cell degranulation. *J Biol Chem* 2008; 283: 32110-32118
- 14 Machado FS, Esper L, Dias A, Madan R, Gu Y, Hildeman D, Serhan CN, Karp CL, Aliberti J. Native and aspirin-triggered lipoxins control innate immunity by inducing proteasomal degradation of TRAF6. *J Exp Med* 2008; 205: 1077-1086
- 15 Lomaga MA, Henderson JT, Elia AJ, Robertson J, Noyce RS, Yeh WC, Mak TW. Tumor necrosis factor receptor-associated factor 6 (TRAF6) deficiency results in exencephaly and is required for apoptosis within the developing CNS. *J Neurosci* 2000; 20: 7384-7393
- 16 Tian X, Zhang P, Zamek-Gliszczynski MJ, Brouwer KL. Knocking down transport: applications of RNA interference in the study of drug transport proteins. *Drug Metab Rev* 2005; 37: 705-723
- 17 George J, Tsutsumi M. siRNA-mediated knock-down of connective tissue growth factor prevents N-nitrosodimethylamine-induced hepatic fibrosis in rats. *Gene Ther* 2007; 14: 790-803
- 18 Song E, Lee SK, Wang J, Ince N, Ouyang N, Min J, Chen J, Shankar P, Lieberman J. RNA interference targeting Fas protects mice from fulminant hepatitis. *Nat Med* 2003; 9: 347-351
- 19 Kim KH, Kim HC, Hwang MY, Oh HK, Lee TS, Chang YC, Song HJ, Won NH, Park KK. The anti-fibrotic effect of TGF-beta1 siRNAs in murine model of liver cirrhosis. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 343: 1072-1078
- 20 Gopalakrishnan B, Wolff J. siRNA and DNA transfer to cultured cells. *Methods Mol Biol* 2009; 480: 31-52
- 21 Schwabe RF, Brenner DA. Mechanisms of Liver Injury. I. TNF-alpha-induced liver injury: role of IKK, JNK, and ROS pathways. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2006; 290: G583-G589
- 22 Navarrete-Reyes AP, Montaña-Alvarez M. [Inflammation. Aging inflammatory origin]. *Rev Invest Clin* 2009; 61: 327-336
- 23 Huynh ML, Fadok VA, Henson PM. Phosphatidylserine-dependent ingestion of apoptotic cells promotes TGF-beta1 secretion and the resolution of inflammation. *J Clin Invest* 2002; 109: 41-50
- 24 Otsuka M, Negishi Y, Aramaki Y. Involvement of phosphatidylinositol-3-kinase and ERK pathways in the production of TGF-beta1 by macrophages treated with liposomes composed of phosphatidylserine. *FEBS Lett* 2007; 581: 325-330
- 25 Viatour P, Merville MP, Bours V, Chariot A. Phosphorylation of NF-kappaB and IkappaB proteins: implications in cancer and inflammation. *Trends Biochem Sci* 2005; 30: 43-52
- 26 Zhou Z, Wang L, Song Z, Saari JT, McClain CJ, Kang YJ. Abrogation of nuclear factor-kappaB activation is involved in zinc inhibition of lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor-alpha production and liver injury. *Am J Pathol* 2004; 164: 1547-1556
- 27 Dambach DM, Andrews BA, Moulin F. New technologies and screening strategies for hepatotoxicity: use of in vitro models. *Toxicol Pathol* 2005; 33: 17-26
- 28 Jamaluddin M, Tian B, Boldogh I, Garofalo RP, Brasier AR. Respiratory syncytial virus infection induces a reactive oxygen species-MSK1-phospho-Ser-276 RelA pathway required for cytokine expression. *J Virol* 2009; 83: 10605-10615
- 29 Aggarwal BB, Sung B. The relationship between inflammation and cancer is analogous to that between fuel and fire. *Oncology (Williston Park)* 2011; 25: 414-418
- 30 Tsatsanis C, Androulidaki A, Venihaki M, Margioris AN. Signalling networks regulating cyclooxygenase-2. *Int J Biochem Cell Biol* 2006; 38: 1654-1661
- 31 Jain S, Chakraborty G, Raja R, Kale S, Kundu GC. Prostaglandin E2 regulates tumor angiogenesis in prostate cancer. *Cancer Res* 2008; 68: 7750-7759

编辑 李军亮 电编 何基才

# 神经调节在功能性胃肠病发病中的作用及其研究进展

倪敏, 丁义江, 丁曙晴

倪敏, 南京中医药大学第一临床医学院 江苏省南京市 210029  
倪敏, 丁义江, 丁曙晴, 南京中医药大学第三附属医院全国  
中医肛肠医疗中心 江苏省南京市 210001  
通讯作者: 丁义江, 210001, 江苏省南京市, 南京中医药大学第  
三附属医院全国中医肛肠医疗中心. njgczx@gmail.com  
收稿日期: 2011-04-17 修回日期: 2011-08-25  
接受日期: 2011-09-01 在线出版日期: 2011-09-08

## Progress in understanding the role of neuromodulation in the pathogenesis of functional gastrointestinal disorders

Min Ni, Yi-Jiang Ding, Shu-Qing Ding

Min Ni, the First Clinical Medical College of Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210029, Jiangsu Province, China

Min Ni, Yi-Jiang Ding, Shu-Qing Ding, the Third Affiliated Hospital of Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210001, Jiangsu Province, China

Correspondence to: Yi-Jiang Ding, the Third Affiliated Hospital of Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210001, Jiangsu Province, China. njgczx@gmail.com

Received: 2011-04-17 Revised: 2011-08-25

Accepted: 2011-09-01 Published online: 2011-09-08

## Abstract

Functional gastrointestinal disorders (FGIDs) are a group of common digestive diseases whose pathogenesis is closely related to the abnormal brain-gut axis. Disturbances of the neuromodulatory processes in the brain-gut axis generate functional digestive disorders mainly centered on the pain, bloating symptoms and motility diseases. This article reviews neuromodulatory mechanism aspects of the brain-gut axis and discusses the clinical prospects for the neuromodulatory interventional treatment of FGIDs.

**Key Words:** Neuromodulation; Brain-gut axis; Functional gastrointestinal disorders

Ni M, Ding YJ, Ding SQ. Progress in understanding the role of neuromodulation in the pathogenesis of functional gastrointestinal disorders. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(25): 2649-2653

## 摘要

功能性胃肠病是消化系统的常见疾病, 其发

生与脑-肠轴的异常密切相关。脑-肠轴神经调节过程的紊乱产生了以胃肠道动力改变和疼痛、腹胀为主症的消化系统疾病。本文总结了脑-肠轴的神经调节机制和介入治疗进展, 探讨了神经调节介入治疗功能性胃肠病的临床研究前景。

**关键词:** 神经调节; 脑-肠轴; 功能性胃肠病

倪敏, 丁义江, 丁曙晴. 神经调节在功能性胃肠病发病中的作用及其研究进展. *世界华人消化杂志* 2011; 19(25): 2649-2653

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/2649.asp>

## 0 引言

功能性胃肠病(functional gastrointestinal disorders, FGID)是一组以慢性便秘、腹泻、腹痛和腹胀等肠道症状为临床表现, 而缺乏严重解剖结构或代谢异常的综合征的总称。胃肠道活动通过各处的传出和传入通路与大脑皮质活动相关并受到神经调节, 这种双向性的脑-肠作用的异常将引起这类疾病的发生。近年来随着神经胃肠病学发展及脑影像技术的应用, 逐步揭示了脑肠相互作用的机制, 解释了其对肠道肌电兴奋、舒缩功能的影响及对动力障碍、疼痛的调节机制。这类疾病主要包括功能性便秘, 肠易激综合征(irritable bowel syndrome, IBS), 胃食管反流疾病(gastroesophageal reflux disease, GERD), 慢性腹痛等。

神经系统对胃肠运动的调控通过3个层次来实现: 第1层次是中枢神经系统, 第2层次是自主神经系统, 第3层次是肠神经系统。这种在不同层次将胃肠道与中枢神经系统联系起来的神经-内分泌网络称为脑-肠轴<sup>[1]</sup>。理解了不同水平脑肠轴神经调控过程, 可以解释脊髓刺激(spinal cord stimulation, SCS)和骶神经刺激(sacral nerve electrostimulation, SNS)等神经调节治疗的作用, 也增加了发现新的治疗方法的机会。

## 1 神经调节机制

### 1.1 中枢神经系统调节 大脑的各级中枢和脊髓

## ■背景资料

功能性胃肠病(FGID)是一组以慢性便秘、腹泻、腹痛和腹胀等肠道症状为临床表现, 而缺乏严重解剖结构或代谢异常的综合征的总称。胃肠道活动通过各处的传出和传入通路与大脑皮质活动相关并受到神经调节, 这种双向性的脑-肠作用的异常将引起这类疾病的发生。近年来随着神经胃肠病学发展及脑影像技术的应用, 逐步揭示了脑肠相互作用的机制, 解释了其对肠道肌电兴奋、舒缩功能的影响及对动力障碍、疼痛的调节机制。

## ■同行评议者

许文燮, 教授, 上海交通大学医学院生命科学院生物医学工程系

## ■研究前沿

Schwartz等研究发现功能性消化不良患者与正常受试者相比酸进入胃窦与肠蠕动慢,高敏症状,如恶心是密切相关的。

接受体内、外环境传入的信息,经整合后由自主神经和神经内分泌系统将调控信息传递到胃肠道内在的神经丛(肌间或黏膜下神经丛),亦或直接作用于胃肠道平滑肌细胞。大量研究已显示精神心理因素与肠道动力失调和内脏敏感机制密切联系,行为和认知可以通过间接复杂的通路影响肠活动:焦虑和抑郁可以加重IBS、非溃疡性消化不良或慢性便秘<sup>[2]</sup>,而生物反馈治疗和行为放松疗法可以改善这些症状<sup>[3,4]</sup>。

近年来,随着脑影像技术的发展,人们采用fMRI和PET对脑肠轴进行研究<sup>[5-15]</sup>。研究结果显示IBS患者与健康者比较,直肠球囊反复扩张诱发疼痛刺激时丘脑、岛叶及杏仁核信号更强<sup>[5]</sup>。Loening-Baucke等研究便秘和肛门失禁儿童的肛门直肠感觉诱发电位应答,发现诱发电位的P1潜伏期延长了<sup>[16-18]</sup>。另一研究中反流性食管炎和健康受试者相比,食管黏膜酸刺激后激活的大脑区域相同,但患者组血流波峰提前出现,大脑信号更强<sup>[6]</sup>。这可能是黏膜被酸损伤后神经剥脱,更快激活大脑活动,而更快激活的大脑活动可以理解为GERD特定脑区域的致敏作用。众多研究证实,酸暴露与直肠扩张诱发疼痛刺激激活的脑区域很相似,这些说明存在一个共同的整合内脏痛觉的大脑基质,与这类疾病的发生紧密相关。最近还有研究<sup>[19-21]</sup>发现盆底失弛缓便秘成年患者与正常受试者相比肛门和直肠感觉诱发电位应答的潜伏期延长,振幅降低。这表明盆底失弛缓便秘患者的胃肠道和大脑之间的感觉传入通路可能受损。

**1.2 自主神经系统调节** 自主神经系统是中枢神经系统与肠神经系统的桥梁,主要由交感神经和副交感神经完成。副交感神经节前纤维接收食管至近端结肠的信息,远端结肠和直肠的副交感神经是由骶神经的S2-S4发出并终止于背侧角。他们的初级神经元的神经末梢终止于肠壁,细胞体位于脊髓后根神经节。这些传入神经元也是伤害性刺激感受器,参与感受痛觉。许多神经元包含有降钙素基因相关肽,另一些含有P物质。这些神经递质在内脏痛及内脏感觉过敏中发挥重要作用。

迷走神经在支配胃肠运动中也发挥重要作用,可以增加胃肠的蠕动,促进腺体的分泌,同时对肠道黏膜的屏障作用和黏膜病变形成都有影响。迷走神经和骨盆神经是非常重要的神经调节干预的部位,如药物难治性的消化系溃疡可以手术切断远侧迷走神经来治疗。近来许多

研究采用电刺激外周神经或背侧脊柱来改善大便失禁<sup>[22]</sup>,严重难治性便秘<sup>[23]</sup>,IBS<sup>[24]</sup>和慢性腹痛<sup>[25,26]</sup>的症状。由此可知任何水平神经通路的调节治疗都可能影响临床结果。

**1.3 肠神经系统局部调节** 肠神经系统是指胃肠道中存在一个从初级感觉神经元、中间神经元到支配胃肠效应的运动神经元组成的神经系统。肠神经系统内在的初级传入神经元(intrinsic primary afferent neurons, IPANs)能感受各种刺激,直接收集特定信息如化学的,机械的,热量的和疼痛等刺激并转化为电位。其中,而化学敏感和牵张敏感的机械感受器在具有“储存库”作用的胃肠道特别重要,对黏膜机械敏感的IPANs主要位于黏膜下肌层,肠壁的压力和扩张程度激活受体进而改变肠道动力和分泌活性,再通过整合下丘脑的信息影响了饥饿、胀满感的感知。大量研究<sup>[27,28]</sup>证明对管腔扩张的超敏反应很可能是因为机械敏感器在肠自主神经水平异常引起的。Gebhart和Coll发现小鼠内脏机械感受器香草素1(TRPV1)和酸离子通道受体3在结肠扩张诱导超敏反应过程中起着重要作用<sup>[14]</sup>。激活机械感受器受体的不同亚型可以引出胃肠道特殊的感知觉。低阈值的机械刺激感受器可能与非疼痛感知觉(如发胀)的传导有关,而高阈值的机械刺激感受器可能与急剧的,局部的疼痛感知觉的传导相关<sup>[29]</sup>。

化学敏感性在小肠中非常重要,小肠有特异性的依赖于氢离子浓度而产生应答的传入神经末梢,其IPANs位于肌间神经丛。最近的一项研究揭示化学感受器神经末梢水平的调节异常可能是产生功能性消化不良的关键因素。Schwartz等<sup>[30]</sup>研究发现功能性消化不良患者与正常受试者相比酸进入胃窦与肠蠕动慢,高敏症状,如恶心是密切相关的。由以上研究我们似乎可以把质子泵一抑制剂抑制胃酸分泌的药理作用理解为神经调节的结果,因为这些药物可以影响神经末梢水平感觉信息传入中枢从而影响肠道动力。

## 2 治疗进展

神经调节作用主要通过外周药理学靶向性作用或者电刺激神经系统不同水平或者直接刺激肠道肌层从而改变胃肠道状态。采用电刺激方法,其效率与所采用的物理参数:振幅,频率及电极的位置有关。各种类型的神经调节介入治疗临床上已逐渐应用。

GERD是临床上一种非常常见的疾病,其发



生与食管下端括约肌(lower esophageal sphincter, LES)收缩功能下降有密切关系. 目前有学者<sup>[31-34]</sup>开始研究电刺激LES的作用, 探讨植入电刺激器治疗GERD的可能. Xing等<sup>[31]</sup>和同事把电极直接植入8位健康的狗的胃肌层壁中, 在幽门口上14 cm处, 采用低频率/宽脉冲(0.1 Hz/375 ms)和高频率/窄脉冲(14 Hz/330 us)两种类型电流. 两种类型的刺激都显著增加了LES的压力. 低频率/宽脉冲电流平均从21.5 mmHg增加到30.9 mmHg, 而高频率/窄脉冲电流平均从19.6 mmHg增加到33.4 mmHg. 最近研究中<sup>[32]</sup>, 采用相同的理念, 一个3.3 mm×28.0 mm微型刺激器(Bion<sup>®</sup>)内向性直接植入3只狗的低位食管肌层中并采用遥控引导装置, 结果在3只狗中都显著增加了LES的压力, 所采用的电流是10 mA, 20 Hz和200 us. LES电刺激术目前虽只是用于动物模型, 但这些研究证明将来可能用于治疗人类GERD.

许多研究把电极植入体内从而进行SNS, 用于慢性便秘和肛门失禁, 尿失禁, 脊髓损伤, 功能性肛门直肠痛的治疗<sup>[23,35-39]</sup>. 在一个研究中<sup>[38]</sup>电刺激S2引起了所有结肠推进式蠕动的显著增加, 而电刺激S3逆向的蠕动显著增加. 患者的排便频率和轻泻药使用的统计结果表明使用SNS能够改善难治性便秘的症状. 即使刺激S2和S3根部, 在近端结肠也能发现到结肠蠕动的改善, 而不仅仅在远端(该区域是骶副交感神经分布区域). 该研究也解释了由于直肠-结肠反射的存在, 可以在刺激直肠的同时诱导临近结肠的活动. 另一研究<sup>[35]</sup>虽然有价值的结果很少, 显示刺激8位患者中只有2位在临床上有所改善, 但参与这些研究的大多数患者患有慢传输性便秘, 但是另一研究<sup>[6]</sup>在盆底失弛缓便秘患者中发现症状有改善. SNS对脊髓损伤后排便障碍患者的乙状结肠, 直肠, 肛周括约肌活动也有所增加<sup>[39]</sup>. 但是以上研究中安慰作用并没有被完全排除, 他们不是盲法, 随机的实验. 上面所提到的通过SNS神经调节产生的作用还不尽如人意, 还需要进一步的研究. 总之, SNS对顽固性便秘患者的治疗是有效的, 可以延迟结肠造口术, 降低了激进的外科手术伴随症状的发病率.

SNS也是治疗由脊髓外伤或其他情况如多发性硬化症, 硬皮病所导致的肛门失禁的有效方法. 在一项研究中<sup>[40]</sup>, 短暂刺激的应答筛选后, 对一组患者进行永久性的SNS. 5位患者中的4位反应良好并且SNS被使用了. 在这组选择的患者中, 失禁的发生被减少到0. 另外一组各种原因导

致的女性大便失禁患者在植入持久性电极以后, 随访16 mo症状均显著改善<sup>[36]</sup>. 当然这些都是小样本报告, 还需要大样本的研究进一步证实.

对IBS, 内脏痛综合征, 慢性腹痛等疼痛相关的综合征, 各种神经调节介入治疗的效率都已有报道<sup>[41-45]</sup>. Govaert等<sup>[41]</sup>研究发现9个难治性功能性肛门直肠痛患者中, 4个永久植入刺激器的患者, 症状改善明显, 半年后疼痛评分从9下降到1. Greenwood-Van Meerveld等<sup>[43]</sup>发现采用50 Hz和0.2 mS脉冲宽单相直流电在T12/L1水平对正常大鼠进行SCS可以降低对结肠60 mmHg压力扩张的痛觉阈值, 即使植入的SCS系统被关闭以后, 延迟作用仍然能持续70-90 min. 类似的研究, 研究者用三硝基苯磺酸<sup>[44]</sup>致敏了大鼠的结肠黏膜, 然后在脊柱水平进行电刺激也观察到腹部收缩次数降低, 疼痛症状减轻. SCS可能在中枢水平抑制了由于实验性酸刺激或扩张性疼痛所诱导的神经过度兴奋, 也可能是抑制了交感神经的活性, 进而降低皮质层疼痛觉的感知. SCS还被成功地用于家族性地中海热相关的腹痛<sup>[45]</sup>. 两个家族性地中海热患者, 在T8-T9水平植入一个单极刺激器能够在3和6 mo后显著改善疼痛症状, 但是在第一个患者随访12 mo后发现SCS的这种作用降低了. 回顾以上这些结果, 直接脊髓刺激的临床应用前景是广阔的, 但还需要更多的临床研究评估.

FGID的脑-肠轴发病机制的研究, 有利于开拓靶向性的治疗, 开发其他神经调节介入治疗. 例如经颅磁刺激治疗(transcranial magnetic stimulation, TMS), 采用外部磁场进行外部调节从而在皮质水平上发生作用. Gow等<sup>[46]</sup>证明采用TMS刺激舌咽运动神经皮质可以增加皮质兴奋性从而影响下游的咽的运动. TMS改善了不同状态(中风, 神经痛)的疼痛症状, 当TMS刺激第二体觉区时改善了慢性胰腺炎导致的慢性内脏痛<sup>[47]</sup>. 这种方法应用于功能性胃肠病还需要更多的实验和临床研究.

### 3 结论

神经调节治疗可以在脑肠轴的任何水平发生作用, 影响神经活动, 从而争取恢复脑肠神经系统的平衡. 其通过药物影响受体活性或者电刺激神经从而改变黏膜兴奋性等方法发生作用. 采用植入性的电刺激装置虽然还没得到广泛应用但是临床研究显示这些方法有很大的应用前景.

**■应用要点**  
FGID的脑-肠轴发病机制的研究, 有利于开拓靶向性的治疗, 开发其他神经调节介入治疗.

## ■同行评价

了解功能性胃肠病的发病机制以及治疗方面的进展对临床工作者具有一定的指导性作用。

## 4 参考文献

- 1 Talley NJ, Howell S, Poulton R. The irritable bowel syndrome and psychiatric disorders in the community: is there a link? *Am J Gastroenterol* 2001; 96: 1072-1079
- 2 Henningsen P, Zimmermann T, Sattel H. Medically unexplained physical symptoms, anxiety, and depression: a meta-analytic review. *Psychosom Med* 2003; 65: 528-533
- 3 Lackner JM, Lou Coad M, Mertz HR, Wack DS, Katz LA, Krasner SS, Firth R, Mahl TC, Lockwood AH. Cognitive therapy for irritable bowel syndrome is associated with reduced limbic activity, GI symptoms, and anxiety. *Behav Res Ther* 2006; 44: 621-638
- 4 Lackner JM, Jaccard J, Krasner SS, Katz LA, Gudleski GD, Blanchard EB. How does cognitive behavior therapy for irritable bowel syndrome work? A mediational analysis of a randomized clinical trial. *Gastroenterology* 2007; 133: 433-444
- 5 Gaman A, Kuo B. A review of CNS activation patterns from fMRI studies in IBS patients versus healthy controls. *Gastroenterology* 2007; 32 (4 supplement 2): A-602
- 6 Kern M, Hofmann C, Hyde J, Shaker R. Characterization of the cerebral cortical representation of heartburn in GERD patients. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2004; 286: G174-G181
- 7 Andresen V, Bach DR, Poellinger A, Tstrouya C, Stroh A, Foerschler A, Georgiewa P, Zimmer C, Mönnikes H. Brain activation responses to subliminal or supraliminal rectal stimuli and to auditory stimuli in irritable bowel syndrome. *Neurogastroenterol Motil* 2005; 17: 827-837
- 8 Ringel Y, Drossman DA, Turkington TG, Bradshaw B, Hawk TC, Bangdiwala S, Coleman RE, Whitehead WE. Regional brain activation in response to rectal distension in patients with irritable bowel syndrome and the effect of a history of abuse. *Dig Dis Sci* 2003; 48: 1774-1781
- 9 Kwan CL, Diamant NE, Pope G, Mikula K, Mikulis DJ, Davis KD. Abnormal forebrain activity in functional bowel disorder patients with chronic pain. *Neurology* 2005; 65: 1268-1277
- 10 Mertz H, Morgan V, Tanner G, Pickens D, Price R, Shyr Y, Kessler R. Regional cerebral activation in irritable bowel syndrome and control subjects with painful and nonpainful rectal distention. *Gastroenterology* 2000; 118: 842-848
- 11 Verne GN, Himes NC, Robinson ME, Gopinath KS, Briggs RW, Crosson B, Price DD. Central representation of visceral and cutaneous hypersensitivity in the irritable bowel syndrome. *Pain* 2003; 103: 99-110
- 12 Wilder-Smith CH, Schindler D, Lovblad K, Redmond SM, Nirkko A. Brain functional magnetic resonance imaging of rectal pain and activation of endogenous inhibitory mechanisms in irritable bowel syndrome patient subgroups and healthy controls. *Gut* 2004; 53: 1595-1601
- 13 Mayer EA, Berman S, Suyenobu B, Labus J, Mandelkern MA, Naliboff BD, Chang L. Differences in brain responses to visceral pain between patients with irritable bowel syndrome and ulcerative colitis. *Pain* 2005; 115: 398-409
- 14 Song GH, Venkatraman V, Ho KY, Chee MW, Yeoh KG, Wilder-Smith CH. Cortical effects of anticipation and endogenous modulation of visceral pain assessed by functional brain MRI in irritable bowel syndrome patients and healthy controls. *Pain* 2006; 126: 79-90
- 15 Kong J, Gollub RL, Rosman IS, Webb JM, Vangel MG, Kirsch I, Kaptchuk TJ. Brain activity associated with expectancy-enhanced placebo analgesia as measured by functional magnetic resonance imaging. *J Neurosci* 2006; 26: 381-388
- 16 Barker AT, Jalinous R, Freeston IL. Non-invasive magnetic stimulation of human motor cortex. *Lancet* 1985; 1: 1106-1107
- 17 Loening-Baucke V, Yamada T. Is the afferent pathway from the rectum impaired in children with chronic constipation and encopresis? *Gastroenterology* 1995; 109: 397-403
- 18 Turnbull GK, Hamdy S, Aziz Q, Singh KD, Thompson DG. The cortical topography of human anorectal musculature. *Gastroenterology* 1999; 117: 32-39
- 19 Rao SS. Advances in diagnostic assessment of fecal incontinence and dyssynergic defecation. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2010; 8: 910-919
- 20 Remes-Troche JM, Rao SS. Neurophysiological testing in anorectal disorders. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol* 2008; 2: 323-335
- 21 Berlin G, Selbing A, Ryden G. Rhesus haemolytic disease treated with high-dose intravenous immunoglobulin. *Lancet* 1985; 1: 1153
- 22 Ganio E, Luc AR, Clerico G, Trompetto M. Sacral nerve stimulation for treatment of fecal incontinence: a novel approach for intractable fecal incontinence. *Dis Colon Rectum* 2001; 44: 619-629; discussion 629-631
- 23 Kenefick NJ, Nicholls RJ, Cohen RG, Kamm MA. Permanent sacral nerve stimulation for treatment of idiopathic constipation. *Br J Surg* 2002; 89: 882-888
- 24 Krames ES, Mousad DG. Spinal cord stimulation reverses pain and diarrheal episodes of irritable bowel syndrome: a case report. *Neuromodulation* 2004; 7: 82-88
- 25 Tiede JM, Ghazi SM, Lamer TJ, Obray JB. The use of spinal cord stimulation in refractory abdominal visceral pain: case reports and literature review. *Pain Pract* 2006; 6: 197-202
- 26 Kapural L, Narouze SN, Janicki TI, Mekhail N. Spinal cord stimulation is an effective treatment for the chronic intractable visceral pelvic pain. *Pain Med* 2006; 7: 440-443
- 27 Bouin M, Plourde V, Boivin M, Riberdy M, Lupien F, Laganière M, Verrier P, Poitras P. Rectal distention testing in patients with irritable bowel syndrome: sensitivity, specificity, and predictive values of pain sensory thresholds. *Gastroenterology* 2002; 122: 1771-1777
- 28 Mertz H, Naliboff B, Munakata J, Niazi N, Mayer EA. Altered rectal perception is a biological marker of patients with irritable bowel syndrome. *Gastroenterology* 1995; 109: 40-52
- 29 Cervero F, Jänig W. Visceral nociceptors: a new world order? *Trends Neurosci* 1992; 15: 374-378
- 30 Schwartz MP, Samsom M, Smout AJ. Chemospecific alterations in duodenal perception and motor response in functional dyspepsia. *Am J Gastroenterol* 2001; 96: 2596-2602
- 31 Xing J, Felsner J, Brody F, Soffer E. Gastric electrical stimulation significantly increases canine lower esophageal sphincter pressure. *Dig Dis Sci* 2005; 50: 1481-1487

- 32 Clarke JO, Jagannath SB, Kalloo AN, Long VR, Beitler DM, Kantsevoy SV. An endoscopically implantable device stimulates the lower esophageal sphincter on demand by remote control: a study using a canine model. *Endoscopy* 2007; 39: 72-76
- 33 Ouyang H, Xing J, Chen JD. Tachygastria induced by gastric electrical stimulation is mediated via alpha- and beta-adrenergic pathway and inhibits antral motility in dogs. *Neurogastroenterol Motil* 2005; 17: 846-853
- 34 Tang M, Zhang J, Xu L, Chen JD. Implantable gastric stimulation alters expression of oxytocin- and orexin-containing neurons in the hypothalamus of rats. *Obes Surg* 2006; 16: 762-769
- 35 Malouf AJ, Wiesel PH, Nicholls T, Nicholls RJ, Kamm MA. Short-term effects of sacral nerve stimulation for idiopathic slow transit constipation. *World J Surg* 2002; 26: 166-170
- 36 Malouf AJ, Vaizey CJ, Nicholls RJ, Kamm MA. Permanent sacral nerve stimulation for fecal incontinence. *Ann Surg* 2000; 232: 143-148
- 37 Dinning PG, Fuentealba SE, Kennedy ML, Lubowski DZ, Cook IJ. Sacral nerve stimulation induces pan-colonic propagating pressure waves and increases defecation frequency in patients with slow-transit constipation. *Colorectal Dis* 2007; 9: 123-132
- 38 Felten DL, Jozefowicz R. Netter's Atlas of Human Neuroscience. 1st ed, Netter Basic Science, Elsevier. 2003: 131
- 39 Varma JS, Binnie N, Smith AN, Creasey GH, Edmond P. Differential effects of sacral anterior root stimulation on anal sphincter and colorectal motility in spinally injured man. *Br J Surg* 1986; 73: 478-482
- 40 Kenefick NJ, Vaizey CJ, Nicholls RJ, Cohen R, Kamm MA. Sacral nerve stimulation for faecal incontinence due to systemic sclerosis. *Gut* 2002; 51: 881-883
- 41 Govaert B, Melenhorst J, van Kleef M, van Gemert WG, Baeten CG. Sacral neuromodulation for the treatment of chronic functional anorectal pain: a single center experience. *Pain Pract* 2010; 10: 49-53
- 42 Wehbe SA, Whitmore K, Ho MH. Sacral neuromodulations for female lower urinary tract, pelvic floor, and bowel disorders. *Curr Opin Obstet Gynecol* 2010; 22: 414-419
- 43 Greenwood-Van Meerveld B, Johnson AC, Foreman RD, Linderth B. Attenuation by spinal cord stimulation of a nociceptive reflex generated by colorectal distention in a rat model. *Auton Neurosci* 2003; 104: 17-24
- 44 Greenwood-Van Meerveld B, Johnson AC, Foreman RD, Linderth B. Spinal cord stimulation attenuates visceromotor reflexes in a rat model of post-inflammatory colonic hypersensitivity. *Auton Neurosci* 2005; 122: 69-76
- 45 Kapur S, Mutagi H, Raphael J. Spinal cord stimulation for relief of abdominal pain in two patients with familial Mediterranean fever. *Br J Anaesth* 2006; 97: 866-868
- 46 Gow D, Hobson AR, Furlong P, Hamdy S. Characterising the central mechanisms of sensory modulation in human swallowing motor cortex. *Clin Neurophysiol* 2004; 115: 2382-2390
- 47 Fregni F, DaSilva D, Potvin K, Ramos-Estebanez C, Cohen D, Pascual-Leone A, Freedman SD. Treatment of chronic visceral pain with brain stimulation. *Ann Neurol* 2005; 58: 971-972

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》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<sup>[1]</sup>报告……,潘伯荣等<sup>[2-5]</sup>认为……;PCR方法敏感性高<sup>[6-7]</sup>。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。

# 干细胞标志物Nanog、Oct-4、SOX-2表达与结肠癌术后复发转移关系

李 宁, 邓文英, 马懿辉, 陈小兵, 韩黎丽, 吕慧芳, 陈贝贝, 罗素霞

## ■背景资料

Oct-4、SOX-2、Nanog是细胞转录调节系统的重要组成部分, 共同维持胚胎干细胞的自我更新。目前在很多肿瘤组织中发现具有自我更新能力的肿瘤细胞, 并通常表达一些胚胎干细胞因子。

李宁, 邓文英, 陈小兵, 韩黎丽, 吕慧芳, 陈贝贝, 罗素霞, 河南省肿瘤医院内科(郑州大学附属肿瘤医院) 河南省郑州市450000

马懿辉, 郑州大学第一附属医院病理科 河南省郑州市450000

河南省卫生厅资助项目, No. WKJ2007-2-026; No. 201102171  
作者贡献分布: 主要实验、数据分析和文章起草由李宁、邓文英完成; 病例选择、临床资料整理由邓文英、陈小兵、韩黎丽、吕慧芳及陈贝贝完成; 免疫组织化学分析和评分由马懿辉与陈贝贝完成; 文章的设计、修改和审阅由罗素霞完成。

通讯作者: 罗素霞, 主任医师, 450000, 河南省郑州市东明路127号, 河南省肿瘤医院内科三区. lining97@126.com

电话: 0371-65587697

收稿日期: 2011-06-06 修回日期: 2011-09-09

接受日期: 2011-08-20 在线出版日期: 2011-09-08

## Correlation of expression of Nanog, Oct-4 and SOX-2 with tumor metastasis in colonic cancer

Ning Li, Wen-Ying Deng, Yi-Hui Ma, Xiao-Bing Chen, Li-Li Han, Hui-Fang Lv, Bei-Bei Chen, Su-Xia Luo

Ning Li, Wen-Ying Deng, Xiao-Bing Chen, Li-Li Han, Hui-Fang Lv, Bei-Bei Chen, Su-Xia Luo, Department of Medical Oncology, Henan Tumor Hospital (Tumor Hospital Affiliated to Zhengzhou University), Zhengzhou 450000, Henan Province, China

Yi-Hui Ma, Department of Pathology, the First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450000, Henan Province, China

Supported by: the Key Project of Henan Provincial Health Department, Nos. WKJ2007-2-026 and 2011020171

Correspondence to: Su-Xia Luo, Department of Medical Oncology, Henan Tumor Hospital, 127 Dongming Road, Zhengzhou 450000, Henan Province, China. lining97@126.com

Received: 2011-06-06

Revised: 2011-09-09

Accepted: 2011-08-20

Published online: 2011-09-08

## Abstract

**AIM:** To investigate the expression of Nanog, Oct-4 and SOX-2 in colonic carcinoma and to analyze their relationship with tumor metastasis.

**METHODS:** Immunohistochemistry was used to evaluate the expression of Nanog, Oct-4 and SOX-2 in 80 colonic cancer surgical specimens. The correlation of Nanog, Oct-4 and SOX-2 expression with tumor histological differentiation,

T stage, N stage and metastasis was analyzed.

**RESULTS:** Thirty-five patients had metastasis. The positive rates of SOX-2, Oct-4 and Nanog expression were significantly higher in the metastasis group than in the non-metastasis group (48.57% vs 17.78%, 51.43% vs 13.33%, 60% vs 26.67%, all  $P < 0.05$ ). Nanog expression was significantly correlated with differentiation ( $P = 0.001$ ), but expression of Nanog, Oct-4 and SOX-2 was not associated with T stage or N stage. Metastatic rate was higher in patients with positive expression of the three markers than in those with negative expression. Survival analysis showed that the time to develop metastasis was significant different among patients with differential expression of the three markers ( $P = 0.0001$ ).

**CONCLUSION:** The expression of Nanog, Oct-4 and SOX-2 in tumor tissue can predict the post-operative metastasis of colonic cancer. Nanog, Oct-4 and SOX-2 are promising predictors for metastasis of colonic cancer.

**Key Words:** Colonic cancer; Nanog; Oct-4; SOX-2; Metastasis

Li N, Deng WY, Ma YH, Chen XB, Han LL, Lv HF, Chen BB, Luo SX. Correlation of expression of Nanog, Oct-4 and SOX-2 with tumor metastasis in colonic cancer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(25): 2644-2648

## 摘要

**目的:** 探讨结肠癌患者肿瘤组织中Nanog、Oct-4、SOX-2表达情况及其对远处转移的预测作用。

**方法:** 采用免疫组织化学方法检测经手术切除的80例结肠癌术后标本中Nanog、Oct-4、SOX-2表达情况, 并且对三种指标的表达同肿瘤分化程度、分期和术后复发转移关系进行分析。

**结果:** 80例患者有35例出现复发转移,

## ■同行评议者

陈卫昌, 教授, 苏州大学附属第一医院消化内科



SOX-2、Oct-4、Nanog在转移组患者中表达率分别为48.57%(17/35)、51.43%(18/35)、60%(21/35), 在非转移组中表达率分别为17.78%(8/45)、13.33%(6/45)、26.67%(12/45). 差异有统计学意义. 原发灶分化程度仅同Nanog表达差异有统计学意义( $P = 0.001$ ). 但是三指标表达同T分期和N分期没有明显联系. 三者均为表达阳性其转移率明显高于均为阴性转移率, 生存分析显示不同表达状态其远处转移出现时间差异有统计学意义( $P = 0.0001$ ).

**结论:** 组织中Nanog、Oct-4、SOX-2表达同结肠癌术后复发转移发生相关, 联合检测有助于评估肿瘤转移情况.

**关键词:** 结肠癌; Nanog; Oct-4; SOX-2; 转移

李宁, 邓文英, 马懿辉, 陈小兵, 韩黎丽, 吕慧芳, 陈贝贝, 罗素霞. 干细胞标志物Nanog、Oct-4、SOX-2表达与结肠癌术后复发转移关系. 世界华人消化杂志 2011; 19(25): 2644-2648  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/2644.asp>

## 0 引言

近几年来, 世界范围内结肠癌的发病率和病死率逐年上升, 多数肿瘤患者无法获得根治, 易于复发转移. 目前飞速发展的肿瘤干细胞理论为肿瘤的治疗带来新希望. 该理论认为肿瘤组织中存在部分有干细胞特性的细胞, 具有无限增殖和自我更新能力, 成为肿瘤生长、复发及转移的根源. 寻找特异性的干细胞表面标志物, 通过其分选肿瘤干细胞, 是进一步治愈恶性肿瘤的关键.

早在1989年就有学者在小鼠成体的各种组织及不同发育阶段的胚胎中检测到一系列因子, 因其能与基因启动子或增强子区域的八聚体模序位点结合而命名为Oct-4<sup>[1]</sup>. Oct-4基因定位于人类染色体6p21.3, 是维持细胞多能性所必需的, 参与胚胎发育过程中多向性分化的调节<sup>[2]</sup>. 2003年Mitsui等<sup>[3]</sup>在胚胎干细胞中发现了另一个新的转录因子, 命名为Nanog. 基础研究表明在卵巢表面上皮<sup>[4]</sup>、胃癌<sup>[5]</sup>、膀胱癌<sup>[6]</sup>和脑胶质瘤<sup>[7]</sup>的细胞中均能检测到Nanog阳性表达, 但在分化成熟的体细胞中为阴性表达<sup>[8]</sup>. 作为另一个胚胎干细胞转录因子, SOX-2在维持胚胎干细胞的干性方面同样发挥重要的作用<sup>[9]</sup>, 并且在多种肿瘤组织中可以检测到SOX家族成员, 比如小细胞肺癌、脑膜瘤、胰腺癌等<sup>[10-13]</sup>. 但是, 在结肠癌

组织中SOX-2、Oct-4、Nanog表达情况如何, 三者表达同结肠癌术后的复发转移关系如何目前还不清楚. 因此, 本研究旨在分析结肠癌组织中Nanog、Oct-4、SOX-2基因的表达情况, 探讨干细胞标志物表达情况同结肠癌术后复发转移的关系, 为结肠癌干细胞研究提供一定的理论基础.

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 随机选取2008-01/2008-12在我院确诊的Dukes'C期结肠癌患者80例. 男38例, 女42例, >60岁患者21例, ≤60岁59例, 中位年龄52岁. 术前未行治疗, 术前检查及术中探查均未发现远处转移. 术后行辅助FOLFOX6方案化疗10-12个疗程, 每位患者每3-4 mo复查胸、腹部CT等, 如CT提示肺、肝吻合口或局部淋巴结转移时, 可再行局部穿刺、MRI、PET-CT等检查证实, 以CT检查时间为转移发生时间.

**1.2 方法** 采用SP免疫组织化学方法, 严格按照试剂盒说明书检测Nanog, Oct-4和SOX-2(一抗: Santa Cruz公司)在肿瘤组织中的表达. 免疫组织化学评价标准: 由有经验的病理科医师单盲阅片, 在10×40倍显微镜下观察记数, 每张切片随机选择5个视野, 每个视野记数200个细胞. Nanog、SOX-2、Oct-4抗原阳性反应为位于细胞核内的棕黄色颗粒, 阳性表达程度判断: 阳性细胞数≥10%为阳性表达, <10%为阴性染色.

**统计学处理** 采用SPSS10.0统计软件包进行数据整理和统计分析. 比较Nanog、Oct-4、SOX-2蛋白表达水平与转移关系时采用 $\chi^2$ 检验; 比较表达情况对远处转移出现时间影响时采用Kaplan-Meier生存分析法.

## 2 结果

**2.1 可评价患者临床特征** 所有患者, 均可评价Nanog、SOX-2、Oct-4染色情况. 随访率100%, 中位随访时间2年. 以复发转移是否发生将患者分为转移组和非转移组. 共有35(43.75%)名患者确诊复发转移, 其中10例为局部吻合口复发, 11例为单个脏器转移, 14例为多发脏器转移.

**2.2 SOX-2在结肠癌组织中表达情况** 在转移组中共有17(48.57%)名患者SOX-2阳性表达, 而非转移组中共有8(17.78%)名患者阳性表达, 两组差异有统计学意义( $P = 0.001$ ). 同时, 虽然原发灶不同分化程度、不同T分期和N分期中SOX-2表达存在差异, 但是差异没有统计学意义(表1, 图1).

## ■研究前沿

基础研究发现, 从分离出的具有体外致瘤性的类干细胞肿瘤细胞中检测到Oct-4、SOX-2、Nanog基因的表达, 并且在多种肿瘤组织中也检测到了这些因子的表达. 但是其表达同肿瘤的生物学特性有什么关系成为目前肿瘤学研究的热点.

## ■相关报道

曹浩哲等报道了Oct-4在宫颈癌中的表达情况, 陈忠等报道了Nanog在胃癌中的表达情况, 但是联合分析三者结肠癌中表达和复发转移关系的文章还较少.

## ■创新盘点

本文首次报道了Oct-4、SOX-2、Nanog在结肠癌组织中的表达,并对其表达和肿瘤的分化程度、分期及术后复发转移进行相关性分析,对结肠癌患者术后复发转移的可能的机制进行了初步探讨。

表 1 组织中Nanog、Oct-4、SOX-2表达同临床特征间关系

临床特征	n	SOX-2表达		Nanog表达		Oct-4表达	
		n	P值	n	P值	n	P值
分化程度							
分化型	33	12		5		7	
未分化型	47	13	0.408	28	0.001	17	0.151
T分期							
T1/T2	43	13		20		14	
T3/T4	37	12	0.832	13	0.100	10	0.592
N分期							
(阳性淋巴结)							
<4个	41	16		14		16	
≥4个	39	9	0.124	10	0.407	8	0.071
转移							
有	35	17		21		18	
无	45	8	0.001	12	0.003	6	0.001

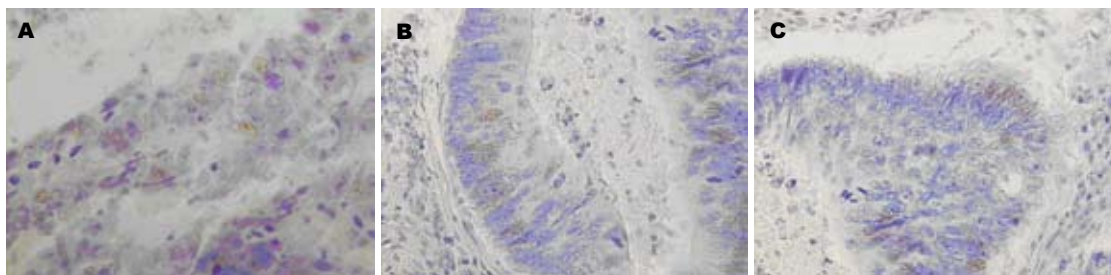


图 1 不同干细胞标志物在结肠癌组织中表达(SP×400). A: Nanog 阳性表达; B: SOX-2阳性表达; C: Oct-4阳性表达.

**2.3 Oct-4在结肠癌组织中表达情况** 在转移组中共有18(51.43%)名患者Oct-4阳性表达,而非转移组中共有6(13.33%)名患者阳性表达,两组差异有统计学意义( $P = 0.001$ ).同时,虽然原发灶不同分化程度、不同T分期和N分期中Oct-4表达存在差异,但是差异没有统计学意义(表1,图1).

**2.4 Nanog在结肠癌组织中表达情况** 在转移组中共有21(60%)名患者Nanog阳性表达,而非转移组中共有12(26.67%)名患者阳性表达,两组差异有统计学意义( $P = 0.003$ ).同时,原发灶不同分化程度Nanog表达差异有统计学意义,但是不同T分期和N分期中Nanog表达存在差异,但是差异没有统计学意义(表1,图1).

**2.5 SOX-2、Oct-4和Nanog表达情况同术后转移关系** 入组80例结肠癌患者,三者均为阳性表达的患者为8例,其中发生远处转移为6例,任两指标为阳性表达为15例,远处转移13例,任一指标为阳性表达为29,远处转移13例,均为阴性表达为28例,其中远处转移3例.不同表达状态同远处转移差异有统计学意义( $P = 0.0001$ ).两项及三项指标均阳性表达者转移发生率明显高于均阴性表达者(图2).

### 3 讨论

肿瘤干细胞理论认为<sup>[14]</sup>恶性肿瘤中存在一群数量较少的肿瘤干细胞,在启动肿瘤形成和生长中起着决定性作用;而其余多数肿瘤细胞都是肿瘤干细胞异常增殖分化形成的子代细胞,仅具有有限的增殖及分化能力<sup>[15]</sup>.而处于休眠状态的肿瘤干细胞因其处于G<sub>0</sub>期,对放化疗都不敏感,从而存活下来,成为复发的根源.因此只有针对肿瘤干细胞的治疗才可能出现持久疗效,只有彻底清除肿瘤干细胞才能彻底治愈肿瘤.

目前,在胚胎发育及维系胚胎干细胞干性相关基因研究方面取得较大进展,Oct-4、SOX-2、Nanog转录因子是细胞转录调节系统的重要部分,共同维持胚胎干细胞的自我更新.过表达Oct-4, Nanog和SOX-2的成体细胞能够恢复多能干细胞的特性<sup>[16,17]</sup>.他们的缺失会直接影响正常细胞的生长发育<sup>[18-21]</sup>,同时在一些上皮恶性肿瘤中检测到Oct-4呈高表达,且其表达水平与上皮性恶性肿瘤发生、进展、转移及预后等密切相关<sup>[22,23]</sup>.在脑胶质瘤<sup>[24]</sup>、乳腺癌及生殖系统肿瘤中同样可检测到Nanog高表达,而SOX-2的高表达也在多种恶性肿瘤<sup>[25,26]</sup>中发现.

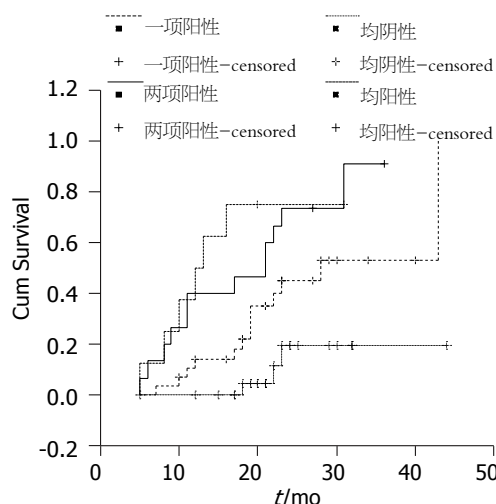


图 2 Nanog, Oct-4和SOX-2表达情况与转移出现时间比较.  $P < 0.001$ .

三种转录因子并不是孤立的发挥作用, 三者之间相互作用, 相互影响. 在冰冻乳腺癌标本中, 虽然研究例数不是很多(18例), 但是SOX-2高表达的患者同样有OCT-4和Nanog的高表达<sup>[27]</sup>. 在干细胞中下调SOX-2 mRNA水平后发现多种干细胞因子及调控子均下调, 包括Wnt传导通路也会表达下调<sup>[28]</sup>. 同样Oct-4和Nanog之间又是相互影响, Nanog部分依赖Oct-4<sup>[29]</sup>. 但是Nanog的调节并不是单靠Oct-4, 一个非常有趣的现象, 在Oct-4缺失的细胞中也能检测到Nanog的表达. 反之, 在Nanog缺失的细胞中, 仅有Oct-4的表达并不能保护细胞免受凋亡<sup>[28]</sup>. 总之, 可以说SOX-2, Nanog和Oct-4形成了胚胎干细胞自我更新转录系统的核心. 他们之间相互作用维持细胞干性<sup>[30,31]</sup>.

本研究中, 80例结肠癌有33例出现Nanog蛋白阳性表达, 24例Oct-4蛋白阳性表达, 25例出现SOX-2蛋白阳性表达, 其阳性表达细胞多呈点状聚集, 少有灶状聚集, 说明即使Nanog、Oct-4、SOX-2阳性表达, 也只是少部分细胞表达, 这和肿瘤干细胞只占肿瘤组织的很少一部分理论是吻合的. 同时, 发生远处转移患者Nanog、Oct-4或SOX-2阳性表达率要高于没有发生转移的患者, 也说明Nanog、Oct-4、SOX-2蛋白高表达的肿瘤侵袭性要高于低表达的肿瘤. 在免疫组织化学读片中, 发现共有6例患者癌旁正常组织表达Nanog、Oct-4、SOX-2, 这样说明可能存在正常细胞发生恶性转变. 同样佐证了肿瘤是可能来自成体干细胞恶性转变的假说.

三项指标均阳性表达的患者有6(75%)例出现了远处转移, 任两项指标为阳性表达为15例,

其中转移13(86.67%)例, 任一指标为阳性表达为29, 远处转移13例(44.83%), 均为阴性表达为28例, 其中远处转移3例(10.71%). 均为阳性表达的患者转移发生时间最早, 明显高于均为阴性患者. 三项指标的高表达属于不良预后因素, 提示肿瘤复发转移的风险较高. 联合检测对于预测结肠癌患者术后复发风险具有一定的临床应用价值.

肿瘤的发生发展、复发转移是非常复杂的过程, 众多基因、蛋白、信号传导通路参与其中. 目前, 随着肿瘤干细胞理论不断的完善和发展, 虽然仍然缺乏高特异性的生物学标记, 虽然还有许多问题没有解决, 但是利用干细胞理论, 靶向治疗肿瘤干细胞的研究已经处于基础试验阶段. 因此, 有理由相信干细胞标志物检测有重要的临床应用价值, 为正确检测肿瘤术后的复发转移提供了有力的帮助.

#### 4 参考文献

- 1 张楠, 连鹏, 时永香, 步宇翔, 白增亮. Oct-4/SOX-2协同调控下游基因表达的分子机制. 生物物理学报 2007; 23: 420-426
- 2 王海威, 王家东. Oct-4蛋白在甲状腺肿瘤中的表达及意义. 临床耳鼻咽喉头颈外科杂志 2010; 24: 682-685
- 3 Mitsui K, Tokuzawa Y, Itoh H, Segawa K, Murakami M, Takahashi K, Maruyama M, Maeda M, Yamanaka S. The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells. *Cell* 2003; 113: 631-642
- 4 李莉平, 康佳丽. 卵巢癌干细胞研究进展. 医学综述 2010; 16: 64-66
- 5 陈忠, 许文荣, 钱晖, 朱伟, 王胜, 步雪峰, 毛飞, 曹慧玲, 徐学静. 干细胞标志物Nanog的检测在胃癌诊断中的意义. 临床检验杂志 2009; 7: 6-8
- 6 王卫生, 唐伟. 胚胎干细胞关键因子Nanog在膀胱癌中的表达及与肿瘤干细胞的关系. 重庆医科大学学报 2009; 34: 409-412
- 7 牛朝诗, 倪永丰, 陈健民. 胶质母细胞瘤肿瘤干细胞的分离培养与生物学特性研究. 中国微侵袭神经外科杂志 2009; 14: 25-28
- 8 文雯, 冀静, 郑鹏生. Nanog基因在宫颈癌中的表达及其意义. 西安交通大学学报(医学版) 2010; 31: 26-31
- 9 牛海静, 陈鑫, 王邦茂. Sox2和Cdx2在胃黏膜肠化生中的表达及意义. 世界华人消化杂志 2011; 19: 1295-1299
- 10 Dong C, Wilhelm D, Koopman P. Sox genes and cancer. *Cytogenet Genome Res* 2004; 105: 442-447
- 11 Güre AO, Stockert E, Scanlan MJ, Keresztes RS, Jäger D, Altorki NK, Old LJ, Chen YT. Serological identification of embryonic neural proteins as highly immunogenic tumor antigens in small cell lung cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97: 4198-4203
- 12 Comtesse N, Zippel A, Walle S, Monz D, Backes C, Fischer U, Mayer J, Ludwig N, Hildebrandt A, Keller A, Steudel W, Lenhof HP, Meese E. Complex humoral immune response against a benign tumor: frequent antibody response against specific antigens as diagnostic targets. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102: 9601-9606

#### ■应用要点

本文对Oct-4、SOX-2、Nanog在结肠癌组织中的表达情况进行初步探讨, 为进一步深入研究结肠癌复发转移机制提供理论依据, 同时也为寻找合适靶标, 靶向治疗结肠癌提供帮助.

## ■同行评价

本文有一定的研究价值, 若增加研究的例数和延长随访时间则更具说服力。

- 13 Sanada Y, Yoshida K, Ohara M, Oeda M, Konishi K, Tsutani Y. Histopathologic evaluation of stepwise progression of pancreatic carcinoma with immunohistochemical analysis of gastric epithelial transcription factor SOX2: comparison of expression patterns between invasive components and cancerous or nonneoplastic intraductal components. *Pancreas* 2006; 32: 164-170
- 14 Tu SM, Lin SH, Logothetis CJ. Stem-cell origin of metastasis and heterogeneity in solid tumours. *Lancet Oncol* 2002; 3: 508-513
- 15 宋娟, 严宁, 张汉东, 丁玉梅. 口腔鳞癌组织中干细胞转录因子Oct-4的表达及意义. *临床口腔医学杂志* 2010; 26: 390-393
- 16 Park IH, Zhao R, West JA, Yabuuchi A, Huo H, Ince TA, Lerou PH, Lensch MW, Daley GQ. Reprogramming of human somatic cells to pluripotency with defined factors. *Nature* 2008; 451: 141-146
- 17 魏蕊, 洪天配. 干细胞治疗糖尿病的研究进展与应用前景. *世界华人消化杂志* 2011; 19: 441-450
- 18 Nichols J, Zevnik B, Anastassiadis K, Niwa H, Klewe-Nebenius D, Chambers I, Schöler H, Smith A. Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct4. *Cell* 1998; 95: 379-391
- 19 Zhang J, Wang X, Chen B, Suo G, Zhao Y, Duan Z, Dai J. Expression of Nanog gene promotes NIH3T3 cell proliferation. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 338: 1098-1102
- 20 李冬雪, 牛朝诗. Nanog与肿瘤细胞和干细胞的关系. *国际病理科学与临床杂志* 2010; 30: 61-64
- 21 Kamachi Y, Uchikawa M, Kondoh H. Pairing SOX off: with partners in the regulation of embryonic development. *Trends Genet* 2000; 16: 182-187
- 22 侯铁, 赵晓昆, 蒋宏毅, 钟朝晖, 杨竹林. 膀胱移行细胞癌组织中PSCA和Oct-4表达及其意义. *实用肿瘤杂志* 2010; 25: 531-533
- 23 何欣, 刘斌. 胃癌干细胞研究进展. *中国肿瘤临床与康复* 2011; 16: 281-282
- 24 Liu G, Yuan X, Zeng Z, Tunici P, Ng H, Abdulkadir IR, Lu L, Irvin D, Black KL, Yu JS. Analysis of gene expression and chemoresistance of CD133+ cancer stem cells in glioblastoma. *Mol Cancer* 2006; 5: 67
- 25 Li XL, Eishi Y, Bai YQ, Sakai H, Akiyama Y, Tani M, Takizawa T, Koike M, Yuasa Y. Expression of the SRY-related HMG box protein SOX2 in human gastric carcinoma. *Int J Oncol* 2004; 24: 257-263
- 26 Sattler HP, Lensch R, Rohde V, Zimmer E, Meese E, Bonkhoff H, Retz M, Zwergel T, Bex A, Stoeckle M, Wullich B. Novel amplification unit at chromosome 3q25-q27 in human prostate cancer. *Prostate* 2000; 45: 207-215
- 27 Lengerke C, Fehm T, Kurth R, Neubauer H, Scheble V, Müller F, Schneider F, Petersen K, Wallwiener D, Kanz L, Fend F, Perner S, Bareiss PM, Staebler A. Expression of the embryonic stem cell marker SOX2 in early-stage breast carcinoma. *BMC Cancer* 2011; 11: 42
- 28 Fong H, Hohenstein KA, Donovan PJ. Regulation of self-renewal and pluripotency by Sox2 in human embryonic stem cell. *Stem Cells*, 2008, 26: 1931-1938
- 29 Sheik Mohamed J, Gaughwin PM, Lim B, Robson P, Lipovich L. Conserved long noncoding RNAs transcriptionally regulated by Oct4 and Nanog modulate pluripotency in mouse embryonic stem cells. *RNA* 2010; 16: 324-337
- 30 Yamaguchi S, Kurimoto K, Yabuta Y, Sasaki H, Nakatsuji N, Saitou M, Tada T. Conditional knock-down of Nanog induces apoptotic cell death in mouse migrating primordial germ cells. *Development* 2009; 136: 4011-4020
- 31 Jung M, Peterson H, Chavez L, Kahlem P, Lehrach H, Vilo J, Adjaye J. A data integration approach to mapping OCT4 gene regulatory networks operative in embryonic stem cells and embryonal carcinoma cells. *PLoS One* 2010; 5: e10709

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)



# 金黄益胆颗粒对大鼠重症急性胰腺炎肝损伤的保护作用

赵立新, 马向明, 曹立瀛, 刘四清, 付庆江, 张青松

## ■背景资料

急性胰腺炎(AP)是一种发生在胰腺的急性炎症性疾病,常累及胰腺周围组织,其发病急,病情发展迅猛,多器官功能不全综合征(MODS)发生率高。由于胰腺和肝脏在解剖位置、生理功能和血流动力学方面的联系, SAP 时往往胰外首先累及肝脏,引起肝损伤,其损伤使 Kupffer 细胞激活,肝脏释放大量的炎性介质,又可加重 SAP 的病情,形成恶性循环,使 MODS 进一步加重,导致 SAP 的高死亡率。

赵立新, 河北联合大学研究生院 河北省唐山市 063000  
马向明, 曹立瀛, 刘四清, 付庆江, 河北联合大学附属开滦医院肝胆外科 河北省唐山市 063000  
张青松, 河北联合大学附属开滦医院普外科 河北省唐山市 063000  
国家科技支撑基金资助项目, No. 2006BAI04A15  
作者贡献分布: 此课题由曹立瀛、刘四清、付庆江及张青松负责实验设计、指导论文写作及修改工作; 由赵立新负责实验数据整理、论文撰写和实验工作; 由马向明负责实验试剂的购买和实验协助工作。  
通讯作者: 曹立瀛, 主任医师, 教授, 硕士研究生导师, 063000, 河北省唐山市路北区新华东道57号, 河北联合大学附属开滦医院肝胆外科。 liying.cao@hotmail.com  
电话: 0315-3025839  
收稿日期: 2011-04-27 修回日期: 2011-06-21  
接受日期: 2011-06-28 在线出版日期: 2011-09-08

## Protective effect of Jinhuangyidan Granules on liver injury in rats with severe acute pancreatitis

Li-Xin Zhao, Xiang-Ming Ma, Li-Ying Cao, Si-Qing Liu, Qing-Jiang Fu, Qing-Song Zhang

Li-Xin Zhao, Graduate School of Hebei United University, Tangshan 063000, Hebei Province, China  
Xiang-Ming Ma, Li-Ying Cao, Si-Qing Liu, Qing-Jiang Fu, Department of Hepatobiliary Surgery, the Affiliated Kai Luan Hospital of Hebei United University, Tangshan 063000, Hebei Province, China  
Qing-Song Zhang, Department of General Surgery, the Affiliated Kai Luan Hospital of Hebei United University, Tangshan 063000, Hebei Province, China  
Supported by: the National Science and Technology Foundation of China, No. 2006BAI04A15  
Correspondence to: Li-Ying Cao, Professor, Department of Hepatobiliary Surgery, the Affiliated Kai Luan Hospital of Hebei United University, 57 East Xinhua Road, Tangshan 063000, Hebei Province, China. liying.cao@hotmail.com  
Received: 2011-04-27 Revised: 2011-06-21  
Accepted: 2011-06-28 Published online: 2011-09-08

## Abstract

**AIM:** To investigate the protective effect of Jinhuangyidan Granules on liver injury in rats with severe acute pancreatitis (SAP) and to explore the possible mechanisms involved.

**METHODS:** Fifty-four male Sprague-Dawley (SD) rats were randomly divided into three groups: sham operation group, SAP group and Jinhuangyidan Granules group. Each group was

further divided into three subgroups for testing at different time points after treatment (2, 6 and 12 h). SAP was induced by retrograde injection of 5% sodium taurocholate into the biliary pancreatic duct. Serum amylase (AMY), ALT, AST and the liver coefficient were measured. The levels of TNF- $\alpha$ , IL-6 and ET-1 were examined by ELISA, and the expression of NF- $\kappa$ B in the liver was evaluated by immunohistochemistry.

**RESULTS:** Compared to the sham operation group, the levels of AMY, ALT, AST, TNF- $\alpha$ , IL-6, ET-1 and NF- $\kappa$ B increased significantly in the SAP group. The liver coefficient also differed significantly between the sham operation group and SAP group at 6 and 12 h (both  $P < 0.05$ ). Compared to the SAP group at 6 and 12 h, the levels of AMY, ALT, AST, TNF- $\alpha$ , IL-6, ET-1 and NF- $\kappa$ B decreased significantly in the Jinhuangyidan Granules group (all  $P < 0.05$ ). At 6 h, the expression of liver NF- $\kappa$ B was significantly higher in the SAP group than in the sham operation group at 6 and 12 h (6 h:  $49.89 \pm 3.53$  vs  $5.32 \pm 0.24$ ; 12 h:  $54.73 \pm 1.68$  vs  $6.38 \pm 0.24$ , both  $P < 0.05$ ), but was significantly lower in the Jinhuangyidan Granules group than in the SAP group (6 h:  $19.18 \pm 1.51$  vs  $49.89 \pm 3.53$ ; 12 h:  $31.15 \pm 2.25$  vs  $54.73 \pm 1.68$ , both  $P < 0.05$ ). Compared to the SAP group, the levels of edema and inflammatory mediators ameliorated significantly in the Jinhuangyidan Granules group.

**CONCLUSION:** Jinhuangyidan Granules ameliorates liver injury and improve microcirculation in SAP rats possibly by inhibiting NF- $\kappa$ B activity and down-regulating inflammatory mediators.

**Key Words:** Jinhuangyidan Granules; Pancreatitis; Liver injury; Nuclear factor-kappa B; Inflammatory mediators

Zhao LX, Ma XM, Cao LY, Liu SQ, Fu QJ, Zhang QS. Protective effect of Jinhuangyidan Granules on liver injury in rats with severe acute pancreatitis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(25): 2654-2659

## 摘要

**目的:** 探讨金黄益胆颗粒(jinhuangyidan

## ■同行评议者

李胜, 研究员, 山东省肿瘤防治研究院肝胆外科; 崔云甫, 教授, 哈尔滨医科大学第二附属医院普外科

granules)对大鼠重症急性胰腺炎肝损伤的保护作用和可能机制。

**方法:** 54只♂SD大鼠随机分为假手术组(sham operation group, SO)、重症急性胰腺炎组(severe acute pancreatitis, SAP)和金黄益胆颗粒治疗组(jinhuangyidan granules treatment, JHT), 每组分为2、6、12 h三个时间点组, 每个时间点组6只。5%的牛黄胆酸钠逆行胰胆管注射制备SAP模型。各组于造模后2、6、12 h处死大鼠, 检测血清淀粉酶(serum amylase, AMY)、谷丙转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST), 计算肝脏系数, HE染色观察胰腺、肝脏组织病理, 酶联免疫吸附试验(ELISA)方法检测TNF- $\alpha$ 、IL-6、ET-1水平。免疫组化检测肝脏组织中核转录因子- $\kappa$ B的活性。

**结果:** 各时间点SAP组与SO组比较, AMY、ALT、AST、TNF- $\alpha$ 、IL-6、ET-1均升高, 肝脏系数在6 h、12 h差异有统计学意义( $P<0.05$ ); 在6 h、12 h JHT组与SAP组比较, AMY、肝脏系数、ALT、AST、TNF- $\alpha$ 、IL-6、ET-1指标均明显降低( $P<0.05$ )。6 h时间点SO组、SAP组和JHT组NF- $\kappa$ B表达分别为( $5.32\pm 0.24$  vs  $49.89\pm 3.53$  vs  $19.18\pm 1.51$ ), 三组之间差异有统计学意义( $P<0.05$ ); 12 h时间点各组之间NF- $\kappa$ B表达分别为( $6.38\pm 0.24$  vs  $54.73\pm 1.68$  vs  $31.15\pm 2.25$ ), 三组之间差异有统计学意义( $P<0.05$ )。胰腺和肝脏的病理镜下观察水肿和炎症介质表达JHT组较SAP组明显改善。

**结论:** 金黄益胆颗粒可以一定程度的改善大鼠重症胰腺炎肝脏的损伤, 改善微循环, 其对大鼠重症急性胰腺炎肝损伤的保护作用机制可能与抑制NF- $\kappa$ B的活性进而下调TNF- $\alpha$ 、IL-6的表达有关。

**关键词:** 金黄益胆颗粒; 胰腺炎; 肝损伤; 核转录因子- $\kappa$ B; 炎症介质

赵立新, 马向明, 曹立瀛, 刘四清, 付庆江, 张青松. 金黄益胆颗粒对大鼠重症急性胰腺炎肝损伤的保护作用. 世界华人消化杂志 2011; 19(25): 2654-2659  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/2654.asp>

## 0 引言

重症急性胰腺炎(severe acute pancreatitis, SAP)起病急、发展快、病情重, 是一种累及多系统多器官的外科急腹症之一, 常常并发全身炎症反映综合征(systemic inflammatory response syn-

drome, SIRS)和多器官功能障碍综合征(multiple organ dysfunction syndrome, MODS), 死亡率达20%, 严重威胁着患者的生命。近年来有学者研究发现SAP并发肝损伤的发生率达89%<sup>[1]</sup>, 肝损伤时其调节微循环及清除炎性物质及毒素的能力下降, 加重了炎症反映对全身其他脏器的损害, 从而影响了疾病的临床治疗效果和病情预后<sup>[2]</sup>。因此, 防治SAP时的肝损伤对疾病的治疗很重要。关于SAP导致肝损伤的机制还不清楚, 本实验通过建立大鼠重症急性胰腺炎模型, 应用金黄益胆颗粒观察对大鼠SAP肝损伤的保护作用, 并探讨其可能机制。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 清洁级♂SD(Sprague-Dawley)大鼠54只, 饲养8 wk, 室温维持在 $23\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 定期紫外线消毒, 体质量为180-310 g, 购于北京华卓康生物科技股份有限公司[许可证号: SCXK(京)2009-0004]。金黄益胆颗粒(冀药制字Z20051588)购自开滦总医院药剂科, 由唐山太阳石药业有限责任公司生产; 牛黄胆酸钠购自Sigma公司; NF- $\kappa$ B p65单克隆抗体、SP免疫组织化学试剂盒购自北京博奥森生物技术有限公司; TNF- $\alpha$ 、IL-6和ET-1 ELISA试剂盒均购自北京博奥森生物技术有限公司; WZS-50F6型微量泵购自浙大医疗有限公司。

### 1.2 方法

**1.2.1 实验分组:** 适应性饲养1 wk后, 大鼠按完全随机法分SO组、SAP组和JHT组, 每组分为2、6、12 h三个时间点组, 每个时间点组6只。

**1.2.2 模型的制备和标本的检测:** 采用改良式的Aho法<sup>[3]</sup>, 拉细硬膜外导管经十二指肠乳头逆行经电子微量泵注入5%牛磺胆酸钠( $1\text{ mL/kg}$ ,  $0.1\text{ mL/min}$ )制作SAP模型, 经空场上段营养管注入生理盐水( $10\text{ mL/kg}$ ), 此后1次/6 h; JHT组在SAP造模成功后由空肠营养管注入25%金黄益胆颗粒溶液( $10\text{ mL/kg}$ ), 此后1次/6 h; SO组大鼠打开腹腔找到胰腺组织后翻动数次后关腹。各组大鼠试验中均禁食水, 皮下注射生理盐水 $20\text{ mL/kg}$ , 1次/6 h。各组对应的时间点处死大鼠, 收集腹水, 腹主动脉取血 $4\text{ mL}$ , 检测AMY、ALT和AST, ELISA法进行TNF- $\alpha$ 和IL-6、ET-1的测定。实验中由同一人剪取各组相同部位的胰腺和肝脏组织 $1\text{ cm}\times 1\text{ cm}\times 0.5\text{ cm}$ 大小, 生理盐水冲洗表面残余血迹, 清洁滤纸吸干水分后, 电子天平称量肝脏湿质量, 计算肝脏系数( $W/G\times 100\%$ ), 4%的

## ■ 研发前沿

目前急性胰腺炎的发病机制还不是很清楚, 死亡原因主要是发展到SAP时导致肝、肺、肾脏等器官受损, 合并了MODS, 死亡率在20%左右。研究发现NF- $\kappa$ B的活性表达参与SAP的发生、发展过程, 其在SAP合并肝损伤时的变化情况是目前研究的热点。

## ■相关报道

Rakonczay等认为,过度活化的NF- $\kappa$ B可促使炎症细胞释放大量炎症因子,从而导致组织的炎症损伤;阻止NF- $\kappa$ B活化,可明显减轻胰腺的炎症反应。Geisler等发现AP伴发的胰酶血症也参与了全身性炎症反应,其中胰腺弹性蛋白酶随血流到胰外的肝脏,可激活肝Kupffer细胞NF- $\kappa$ B信号途径,增加炎症细胞因子的产生,进而引起肝脏损伤。刘石龙等研究发现N-乙酰半胱氨酸可以抑制NF- $\kappa$ B活性表达,对SAP肝损伤有一定的保护作用。

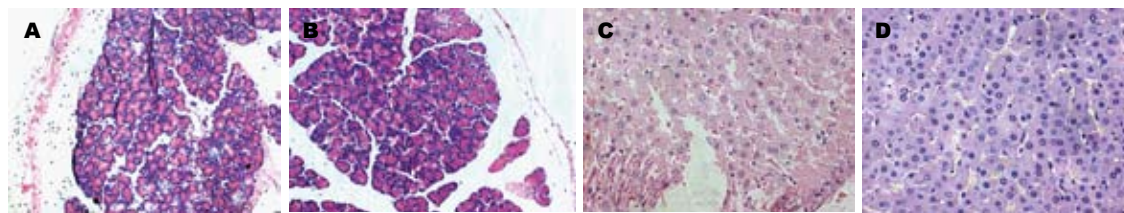


图1 胰腺和肝脏组织镜下病理改变(HE)。A: SAP组6 h胰腺组织( $\times 100$ ) ; B: JHT组6 h胰腺组织( $\times 100$ ); C: SAP组12 h肝脏组织( $\times 200$ ); D: JHT组12 h肝脏组织( $\times 200$ )。

表1 不同时间点三组之间肝脏系数的比较 ( $n=18$ , mean  $\pm$  SD)

分组	时间点(h)	肝脏系数(%)
SO组	2	0.04 $\pm$ 0.01
	6	0.04 $\pm$ 0.01
	12	0.04 $\pm$ 0.01
SAP组	2	0.05 $\pm$ 0.01
	6	0.07 $\pm$ 0.01 <sup>ac</sup>
	12	0.07 $\pm$ 0.01 <sup>ac</sup>
JHT组	2	0.04 $\pm$ 0.01
	6	0.05 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>
	12	0.06 $\pm$ 0.00 <sup>a</sup>

<sup>a</sup> $P<0.05$  vs SO组; <sup>c</sup> $P<0.05$  vs JHT组。

多聚甲醛溶液固定组织,修剪、石蜡包埋、切片,HE染色和免疫组化。由实验室专业病理人员观察胰腺和肝脏的病理改变,按照Schmid标准<sup>[4]</sup>进行病理评分。

1.2.3 SP免疫组织化学检测NF- $\kappa$ B的表达:常规免疫组化法(immunohistochemical, IHC)检测肝脏的NF- $\kappa$ B活性。组织生理盐水清洗后,4%多聚甲醛固定常规脱水、石蜡包埋、制备3  $\mu$ m的单层切片,SP法免疫染色,一抗浓度为1:300,操作步骤完全按照试剂盒的说明来完成。参照文献[5]方法,用PBS代替一抗做空白对照。结果判定:阳性细胞为细胞核和(或)胞质呈棕黄色染色。在高倍视野( $10\times 40$ )下随机选取5个视野,计算每个阳性细胞数取其均数代表该样本的阳性表达数N1,总细胞数为N,阳性率 =  $N1/N \times 100\%$ 。

**统计学处理** 计量资料采用mean  $\pm$  SD表示,计数资料采用 $\chi^2$ 检验,应用SPSS13.0统计学软件包进行方差分析。同时段组间比较采用 $t$ 检验,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 死亡情况 实验造模成功后,SO组2、6、12 h三个时间点无一例死亡,死亡率为0; SAP组12 h

内死亡6只,死亡率为33.33%(6/18), JHT组12 h内死亡2只,死亡率为11.11%(2/18),明显低于SAP组,两组之间的 $\chi^2$ 检验显示,差异无统计学意义。

2.2 肝脏和胰腺的病理学改变 光镜下观察SO组各时间点肝脏和胰腺形态学结构没有明显变化。SAP组各时间点肝脏可见不同程度水肿及肝窦扩张,肝细胞排列紊乱,炎性细胞浸润,部分肝实质可见点状或斑块状出血坏死;胰腺组织可见不同程度的腺叶局限性水肿、出血,部分结构坏死区,组织间隙大量炎性细胞浸润。JHT组肝脏和胰腺组织的水肿、出血、坏死与炎细胞浸润程度较SAP组病变为轻(图1)。

2.3 肝脏的系数比较 6、12 h同时点SAP组和SO组比较,肝脏系数有所升高,差异有统计学意义; JHT组和SAP比较肝脏的系数降低,差异有统计学意义( $P<0.05$ ,表1)。

2.4 腹水、AMY、ALT、AST的变化情况 在2、6、12 h同时点, SAP组和JHT组腹水、AMY、ALT、AST水平较SO组有所升高( $P<0.05$ )。三个时间点JHT组较SAP组比较ALT明显下降, 6、12 h时间点JHT组较SAP组AMY、AST明显降低( $P<0.05$ ,表2)。

2.5 血清TNF- $\alpha$ 、IL-6、ET-1的变化情况 与SO组比较, SAP和JHT组各时间点血清TNF- $\alpha$ 、IL-6、ET-1水平明显升高,差异有统计学差异( $P<0.05$ ); 6、12 h JHT组与SAP组比较, TNF- $\alpha$ 、IL-6、ET-1水平明显降低,差异有统计学差异( $P<0.05$ ,表3)。

2.6 肝脏组织中NF- $\kappa$ B的变化情况 NF- $\kappa$ B在SO组少量表达。在2、6、12 h同时点, SAP组NF- $\kappa$ B的活性表达逐渐升高,均明显高于SO组,差异有统计学意义( $P<0.05$ ); JHT组NF- $\kappa$ B的活性表达均较SAP组显著下降,但仍高于SO组[SO vs SAP vs JHT, 2 h: (2.20  $\pm$  0.27 vs 15.96  $\pm$  1.06 vs 10.17  $\pm$  0.54); 6 h: (5.32  $\pm$  0.24 vs 49.89  $\pm$  3.53 vs 19.18  $\pm$  1.51), 12 h: (6.38  $\pm$  0.24 vs 54.73  $\pm$  1.68 vs 31.15  $\pm$  2.25),  $P<0.05$ ,图2, 3]。

表 2 各组大鼠检测指标的比较 (n = 18, mean ± SD)

分组	时间点	腹水(mL)	AMY(U/L)	ALT(U/L)	AST(U/L)
SO组	2	0.40 ± 0.65	1536.67 ± 274.01	31 ± 4.89	120.33 ± 21.65
	6	0.42 ± 0.67	1541.50 ± 355.95	50.67 ± 12.50	149.39 ± 3.63
	12	0.38 ± 0.60	1586.17 ± 288.71	69.67 ± 14.00	204.50 ± 30.28
SAP组	2	4.17 ± 0.68 <sup>a</sup>	3490.17 ± 465.41 <sup>a</sup>	107.67 ± 31.74 <sup>ac</sup>	249.33 ± 66.88 <sup>a</sup>
	6	6.85 ± 0.70 <sup>a</sup>	4976.83 ± 142.22 <sup>ac</sup>	151.83 ± 43.65 <sup>ac</sup>	429.13 ± 21.68 <sup>ac</sup>
	12	7.63 ± 0.76 <sup>ac</sup>	5129.00 ± 227.88 <sup>ac</sup>	218.83 ± 20.59 <sup>ac</sup>	527.83 ± 10.40 <sup>ac</sup>
JHT组	2	3.92 ± 1.43 <sup>a</sup>	3401.50 ± 703.16 <sup>a</sup>	71.67 ± 6.77 <sup>a</sup>	211.50 ± 49.32 <sup>a</sup>
	6	5.92 ± 1.36 <sup>a</sup>	4385.00 ± 232.37 <sup>a</sup>	116.67 ± 15.59 <sup>a</sup>	320.63 ± 9.50 <sup>a</sup>
	12	5.35 ± 1.38 <sup>a</sup>	4177.83 ± 284.57 <sup>a</sup>	156.17 ± 26.96 <sup>a</sup>	437.67 ± 13.48 <sup>a</sup>

<sup>a</sup>P<0.05 vs SO组; <sup>c</sup>P<0.05 vs JHT组.

表 3 各组大鼠TNF-α、IL-6、ET-1的比较 (n = 18, mean ± SD)

分组	时间点	TNF-α(ng/L)	IL-6(ng/L)	ET-1(ng/L)
SO组	2	31.38 ± 6.81	40.06 ± 2.92	27.55 ± 1.97
	6	34.55 ± 3.88	52.24 ± 5.04	48.11 ± 1.95
	12	46.10 ± 5.07	62.18 ± 4.94	56.10 ± 1.54
SAP组	2	54.08 ± 4.35 <sup>a</sup>	66.76 ± 5.08 <sup>a</sup>	85.83 ± 1.71 <sup>ac</sup>
	6	72.88 ± 4.97 <sup>ac</sup>	78.65 ± 6.92 <sup>ac</sup>	124.42 ± 5.35 <sup>ac</sup>
	12	97.60 ± 11.38 <sup>ac</sup>	99.78 ± 14.92 <sup>ac</sup>	180.60 ± 5.42 <sup>ac</sup>
JHT组	2	50.82 ± 5.68 <sup>a</sup>	63.21 ± 4.92 <sup>a</sup>	61.71 ± 3.23 <sup>a</sup>
	6	60.36 ± 6.07 <sup>a</sup>	65.4 ± 2.42 <sup>a</sup>	110.81 ± 6.90 <sup>a</sup>
	12	82.46 ± 3.44 <sup>a</sup>	83.98 ± 3.79 <sup>a</sup>	136.00 ± 9.64 <sup>a</sup>

<sup>a</sup>P<0.05 vs SO组; <sup>c</sup>P<0.05 vs JHT组.

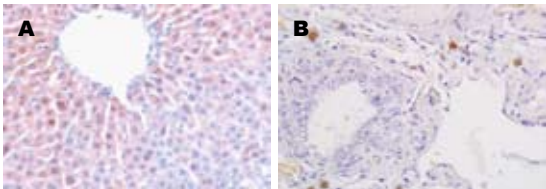


图 2 肝脏组织NF-κB p65免疫组化表达(× 200). A: SAP组12 h的表达; B: JHT组12 h的表达.

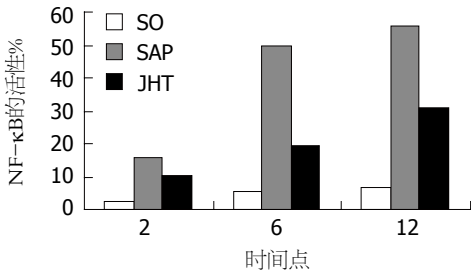


图 3 肝脏组织中NF-κB的表达情况.

### 3 讨论

近年有研究发现SAP的高死亡率与肝损伤有着密切的联系<sup>[6]</sup>. 肝脏作为调节物质代谢、参与凝血因子生成及解毒的主要器官, 在SAP的发生、发展中起着重要的作用. SAP时由于其特殊复杂的生理功能变化及电解质紊乱使肝脏成为SAP时胰外器官病理损害较早的器官之一, 同时也成为其病理机制研究的重要器官之一. 目前, 众多学者对SAP的发病机制已经不局限于单一的肺脏和肾脏研究, SAP合并肝损伤已成为研究的新方向. 肝损伤的机制探讨取得了一定进展, 炎性

介质起到了不可忽视的作用. 邹树等<sup>[7]</sup>报道炎性细胞因子TNF-α和IL-6在SAP的发病过程中起着重要作用, 与早期肝脏损伤有着密切关系. 因此, SAP早期保护肝损伤有着重要的意义.

SAP模型制备成功后会 导致大鼠在相应处死时间点之前死亡. 本实验过程中, 12 h内SO组、SAP组和JHT组死亡率分别为0、33.33%和为11.11%, 虽然JHT组的死亡率在百分率上低于SAP组, 但两组之间的进行 $\chi^2$ 检验, 差异无统计学意义. 笔者考虑到样本量较小, 以后应加大样

### ■创新盘点

以急性胰腺炎的发病机制及治疗的基础研究为前提, 根据少阳之邪、阳明之实组方自制中药“金黄益胆颗粒”对大鼠SAP合并肝损伤进行早期实验研究, 效果较可靠, 研究较新颖, 为中西医结合治疗提供了理论基础, 有一定的科学性和创新性.



## ■应用要点

目前,单一的应用生长抑素等制剂已不能满足SAP的治疗及预后,中西医结合治疗急性胰腺炎在临床上有着一定的应用前景。

本量进一步观察JHT组和SAP组在死亡率方面的差异性。

本实验采用清洁SD大鼠,用拉细的硬膜外导管经十二指肠乳头逆行穿入胆总管电子微量泵恒速注射5%牛黄胆酸钠建立SAP模型。SAP组随着时间的延长肝脏系数逐渐升高,说明随着SAP病情的发展,炎症因子和毒素作用于肝脏组织,使肝脏中央静脉及毛细血管扩张,毛细血管淤血加剧;6、12 h时间点,JHT组与SAP组比较,肝脏系数有所降低,且有统计学意义( $P<0.05$ ),说明金黄益胆颗粒可以降低SAP早期肝脏系数,减少组织水肿和渗漏。在病理形态学上,JHT组肝脏和胰腺组织的水肿、出血、炎细胞浸润程度较SAP组病变明显减轻。许多研究表明TNF- $\alpha$ 、IL-6参与了SAP诸多器官损伤的过程,是炎症细胞的代表因子。各时间点SAP组与SO组比较,ALT、AST、TNF- $\alpha$ 、IL-6均明显升高,说明SAP时早期肝脏已受到损伤,与邹树等报道一致。本实验证实,6 h和12 h 时间点JHT组与SAP组比较TNF- $\alpha$ 、IL-6的水平明显降低,说明金黄益胆颗粒在改善SAP早期肝脏损伤起着一定的保护作用。

内皮素(endothelin, ET)是由内皮素前体原(prepro ET)水解而成的、由21个氨基酸组成的多肽。血液中的ET主要为ET-1。ET-1是强烈的缩血管物质,参与了SAP微循环障碍的发生,其作用机制包括血管收缩、缺血-再灌注损伤、毛细血管通透性增加、血液流变学改变、影响白细胞-内皮细胞相互作用等多个方面,对微循环起着重要的作用。研究发现在急性胰腺炎早期就存在胰腺血液循环障碍,缺血缺氧刺激内皮细胞前ET原基因表达,ET mRNA表达上调从而导致ET合成增加,加重组织微循环障碍<sup>[8]</sup>。研究表明,活血化淤的中药制剂可以改善急性胰腺炎动物模型血清ET-1浓度,降低组织的损伤程度<sup>[9]</sup>。本研究表明,SAP组和JHT组ET-1水平在2、6、12 h较SO组明显为高,JHT组较SAP组显著降低,病理镜下可见肝脏和胰腺组织的水肿程度和红细胞渗漏均减少,说明金黄益胆颗粒可以减缓血管收缩,缓解组织缺氧和代谢障碍,降低毛细血管渗漏,从一定程度上改善了损伤组织的微循环障碍。

NF- $\kappa$ B是一种具有多向转录调节作用的蛋白,p50/p65异源二聚体是NF- $\kappa$ B活化的最常见形式。当机体受到损伤及病原微生物入侵时,血管及免疫系统迅速作出反应,NF- $\kappa$ B被激活,然

后进入细胞核,与其靶基因上的启动子或增强子结合而调节基因转录,激活与细胞应激相关的基因和炎症早期反应基因,产生大量的包括TNF- $\alpha$ 、IL-1等炎症因子。炎症介质在SAP发生、发展中起重要作用,因此研究如何抑制NF- $\kappa$ B的活性,减少促炎因子的表达,从而减轻组织损伤和炎症反应以改善SAP的预后具有重要意义。有报道证实,通过阻断NF- $\kappa$ B的活化,可以减轻急性胰腺炎的重型化<sup>[10]</sup>。先前研究显示,用N-乙酰半胱氨酸(N-acetylcysteine, NAC)抑制胰腺NF- $\kappa$ B活性,能显著减少胰腺炎症细胞浸润,降低TNF- $\alpha$ 、IL-6等细胞因子基因表达<sup>[11]</sup>;同时研究发现NAC能抑制肝脏NF- $\kappa$ B活性及iNOS mRNA 的表达,降低ALT、AST的水平,对肝损伤有一定的保护作用<sup>[12]</sup>,说明NF- $\kappa$ B在SAP发生与发展中发挥着及其重要作用。本研究证实,SAP组NF- $\kappa$ B的活性表达高于SO组,JHT组NF- $\kappa$ B的活性表达较SAP组明显下降,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。可见金黄益胆颗粒在SAP早期对肝脏NF- $\kappa$ B的活性表达有一定的抑制作用。

金黄益胆颗粒(原胆胰和胃冲剂)根据肝胆胰胃十二指肠疾病间的少阳之邪、阳明之实,以大柴胡汤为基础,由柴胡、大黄、黄连、黄芩、枳壳、香附、木香、郁金、金钱草、陈皮及元胡11味中药组方组成,具有疏肝理气、通里攻下、清热利胆、健脾和胃、活血化瘀等综合功效<sup>[13]</sup>。研究发现金黄益胆颗粒可以增强肠黏膜对氧自由基的清除能力,提高肠黏膜的免疫力;同时调控炎症介质的释放、降低肺毛细血管通透性,对SAP早期小肠黏膜的损伤和肺损伤有保护作用<sup>[14,15]</sup>。本实验显示,SAP时ALT、AST、TNF- $\alpha$ 、IL-6、ET-1、NF- $\kappa$ B的活性表达均明显高于SO组( $P<0.05$ ),在6、12 h JHT组上述指标均显著下降( $P<0.05$ )。ALT、AST、TNF- $\alpha$ 、IL-6表达水平的下降表明金黄益胆颗粒可以一定程度改善SAP的肝脏损伤。ET-1在SAP组明显升高与肝脏损伤导致微循环障碍有关,肝脏系数及ET-1降低表明金黄益胆颗粒可能改善了肝脏的微循环和毛细血管通透性。

总之,金黄益胆颗粒可以一定程度的改善大鼠重症胰腺炎肝脏的损伤,改善微循环,其对大鼠重症急性胰腺炎肝损伤的保护作用机制可能与抑制NF- $\kappa$ B的活性进而下调TNF- $\alpha$ 、IL-6的表达有关。而关于金黄益胆颗粒抑制肝损伤的具体机制还有待于进一步研究。

**志谢:** 感谢张秀平、张永健及华科雷同志在实验过程中给予的大力帮助和支持, 感谢肝胆外科和中西医肝胆科李英俊和王瑞霞护士长对实验的准备协助工作。

#### 4 参考文献

- 1 孔瑞, 孙备. 重症急性胰腺炎并发肝损伤的研究进展. 国际外科学杂志 2006; 33: 401-404
- 2 Zhang XP, Wang L, Zhang J. Study progress on mechanism of severe acute pancreatitis complicated with hepatic injury. *J Zhejiang Univ Sci B* 2007; 8: 228-236
- 3 Aho HJ, Koskensalo SM, Nevalainen TJ. Experimental pancreatitis in the rat. Sodium taurocholate-induced acute haemorrhagic pancreatitis. *Scand J Gastroenterol* 1980; 15: 411-416
- 4 Schmidt J, Rattner DW, Lewandrowski K, Compton CC, Mandavilli U, Knoefel WT, Warshaw AL. A better model of acute pancreatitis for evaluating therapy. *Ann Surg* 1992; 215: 44-56
- 5 Zhao YF, Zhai WL, Zhang SJ, Chen XP. Protection effect of triptolide to liver injury in rats with severe acute pancreatitis. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2005; 4: 604-608
- 6 李国庆, 王旺河, 张超, 田鹏, 张辉, 王志凯, 梁鸿. 肿瘤坏死因子- $\alpha$ 、Fas/FasL在急性胰腺炎肝细胞凋亡中的作用. 中华实验外科杂志 2010; 27: 600-602
- 7 邹树, 田伏洲, 汤礼军, 黎冬暄. 急性胰腺炎大鼠早期生长反应基因-1与肝脏损害的关系. 中国普通外科杂志 2008; 17: 219-223
- 8 Kourembanas S, Marsden PA, McQuillan LP, Faller DV. Hypoxia induces endothelin gene expression and secretion in cultured human endothelium. *J Clin Invest* 1991; 88: 1054-1057
- 9 Jung WS, Chae YS, Kim DY, Seo SW, Park HJ, Bae GS, Kim TH, Oh HJ, Yun KJ, Park RK, Kim JS, Kim EC, Hwang SY, Park SJ, Song HJ. Gardenia jasminoides protects against cerulein-induced acute pancreatitis. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 6188-6194
- 10 Hagiwara S, Iwasaka H, Hidaka S, Hasegawa A, Noguchi T. Neutrophil elastase inhibitor (sivelestat) reduces the levels of inflammatory mediators by inhibiting NF-kB. *Inflamm Res* 2009; 58: 198-203
- 11 邹忠东, 张再重, 宋香全, 王烈, 涂小煌, 陈少全, 王瑜. N-乙酰半胱氨酸对重症急性胰腺炎大鼠肝损伤的保护作用. 世界华人消化杂志 2008; 16: 3894-3899
- 12 刘石龙, 廖雯俊, 郭林泉. N-乙酰半胱氨酸对重症急性胰腺炎肝损伤的抑制作用. 世界华人消化杂志 2010; 18: 1046-1050
- 13 付庆江, 马向明, 陈丽荣, 曹立瀛, 屈顺喜, 董浩. 胆胰和胃冲剂预防急性胰腺炎重型化. 中国中西医结合外科杂志 2011; 17: 239-241
- 14 曹立瀛, 刘四清, 王保强, 李勇, 郭振武. 胆胰和胃冲剂对大鼠急性胰腺炎早期小肠黏膜抗氧化损伤的保护. 中国中西医结合外科杂志 2002; 8: 150-152
- 15 曹立瀛, 刘四清, 李勇, 王保强, 王东, 祁刚, 赵群, 郭振武. 胆胰和胃冲剂对大鼠重症急性胰腺炎合并肺损伤的治疗作用. 中国中西医结合外科杂志 2003; 9: 170-172

#### ■同行评价

本研究具有一定的科学性及创新性, 可读性强, 具有一定的临床参考价值。

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 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)

# 表达大鼠IL-2、B7-1基因CBRH7919细胞的建立

史瑶平, 郭燕, 李鹤平, 沈俊杰, 杨建勇

## ■背景资料

肝细胞癌(HCC)是全球最常见的恶性肿瘤之一, 具有极高的发病率和肿瘤相关死亡率。随着分子生物技术的迅速发展和对肿瘤发生分子机制的深入研究, 生物免疫治疗已经成为肝细胞癌综合治疗的重要组成部分。肿瘤细胞疫苗是将完整的肿瘤细胞经物理或化学方法处理及基因修饰后接种于患者, 进入患者体内的肿瘤细胞表面相关或特异性抗原可诱导产生抗肿瘤免疫反应。

史瑶平, 郭燕, 李鹤平, 沈俊杰, 杨建勇, 中山大学附属第一医院放射科 广东省广州市 510080

国家自然科学基金面上资助项目, No. 30600156, No. 81071247, No. 30870692

作者贡献分布: 史瑶平与杨建勇对此文所作贡献均等; 此项研究经费由杨建勇与李鹤平提供; 课题由杨建勇、郭燕、李鹤平及史瑶平设计; 研究过程由史瑶平与沈俊杰操作完成; 数据分析及论文撰写由史瑶平完成; 郭燕、李鹤平及杨建勇提供指导。

通讯作者: 杨建勇, 教授, 510080, 广东省广州市, 中山大学附属第一医院放射科. cjr.yangjianyong@vip.163.com

收稿日期: 2011-04-27 修回日期: 2011-06-21

接受日期: 2011-06-28 在线出版日期: 2011-09-08

## Establishment of a CBRH7919 cell line expressing rat IL-2 and B7-1

Yao-Ping Shi, Yan Guo, He-Ping Li, Jun-Jie Shen, Jian-Yong Yang

Yao-Ping Shi, Yan Guo, He-Ping Li, Jun-Jie Shen, Jian-Yong Yang, Department of Radiology, the First Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, Guangdong Province, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, Nos. 30600156, 81071247 and 30870692

Correspondence to: Professor Jian-Yong Yang, Department of Radiology, the First Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, Guangdong Province, China. cjr.yangjianyong@vip.163.com

Received: 2011-04-27 Revised: 2011-06-21

Accepted: 2011-06-28 Published online: 2011-09-08

## Abstract

**AIM:** To establish a CBRH7919 cell line CBRH7919 expressing rat IL-2 and B7-1 genes and to examine their ability to express the IL-2 and B7-1 genes *in vitro*.

**METHODS:** The IL-2 and B7-1 genes were amplified by RT-PCR and subcloned into retroviral vectors pBaBe-puro and pMSCV-neo, respectively, to obtain the recombinant retroviral vectors pBaBe-puro-IL-2 and pMSCV-neo-B7-1. The recombinant plasmids were then transfected into the 293FT packaging cells. The obtained infectious viruses were used to infect the CBRH7919 cell line, and puro/G418-resistant clones were acquired after puro/G418 selection. The expression of IL-2 and B7-1 was detected using Q-PCR, Western blot and ELISA.

**RESULTS:** The rat IL-2 and B7-1 genes were successfully amplified by RT-PCR, and the recombinant plasmids pBaBe-puro-IL-2 and pMSCV-neo-B7-1 were successfully constructed and verified by direct sequencing. A CBRH7919 cell line (CBRH7919/IL-2/B7-1) expressing rat IL-2 and B7-1 was established. Q-PCR analysis showed that the expression levels of IL-2 and B7-1 mRNAs in CBRH-7919/IL-2/B7-1 cells were 4.15 and 17.04 times higher than those in CBRH-7919-pmscv-neo cells. Western blot analysis showed that the expression level of B7-1 protein in CBRH-7919/IL-2/B7-1 cells was 3 times more than that in unmodified cells, while ELISA showed that expression level of IL-2 was 190 times more than that in unmodified cells.

**CONCLUSION:** A CBRH7919 cell line stably and effectively expressing rat IL-2 and B7-1 genes was obtained and provides a good basis for further research of immuno-gene therapy of liver cancer.

**Key Words:** Interleukin-2; B7-1; CBRH7919; Primary liver cancer

Shi YP, Guo Y, Li HP, Shen JJ, Yang JY. Establishment of a CBRH7919 cell line expressing rat IL-2 and B7-1. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(25): 2660-2663

## 摘要

**目的:** 研究携带大鼠IL-2、B7-1目的基因的CBRH7919细胞(即CBRH7919/IL-2/B7-1)体外表达目的基因的能力。

**方法:** RT-PCR扩增Wistar大鼠IL-2、B7-1目的基因, 分别克隆至重组逆转录病毒载体pBaBe-puro及pMSCV-neo, 构建逆转录病毒载体pBaBe-puro-IL-2及pMSCV-neo-B7-1, 重组质粒转染病毒包装细胞293FT(胚胎肾细胞), 产生病毒后感染CBRH-7919, 用抗生素puro/G418筛选出细胞抗性克隆, 并用RT-QPCR、Western blot及ELISA实验证实抗性细胞在转录水平和蛋白水平IL-2、B7-1的表达情况。

**结果:** 用RT-PCR方法成功扩增了Wistar大鼠

## ■同行评议者

胡国信, 副教授, 南昌大学第一附属医院感染内科

IL-2及B7-1目的基因, 经测序结果证实成功构建了pBaBe-puro-IL-2及pMSCV-neo-B7-1重组质粒. 利用该重组质粒成功构建了CBRH7919/IL-2/B7-1细胞系, 实时荧光定量PCR检测结果显示CBRH-7919/IL-2/B7-1细胞中IL-2和B7-1基因的平均表达量分别是CBRH-7919-pmscv-neo的4.153倍和17.040倍; West blot检测结果显示CBRH-7919/IL-2/B7-1细胞B7-1表达是无基因修饰CBRH7919的3倍; ELISA法检测结果显示CBRH-7919/IL-2/B7-1细胞IL-2表达量是无基因修饰CBRH7919的190余倍.

**结论:** 成功建立了稳定高效表达大鼠IL-2、B7-1的CBRH7919/IL-2/B7-1细胞系, 为下一步开展研究肝癌免疫基因治疗奠定了基础.

**关键词:** 白介素2; B7-1; CBRH7919; 原发性肝癌

史瑶平, 郭燕, 李鹤平, 沈俊杰, 杨建勇. 表达大鼠IL-2、B7-1基因CBRH7919细胞的建立. 世界华人消化杂志 2011; 19(25): 2660-2663  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/2660.asp>

## 0 引言

恶性肿瘤是威胁人类健康和生命的主要疾病之一, 手术、放疗和化疗是肿瘤治疗的三大常规手段, 随着分子生物技术的迅速发展和对肿瘤发生分子机制的深入研究, 生物免疫治疗已经成为肿瘤综合治疗的第4种模式. 机体对肿瘤细胞的免疫排斥主要依赖于T细胞产生的细胞免疫反应<sup>[1]</sup>, T淋巴细胞的激活需要两类信号: 一类是传统的特异的抗原递呈信号; 另一类是非抗原特异的, 非MHC限制的共刺激信号<sup>[2]</sup>. 将细胞因子基因和(或)共刺激分子基因导入肿瘤细胞, 造成肿瘤微环境中细胞因子高表达, MHC等抗原分子表达增加, 肿瘤细胞免疫原性增强, 能有效激活肿瘤特异性免疫反应<sup>[3,4]</sup>. 本研究构建携带大鼠IL-2、B7-1目的基因的逆转录病毒, 通过病毒感染特定的大鼠CBRH 7919肝癌细胞, 建立稳定高效表达IL-2、B7-1基因的细胞系CBRH7919/IL-2/B7-1, 为进一步研究IL-2、B7-1的功能及为下一步开展研究肝癌免疫基因治疗奠定了基础.

## 1 材料和方法

1.1 材料 逆转录病毒载体质粒pBaBe-puro、pMSCV-neo(Biovector Science Lab); DH5 $\alpha$ 感受态细

胞(广州博川生物科技有限公司); 293FT(Sigma, Cat no. H9268); 引物合成(Invitrogen公司); 各种限制性内切酶(NEB公司); PrimeSTAR HS DNA聚合酶、T4 DNA ligase、DNA聚合酶(TaKaRa公司); 质粒提取试剂盒、DNA凝胶纯化试剂盒、DNA产物纯化试剂盒(Tiagen公司);  $\beta$ -actin一抗(博士德); B7-1一抗(Santa Cruz). 胎牛血清、DMEM高糖培养基(Gibco公司); 嘌呤霉素、硫酸新霉素(MD公司).

### 1.2 方法

1.2.1 大鼠IL-2及B7-1基因扩增: 以Wistar大鼠cDNA为模板, 通过PCR扩增出IL-2及B7-1基因. 根据NCBI上已经提交的IL-2及B7-1基因序列设计引物, IL-2基因可用*Bam*H I 和*Eco*R I 进行酶切, B7-1基因可用*Eco*R I 和*Bgl* II 进行酶切. 引物序列为: IL-2-F: 5'CGGGATCCATGTACAGCATGCAGCTCG3', IL-2-R: 5'CCGGAATTCTTACTGAGTCATTGTTGAGAT3'; B7-1-F: 5'GCCGAATTCATGGCTTACAGTTGCCAGCT3', B7-1-R: 5'GCCAGATCTTCAAA-CAGTCTGTTCGGCTG3'.

1.2.2 构建pBaBe-puro-IL-2及pMSCV-neo-B7-1重组载体: 用琼脂糖凝胶DNA回收试剂盒从PCR产物中回收目的基因片段. 把IL-2基因的胶回收产物和pBaBb-puro载体分别用*Eco*R I 和*Bam*H I 进行酶切, B7基因的胶回收产物和pMSCV-neo载体分别用*Eco*R I 和*Bgl* II 进行酶切, 酶切产物均用天根生化的PCR产物纯化试剂盒进行纯化回收, 用TaKaRa的T4 DNA连接酶, 16℃连接过夜; 连接体系中PCR纯化产物和载体的摩尔比采用3:1到8:1的连接比例, 以此来调整连接体系中的PCR纯化产物所加的体积, 来优化连接体系. 将连接产物转化大肠杆菌DH5 $\alpha$ , 经菌落PCR筛选出阳性克隆后送公司测序.

1.2.3 重组逆转录病毒原液的制备: 磷酸钙转染法将pBaBe-puro-IL-2及pMSCV-neo-B7-1转染病毒包装细胞293FT(胚胎肾细胞). 转染48 h后收集病毒上清液, 0.45  $\mu$ m微孔滤膜过滤去除细胞及细胞碎屑, 此即病毒原液, 等份分装, 置-80℃冰箱保存备用.

1.2.4 表达大鼠IL-2及B7-1 CBRH7919细胞的建立: 将上述感染性病毒颗粒感染CBRH7919细胞, 37℃孵育3 h, 吸弃上清液, 换新病毒上清孵育3 h, 重复2次. 48 h后, 用抗生素puro/G418(0.5 mg/L)筛选获得阳性细胞, 将该细胞系命名为CBRH7919/IL-2/B7-1细胞.

### ■ 相关报道

葛宁灵等报道了IL-2和B7-1基因联合修饰的Hep6-IL2/B7肝癌疫苗能有效激活小鼠体内的细胞毒性淋巴细胞, 并能对亲代肿瘤细胞产生明显的特异性杀伤作用. Alexander Buchner等用CD80和IL-2基因联合修饰的RCC-26/CD80/IL-2疫苗治疗晚期转移性肾癌患者, 证实大部分病人能够产生针对肿瘤相关抗原的免疫学反应.



## ■应用要点

本实验所建立的IL-2、B7-1双基因修饰的CBRH7919/IL-2/B7-1细胞,能广泛用于Wistar大鼠移植性肝癌模型(CBRH7919)的免疫治疗研究,而此模型相对于目前广泛应用的其他模型而言能更好地模拟人原发性肝癌的特性,故可以为肝癌基因免疫治疗提供实验基础。

表 1 ELISA法检测肿瘤细胞IL-2含量 (ng/L)

分组	样品浓度	A <sub>450</sub>	蛋白含量	平均
CBRH7919细胞	0.068	0.019	0.6837	0.304933
	0.068	0.019	0.6837	
	0.067	0.018	-0.4526	
空载组	0.066	0.017	-1.5889	-0.07383
	0.068	0.019	0.6837	
	0.068	0.019	0.6837	
CBRH7919/IL-2/B7-1	0.119	0.070	58.635	59.01377
	0.121	0.072	60.9076	
	0.118	0.069	57.4987	

1.2.5 CBRH7919/IL-2/B7-1细胞的体外鉴定: 实时荧光定量PCR的方法, 采用Sybrgreen染料法, 以 $\beta$ -actin为内参基因, 对于空载组和CBRH7919/IL-2/B7-1细胞中IL-2、B7-1基因的表达量进行检测; ELISA法分别检测CBRH7919、空载组及CBRH7919/IL-2/B7-1细胞上清液中IL-2含量; Western blot法分别检测CBRH7919、空载组及CBRH7919/IL-2/B7-1细胞中B7-1含量。

## 2 结果

2.1 重组载体pBaBe-puro-IL-2及pMSCV-neo-B7的构建 利用Wistar大鼠成功扩增出IL-2及B7-1目的基因; 将目的基因分别克隆至重组逆转录病毒载体pBaBe-puro及pMSCV-neo构建了重组载体pBaBe-puro-IL-2及pMSCV-neo-B7-1, 将重组载体分别转化大肠杆菌DH5 $\alpha$ , 经菌落PCR鉴定后挑取的阳性克隆测序结果证实pBaBe-puro-IL-2及pMSCV-neo-B7载体构建成功。

2.2 表达大鼠IL-2和B7-1基因CBRH7919细胞的体外鉴定 实时荧光定量PCR检测结果显示CBRH-7919/IL-2/B7-1细胞中IL-2和B7-1基因的平均表达量为4.15和17.04, 分别是CBRH-7919-pmscv-neo的4.15倍和17.04倍; Western blot检测结果显示CBRH-7919/IL-2/B7-1细胞B7-1表达是无基因修饰CBRH7919的3倍(图1); ELISA法检测结果显示CBRH-7919/IL-2/B7-1细胞IL-2表达量是无基因修饰CBRH7919的190余倍(表1)。

## 3 讨论

在肿瘤的发生过程中, 虽然机体具有严密的免疫监视机制, 但恶变的肿瘤细胞自身存在免疫原性减弱、MHC分子表达下调或异常, 共刺激分子B7等缺失等因素, 因此, 在某些情况下他们有可能通过多种机制逃避机体的免疫监视, 从

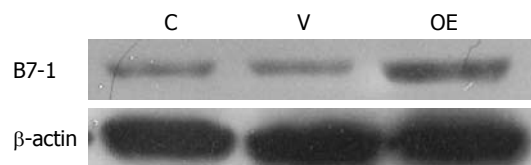


图 1 Western blot检测CBRH-7919/IL-2/B7-1细胞中B7-1基因表达产物。C: CBRH7919细胞; V: 空载组; OE: CBRH7919/IL-2/B7-1。

而导致肿瘤的发生<sup>[5]</sup>。

IL-2是由T淋巴细胞或NK细胞分泌产生的一种重要的细胞因子, 能够促进T细胞的增殖、活化, 并刺激MHC II类抗原等多种细胞表面分子的表达和多种细胞因子的产生, 从而增强疫苗免疫效果并发挥佐剂作用<sup>[6]</sup>。B7-1作为共刺激分子, 在T细胞的活化中发挥重要的第二刺激信号的作用<sup>[1]</sup>, 由于绝大多数肿瘤不表达或低表达B7-1分子, 导致癌细胞逃避机体免疫监视, 因而机体免疫系统无法识别并有效杀伤<sup>[7]</sup>, 缺乏了共刺激信号, 体内的T淋巴细胞将不可能对肿瘤等抗原产生有效的反应进而出现免疫耐受, 机体也就易于形成肿瘤<sup>[8]</sup>。B7-1基因在肿瘤细胞中的表达能够增强肿瘤细胞的免疫原性, 激活T淋巴细胞产生有效的抗肿瘤效应。Ge等<sup>[9]</sup>报道了IL-2和B7-1基因联合修饰的Hep6-IL2/B7肝癌疫苗能有效激活小鼠体内的细胞毒性淋巴细胞, 并能对亲代肿瘤细胞产生明显的特异性杀伤作用。Buchner等<sup>[10]</sup>用CD80和IL-2基因联合修饰的RCC-26/CD80/IL-2疫苗治疗晚期转移性肾癌患者, 证实大部分病人能够产生针对肿瘤相关抗原的免疫学反应。

本实验采用来源于Wistar大鼠的原发性肝癌细胞CBRH7919, 利用逆转录病毒的整合特性, 由逆转录病毒载体介导的pBaBe-puro-IL-2及pMSCV-neo-B7-1转移到CBRH7919细胞, 筛

选阳性克隆, 通过RT-QPCR、Western blot及ELISA等方法分别从mRNA和蛋白质水平上检测了IL-2、B7-1的表达情况. 以上结果提示与正常CBRH7919细胞相比, CBRH7919/IL-2/B7-1细胞在转录水平和蛋白水平IL-2和B7-1的表达均有明显的提高, 表明成功建立了高效表达IL-2、B7-1的大鼠CBRH-7919/IL-2/B7-1细胞.

CBRH-7919细胞为二乙基亚硝胺诱发Wistar大鼠所得的甲胎蛋白阳性的原发性肝癌细胞<sup>[1]</sup>, 已有报道利用CBRH7919细胞建立Wistar大鼠移植性肝癌模型并进行相关研究<sup>[12-15]</sup>. 由CBRH7919细胞建立的原位移植性肝癌模型相比Walker-256原位肝癌模型能更好地模仿人原发性肝癌的特性, 相比小鼠或裸鼠肝癌模型可进行更广泛的研究, 如肝动脉插管局部给药等介入治疗领域的研究. 故本实验采用CBRH7919细胞为研究对象, 成功建立了高效表达大鼠IL-2、B7-1的CBRH7919/IL-2/B7-1细胞, 为进一步研究IL-2、B7-1的功能及下一步开展研究肝癌免疫基因治疗奠定了基础.

#### 4 参考文献

- 1 Chen L, Ashe S, Brady WA, Hellström I, Hellström KE, Ledbetter JA, McGowan P, Linsley PS. Costimulation of antitumor immunity by the B7 counter-receptor for the T lymphocyte molecules CD28 and CTLA-4. *Cell* 1992; 71: 1093-1102
- 2 Schwartz RH. A cell culture model for T lymphocyte clonal anergy. *Science* 1990; 248: 1349-1356
- 3 Tepper RI, Mulé JJ. Experimental and clinical studies of cytokine gene-modified tumor cells. *Hum Gene Ther* 1994; 5: 153-164
- 4 Wu S, Ma J, Che X, Liu Y, Wang H, Zhao J, Shen F, Xie T, Trojan J, Wu M, Guo Y. Treatment of hepatocellular carcinoma with the cellular tumor vaccines generated by in vitro modification of tumor cells with non gene transfer approaches. *Adv Exp Med Biol* 1998; 451: 283-293
- 5 Ridolfi L, Petrini M, Fiammenghi L, Riccobon A, Ridolfi R. Human embryo immune escape mechanisms rediscovered by the tumor. *Immunobiology* 2009; 214: 61-76
- 6 Nunberg JH, Doyle MV, York SM, York CJ. Interleukin 2 acts as an adjuvant to increase the potency of inactivated rabies virus vaccine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989; 86: 4240-4243
- 7 Tatsumi T, Takehara T, Katayama K, Mochizuki K, Yamamoto M, Kanto T, Sasaki Y, Kasahara A, Hayashi N. Expression of costimulatory molecules B7-1 (CD80) and B7-2 (CD86) on human hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 1997; 25: 1108-1114
- 8 Chen L, McGowan P, Ashe S, Johnston J, Li Y, Hellström I, Hellström KE. Tumor immunogenicity determines the effect of B7 costimulation on T cell-mediated tumor immunity. *J Exp Med* 1994; 179: 523-532
- 9 Ge NL, Ye SL, Zheng N, Sun RX, Liu YK, Tang ZY. Prevention of hepatocellular carcinoma in mice by IL-2 and B7-1 genes co-transfected liver cancer cell vaccines. *World J Gastroenterol* 2003; 9: 2182-2185
- 10 Buchner A, Pohla H, Willimsky G, Frankenberger B, Frank R, Baur-Melnyk A, Siebels M, Stief CG, Hofstetter A, Kopp J, Pezzutto A, Blankenstein T, Oberneder R, Schendel DJ. Phase 1 trial of allogeneic gene-modified tumor cell vaccine RCC-26/CD80/IL-2 in patients with metastatic renal cell carcinoma. *Hum Gene Ther* 2010; 21: 285-297
- 11 朱德厚, 叶秀珍, 陈瑞铭. 大鼠肝癌细胞(CBRH-7919)的建株及其生物学特性研究. *实验生物学报* 1980; 13: 22
- 12 沈俊杰, 李鹤平, 张冰, 谭国胜, 杨建勇. Wistar大鼠移植性肝癌模型的建立. *临床放射学杂志* 2011; 30: 56
- 13 Jiang H, Meng Q, Tan H, Pan S, Sun B, Xu R, Sun X. Antiangiogenic therapy enhances the efficacy of transcatheter arterial embolization for hepatocellular carcinomas. *Int J Cancer* 2007; 121: 416-424
- 14 Sun X, Jiang H, Jiang X, Tan H, Meng Q, Sun B, Xu R, Krissansen GW. Antisense hypoxia-inducible factor-1alpha augments transcatheter arterial embolization in the treatment of hepatocellular carcinomas in rats. *Hum Gene Ther* 2009; 20: 314-324
- 15 Zhong XG, He S, Yin W, Deng JY, Cheng B. Selective tropism of liver stem cells to hepatocellular carcinoma in vivo. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 3886-3891

#### ■同行评价

本文的科学性、创新性和可读性基本能反映肿瘤免疫治疗基础研究的先进水平.

编辑 李薇 电编 何基才

# 降逆汤治疗反流性食管炎150例

陈昱倩, 刘万里, 李学良

## ■背景资料

反流性食管炎在西方国家较常见。在我国北京、上海两地流行病学调查结果提示, RE发病率为1.92%, 明显低于西方国家, 但随着人民生活水平的不断提高, 现代生活节奏加快, 饮食结构的改变, RE在中国的发病率呈上升趋势。

陈昱倩, 李学良, 南京医科大学第一附属医院消化科 江苏省南京市 210029

刘万里, 南京市中西医结合医院消化科 江苏省南京市 210014

作者贡献分布: 该课题由陈昱倩与李学良共同设计; 研究过程由陈昱倩与刘万里完成; 研究所用药物组方由刘万里提供; 药品及数据统计分析工具由陈昱倩提供; 数据分析由陈昱倩完成; 论文撰写由陈昱倩完成; 刘万里协助课题设计; 李学良修改论文并最终审定论文。

通讯作者: 李学良, 副教授, 210029, 江苏省南京市广州路300号, 南京医科大学第一附属医院消化科. ligakur@yahoo.com.cn  
电话: 025-83718836-6033

收稿日期: 2011-07-18 修回日期: 2011-09-06

接受日期: 2011-09-07 在线出版日期: 2011-09-08

## Treatment of reflux esophagitis with Jiangni decoction: an analysis of 150 cases

Yu-Qian Chen, Wan-Li Liu, Xue-Liang Li

Yu-Qian Chen, Xue-Liang Li, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210029, Jiangsu Province, China

Wan-Li Liu, Department of Gastroenterology, Nanjing Hospital of Integrated Chinese and Western Medicine, Nanjing 210014, Jiangsu Province, China

Correspondence to: Xue-Liang Li, Associate Professor, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, 300 Guangzhou Road, Nanjing 210029, Jiangsu Province, China. ligakur@yahoo.com.cn

Received: 2011-07-18 Revised: 2011-09-06

Accepted: 2011-09-07 Published online: 2011-09-08

## Abstract

**AIM:** To evaluate the therapeutic effect of Jiangni decoction on reflux esophagitis (RE).

**METHODS:** One hundred and fifty patients with RE were divided randomly into three groups: a control group and two test groups. The control group received omeprazole only, while the two test groups received Jiangni decoction and Jiangni decoction plus omeprazole, respectively. The treatment lasted for 8 weeks. Immediately and half a year after treatment, RE was evaluated using the GERDQ tool and gastroscopy.

**RESULTS:** After 8 weeks of treatment, all three groups showed significant improvement, but

there were no significant differences in the improvement rates between the two treatment groups and between the treatment groups and control group in terms of GERDQ score and endoscopic signs (all  $P > 0.01$ ). However, a significant difference was noted in the recurrence rate between the treatment groups and control group (all  $P < 0.01$ ) though there was no significant difference between the two treatment groups (all  $P > 0.01$ ).

**CONCLUSION:** Jiangni decoction has similar therapeutic effect to omeprazole in RE patients but is associated with a lower recurrence rate.

**Key Words:** Jiangni decoction; Chinese medicine; Reflux esophagitis; GerDQ questionnaire

Chen YQ, Liu WL, Li XL. Treatment of reflux esophagitis with Jiangni decoction: an analysis of 150 cases. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(25): 2664-2667

## 摘要

**目的:** 观察降逆汤治疗反流性食管炎(reflux esophagitis, RE)的疗效及复发情况。

**方法:** 将150例RE患者随机分为三组: 实验1组给予降逆汤治疗; 实验2组为降逆汤联合奥美拉唑治疗; 对照组给予奥美拉唑治疗。疗程8 wk, 治疗后及停药半年后计算症状积分(GERDQ)及胃镜检查, 进行疗效评价。

**结果:** 8 wk治疗后各组均明显好转, 但实验1组, 实验2组分别与对照组比较, 实验1组与实验2组比较, 其GERDQ评分及内镜分级均无明显差异( $P > 0.01$ )。半年后复发率: 实验1组, 实验2组与对照组比较, GERDQ评分及内镜分级均有明显差异( $P < 0.01$ ); 实验1组与实验2组之间的GERDQ评分及内镜分级无明显差异( $P > 0.01$ )。

**结论:** 单纯服用中药降逆汤治疗RE与奥美拉唑治疗以及降逆汤联合奥美拉唑治疗具有相似的好转率, 而单纯服用中药降逆汤以及降逆汤联合奥美拉唑治疗有更低的半年复发率。

## ■同行评议者

任超世, 研究员, 中国医学科学院生物医学工程研究所

**关键词:** 降逆汤; 中医药; 反流性食管炎; GERDQ量表

陈昱倩, 刘万里, 李学良. 降逆汤治疗反流性食管炎150例. 世界华人消化杂志 2011; 19(25): 2664-2667

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/2664.asp>

## 0 引言

反流性食管炎(reflux esophagitis, RE)是由胃和(或)十二指肠内容物,特别是酸性胃液和胆汁反流至食管,引起食管黏膜炎症、糜烂、溃疡所致<sup>[1]</sup>。是一种常见的消化系动力障碍性疾病。国内外研究表明,RE是一种慢性和复发性疾病,其内科治疗目的是减轻或消除胃食管反流的症状、预防并发症、防止复发<sup>[2]</sup>。但是西医传统方案以PPI治疗结束后复发率较高,据文献报道,其2 mo为50%,6 mo为82%,年累计复发率可达75%-85%。因此以往的治疗通常需要在食管炎病损愈合以后维持治疗半年,症状严重的甚至1年以上<sup>[3]</sup>。近年来国内众多学者根据祖国医学的理论,对RE的病因病机、辨证治疗及实验研究等均作了较深入的研究,使用中医药治疗RE的研究有较大进展,取得了一定的治疗效果<sup>[4]</sup>。

降逆汤系南京市中西医结合医院年治疗反流性食管炎之经验总结方剂,组方如下:黄连;吴茱萸;竹茹;枳壳;煅乌贼骨;大贝母;白芨等。据近年门诊治疗RE患者及回访情况表明,服用降逆汤治疗或服用该汤剂同时联合西医药物治疗的RE患者,停药后的复发率明显降低,故推想此方用于治疗RE患者的疗效及降低远期复发率优于西药方案。本研究以经电子胃镜和GERDQ确诊RE者为研究对象,观察降逆汤与奥美拉唑治疗RE的疗效及复发情况。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 选取2010-04/2010-12在南京市中西医结合医院就诊的RE患者150例,男63例,女87例,年龄18-65(平均52.6±12.3)岁。其中初诊患者27例,不规则治疗者48例,治疗后复发者75例。所有对象均在入选前5 d内经镜检查确诊为RE。将受试者随机分为3组,每组50例,各组患者性别、年龄、病程无显著差异。

### 1.2 方法

**1.2.1 诊断标准:** (1)本研究采用的胃食管反流病诊断问卷(GERDQ)<sup>[5]</sup>是由Dent、Vakil等国际知名消化专家负责的DIAMDND研究结果,是目前国内公认的主要针对胃食管反流病(GERD)

的诊断筛查工具。该问卷把GERD的典型症状归纳成六个表现,分为A、B、C三项内容,包括A:胸骨后烧灼感、反食;B:上腹部疼痛、恶心;C:症状所致睡眠障碍、药物治疗过程中需加服药物,设计成6个问题,根据症状发生的频率分为4个等级,评分0-3分,可以确定GERD诊断、评估GERD患者生活质量、监测GERD治疗效果,对GERD有较高的诊断价值,可监测治疗效果及评估生活质量的变化。诊断标准:初诊患者:A+B+C总分≥8分,提示GERD诊断。C项评分≥3分,提示GERD影响生活质量。复诊患者:A与C任一项评分≤1分,提示治疗有效。A与C任一项评分≥2分,提示治疗方案需调整。

(2)根据中华医学会消化内镜学分会制定的《反流性食管炎诊断及治疗指南(2003年)》,分级I a-III级。同时具有以下反流性食管炎典型症状之一:烧心、反流。

**1.2.2 排除标准:** 妊娠和哺乳期妇女;消化性溃疡;癌性溃疡和未能排斥癌变可能的溃疡(中重度异常增生者要排除);有明确的降低胃酸手术史或食管或胃手术史;食管或胃底静脉曲张;卓-艾综合征;有严重并发症,如食管狭窄或Barrett's食管;有消化系其他严重疾病,如克罗恩病、溃疡性结肠炎等;有严重的心、肝、肺、肾、血液、内分泌系统疾病;入选前4周内服用抑酸剂和其他影响胃肠道功能的药物;需长期服用降低LES张力或影响胃肠动力的药物。

**1.2.3 治疗方法:** 对照组:奥美拉唑 20 mg 2次/d,口服;实验1组:降逆汤 2次/d,口服;实验2组:降逆汤2次/d,联合奥美拉唑 20 mg,2次/d,口服;疗程8 wk,三组受试者均以完成一般治疗为前提,包括改变体位;戒除烟酒;调整饮食;控制体质质量。其中降逆汤汤剂使用统一的中药煎药机制备。

**1.2.4 观察项目及疗效标准:** 治疗8 wk后复查电子胃镜观察记录食管黏膜炎症分级变化,分级程度减轻者记录为好转。同时,再次予以记录GERDQ量表测评,A+C≤1者记录为好转。根据胃镜检查结果,脱落需要继续治疗及调整治疗方案者,余受试者停药半年后复查电子胃镜观察记录食管黏膜炎症分级变化,可分级诊断者记录为复发。同时,再次予以记录GERDQ量表测评,A+B+C≥8者记录为复发。

**统计学处理** 采用SPSS17.0统计软件包进行统计处理,对组间GERDQ评分、内镜分级好转率及半年后复发率进行统计学分析,三组间率

## ■研发前沿

国内外研究表明,RE是一种慢性和复发性疾病,其内科治疗目的是减轻或消除胃食管反流的症状、预防并发症、防止复发。但是西医传统方案以PPI治疗结束后复发率较高,近年来国内众多学者根据祖国医学的理论,对RE的病因病机、辨证治疗及实验研究等均作了较深入的研究,使用中医药治疗RE的研究有较大进展,取得了一定的治疗效果。

## ■创新盘点

利用中药的疗效单一或联合西医治疗RE,提高治疗效果,降低复发率,同时降低治疗成本,减少长期服药的不良反应,提高患者治疗依从性。



### ■应用要点

利用中药的疗效单一或联合西医治疗RE, 提高治疗效果, 降低复发率。随着人民生活水平的不断提高, 现代生活节奏加快, 饮食结构的改变, RE 在中国的发病率呈上升趋势。利用中药的疗效单一或联合西医治疗RE, 疗效可靠, 复发率低, 应用简单, 有着良好的临床应用前景。

表 1 治疗8 wk后GERDQ评分及内镜分级比较 ( $n = 50$ )

	GERDQ评分		内镜分级	
	好转	无效	好转	无效
对照组	44	6	48	2
试验1组	43	7	45	5
试验2组	49	1	50	0

表 2 停药半年后GERDQ评分及内镜分级比较

	$n$	GERDQ评分		内镜分级	
		复发	未复发	复发	未复发
对照组	43	36	7	35	8
试验1组	41	7 <sup>b</sup>	34 <sup>b</sup>	6 <sup>b</sup>	35 <sup>b</sup>
试验2组	47	3 <sup>b</sup>	44 <sup>b</sup>	3 <sup>b</sup>	44 <sup>b</sup>

<sup>b</sup> $P < 0.01$  vs 对照组。

的比较采用卡方检验, 频数小于5时校正卡方值,  $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。再进行两组间率的比较, 采用卡方检验, 频数小于5时校正卡方值,  $P < 0.01$ 认为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 疗效评价** 对照组GERDQ评分好转44例, 内镜分级好转48例; 实验1组GERDQ评分好转43例, 内镜分级好转45例; 实验2组GERDQ评分好转49例, 内镜分级好转50例; 实验1组与对照组疗效比较GERDQ评分及内镜分级均无明显差异 ( $P > 0.01$ ); 实验2组与对照组疗效比较GERDQ评分及内镜分级均无明显差异 ( $P > 0.01$ ); 实验1组与实验2组疗效比较GERDQ评分及内镜分级均无明显差异 ( $P > 0.01$ , 表1)

**2.2 复发率比较** 对照组脱落需要继续治疗及调整治疗方案者7例, 43例受试者中GERDQ评分复发36例, 内镜分级复发35例; 实验1组同因脱落9例, 41例受试者中GERDQ评分复发7例, 内镜分级复发6例; 实验2组同因脱落3例, GERDQ评分复发3例, 内镜分级复发3例。三组受试者经脱落后均符合: GERDQ评分A+B+C<8分; A与C任何一项评分 $\leq 1$ 分; 内镜分级0级。达到停药标准。各组间无显著差异。实验1组与对照组比较GERDQ评分及内镜分级均有明显差异 ( $P < 0.01$ ); 实验2组与对照组比较GERDQ评分及内镜分级均有明显差异 ( $P < 0.01$ ); 实验1组与实验2组比较GERDQ评分及内镜分级均无明显差异 ( $P > 0.01$ , 表2)。

## 3 讨论

反流性食管炎在西方国家较常见。在我国北京、上海两地流行病学调查结果提示, RE发病率为1.92%<sup>[6]</sup>, 明显低于西方国家, 但随着人民生活水平的不断提高, 现代生活节奏加快, 饮食结构的改变, RE 在中国的发病率呈上升趋势<sup>[7]</sup>。RE的主要病因和机制为抗反流防御功能下降和反流物对食管黏膜的攻击增强: 抗反流屏障功能降低; 食管酸廓清能力降低; 食管黏膜屏障破坏; 胃十二指肠功能异常。主要治疗原则是抑制胃酸、抗反流、增强食管防御机能。

祖国医学中RE可归于“胸痛”、“吐酸”、“胃脘痛”、“噎膈”等病证范畴。其中医辨证分型国内尚无统一标准, 因此临床分型论治较混乱。不论是哪种病因最终均导致脾虚肝郁, 胃气上逆、升降失司的共同病机, 从而产生反胃烧心、返酸呃逆、胸膈阻闷之证候。病位在胃, 与肝、脾有关。治以疏肝理气, 和胃降逆。

降逆汤系南京医科大学第一附属医院根据多年方剂治疗经验, 结合多味中药的降逆、清火、制酸、护膜等机制, 新近组合的用于治疗反流性食管炎的经验方剂。方中黄连苦寒, 泻心清火; 吴茱萸辛热, 行气解郁, 又能引热下行, 以为反佐。一寒一热, 寒者正治, 热者从治。竹茹清热降逆止呕, 枳壳疏肝理气, 升降相因有助于气血运行。乌贼骨、大贝母制酸和胃止痛; 白芨降逆止呕, 收敛消肿。全方有疏肝理气、和胃降逆、辛开苦降、抑酸止痛之功。

现代药理研究表明, 黄连具有抗菌、抗病毒及解痉、调整胃肠平滑肌收缩等功能<sup>[8]</sup>, 吴茱萸中所含的吴茱萸苦素为苦味质, 有苦味健胃作用, 其所含的挥发油又具有芳香健胃作用<sup>[9,10]</sup>。乌贼骨所含的胶质成分可在糜烂或溃疡面形成保护膜, 有利于食管黏膜的修复和溃疡面的愈合<sup>[11]</sup>, 白芨降逆止呕, 收敛消肿, 抑菌止血, 具有高度黏性, 含有胶体状成分, 能在受损黏膜表面形成一层保护膜, 可防护黏膜受损<sup>[12,13]</sup>, 与乌贼骨配合, 可使药液黏滞, 覆于黏膜, 增强屏障作用<sup>[14,15]</sup>。全方有制酸、抗反流、增强食管防御机能。

总之, 降逆汤治疗RE的作用机制符合中西医各自治疗领域的基本治疗原则。根据本文试验结果, 服用降逆汤治疗RE的好转率与西药奥美拉唑相比, 在GERDQ评分和内镜分级评价中均无显著差异, 而经降逆汤治疗后的复发率在GERDQ评分和内镜分级评价中均明显低于奥美

拉唑的结果. 在本研究中, 降逆汤联合奥美拉唑治疗与降逆汤单剂相比并未显示更低的复发率, 提示奥美拉唑在防止停药后的复发率方面其效果是非常有限的. 但本研究仅为单次研究, 复发的随访时间仅为半年, 对远期复发率的影响则需进一步随访研究.

#### 4 参考文献

- 1 中华医学会消化内镜学会. 反流性食管炎诊断及治疗指南. 中华消化内镜杂志 2004; 21: 221
- 2 朱争鸣. 反流性食管炎的内科综合治疗. 中国现代药物应用 2011; 1: 30-31
- 3 柯美云. 加强和维持胃食管反流病的有效治疗. 胃肠病学 2000; 5: 201
- 4 王学, 王金玲. 自拟通降安胃汤治疗反流性食管炎50例. 中国中医药信息杂志 2010; 17: 63-64
- 5 Dimenäs E, Glise H, Hallerbäck B, Hernqvist H, Svédlund J, Wiklund I. Quality of life in patients with upper gastrointestinal symptoms. An improved

evaluation of treatment regimens? *Scand J Gastroenterol* 1993; 28: 681-687

- 6 潘国宗, 许国铭, 郭慧平. 北京上海胃食管反流症状的流行病学调查. 中华消化杂志 1999; 19: 223-226
- 7 郭文娟, 张艳丽. 胃食管反流病的诊治. 中国临床医生 2011; 39: 23-26
- 8 王捷虹, 秋增超. 对药在治疗脘腹痛中的运用. 河南中医 2010; 30: 88-89
- 9 郭惠, 杨云云, 王昌利. 吴茱萸碱药理研究进展. 陕西中医 2010; 31: 1685-1686
- 10 姚东英. 和胃降逆法治疗反流性食管炎60例. 浙江中医杂志 2009; 44: 493-493
- 11 朱炳良. 海螵蛸大贝母治疗反流性食管炎32例. 世界华人消化杂志 2001; 9: 1098-1099
- 12 王磊, 杨立娟. 白芨治疗胃溃疡临床应用与进展. 黑龙江医药 2010; 23: 789-790
- 13 陈培琼, 陈慧, 黄德平. 乌贝散加味联合西沙必利治疗反流性食管炎. 广东医学 2000; 21: 435-436
- 14 国家中医药管理局. 中华本草. 第1版. 上海: 上海科学技术出版社, 1998: 2386
- 15 黄泰康. 常用中药成分与药理手册. 第1版. 北京: 中国医药科技出版社, 1994: 879

#### ■同行评论

本研究设计合理, 结果可靠, 对临床医生有较好的参考价值.

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《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)

# 血清可溶性E钙粘蛋白与胃癌生物学行为的关系

赵越, 周永宁, 冉俊涛, 邹邵静, 李强, 陈兆锋

## ■背景资料

胃癌是严重威胁人类健康的疾病, 其发生、发展的机制尚不十分清楚, 目前可作为胃癌诊断及疗效观察、判断预后的指标较少, 因此有必要寻找可作为胃癌诊断及疗效观察, 对监测肿瘤转移、复发、预后具有意义的新指标。

赵越, 周永宁, 冉俊涛, 邹邵静, 李强, 陈兆锋, 兰州大学第一医院消化科 甘肃省兰州市 730000

国家自然科学基金资助项目, No. 30872478C160401

作者贡献分布: 此课题由周永宁、赵越、冉俊涛、邹邵静、李强及陈兆锋设计; 研究过程由赵越、冉俊涛、邹邵静、李强及陈兆锋操作完成; 研究所用试剂及分析工具由冉俊涛提供; 数据分析由赵越完成; 本论文写作由赵越、李强及周永宁完成。

通讯作者: 周永宁, 博士研究生导师, 教授, 730000, 甘肃省兰州市, 兰州大学第一医院. yongningzhou@sina.com  
电话: 0931-8619797

收稿日期: 2011-07-01 修回日期: 2011-08-24

接受日期: 2011-09-01 在线出版日期: 2011-09-08

## Clinical significance of serum levels of soluble E-cadherin in patients with gastric carcinoma

Yue Zhao, Yong-Ning Zhou, Jun-Tao Ran, Shao-Jing Zou, Qiang Li, Zhao-Feng Chen

Yue Zhao, Yong-Ning Zhou, Jun-Tao Ran, Shao-Jing Zou, Qiang Li, Zhao-Feng Chen, Department of Gastroenterology, the First Hospital of Lanzhou University, Lanzhou 730000, Gansu Province, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30872478C160401

Correspondence to: Yong-Ning Zhou, Professor, Department of Gastroenterology, the First Hospital of Lanzhou University, Lanzhou 730000, Gansu Province, China. yongningzhou@sina.com

Received: 2011-07-01 Revised: 2011-08-24

Accepted: 2011-09-01 Published online: 2011-09-08

## Abstract

**AIM:** To measure serum levels of soluble E-cadherin (sE-cadherin) in patients with gastric cancer and to evaluate the relationship of serum levels of sE-cadherin with tumor clinicopathological features and patient survival.

**METHODS:** Peripheral blood samples were collected from 127 gastric cancer patients and 31 healthy controls from March 2003 to September 2004. Serum levels of sE-cadherin were measured using double-antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assay. The clinical pathological data and survive data for all patients were recorded.

**RESULTS:** Serum levels of sE-cadherin were

significantly higher in patients with gastric cancer than in healthy controls ( $43.83 \mu\text{g/L} \pm 15.77 \mu\text{g/L}$  vs  $17.17 \mu\text{g/L} \pm 5.38 \mu\text{g/L}$ ,  $P = 0.000$ ,  $t = 8.34$ ). Serum levels of sE-cadherin were closely associated with tumor differentiation, depth of invasion and lymph node metastasis (all  $P < 0.05$ ). Patients with lower levels of serum sE-cadherin had significant survival advantage over those with higher levels of serum sE-cadherin ( $P < 0.001$ ), and such survival advantage was independent of depth of invasion, lymph node metastasis and tumor differentiation.

**CONCLUSION:** sE-cadherin may serve as a potential biological marker for the diagnosis and prognosis of gastric cancer.

**Key Words:** Serum; E-cadherin; Gastric cancer; Clinical pathology; Survival

Zhao Y, Zhou YN, Ran JT, Zou SJ, Li Q, Chen ZF. Clinical significance of serum levels of soluble E-cadherin in patients with gastric carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(25): 2668-2672

## 摘要

**目的:** 检测胃癌患者及健康者血清可溶性E钙粘蛋白(sE-Cadherin)浓度; 探讨sE-Cadherin浓度与胃癌临床病理学及生存期之间的关系。

**方法:** 收集2003-03/2004-09 127例胃癌患者术前及31例健康者外周血标本, 用酶联免疫吸附双抗体夹心法检测sE-Cadherin浓度, 所有胃癌患者均接受手术治疗, 收集癌组织临床病理学数据, 并随访获得生存期。

**结果:** 127 例胃癌患者 sE-Cadherin浓度为  $43.83 \mu\text{g/L} \pm 15.77 \mu\text{g/L}$ , 31例健康者为  $17.17 \mu\text{g/L} \pm 5.38 \mu\text{g/L}$ , 前者显著高于后者( $P = 0.000$ ,  $t = 8.34$ ), sE-Cadherin浓度与胃癌分化程度、浸润深度、淋巴结转移密切相关( $P < 0.05$ ), sE-Cadherin浓度较低者具有显著的生存优势( $P < 0.01$ ), 且独立于浸润深度、淋巴结转移及分化程度。

**结论:** sE-Cadherin可作为一种新的辅助胃癌诊

## ■同行评议者

王小众, 教授, 福建医科大学附属协和医院消化内科

断, 评价病变程度及判断预后的血清学指标。

**关键词:** 血清; 钙粘蛋白; 胃癌; 临床病理学; 生存期

赵越, 周永宁, 由俊涛, 邵邵静, 李强, 陈兆锋. 血清可溶性E钙粘蛋白与胃癌生物学行为的关系. 世界华人消化杂志 2011; 19(25): 2668-2672  
http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/2668.asp

## 0 引言

黏附丧失是胃癌细胞侵袭生长的重要因素。上皮细胞钙黏蛋白(E-Cadherin, E-Cad)所介导的黏附系统早已被公认为“浸润抑制系统”, 但关于其降解片段-血清可溶性E钙粘蛋白(sE-Cadherin)与胃癌生物学行为间的关系研究尚少且结果不一, 本实验研究sE-Cadherin与胃癌生物学行为的关系。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 血清取自2003-03/2004-09兰州大学第一医院127例经病理确诊的胃癌患者及31例健康者(男22例, 女9例), 胃癌患者不合并其他恶性肿瘤, 均接受手术治疗, 收集术后临床病理资料, 男105例, 女22例, 年龄28-75(中位年龄59)岁; 浸润局限于黏膜或黏膜下层(T1)9例、至肌层(T2)43例、至浆膜层(T3)36例、至浆膜层以外者(T4)39例; 无淋巴结转移59例, 淋巴转移68例; 肿瘤低、中、高分化分别为64、41、22例。并随访获5年生存期。sE-Cadherin定量检测ELISA试剂盒购自美国R&D Systems Inc, 酶标仪(Powerwave X Bio-tek Instruments Inc, 美国)、微量离心机(BECKMAN Microfuge lite, 美国)、超净水机(MILLIPORE water purification systems, 日本)均由兰大一院中心实验室提供。

**1.2 方法** 胃癌患者及健康者基础代谢状态下采集患者末梢静脉3mL, 即刻分离血清, -70℃保存。每份血样重复检测2次。sE-Cadherin检测采用ELISA双抗体夹心法: 96孔板预包被E-Cadherin特异性鼠抗人单克隆抗体, 加入20倍稀释血样和标准品, 反应后洗涤去除未结合标本; 加入酶标E-Cadherin特异性抗体反应后洗涤去除未反应酶标抗体; 加入底物显色; 30 min内测定各标本光密度值(波长450nm, 参考波长570nm); 通过标准品曲线得出待测血样中sE-Cadherin浓度。

**统计学处理** 采用SPSS15.0软件统计, sE-

表1 sE-Cadherin与胃癌临床病理特征的关系

病理参数	n	sE-Cadherin( $\mu\text{g/L}$ )	t值	P值
性别			0.045	0.964
男	105	43.86 $\pm$ 15.86		
女	22	43.69 $\pm$ 15.69		
年龄(岁)			1.864	0.065
$\geq 50$	87	42.71 $\pm$ 16.10		
<50	20	49.80 $\pm$ 12.59		
浸润深度 <sup>1</sup>			-7.249	0.000
T1/T2	52	33.57 $\pm$ 7.92		
T3/T4	75	50.95 $\pm$ 15.96		
分化程度			-2.611	0.011
低	64	47.45 $\pm$ 19.73		
中-高	63	40.27 $\pm$ 9.43		
淋巴结转移			-7.087	0.000
有	68	51.46 $\pm$ 16.3		
无	59	35.04 $\pm$ 9.26		

<sup>1</sup>因例数少, 故合并T1/T2与T3/T4。

Cadherin与胃癌临床病理学的关系用t检验, 与患者生存期之间的关系用Kaplan-meier曲线分析, Log-rank检验。多因素生存分析用Cox回归分析法。均以 $P < 0.05$ 为有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 sE-Cadherin浓度** 127例胃癌患者sE-Cadherin浓度为43.83  $\mu\text{g/L} \pm 15.77 \mu\text{g/L}$ 。31例健康者sE-Cadherin浓度为17.17  $\mu\text{g/L} \pm 5.38 \mu\text{g/L}$ , 胃癌患者sE-Cadherin浓度显著高于健康者( $t = 8.34$ ,  $P = 0.000$ )。

**2.2 sE-Cadherin与胃癌临床病理学的关系** sE-Cadherin浓度与淋巴结转移、分化程度和浸润深度密切相关( $P < 0.05$ ), 而与年龄、性别无关( $P > 0.05$ , 表1)。

**2.3 sE-Cadherin与生存分析** 到随访结束时, 获得127例患者中106例的生存期数据, 21例失访, 失访率为16.54%, 所得数据中, 生存期为2.6-57.87 mo, 平均为27.03 mo  $\pm 16.42$  mo, 半数生存期为28 mo, 3年生存率为44.2%, 5年生存率为39.6%(图1)。以sE-Cadherin浓度中位数41.04  $\mu\text{g/L}$ 将106例分为低浓度组和高浓度组, 每组各53例。应用Kaplan-Meier生存分析显示: sE-Cadherin浓度(图2)与生存期密切相关( $P = 0.000$ ), 浓度较低组具有显著的生存优势。COX多因素生存分析显示: sE-Cadherin浓度(图3)与生存期密切相关( $P < 0.05$ ), 并且是独立于胃癌分化程度、浸润深度及淋巴结转移的生存预测因素。

## ■研究前沿

黏附丧失是恶性肿瘤细胞具备侵袭性生长的主要因素, E-cadherin作为一种重要的细胞黏附分子, 已经发现与多种恶性肿瘤的生物学行为密切相关, 其在恶性肿瘤中异常表达的分子机制已成为目前研究热点之一。



### ■创新盘点

E钙粘蛋白所介导的黏附系统已被公认为“浸润抑制系统”，但关于其降解片段-血清可溶性E钙粘蛋白(sE-Cadherin)与胃癌生物学行为间的关系研究尚少且结果不一，本实验研究了sE-Cadherin与胃癌生物学行为的关系。

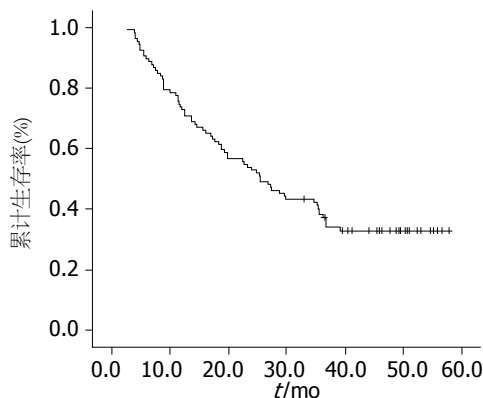


图1 106例胃癌Kaplan-Meier生存曲线。

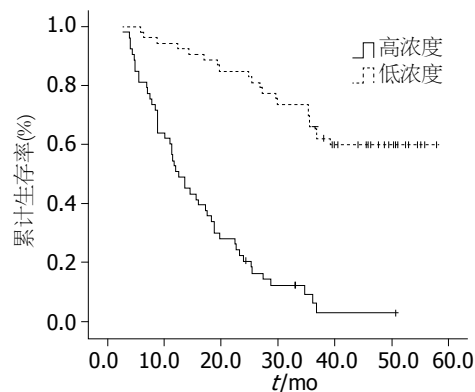


图2 sE-Cadherin浓度与生存期的关系( $P = 0.000$ )。

### 3 讨论

sE-Cadherin相对分子质量为80 000-84 000 Da, 首先由Damsky等于1983年在人乳腺癌细胞MCF-7无血清培养液中发现。Katayama等于1994年首先发现癌症患者血清中也存在这个片段, 并且较正常人水平高。sE-Cadherin一经发现就引起了广泛关注, 试图探讨其作为一种肿瘤诊断及预后判断的新指标。现已发现sE-Cadherin浓度在膀胱癌<sup>[1]</sup>、非小细胞肺癌<sup>[2]</sup>、肝癌<sup>[3]</sup>、皮肤黑素瘤<sup>[4]</sup>、乳腺癌<sup>[5]</sup>等恶性肿瘤均明显的升高, 我们的实验表明胃癌患者sE-Cadherin浓度明显高于正常人, 且与胃癌的浸润深度、淋巴结转移成正相关, 而与分化程度呈负相关。有实验证明, sE-Cadherin浓度与膀胱癌的临床病理学间也有类似的关系<sup>[6]</sup>, sE-Cadherin浓度还是预测胃癌手术复发的敏感指标<sup>[7]</sup>。

E-Cadherin作为重要的细胞黏附分子, 存在于上皮细胞膜上, 为I型跨膜糖蛋白, 在建立与保持上皮细胞极性和细胞细胞紧密连接中起到关键的作用。其相对分子质量为120 000 Da, 由细胞外肽段、跨膜区和细胞内肽段构成。其胞外部分含5个(E-Cadherin1-E-Cadherin5)重复的结构域(motif), 每个结构域含一个由组氨酸-精氨酸-缬氨酸(histidine arginine valine, HAV)组成的模体, 长度约为110个氨基酸。E-Cadherin跨膜、胞内段主要与连接素(catenin)结合, 从而形成完整的E-Cadherin/catenin复合体。Catenin是与E-Cadherin关系最为密切的细胞质黏附相关蛋白, 主要包括 $\alpha$ 、 $\beta$ 和 $\gamma$ -Catenin。E-Cadherin的嗜同性特异黏附作用主要是细胞间的E-Cadherin的胞外段共同形成“拉链(Zipper)”结构的黏附连接。

健康个体无论性别和年龄, 代谢过程中

E-Cadherin可通过降解产生少量的sE-Cadherin, 在血清中可微量检测。恶性肿瘤的病理过程中, 快速的细胞增殖和生长可引起E-Cadherin代谢和蛋白降解作用加快, 从而导致sE-Cadherin浓度升高。实验证明, 恶性肿瘤的病理过程中, sE-Cadherin浓度的升高常常伴随着基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMPs)的过表达<sup>[8]</sup>, 进一步研究发现, MMPs是降解E-Cadherin蛋白的关键分子<sup>[9]</sup>, 他作用于E-Cadherin蛋白胞外段根部, 发挥蛋白水解作用, 产生蛋白质片段(E-Cadherin1-E-Cadherin5及E-Cadherin5和跨膜段胞外端之间的部分氨基酸残基, 共约含有545个氨基酸残基), 即sE-Cadherin。MMPs家族中又以MMP-7作用最为活跃<sup>[10]</sup>。在体外培养的肿瘤细胞中加入MMP-7, 培养基中出现sE-Cadherin, 并且肿瘤细胞的浸润能力明显加强<sup>[10]</sup>。在用博来霉素治疗后的野生型小鼠支气管肺泡灌洗液中可检测到sE-Cadherin, 而在同等条件下的MMP-7基因敲除小鼠的支气管肺泡灌洗液中却检测不到<sup>[11]</sup>。因此证明MMP-7能以E-Cadherin为底物进行降解, 从而破坏细胞之间的正常连接, 导致细胞分散能力和肿瘤浸润能力增强。MMPs的调控机制复杂, Wnt/ $\beta$ -catenin信息通路起着非常重要的作用<sup>[12]</sup>,  $\beta$ -catenin是Wnt/ $\beta$ -catenin信息通路的关键因子, 它具有双重作用: 在胞膜正常表达的 $\beta$ -catenin可与E-Cadherin结合形成复合体参与介导上皮细胞黏附, 保持细胞极性, 抑制肿瘤转移; 而进入胞质中的 $\beta$ -catenin如不能被及时分解, 将在胞质、胞核中积累及异常表达。异常表达的 $\beta$ -catenin不但可以启动Wnt/ $\beta$ -catenin信息通路的下游靶基因, 从而上调MMPs<sup>[13]</sup>, 还可以在细胞核内与TCF形成复合物,  $\beta$ -catenin/TCF复合物可作为转录因子上调MMPs表达, 后者可降

解E-Cadherin蛋白<sup>[14]</sup>. TGF- $\beta$ 通过 TGF- $\beta$ /Smad 通路中的Smad7介导降解细胞膜上的 $\beta$ -catenin 并造成 $\beta$ -catenin在胞质中的积累<sup>[15]</sup>. 此外, MMPs 的活性增强还与MMP与组织抑制因子(tissue inhibitor of metalloproteinase, TIMP)之间的比例失衡密切相关<sup>[16]</sup>. 因此, sE-Cadherin浓度增高意味着组织E-Cadherin蛋白降解增加, 而E-Cadherin 蛋白作为重要的黏附分子与胃癌的分化、转移及患者生存期密切相关<sup>[17]</sup>. 另外, sE-Cadherin还有其独特的作用: 可与相邻细胞E-Cadherin胞外段结合, 抑制细胞黏附, 并引起异常信号传导, 进一步提高肿瘤细胞浸润转移能力<sup>[18]</sup>. 但也有学者<sup>[19]</sup>对81例胃癌患者进行研究, 结果发现sE-Cadherin浓度较健康者明显升高, 但是与胃癌临床病理学仅有相互关联的趋势, 却无统计学差异. 这可能是由于样本小导致了较大抽样误差所致, 有待于扩大样本进一步研究.

sE-Cadherin浓度增高不仅意味着组织E-Cadherin蛋白降解增加, 细胞黏附作用下降, 而且还可通过与相邻细胞E-Cadherin胞外段结合, 进一步抑制细胞黏附, 引起细胞间异常的信号传导, 从而导致了胃癌细胞的异常分化和浸润转移, 而这正是影响患者生存期的主要因素. 我们对获得随访的106例应用Kaplan-Meier曲线和Cox多元回归方法进行分析, 结果表明sE-Cadherin是一种独立的生存预后因素, 其浓度与生存期密切相关, 浓度较低者具有显著的生存优势, 这与Chan等<sup>[20]</sup>的研究结果一致.

总之, 本实验发现, 胃癌患者sE-Cadherin浓度显著高于健康者, sE-Cadherin浓度与胃癌的浸润深度、淋巴结转移成正相关, 而与分化程度呈负相关, 并与患者生存期密切相关, 是独立于浸润深度、淋巴结转移及分化程度的生存预后因素, sE-Cadherin可作为一种新的辅助胃癌诊断, 评价病变程度及判断预后的血清学指标.

#### 4 参考文献

- Jäger T, Becker M, Eisenhardt A, Tilki D, Tötsch M, Schmid KW, Romics I, Rübber H, Ergün S, Szarvas T. The prognostic value of cadherin switch in bladder cancer. *Oncol Rep* 2010; 23: 1125-1132
- Gogali A, Charalabopoulos K, Zampira I, Konstantinidis AK, Tachmazoglou F, Daskalopoulos G, Constantopoulos SH, Dalavanga Y. Soluble adhesion molecules E-cadherin, intercellular adhesion molecule-1, and E-selectin as lung cancer biomarkers. *Chest* 2010; 138: 1173-1179
- Soyama A, Eguchi S, Takatsuki M, Kawashita Y, Hidaka M, Tokai H, Nagayoshi S, Mochizuki S, Matsumoto S, Hamasaki K, Tajima Y, Kanematsu T. Significance of the serum level of soluble E-cadherin in patients with HCC. *Hepatogastroenterology* 2008; 55: 1390-1393
- George E, Polissar NL, Wick M. Immunohistochemical evaluation of p16INK4A, E-cadherin, and cyclin D1 expression in melanoma and Spitz tumors. *Am J Clin Pathol* 2010; 133: 370-379
- Najy AJ, Day KC, Day ML. The ectodomain shedding of E-cadherin by ADAM15 supports ErbB receptor activation. *J Biol Chem* 2008; 283: 18393-18401
- Shi B, Laudon V, Yu S, Dong D, Zhu Y, Xu Z. E-cadherin tissue expression and urinary soluble forms of E-cadherin in patients with bladder transitional cell carcinoma. *Urol Int* 2008; 81: 320-324
- Chan AO, Chu KM, Lam SK, Cheung KL, Law S, Kwok KF, Wong WM, Yuen MF, Wong BC. Early prediction of tumor recurrence after curative resection of gastric carcinoma by measuring soluble E-cadherin. *Cancer* 2005; 104: 740-746
- Zhou Y, Li G, Wu J, Zhang Z, Wu Z, Fan P, Hao T, Zhang X, Li M, Zhang F, Li Q, Lu B, Qiao L. Clinicopathological significance of E-cadherin, VEGF, and MMPs in gastric cancer. *Tumour Biol* 2010; 31: 549-558
- Delassus GS, Cho H, Hoang S, Eliceiri GL. Many new down- and up-regulatory signaling pathways, from known cancer progression suppressors to matrix metalloproteinases, differ widely in cells of various cancers. *J Cell Physiol* 2010; 224: 549-558
- Manicone AM, Huizar I, McGuire JK. Matrilysin (Matrix Metalloproteinase-7) regulates anti-inflammatory and antifibrotic pulmonary dendritic cells that express CD103 (alpha(E)beta(7)-integrin). *Am J Pathol* 2009; 175: 2319-2331
- Kitamura T, Biyajima K, Aoki M, Oshima M, Taketo MM. Matrix metalloproteinase 7 is required for tumor formation, but dispensable for invasion and fibrosis in SMAD4-deficient intestinal adenocarcinomas. *Lab Invest* 2009; 89: 98-105
- Zuidervaat W, Pavey S, van Nieuwpoort FA, Packler L, Out C, Maat W, Jager MJ, Gruijs NA, Hayward NK. Expression of Wnt5a and its downstream effector beta-catenin in uveal melanoma. *Melanoma Res* 2007; 17: 380-386
- Dilek FH, Topak N, Aktepe F, Sahin O, Türel KS, Sahin DA, Dilek ON. E-cadherin, beta-catenin adhesion complex and relation to matrilysin expression in pT3 rectosigmoid cancers. *Pathol Res Pract* 2008; 204: 809-815
- Du R, Xia L, Sun S, Lian Z, Zou X, Gao J, Xie H, Fan R, Song J, Li X, Liu J, Fan D. URG11 promotes gastric cancer growth and invasion by activation of beta-catenin signalling pathway. *J Cell Mol Med* 2010; 14: 621-635
- Shafer SL, Towler DA. Transcriptional regulation of SM22alpha by Wnt3a: convergence with TGFbeta(1)/Smad signaling at a novel regulatory element. *J Mol Cell Cardiol* 2009; 46: 621-635
- Lukaszewicz-Zajac M, Mroczko B, Szmitieski M. [The significance of metalloproteinases and their inhibitors in gastric cancer]. *Postepy Hig Med Dosw (Online)* 2009; 63: 258-265
- Czyzewska J, Guzińska-Ustymowicz K, Ustymowicz M, Pryczynicz A, Kemon A. The expression of E-cadherin-catenin complex in patients with advanced gastric cancer: role in formation of metastasis. *Folia Histochem Cytobiol* 2010; 48: 37-45

#### ■应用要点

寻找可作为胃癌诊断及疗效观察, 有助于胃癌患者病情动态分析, 对监测肿瘤转移、复发、预后、指导临床治疗具有意义的新指标.

## ■同行评价

本文对胃癌患者血清可溶性E钙粘蛋白进行检测, 结果对胃癌的临床诊断具有一定辅助价值。

- 18 Pedrazzani C, Caruso S, Corso G, Marrelli D, Neri A, Berardi A, Roviello F. Influence of age on soluble E-cadherin serum levels prevents its utility as a disease marker in gastric cancer patients. *Scand J Gastroenterol* 2008; 43: 765-766
- 19 Gofuku J, Shiozaki H, Doki Y, Inoue M, Hirao M, Fukuchi N, Monden M. Characterization of soluble E-cadherin as a disease marker in gastric cancer patients. *Br J Cancer* 1998; 78: 1095-1101
- 20 Chan AO, Chu KM, Lam SK, Wong BC, Kwok KF, Law S, Ko S, Hui WM, Yueng YH, Wong J. Soluble E-cadherin is an independent pretherapeutic factor for long-term survival in gastric cancer. *J Clin Oncol* 2003; 21: 2288-2293

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》出版流程

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

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

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

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

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

**第五步 排版制作:** 电子编辑对稿件基本情况进行审核, 核对无误后, 进行稿件排版及校对、图片制作及参考文献核对。彩色图片保证放大400%依然清晰; 中文参考文献查找全文, 核对作者、题目、期刊名、卷期及页码, 英文参考文献根据本杂志社自主研发的“参考文献检测系统”进行检测, 确保作者、题目、期刊名、卷期及页码准确无误。排版完成后, 电子编辑进行黑马校对, 消灭错别字及语句错误。

**第六步 组版:** 本期责任电子编辑负责组版, 对每篇稿件图片校对及进行质量控制, 校对封面、目次、正文页码和书眉, 修改作者的意见, 电子编辑进行三校。责任科学编辑制作整期中英文摘要, 并将英文摘要送交英文编辑进一步润色。责任电子编辑再将整期进行二次黑马校对。责任科学编辑审读本期的内容包括封面、目次、正文、表格和图片, 并负责核对作者、语言编辑和语言审校编辑的清样, 负责本期科学新闻稿的编辑。

**第七步 印刷、发行:** 编辑部主任和主编审核清样, 责任电子编辑通知胶片厂制作胶片, 责任科学编辑、电子编辑核对胶片无误送交印刷厂进行印刷。责任电子编辑制作ASP、PDF、XML等文件。编务配合档案管理员邮寄杂志。

**第八步 入库:** 责任电子编辑入库, 责任科学编辑审核, 包括原始文章、原始清样、制作文件等。

《世界华人消化杂志》从收稿到发行每一步都经过严格审查, 保证每篇文章高质量出版, 是消化病学专业人士发表学术论文首选的学术期刊之一。为保证作者研究成果及时公布, 《世界华人消化杂志》保证每篇文章16 wk内完成。(编辑部主任: 李军亮 2010-01-18)

# M2-PK和HSP90 $\alpha$ 在胃癌患者血清中的表达及意义

刘志刚, 宋永春, 孙瑞芳, 雷光焰

刘志刚, 雷光焰, 陕西省肿瘤医院胸部肿瘤外科 陕西省西安市 710061

宋永春, 西安交通大学医学院第一附属医院肿瘤外科 陕西省西安市 710061

孙瑞芳, 西安交通大学医学院 陕西省西安市 710061

作者贡献分布: 此课题由刘志刚、宋永春、孙瑞芳及雷光焰设计; 研究过程由刘志刚与宋永春完成; 标本收集由刘志刚与宋永春完成; 论文的撰写由刘志刚、宋永春、孙瑞芳及雷光焰共同完成。

通讯作者: 雷光焰, 主任医师, 710061, 陕西省西安市雁塔西路309号, 陕西省肿瘤医院胸部肿瘤外科. lei-g-y@163.com  
电话: 029-85276155

收稿日期: 2011-06-26 修回日期: 2011-08-25

接受日期: 2011-09-01 在线出版日期: 2011-09-08

## Clinical significance of serum levels of tumor type M2-pyruvate kinase and heat shock protein 90 $\alpha$ in patients with gastric cancer

Zhi-Gang Liu, Yong-Chun Song, Rui-Fang Sun, Guang-Yan Lei

Zhi-Gang Liu, Guang-Yan Lei, Department of Chest Surgery, Tumor Hospital of Shaanxi Province, Xi'an 710061, Shaanxi Province, China

Yong-Chun Song, Department of Tumor Surgery, the First Affiliated Hospital of College of Medicine of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, Shaanxi Province, China  
Rui-Fang Sun, College of Medicine, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, Shaanxi Province, China

Correspondence to: Guang-Yan Lei, Department of Chest Surgery, Tumor Hospital of Shaanxi Province, Xi'an 710061, Shaanxi Province, China. lei-g-y@163.com

Received: 2011-06-26 Revised: 2011-08-25

Accepted: 2011-09-01 Published online: 2011-09-08

## Abstract

**AIM:** To measure serum levels of tumor type M2 pyruvate kinase (M2-PK) and heat shock protein 90 $\alpha$  (HSP90 $\alpha$ ) in patients with gastric cancer and to evaluate their clinical significance by comparing to serum carcinoembryonic antigen (CEA).

**METHODS:** A total of 80 patients with gastric cancer and 80 controls were enrolled in this study. Serum levels of M2-PK and HSP90 $\alpha$  were measured by ELISA, while those of CEA were determined by radioimmunoassay.

**RESULTS:** Serum levels of M2-PK, HSP90 $\alpha$  and

CEA were significantly higher in patients with gastric cancer than in controls (all  $P < 0.05$ ). The sensitivity and specificity of detection of M2-PK, HSP90 $\alpha$  and CEA were 56.25% and 91.25%, 52.50% and 92.50%, and 45.00% and 92.50% respectively. Compared to detection of HSP90 $\alpha$  and CEA alone, detection of M2-PK had a higher sensitivity. The sensitivity of combined detection of M2-PK, HSP90 $\alpha$  and CEA was increased to 91.25%. Serum M2-PK was positively correlated with tumor size, TNM stage, invasion depth and lymph node metastasis (all  $P < 0.05$ ). A significant positive correlation was noted between serum M2-PK and HSP90 $\alpha$  levels in patients with gastric cancer.

**CONCLUSION:** Serum M2-PK and HSP90 $\alpha$  can be used as potential markers for gastric cancer. There is a strong positive correlation between serum M2-PK and HSP90 $\alpha$  levels in patients with gastric cancer.

**Key Words:** Tumor type M2 pyruvate kinase; Heat shock protein 90 $\alpha$ ; Gastric cancer; Marker

Liu ZG, Song YC, Sun RF, Lei GY. Clinical significance of serum levels of tumor type M2-pyruvate kinase and heat shock protein 90 $\alpha$  in patients with gastric cancer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(25): 2673-2678

## 摘要

**目的:** 检测肿瘤型M2丙酮酸激酶(M2-PK)与热休克蛋白90 $\alpha$ (HSP90 $\alpha$ )在胃癌患者血清中的表达水平, 并与癌胚抗原(CEA)进行比较, 评估其临床应用价值。

**方法:** 收集胃癌患者和健康对照血清标本各80例, 检测血清中的M2-PK、HSP90 $\alpha$ 及CEA的含量。

**结果:** M2-PK、HSP90 $\alpha$ 和CEA在胃癌患者血清的表达水平均显著高于对照组( $P < 0.05$ )。M2-PK的灵敏度为56.25%, 特异度为91.25%。HSP90 $\alpha$ 的灵敏度为52.50%, 特异度为92.50%。CEA灵敏度为45.00%, 特异度为92.50%。与HSP90 $\alpha$ 和CEA相比, M2-PK灵敏度较高, 三

## ■背景资料

蛋白质组学技术给临床肿瘤早期标志物的检测带来了划时代的革命。本研究小组前期实验已利用基质辅助激光解析飞行时间质谱技术(MALDI-TOF MS)检测到胃癌患者和健康对照血清中若干种差异表达的蛋白质/多肽, 并对其氨基酸序列进行了鉴定。我们选择其中鉴定出的两个表达具有正相关的蛋白质-肿瘤型M2丙酮酸激酶(M2-PK)和热休克蛋白90 $\alpha$ (HSP90 $\alpha$ )作为本次研究对象。

## ■同行评议者

曹秀峰, 教授, 南京医科大学附属南京第一医院肿瘤中心



## ■ 研发前沿

近年来,肿瘤血清标志物的研究越来越被重视,灵敏性和特异性较高的肿瘤标志物对肿瘤的诊断、随访及预后评估起到重要作用。

者联合检测的灵敏度高达91.25%。胃癌组间比较结果显示, M2-PK在病变大于5 cm、临床病理晚期、肿瘤浸润深度较深和存在淋巴结转移的情况表达水平较高,有显著性差异( $P<0.05$ )。此外, Spearman相关分析显示, M2-PK和HSP90 $\alpha$ 的在血清中的表达水平具有明显的相关性。

**结论:** M2-PK和HSP90 $\alpha$ 可以作为潜在的胃癌血清标志物,且M2-PK和HSP90 $\alpha$ 可能存在较强的正相关关系,可能对胃癌的诊断、治疗和预后具有较高的应用价值。

**关键词:** 肿瘤型丙酮酸激酶; 热休克蛋白90 $\alpha$ ; 胃癌; 标志物

刘志刚, 宋永春, 孙瑞芳, 雷光焰. M2-PK和HSP90 $\alpha$ 在胃癌患者血清中的表达及意义. 世界华人消化杂志 2011; 19(25): 2673-2678

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/2673.asp>

## 0 引言

蛋白质组学技术给临床肿瘤早期标志物的检测带来了划时代的革命。本研究小组前期实验已利用基质辅助激光解析飞行时间质谱技术(matrix assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry, MALDI-TOF MS)检测到胃癌患者和健康对照血清中若干种差异表达的蛋白质/多肽<sup>[1]</sup>,并对其氨基酸序列进行了鉴定,我们选择其中鉴定出的两个表达具有正相关的蛋白质-肿瘤型M2丙酮酸激酶(M2 pyruvate kinase, M2-PK)和热休克蛋白90 $\alpha$ (heat shock protein 90 $\alpha$ , HSP90 $\alpha$ )作为本次研究对象。M2-PK是丙酮酸激酶的一种同工酶,近年来在胰腺癌、肺癌及结直肠癌等恶性肿瘤标志物中的研究越来越多<sup>[2-4]</sup>。HSP90 $\alpha$ 是高度保守的“分子伴侣”家族成员,具有促进肿瘤的增殖、抑制肿瘤细胞凋亡的作用<sup>[5]</sup>,已有研究发现HSP90 $\alpha$ 在胃癌组织中高表达,而对其在胃癌患者血清中的表达研究较少。目前研究表明,二者的表达均分别与缺氧诱导因子-1(hypoxia inducible factor-1, HIF-1)有关<sup>[6-8]</sup>。因此,本研究检测M2-PK和HSP90 $\alpha$ 在胃癌患者血清中的表达情况,验证前期实验所鉴定的血清差异蛋白结果的可靠性;进一步检验二者的相关性;与CEA作比较,并评估二者是否可以共同作为胃癌的血清标志物,为胃癌的早期诊断、治疗及预后判断提供依据。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 病例组选取胃癌患者80例,来自西安交通大学第一附属医院肿瘤外科(2009-10/2010-05),所有病例均无放化疗史,其中男42例,女38例,年龄33-81(平均 $59.15\pm 9.8$ )岁。所有患者均经影像学、胃镜和手术确诊。有无淋巴结转移以手术所见和临床病理学结果为主要依据,部分晚期胃癌患者无手术指征者参考临床表现和影像学检查确定。TNM分期(以美国癌症联合委员会AJCC第六版为标准): I期3例, II期22例, III期40例, IV期15例。有淋巴结转移51例,无淋巴结转移29例。对照组80例,选取经体检排除胃癌病史的正常健康人(肝功能等各项指标均正常,无胃肠道及其他疾病),男40例,女40例,年龄34-77(平均 $57.98\pm 7.8$ )岁。病例组及对照组所有个体均知情同意。

### 1.2 方法

**1.2.1 样本收集:** 所有研究对象均术前空腹静脉采血3 mL, 乙二胺四乙酸(EDTA)抗凝,混匀,3 000 r/min 4 °C离心10 min,收集血清并保存于-80 °C冰箱待测。

**1.2.2 M2-PK和HSP90 $\alpha$ 测定:** 采用双抗体夹心酶联免疫吸附试验(ELISA)法检测血清M2-PK和HSP90 $\alpha$ ,试剂盒均购于上海亚培生物科技有限公司分装(原产地以色列),严格按照试剂说明书操作,在Triturus全自动酶免疫测定仪上进行测定。CEA采用常规放射性免疫法检测,试剂盒由北方免疫试剂研究所提供,操作按说明书,CEA $\geq 15$   $\mu\text{g/L}$ 为阳性阈值。

**统计学处理** 使用SPSS13.0进行统计学处理,一般计量资料数据描述采用mean $\pm$ SD表示,满足正态和方差齐性的计量资料进行两独立样本均数 $t$ 检验;采用Spearman方法进行相关分析;多组间比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA)。 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 M2-PK、HSP90 $\alpha$ 和CEA在胃癌患者血清中的表达**

**2.1.1 M2-PK、HSP90 $\alpha$ 和CEA在胃癌患者及健康对照血清中表达水平的比较:** 胃癌组M2-PK、HSP90 $\alpha$ 和CEA的表达水平均显著高于对照组( $P<0.05$ ,表1)。

**2.1.2 M2-PK、HSP90 $\alpha$ 和CEA单项及联合检测在胃癌诊断中的价值:** M2-PK和HSP90 $\alpha$ 的表达水平在大多数胃癌患者中有明显上调趋势,

表 1 M2-PK、HSP90 $\alpha$ 和CEA在胃癌及对照组的血清水平 ( $n = 80$ , mean  $\pm$  SD)

	M2-PK(U/mL)	HSP90 $\alpha$ (pg/ml)	CEA(ng/mL)
胃癌组	23.75 $\pm$ 14.81 <sup>a</sup>	162.09 $\pm$ 74.33 <sup>a</sup>	18.38 $\pm$ 10.26 <sup>a</sup>
对照组	11.06 $\pm$ 5.35	109.63 $\pm$ 33.94	3.98 $\pm$ 0.49

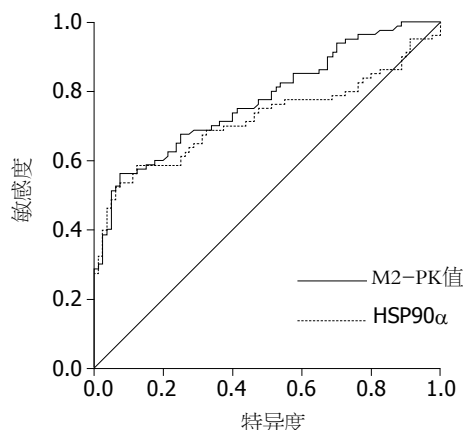
<sup>a</sup> $P < 0.05$  vs 对照组.

 表 2 M2-PK和HSP90 $\alpha$ 在胃癌中的价值

	曲线下面积(AUC)	CUT-OFF	标准误	95%CI	
				上限	下限
M2-PK	0.775	16.34	0.037	0.703	0.847
HSP90 $\alpha$	0.720	154.68	0.042	0.637	0.803

为了将胃癌组和对照组更好地加以区分, 利用ROC曲线划定了M2-PK和HSP90 $\alpha$ 的最佳临界值(cut-off point), 当M2-PK的最佳临界值(A值)为16.34时, 灵敏度为56.25%, 特异度为91.25%, 曲线下面积(AUC)为0.775; 当HSP90 $\alpha$ 的最佳临界值(A值)为154.68时, 灵敏度为52.50%, 特异度为92.50%, 曲线下面积(AUC)为0.720(图1, 表2). 进一步与CEA比较显示, 胃癌患者M2-PK、HSP90 $\alpha$ 和CEA阳性检出率均高于对照组, 差异有显著性( $P < 0.05$ , 表3). 联合检测几个标志物的特异度与单项检测相比差异无显著性( $P > 0.05$ ), 而灵敏度显著提高( $P < 0.05$ ). 与HSP90 $\alpha$ 和CEA相比, M2-PK对胃癌阳性检出率最高, 相应的, 灵敏度也最高(56.25%). 多个指标联合检测显示, M2-PK和CEA联合灵敏度为87.50%, HSP90 $\alpha$ 和CEA联合灵敏度为85.00%, M2-PK和HSP90 $\alpha$ 联合灵敏度为70.00%, 远远高于三个指标单项检测的灵敏度值, 而三者联合检测的灵敏度更是高达91.25%.

**2.1.3 M2-PK、HSP90 $\alpha$ 和CEA的血清水平与胃癌临床病理特征的关系:** M2-PK的表达水平在病变 $\geq 5$  cm组显著高于病变 $< 5$  cm组( $P < 0.05$ ); 病理分期为III期和IV期的表达水平显著高于I期和II期( $P < 0.05$ ); 存在淋巴结转移的表达水平平均显著高于无淋巴结转移的病例( $P < 0.05$ ), 根据肿瘤胃癌浸润的不同深度, 发现随着病变累及黏膜及黏膜下层、肌层、浆膜层及邻近器官, 其M2-PK的血清表达水平逐渐升高( $P < 0.05$ ). HSP90 $\alpha$ 和CEA的表达水平在不同的临床分型间没有显著性差异( $P > 0.05$ , 表4).


 图 1 血清M2-PK和HSP90 $\alpha$ 在胃癌中的价值.

#### ■ 相关报道

Kumar等对M2-PK与其他标志物对胃肠道肿瘤的诊断进行Meta分析发现, M2-PK对胃癌、结直肠癌诊断的敏感性高于传统的肿瘤标志物.

**2.2 M2-PK和HSP90 $\alpha$ 的相关性** 对80例胃癌配对标本进行比较分析, 其中, 38.75%(31/80)的胃癌M2-PK及HSP90 $\alpha$ 均为阳性, 30.00%(24/80)的胃癌M2-PK及HSP90 $\alpha$ 均为阴性, 17.50%(14/80)的胃癌M2-PK阳性但HSP90 $\alpha$ 阴性, 13.75%(11/80)的胃癌M2-PK阴性但HSP90 $\alpha$ 阳性, M2-PK及HSP90 $\alpha$ 表达呈正相关( $P < 0.05$ ). Spearman相关分析结果显示, M2-PK和HSP90 $\alpha$ 的表达水平在胃癌组具有明显的相关性, 其相关系数为0.501( $P < 0.001$ ).

### 3 讨论

近年来, 肿瘤血清标志物的研究越来越被重视, 灵敏性和特异性较高的肿瘤标志物对肿瘤的诊断、随访及预后评估起到重要作用. 蛋白组学的出现为血清标志物的筛选带来了划时代的革命, 采用质谱技术寻找血清标志物是目前蛋白组学研究领域最常用的方法. 本次研究所选M2-PK和HSP90 $\alpha$ 即为前期蛋白组学鉴定出在胃癌组显著增高的两个蛋白.

M2-PK是丙酮酸激酶的一种同工酶, 在正常细胞中, M2-PK主要以四聚体形式存在, 而在肿瘤中, M2-PK大量表达并主要以二聚体形式存在, 故又称为肿瘤型丙酮酸激酶(Tu M2-PK)<sup>[10]</sup>. M2-PK在核酸合成代谢活跃的细胞中起重要作用, 如胚胎细胞、成人干细胞、特别是肿瘤细胞<sup>[11]</sup>. M2-PK在肿瘤细胞的糖代谢及生长起到至关重要的作用<sup>[12]</sup>, 是糖酵解代谢和细胞增殖分化凋亡的调节因子<sup>[13]</sup>. 近年来在胰腺癌、肺癌及结直肠癌等恶性肿瘤标志物中的研究越来越多<sup>[2-4]</sup>.

热休克蛋白(heat shock proteins, HSPs)是高度保守的“分子伴侣”家族, 已有研究证明<sup>[15,16]</sup>, 在许多肿瘤细胞(如乳腺癌、肺癌、卵巢癌、神

### ■同行评价

本研究设计较为严谨,具备一定连续性、完整性,数据可信。

表 3 M2-PK、HSP90 $\alpha$ 和CEA单独及联合检测胃癌的阳性率及灵敏度特异度结果比较 ( $n = 80$ , %)

	M2-PK	HSP90 $\alpha$	CEA	M2-PK/CEA	HSP90 $\alpha$ /CEA	M2-PK/HSP90 $\alpha$	三项联合
胃癌组阳性率	56.25	52.50	45.00	87.50	85.00	70.00	91.20
对照组阳性率	8.75	7.50	7.50	16.25	12.50	16.25	23.75
灵敏度	56.25	52.50	45.00	87.50	85.00	70.00	91.25
特异度	91.25	92.50	92.50	83.75	87.50	83.75	76.25

表 4 M2-PK、HSP90 $\alpha$ 和CEA的血清表达情况与胃癌临床病理特征的关系 (mean  $\pm$  SD)

项目	临床病理学参数	$n$	M2-PK(IU/mL)	HSP90 $\alpha$ (pg/mL)	EA(ng/mL)
年龄	$\geq 60$	45	25.66 $\pm$ 16.10	170.13 $\pm$ 73.13	19.69 $\pm$ 9.25
	$< 60$	35	21.29 $\pm$ 12.77	151.74 $\pm$ 75.63	17.36 $\pm$ 7.98
性别	男	42	26.48 $\pm$ 15.28	168.76 $\pm$ 77.46	17.49 $\pm$ 8.02
	女	38	20.74 $\pm$ 13.86	154.73 $\pm$ 71.01	19.36 $\pm$ 10.98
组织学分级	高分化	28	23.18 $\pm$ 14.30	165.93 $\pm$ 80.69	18.52 $\pm$ 9.34
	中分化	32	24.85 $\pm$ 15.34	158.88 $\pm$ 74.14	17.28 $\pm$ 8.66
	低或未分化	20	22.82 $\pm$ 15.31	161.87 $\pm$ 68.65	19.94 $\pm$ 8.52
病变大小	$< 5$ cm	48	20.21 $\pm$ 13.44	156.71 $\pm$ 75.24	16.50 $\pm$ 7.26
	$\geq 5$ cm	32	29.08 $\pm$ 15.39 <sup>a</sup>	170.16 $\pm$ 73.38	19.40 $\pm$ 8.98
病理分期	I 期, II 期	25	15.68 $\pm$ 9.10	138.48 $\pm$ 61.93	16.95 $\pm$ 7.86
	III 期, IV 期	55	27.42 $\pm$ 15.50 <sup>a</sup>	172.83 $\pm$ 77.48	19.03 $\pm$ 8.98
浸润深度	黏膜及黏膜下	9	12.24 $\pm$ 4.89	146.26 $\pm$ 66.22	16.50 $\pm$ 7.33
	肌层	24	18.10 $\pm$ 12.02	151.88 $\pm$ 77.16	15.69 $\pm$ 6.56
	浆膜及浆膜外	47	28.85 $\pm$ 15.21 <sup>a</sup>	170.34 $\pm$ 74.67	19.63 $\pm$ 8.78
淋巴结转移	有	51	26.94 $\pm$ 15.99 <sup>a</sup>	170.63 $\pm$ 73.51	17.90 $\pm$ 11.58
	无	29	18.16 $\pm$ 10.57	147.08 $\pm$ 74.64	19.22 $\pm$ 10.66

<sup>a</sup> $P < 0.05$  vs 组间。

经母细胞瘤、前列腺癌等)中HSP呈高水平的表达。HSP90是HSP家族中最活跃的分子伴侣蛋白之一,在肿瘤组织中,突变或异常蛋白的存在刺激了HSP90的表达,这种持续高表达以HSP90 $\alpha$ 为主,可以达到正常水平的2-10倍。研究认为肿瘤细胞尤其依赖于HSP90 $\alpha$ 生存于氧含量低、营养缺乏的微环境<sup>[17]</sup>, HSP90 $\alpha$ 参与低氧诱导因子的信号传导通路<sup>[18]</sup>。目前以HSP90 $\alpha$ 作为靶点的肿瘤干预研究越来越受到重视<sup>[19]</sup>。

胃癌大多数起病隐匿,有时不易确诊,因而探寻胃癌相关的肿瘤标志物也一直是临床研究的热点。Kumar等<sup>[20]</sup>对M2-PK与其他标志物对胃肠道肿瘤的诊断进行Meta分析发现, M2-PK对胃癌、结直肠癌诊断的敏感性高于传统的肿瘤标志物。又有研究发现,联合检测多种标志物可以提高诊断的敏感性<sup>[21]</sup>, M2-PK对结直肠癌、胃癌的敏感性分别为48%、61%, M2-PK联合CEA检测结直肠癌敏感性提高到63%; M2-PK联合

CA72-4检测胃癌敏感性提高到81%,但是M2-PK联合两种以上肿瘤标志物对提高诊断的敏感性有限。本研究选取经病理证实的胃癌患者,观察其血清中M2-PK和HSP90 $\alpha$ 的水平在胃癌患者和健康对照的差异,并与CEA比较。我们的结果显示, M2-PK和HSP90 $\alpha$ 的灵敏度均高于CEA。鉴于迄今尚无高灵敏度和特异度的单一肿瘤标志物以筛查胃癌,本研究同时测定了胃肠道常用的肿瘤标志物CEA,联合检测M2-PK、HSP90 $\alpha$ 和CEA结果显示灵敏度大大提高,达91.25%,提示我们在临床应用中可以联合三者做胃癌的早期诊断。进一步分析M2-PK、HSP90 $\alpha$ 和CEA的血清表达情况与胃癌临床病理特征的关系发现, M2-PK的表达水平与病变大小,临床病理分期、有无淋巴结转移和浸润深度的不同有关系,与谢峰等的研究结果类似<sup>[22]</sup>。这说明,肿瘤较大者,病理分期较晚,且浸润深度较深的肿瘤,随着肿瘤的进展,大量肿瘤细胞坏死后或者转移过程中

继发释放出大量的肿瘤型M2-PK, 导致其在血清中的浓度逐步增加, 说明M2-PK表达水平可以间接反映肿瘤的大小和分期. 对于HSP90 $\alpha$ 在肿瘤组织中的研究较多, 作为血清标志物的研究, 目前开展甚少, 黄凌云等<sup>[23]</sup>研究发现, HSP90 $\alpha$ 能区分肺癌及良性肺病患者和健康人, 其敏感性为0.817, 特异性为0.919. 而在胃癌中的研究, 目前尚未见报道. 本次研究发现HSP90 $\alpha$ 对胃癌的灵敏度为52.50%, 特异度为92.50%, 是否能成为胃癌早期诊断、治疗及预后判断的标志物, 后期尚需进一步研究.

关于M2-PK和HSP90 $\alpha$ 之间是否存在相关性的研究, 尽管二者的表达均分别与HIF-1有关<sup>[6-8]</sup>, 然而其具体相互作用机制尚未阐明. 本研究发现, M2-PK和HSP90 $\alpha$ 的表达存在正相关, 可能为偶然因素所得, 也可能二者的确存在着一定的相互作用关系, 这将为进一步揭示二者与HIF-1的相互作用提供依据. 后期尚需扩大样本量做验证, 并采用免疫共沉淀等方法将二者之间的关系做进一步的研究.

总之, 本研究结果显示, M2-PK和HSP90 $\alpha$ 可以作为潜在的胃癌血清标志物, 联合检测M2-PK、HSP90 $\alpha$ 和CEA将大大提高胃癌诊断的灵敏度. 基于M2-PK的表达与病变大小、肿瘤分期的关系, 提示今后有可能将M2-PK作为临床诊断和监测胃癌发生、发展, 指导治疗、判断预后的标志物. 后期我们需要进一步在体内研究M2-PK和HSP90 $\alpha$ 之间的相互关系, 探讨二者共同作为胃癌的标志物, 从而指导临床的诊断、治疗和预后.

#### 4 参考文献

- 1 Serum peptidome profiling in patients with gastric cancer. *Clin Exp Med* 2011; Jul 8. [Epub ahead of print]
- 2 Joergensen MT, Heegaard NH, Schaffalitzky de Muckadell OB. Comparison of plasma Tu-M2-PK and CA19-9 in pancreatic cancer. *Pancreas* 2010; 39: 243-247
- 3 张健清, 张式鸿, 黄汉, 王东, 邓琅辉, 程玮. 肺癌患者肿瘤型M2丙酮酸激酶水平及其临床意义. *检验医学* 2009; 24: 111-113
- 4 张波, 陈剑英, 王国斌. 肿瘤M-2型丙酮酸激酶在结直肠癌粪便筛查中的临床价值, *世界华人消化杂志* 2007; 15: 193-196
- 5 Jäättelä M. Escaping cell death: survival proteins in cancer. *Exp Cell Res* 1999; 248: 30-43
- 6 Gordan JD, Thompson CB, Simon MC. HIF and c-Myc: sibling rivals for control of cancer cell metabolism and proliferation. *Cancer Cell* 2007; 12: 108-113
- 7 Trisciuoglio D, Gabellini C, Desideri M, Ziparo E, Zupi G, Del Bufalo D.. Bcl-2 regulates HIF-1 $\alpha$  protein stabilization in hypoxic melanoma cells via the molecular chaperone HSP90. *PLoS One* 2010; 5: e11772

- 8 Luo W, Hu H, Chang R, Zhong J, Knabel M, O'Meally R, Cole RN, Pandey A, Semenza GL. Pyruvate kinase M2 is a PHD3-stimulated coactivator for hypoxia-inducible factor 1. *Cell* 2011; 145: 732-744
- 9 Marrelli D, Roviello F, De Stefano A, Farnetani M, Garosi L, Messano A, Pinto E. Prognostic significance of CEA, CA 19-9 and CA 72-4 preoperative serum levels in gastric carcinoma. *Oncology* 1999; 57: 55-62
- 10 Mazurek S. Pyruvate kinase type M2: a key regulator within the tumour metabolome and a tool for metabolic profiling of tumours. *Ernst Schering Found Symp Proc* 2007; 4: 99-124
- 11 Mazurek S, Szostak R. Quantitative determination of diclofenac sodium in solid dosage forms by FT-Raman spectroscopy. *J Pharm Biomed Anal* 2008; 48: 814-821
- 12 Christofk HR, Vander Heiden MG, Harris MH, Ramanathan A, Gerszten RE, Wei R, Fleming MD, Schreiber SL, Cantley LC. The M2 splice isoform of pyruvate kinase is important for cancer metabolism and tumour growth. *Nature* 2008; 452: 230-233
- 13 Spoden GA, Rostek U, Lechner S, Mitterberger M, Mazurek S, Zwerschke W. Pyruvate kinase isoenzyme M2 is a glycolytic sensor differentially regulating cell proliferation, cell size and apoptotic cell death dependent on glucose supply. *Exp Cell Res* 2009; 315: 2765-2774
- 14 Didelot C, Schmitt E, Brunet M, Maingret L, Parcelier A, Garrido C. Heat shock proteins: endogenous modulators of apoptotic cell death. *Handb Exp Pharmacol* 2006; 172: 171-198
- 15 Kang GH, Lee EJ, Jang KT, Kim KM, Park CK, Lee CS, Kang DY, Lee SH, Sohn TS, Kim S. Expression of HSP90 in gastrointestinal stromal tumours and mesenchymal tumours. *Histopathology* 2010; 56: 694-701
- 16 Zagouri F, Sergentanis TN, Provatopoulou X, Kalo-gera E, Chrysikos D, Lymperi M, Papadimitriou CA, Zografos E, Bletsas G, Kalles VS, Zografos GC, Gounaris A. Serum levels of HSP90 in the continuum of breast ductal and lobular lesions. *In Vivo* 2011; 25: 669-672
- 17 Jolly C, Morimoto RI. Role of the heat shock response and molecular chaperones in oncogenesis and cell death. *J Natl Cancer Inst* 2000; 92: 1564-1572
- 18 Xiong L, Zhao T, Huang X, Liu ZH, Zhao H, Li MM, Wu LY, Shu HB, Zhu LL, Fan M. Heat shock protein 90 is involved in regulation of hypoxia-driven proliferation of embryonic neural stem/progenitor cells. *Cell Stress Chaperones* 2009; 14: 183-192
- 19 Patterson J, Palombella VJ, Fritz C, Normant E. IPI-504, a novel and soluble HSP-90 inhibitor, blocks the unfolded protein response in multiple myeloma cells. *Cancer Chemother Pharmacol* 2008; 61: 923-932
- 20 Kumar Y, Tapuria N, Kirmani N, Davidson BR. Tumour M2-pyruvate kinase: a gastrointestinal cancer marker. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2007; 19: 265-276
- 21 Schneider J, Bitterlich N, Schulze G. Improved sensitivity in the diagnosis of gastro-intestinal tumors by fuzzy logic-based tumor marker profiles

- including the tumor M2-PK. *Anticancer Res* 2005; 25: 1507-1515
- 22 谢峰, 高泉根, 吴国良, 董晓强. 胃癌患者血清肿瘤型M2-PK的测定及其临床意义. *江苏医药* 2006; 32:

- 912-913
- 23 黄凌云, 徐安健, 蒋单懿, 郝佳, 谷俊朝, 肖雪媛, 何大澄. 非小细胞肺癌血清标志蛋白HSP90 $\alpha$ 的鉴定及其临床意义. *国际外科学杂志* 2010; 37: 24-26

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 •

## 百世登出版集团推出 12 种开放获取生物医学期刊全部被 PubMed 和 PMC 收录

**本刊讯** 由美国国立医学图书馆(U.S. National Library of Medicine, 简称NLM), 美国国立生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information, 简称NCBI)和美国国立卫生研究院(National Institutes of Health, 简称NIH), 共同于2010-2011年, 收录了百世登出版集团有限公司(Baishideng Publishing Group Co., Limited, 简称BPG)出版的12种开放获取生物医学期刊. 12种期刊被NLM, NCBI和NIH共同主办的PubMed Central和PubMed平台, 公开面向全球发布, 读者免费阅读和下载全文. 12种期刊被收录的名称及网址如下:

- 1 World Journal of Biological Chemistry (世界生物化学杂志)  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/journals/1495/>
- 2 World Journal of Cardiology (世界心脏病学杂志)  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/journals/1320/>
- 3 World Journal of Clinical Oncology (世界临床肿瘤学杂志)  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/journals/1494/>
- 4 World Journal of Diabetes (世界糖尿病杂志)  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/journals/1498/>
- 5 World Journal of Gastrointestinal Endoscopy (世界胃肠内镜杂志)  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/journals/1323/>
- 6 World Journal of Gastrointestinal Oncology (世界胃肠肿瘤学杂志)  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/journals/1324/>
- 7 World Journal of Gastrointestinal Pathophysiology (世界胃肠病理生理学杂志)  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/journals/1496/>
- 8 World Journal of Gastrointestinal Pharmacology and Therapeutics (世界胃肠药理学与治疗杂志)  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/journals/1497/>
- 9 World Journal of Gastrointestinal Surgery (世界胃肠外科杂志)  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/journals/1325/>
- 10 World Journal of Hepatology (世界肝病学杂志)  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/journals/1321/>
- 11 World Journal of Radiology (世界放射学杂志)  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/journals/1322/>
- 12 World Journal of Stem Cells (世界干细胞杂志)  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/journals/1470/>

(总编辑: 马连生2011-05-30)



# IHC和FISH检测胃癌Her-2蛋白表达及基因扩增的比较

刘学政, 陈 铭, 张家均, 董 虹, 柳文菊

刘学政, 陈铭, 张家均, 董虹, 柳文菊, 湖北省荆州市第一人民医院检验科 湖北省荆州市 434000

**作者贡献分布:** 此课题由刘学政与陈铭设计; 研究过程由刘学政、张家均及董虹操作完成; 研究所用试剂及分析工具由柳文菊提供; 数据分析由刘学政完成; 本论文写作由刘学政、陈铭及张家均完成。

**通讯作者:** 陈铭, 434000, 湖北省荆州市沙市区航空路8号, 湖北省荆州市第一人民医院检验科. chenmingbox@hotmail.com  
电话: 0716-8067626

收稿日期: 2011-07-14 修回日期: 2011-09-06

接受日期: 2011-09-07 在线出版日期: 2011-09-08

## Fluorescence *in situ* hybridization versus immunohistochemistry in the detection of Her-2 gene amplification and protein expression in gastric cancer

Xue-Zheng Liu, Ming Chen, Jia-Jun Zhang, Hong Dong, Wen-Ju Liu

Xue-Zheng Liu, Ming Chen, Jia-Jun Zhang, Hong Dong, Wen-Ju Liu, Department of Clinical Laboratory, the First People's Hospital of Jingzhou City, Jingzhou 434000, Hubei Province, China

**Correspondence to:** Ming Chen, Department of Clinical Laboratory, the First People's Hospital of Jingzhou City, No. 8 Hangkong Road, Shashi District, Jingzhou 434000, Hubei Province, China. chenmingbox@hotmail.com

Received: 2011-07-14 Revised: 2011-09-06

Accepted: 2011-09-07 Published online: 2011-09-08

## Abstract

**AIM:** To compare the difference and correlation between immunohistochemistry (IHC) to detect Her-2 protein expression and fluorescent *in situ* hybridization (FISH) to detect Her-2 gene amplification in gastric cancer and to assess their clinical value.

**METHODS:** Immunohistochemistry and FISH were used to detect Her-2 protein expression and Her-2 gene amplification in 118 cases of gastric carcinoma, respectively. A comparative analysis was then performed.

**RESULTS:** Of 118 cases of gastric carcinoma, 40 showed no Her-2 protein expression (0), 33 showed mild expression (+), 16 had moderate

expression (++) and 29 had strong expression (+++). The rate of Her-2 protein overexpression was 24.6%. Her-2 gene amplification was detected in 38 cases, and 80 cases had no amplification. The rate of Her-2 gene amplification was 32.2%. Of 40 cases of gastric carcinoma showing no Her-2 protein expression, 38 (95%) had no Her-2 gene amplification (95%). Of 33 patients showing Her-2 protein mild expression, 30 (90.9%) had no Her-2 gene amplification. Of 16 patients showing moderate Her-2 protein expression, 9 had no gene amplification. Of 29 patients showing strong Her-2 protein expression, 26 (89.7%) had Her-2 gene amplification.

**CONCLUSION:** The total coincidence rate between IHC and FISH was 85.6%. IHC can be used for initial screening of Her-2 expression status in gastric cancer. When moderate or strong Her-2 protein expression is detected, it is necessary to conduct FISH assay to confirm the result.

**Key Words:** Gastric cancer; Her-2; Immunohistochemistry; Fluorescence *in situ* hybridization

Liu XZ, Chen M, Zhang JJ, Dong H, Liu WJ. Fluorescence *in situ* hybridization versus immunohistochemistry in the detection Her-2 gene amplification and protein expression in gastric cancer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(25): 2679-2683

## 摘要

**目的:** 对比研究胃癌组织中免疫组织化学法(IHC)检测Her-2蛋白表达和荧光原位杂交法(FISH)检测Her-2基因扩增结果的差异性和相关性, 并评估其临床应用价值。

**方法:** 采用EliVision™ plus免疫组织化学染色方法和荧光原位杂交法检测118例胃癌组织中Her-2蛋白表达及Her-2基因扩增状况, 并进行对比分析。

**结果:** 118例胃癌组织中, IHC检测Her-2蛋白表达(0)40例, (+)33例, (++)16例, (+++)29例, Her-2蛋白过表达率24.6%; FISH检测Her-2基因扩增38例, 无扩增80例, Her-2基因扩增率

## ■背景资料

胃癌在全世界肿瘤死因中占第2位, 大部分患者在诊断时已属晚期, 放化疗效果均不理想。Her-2蛋白过表达和(或)基因扩增不仅与胃癌复发、转移和不良预后密切相关, 而且还是制定有效治疗方案如分子靶向治疗、激素治疗和化疗的重要参考指标, 使Her-2表达的准确检测显得尤为重要。

## ■同行评议者

郑鹏远, 教授, 郑州大学第二附属医院消化科

## ■研究前沿

在HER-2基因与乳腺癌靶向治疗的研究取得了显著进展的同时,近年来越来越多的学者将目光投向了HER-2基因与胃癌的关系,胃癌的分子生物学及分子靶向治疗已成为目前肿瘤治疗及预后判断的研究热点之一。

32.2%。40例Her-2蛋白表达为(0)的标本中38例经FISH检测Her-2基因无扩增(95.0%);33例表达为(+)的标本中30例无扩增(90.9%);16例表达为(++)的标本中9例无扩增,7例扩增;29例表达为(+++)的标本中26例扩增(89.7%)。

**结论:** Her-2蛋白表达为(0+)或(+++)时, IHC和FISH检测结果较一致, 两种方法总符合率为85.6%, 两者呈显著相关( $P<0.01$ ), IHC可作为初步筛查胃癌Her-2的首选方法, 当Her-2表达为(++)时, 则有必要进一步行FISH法检测。

**关键词:** 胃癌; Her-2; 免疫组织化学; 荧光原位杂交

刘学政, 陈铭, 张家均, 董虹, 柳文菊. IHC和FISH检测胃癌Her-2蛋白表达及基因扩增的比较. 世界华人消化杂志 2011; 19(25): 2679-2683

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/2679.asp>

## 0 引言

Her-2是定位于人类染色体17q12-21.3的原癌基因, 编码一种具有酪氨酸激酶活性的跨膜生长因子受体, 由胞外区、跨膜区及胞内区构成, 是表皮生长因子受体(Epidermal growth factor receptor, EGFR)家族成员之一。该受体蛋白与Her家族成员及其配体之间相互作用, 通过细胞间的信号传导, 调节细胞生长、分化和增殖。Her-2蛋白过表达和(或)基因扩增不仅与胃癌复发、转移和不良预后密切相关, 而且还是制定有效治疗方案如分子靶向治疗<sup>[1,2]</sup>、激素治疗和化疗的重要参考指标。因此准确检测Her-2基因是成功治疗胃癌的关键, 使Her-2表达的准确检测显得尤为重要。本实验主要讨论应用免疫组织化学(Immunohistochemistry, IHC)检测Her-2蛋白表达, 并结合荧光原位杂交(fluorescence *in situ* hybridization, FISH)检测胃癌Her-2基因扩增状况, 比较两种方法的差异性和相关性。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 收集2009-2010年荆州市第一人民医院消化科患者行外科手术切除的胃癌组织标本118例, 年龄54-72(平均63)岁。术前均未接受放化疗。本研究方案已通过本单位伦理委员会批准。兔抗人Her-2为北京中山生物技术有限公司产品, FISH检测用Her-2探针, 购自Vysis公司, 荧光显微镜为奥林帕斯公司产品(BX51)。

### 1.2 方法

**1.2.1 IHC:** 标本经40 g/L中性甲醛固定, 常规石

蜡包埋, 4  $\mu$ m连续切片, 采用IHC EliVision<sup>TM</sup> plus二步法染色。高倍显微镜下观察10个视野, Her-2蛋白表达定位于细胞膜, 阳性反应物为棕黄色颗粒。

**1.2.2 FISH:** 将17号染色体着丝粒(CEP 17)标记为绿色, Her-2基因标记为红色。具体步骤如下, 切片经二甲苯脱蜡、复水、沸水浴30 min, 200 mg/L胃蛋白酶37  $^{\circ}$ C作用20-40 min, 体积分数1%甲醛固定10 min, 梯度乙醇脱水, 加入10  $\mu$ L探针混合液, 杂交仪83  $^{\circ}$ C变性5 min, 42  $^{\circ}$ C过夜杂交。经0.3% NP-40/0.4 $\times$ SSC 66  $^{\circ}$ C 1 min, 0.11% NP-40/2 $\times$ SSC室温1 min, 700 mL/L乙醇3 min洗片, 干燥后, 加入10  $\mu$ L DAPI复染剂复染, 封片, 暗处静置20 min后于荧光显微镜下计数30个细胞, 统计Ratio值(Ratio值 = 30个细胞核中红信号总数/30个细胞核中绿信号总数)。

**1.2.3 IHC和FISH结果判读标准:** Hofmann等<sup>[3]</sup>推荐专用于胃癌Her-2蛋白检测的评分系统(2008), 该系统判读要点如下<sup>[4]</sup>。IHC: 细胞膜均无染色或<10%肿瘤细胞膜染色者结果为(0/阴性); 肿瘤细胞>10%, 细胞膜不完整, 弱染色者结果为(+/阴性); 肿瘤细胞>10%, 细胞膜轻度至中度完整, 染色者结果为(++/不确定); 肿瘤细胞>10%, 细胞膜完整, 强染色者结果为(+++/阳性)。FISH: Ratio<1.8为阴性结果, 提示该样本无Her-2基因扩增; Ratio在1.8-2.2之间时, 增加细胞计数至100个或重做FISH实验来判断最终结果; Ratio>2.2为阳性结果, 提示样本中Her-2基因发生扩增; 红信号点成簇扩增, 也记为Her-2基因扩增阳性。

**统计学处理** 应用SPSS13.0软件对数据进行统计, 采用Kendall进行相关性分析,  $P<0.05$ 有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 IHC检测结果** 118例胃癌组织中, 40例标本Her-2表达为(0); 33例标本Her-2表达为(+); 16例标本Her-2表达为(++); 29例标本Her-2表达为(+++)。Her-2蛋白过表达率24.6%(29/118)。

**2.2 FISH检测结果** 118例胃癌组织中, 80例标本无扩增, 38例标本扩增。Her-2基因扩增率32.2%(38/118)。

**2.3 IHC和FISH检测结果比较** IHC检测Her-2蛋白表达(0)40例标本中, 38例经FISH检测无Her-2基因扩增, 2例扩增; Her-2表达(+)33例标本中, 30例无扩增, 3例扩增; Her-2表达(++)16例标本中, 9例无扩增(56.2%), 7例扩增(43.8%); Her-2

## ■相关报道

Hofmann等发现胃癌病例较乳腺癌病例肿瘤异质性更常见, 而且部分胃癌病例, 尤其是高分化腺癌病例, 位于腺腔面的瘤细胞保留分泌功能而不被标记物着色, 形成“U”型(基底和侧面)不完整着色。据此认为胃癌的Her-2评分标准应与乳腺癌的评分标准不同。

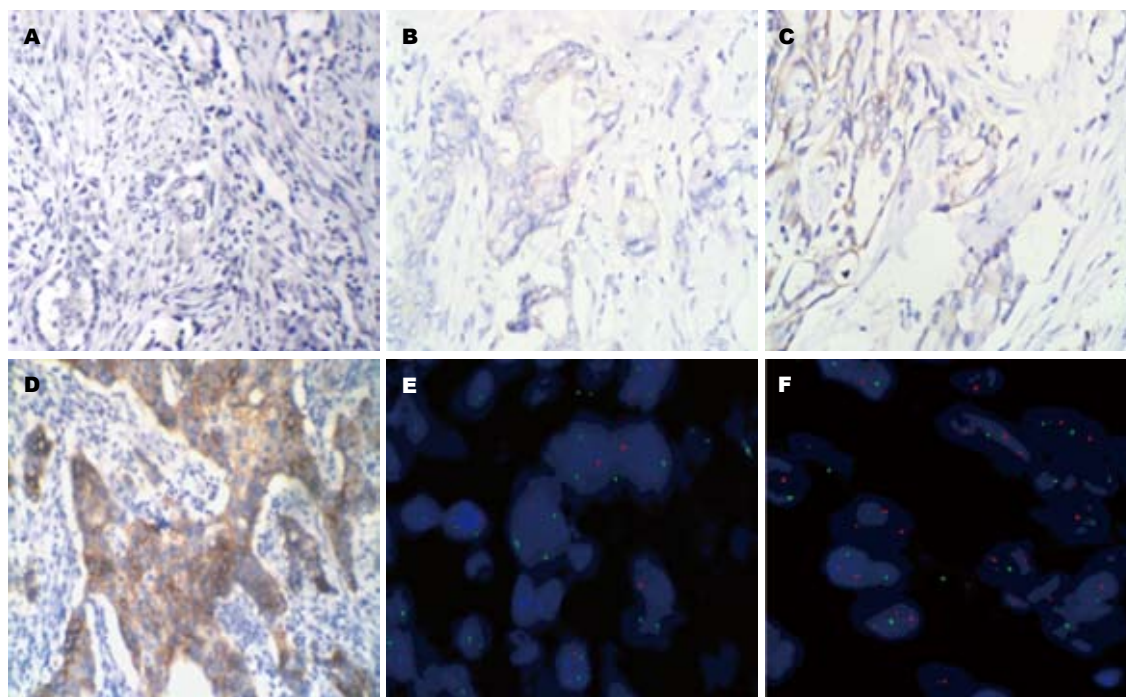


图 1 IHC和FISH检测结果. A: Her-2蛋白(0); B: Her-2蛋白(+); C: Her-2蛋白( ++ ); D: Her-2蛋白( +++ ); E: 无Her-2基因扩增; F: Her-2基因扩增.

#### ■创新盘点

本文全面比较了IHC和FISH两种方法检测胃癌组织Her-2蛋白及基因的优缺点, 介绍了胃癌靶向治疗等最新进展, 使读者对胃癌Her-2基因研究现状有全新的认识.

表 1 Her-2蛋白表达与FISH基因扩增结果对比

IHC	FISH		合计
	扩增	无扩增	
0	2	38	40
+	3	30	33
++	7	9	16
+++	26	3	29
合计	38	80	118

表达(+++)29例标本中, 3例无扩增, 26例扩增. Her-2蛋白表达为(0+)和(+++)时, Her-2基因扩增符合率分别为95.0%(38/40)、90.9%(30/33)和89.7%(26/29), IHC和FISH两种方法检测结果总符合率为85.6%(101/118), 两者呈显著相关( $\tau = 0.753, P < 0.01$ , 表1, 图1).

### 3 讨论

胃癌是我国最常见的消化系恶性肿瘤之一, 病死率居我国各种恶性肿瘤之首. 绝大多数患者确诊时已属进展期, 此期手术治疗效果差, 腹膜播散、肝脏及淋巴结转移严重影响其预后, 术后生存率明显降低. 目前已知, 许多肿瘤的发生和转移都与特定癌基因或受体基因过表达导致的细胞过度增殖有关. 其中, Her-2已被证实是与多种肿瘤发生、发展和转移密切相关的受体.

多数研究表明, Her-2的过表达常常预示肿瘤患者预后不良<sup>[5]</sup>. Park等<sup>[6]</sup>的随访结果显示, Her-2阳性患者5年生存率低于阴性者. 陈斌等<sup>[7]</sup>报道Her-2表达阳性者中位生存时间显著低于阴性者. 从而证实了Her-2表达阳性在胃癌的预后中具有重要作用. Her-2的表达与肿瘤大小、组织分化程度、淋巴结转移有关, 这就意味着随着肿瘤进展, 有更多的肿瘤细胞脱落, 而分化差的肿瘤细胞其侵袭能力、转移能力更强, 淋巴结的转移又进一步促进了肿瘤的远处转移, 这可以解释Her-2表达导致不良预后的原因, 亦与Lubke<sup>[8]</sup>报道的一致. 有研究显示<sup>[9]</sup> Her-2表达阳性的乳腺癌或胃癌患者预后显著比Her-2表达阴性患者差. Allgayer等<sup>[10]</sup>发现Her-2过表达的胃癌患者, 生存期较Her-2低表达患者短, 他们认为Her-2是一新的预测胃癌总生存期的独立参数. 最新研究发现Her-2过表达与胃癌患者的预后密切相关<sup>[11,12]</sup>. 因此, 对 Her-2状态的准确检测有助于判断预后. 在分子靶向治疗方面, 经ToGA研究证实<sup>[13]</sup>, 曲妥珠单抗联合化疗可改善Her-2阳性晚期胃癌患者的生存情况, 尤其是Her-2高水平表达者(IHC++/FISH扩增或IHC+++ )的生存期, 由对照组的11.8 mo提高至16.0 mo. 同时, 使缓解率从34.5%提高至47.3%, 而通常胃癌化疗的缓解率为30%, 因此可谓是胃癌治疗的一项里程碑式研究. ToGA研究结果确立了曲妥珠单抗在胃癌

## ■应用要点

本文为胃癌组织Her-2状态提供不同检测方法及其判断标准,并为胃癌的诊断、治疗及预后提供参考依据。

中的治疗地位,使其有望成为Her-2阳性胃癌患者的重要治疗药物。

在Her-2基因与乳腺癌靶向治疗的研究取得了显著进展的同时,近年来越来越多的学者将目光投向了Her-2基因与胃癌的关系,并取得了一定的进展。目前国内关于胃癌组织IHC与FISH检测Her-2基因状态的对比实验较少,为此,本研究在两种检测方法的优缺点、Her-2基因状态的一致性及其可能导致两者出现差异的原因等方面做出了进一步探讨。

目前美国食品及药物管理局(FDA)批准用于Her-2检测的方法有2种:即检测Her-2蛋白的IHC和检测Her-2基因的FISH。因IHC技术具有操作简便、廉价、快速等特点,胃癌肿瘤异质性较为常见,IHC可通过明视野显微镜能检测到肿瘤组织内的局部Her-2阳性,并具有一定的预后预测价值,因此IHC成为目前病理学实验室检测Her-2状态及用于Her-2相关靶向治疗患者的首选方法。由于IHC本身的手工操作特点,从而检测过程会受许多因素干扰,首先是方法间接,再加上判断标准的不一致,尤其受人为主观因素的影响较大;其次是石蜡包埋、甲醛固定可能会对免疫组织化学检测的结果产生影响,抗原修复时,提高了灵敏度而降低了特异性造成一定的假阳性;三是如果采用不同公司生产的Her-2抗体,检测结果也不完全相同。与蛋白质相比,DNA的检测则具有较高的准确性和稳定性。FISH是分子遗传学常用的检测技术,不仅可以用于异常染色体的检测,也可以用于观察目标基因的扩增情况,该项技术具有高准确性、高灵敏性和高稳定性的特点。FISH既可以在组织和细胞结构相对完整的前提下,于癌细胞原位分析单细胞核内基因的变化,又同时排除了其他非癌细胞的干扰,结果相对客观,因此FISH能直接和准确地判断Her-2基因是否存在扩增,被公认为是目前胃癌Her-2基因状态检测的金标准<sup>[14]</sup>,但存在实验过程相对复杂,费用较昂贵,失败率偏高等缺点。崔小伟等<sup>[15]</sup>报道,大约6%-35%的Her-2在胃癌中表达的不尽相同。日本学者<sup>[16]</sup>研究显示200例胃癌手术切除标本中IHC检测有23%病例Her-2蛋白过表达,FISH检测有27%病例存在Her-2基因扩增,两者符合率为86.7%。本研究中IHC检测显示24.6%病例有Her-2蛋白过表达,FISH检测显示32.2%病例存在Her-2基因扩增,两种方法总符合率为85.6%,结果与之较为相符。Yaziji等<sup>[17]</sup>研究显示,FISH检测Her-2基因无扩增

和IHC检测Her-2蛋白表达(0+)病例,以及FISH检测Her-2基因扩增与IHC检测Her-2蛋白(+++)的病例的结果之间有极好的相关性。本研究中显示Her-2表达为(0+)和(+++)时,Her-2扩增符合率分别为95.0%、90.9%和89.7%。提示如果严格控制实验操作流程,两种方法检测病例的结果之间的一致性较高( $P<0.01$ ),本研究与之报道较一致。由于IHC在普通实验室容易开展,可以作为Her-2状态检测的初筛。当Her-2蛋白表达(++)时Her-2基因扩增率为43.8%,两种检测方法的符合率较低。可能是由于统计病例数量偏少、结果判读主观因素影响和评分标准不同等原因所致。提示当IHC检测Her-2蛋白表达为(++)时,结果具不确定性,病例则有必要进一步行FISH检测以明确Her-2基因状态的变化情况<sup>[11]</sup>。

总之,综合应用IHC与FISH两种方法检测Her-2状态可以更加准确和客观地为临床提供参考<sup>[18]</sup>,并在胃癌患者的临床治疗策略和预后<sup>[19]</sup>评估中具有重要意义。

## 4 参考文献

- 1 熊建萍,赵建国.胃癌分子靶向治疗的进展.实用肿瘤杂志 2008; 24: 329-333
- 2 钟山,余英豪.胃癌HER-2基因检测方法及其靶向治疗的研究现状.世界华人消化杂志 2010;18: 2785-2789
- 3 Hofmann M, Stoss O, Shi D, Büttner R, van de Vijver M, Kim W, Ochiai A, Rüschoff J, Henkel T. Assessment of a HER2 scoring system for gastric cancer: results from a validation study. *Histopathology* 2008; 52: 797-805
- 4 陈娟,李东石,余英豪,王烈,欧阳学农,谢飞来,熊喜生. Her-2蛋白在胃癌中的表达及其临床意义.世界华人消化杂志 2010; 18: 1375-1379
- 5 Middleton LP, Price KM, Puig P, Heydon LJ, Tarco E, Sneige N, Barr K, Deavers MT. Implementation of American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists HER2 Guideline Recommendations in a tertiary care facility increases HER2 immunohistochemistry and fluorescence in situ hybridization concordance and decreases the number of inconclusive cases. *Arch Pathol Lab Med* 2009; 133: 775-780
- 6 Park DI, Yun JW, Park JH, Oh SJ, Kim HJ, Cho YK, Sohn CI, Jeon WK, Kim BI, Yoo CH, Son BH, Cho EY, Chae SW, Kim EJ, Sohn JH, Ryu SH, Sepulveda AR. HER-2/neu amplification is an independent prognostic factor in gastric cancer. *Dig Dis Sci* 2006; 51: 1371-1379
- 7 陈斌,罗荣城,崔斐.胃癌 HER-2/neu基因表达与预后的相关性.南方医科大学学报 2006; 26: 344-347
- 8 Luebke T, Baldus SE, Grass G, Bollschweiler E, Thiele J, Dienes HP, Hoelscher AH, Moenig SP. Histological grading in gastric cancer by Ming classification: correlation with histopathological subtypes, metastasis, and prognosis. *World J Surg* 2005; 29: 1422-147; discussion 1428
- 9 Gravalos C, Jimeno A. HER2 in gastric cancer: a



- new prognostic factor and a novel therapeutic target. *Ann Oncol* 2008; 19: 1523-1529
- 10 Allgayer H, Babic R, Gruetzner KU, Tarabichi A, Schildberg FW, Heiss MM. c-erbB-2 is of independent prognostic relevance in gastric cancer and is associated with the expression of tumor-associated protease systems. *J Clin Oncol* 2000; 18: 2201-2209
- 11 Zhang XL, Yang YS, Xu DP, Qu JH, Guo MZ, Gong Y, Huang J. Comparative study on overexpression of HER2/neu and HER3 in gastric cancer. *World J Surg* 2009; 33: 2112-2118
- 12 Jørgensen JT. Targeted HER2 treatment in advanced gastric cancer. *Oncology* 2010; 78: 26-33
- 13 施达仁. 胃癌中HER2的检测. *中华病理学杂志* 2010; 7: 501-502
- 14 Matsui Y, Inomata M, Tojigamori M, Sonoda K, Shiraishi N, Kitano S. Suppression of tumor growth in human gastric cancer with HER2 overexpression by an anti-HER2 antibody in a murine model. *Int J Oncol* 2005; 27: 681-685
- 15 崔小伟, 张庆瑜. HER2/neu在胃癌中的研究进展. *国际消化病杂志* 2008; 8: 309-311
- 16 Yano T, Doi T, Ohtsu A, Boku N, Hashizume K, Nakanishi M, Ochiai A. Comparison of HER2 gene amplification assessed by fluorescence in situ hybridization and HER2 protein expression assessed by immunohistochemistry in gastric cancer. *Oncol Rep* 2006; 15: 65-71
- 17 Yaziji H, Goldstein LC, Barry TS, Werling R, Hwang H, Ellis GK, Gralow JR, Livingston RB, Gown AM. HER-2 testing in breast cancer using parallel tissue-based methods. *JAMA* 2004; 291: 1972-1977
- 18 Egervari K, Szollosi Z, Nemes Z. Immunohistochemical antibodies in breast cancer HER2 diagnostics. A comparative immunohistochemical and fluorescence in situ hybridization study. *Tumour Biol* 2008; 29: 18-27
- 19 宋岩, 黄镜, 王金万. HER2/neu基因扩增和蛋白表达与晚期胃癌患者预后的关系. *癌症* 2010; 29: 76-81

## ■同行评论

本文学术价值较好, 内容详实, 选题新颖有一定的临床意义.

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》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: <sup>a</sup> $P < 0.05$ , <sup>b</sup> $P < 0.01$  ( $P > 0.05$  不注). 如同一表中另有一套  $P$  值, 则 <sup>1</sup> $P < 0.05$ , <sup>2</sup> $P < 0.01$ ; 第 3 套为 <sup>3</sup> $P < 0.05$ , <sup>4</sup> $P < 0.01$ .  $P$  值后注明何种检验及其具体数字, 如  $P < 0.01$ ,  $t = 4.56$  vs 对照组等, 注在表的左下方. 表内采用阿拉伯数字, 共同的计量单位符号应在表的右上方, 表内个数、小数点、±、- 应上下对齐. “空白”表示无此项或未测, “-”代表阴性未发现, 不能用同左、同上等. 表图勿与正文内容重复. 表图的标目尽量用  $t/\text{min}$ ,  $c/(\text{mol/L})$ ,  $p/\text{kPa}$ ,  $V/\text{mL}$ ,  $t/^\circ\text{C}$  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.



# 精准肝切除巨大肝血管瘤26例

冯伟, 仇毓东

## ■背景资料

肝血管瘤是一种常见的肝脏良性肿瘤, 其尸检发生率在0.40%-7.13%。分为海绵状血管瘤、硬化性血管瘤、血管内皮细胞瘤、毛细血管瘤四类。临床常见的是海绵状血管瘤。

冯伟, 南京大学医学院附属鼓楼医院集团宿迁市人民医院肝胆外科 江苏省宿迁市 223800

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

作者贡献分布: 本文冯伟与仇毓东贡献均等; 写作由冯伟完成。

通讯作者: 仇毓东, 教授, 主任医师, 210008, 江苏省南京市, 南京大学医学院附属鼓楼医院肝胆外科。

yudongqiu510@163.com

收稿日期: 2011-06-20 修回日期: 2011-07-27

接受日期: 2011-09-01 在线出版日期: 2011-09-08

## Regular hepatic segmentectomy for giant hemangioma of the liver: an analysis of 26 cases

Wei Feng, Yu-Dong Qiu

Wei Feng, Department of Hepatobiliary Surgery, Suqian People's Hospital, Nanjing Drum-Tower Hospital Group Affiliated to the Medical School of Nanjing University, Suqian 223800, Jiangsu Province, China

Yu-Dong Qiu, Department of Hepatobiliary Surgery, Nanjing Drum-Tower Hospital Affiliated to the Medical School of Nanjing University, Nanjing 210008, Jiangsu Province, China

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

Received: 2011-06-20 Revised: 2011-07-27

Accepted: 2011-09-01 Published online: 2011-09-08

## Abstract

**AIM:** To evaluate the safety of regular hepatic segmentectomy for giant hemangioma of the liver.

**METHODS:** The clinical data for patients with giant hemangioma of the liver who underwent surgical resection between January 2008 and December 2010 in Nanjing Drum Tower Hospital were analyzed retrospectively.

**RESULTS:** A total of 26 patients were included in the study. All patients underwent regular hepatic segmentectomy. There were no deaths, but 4 patients developed complications. The intraoperative bleeding ranged from 100 to 2 600 mL (average, 775 mL  $\pm$  132 mL), and intraoperative

blood transfusion ranged between 0 and 2 200 mL (average, 384 mL  $\pm$  123 mL).

**CONCLUSION:** Regular hepatic segmentectomy is safe in the management of giant hemangioma occupying the liver lobe or segment.

**Key Words:** Hepatic tumor; Hemangioma; Hepatectomy

Feng W, Qiu YD. Regular hepatic segmentectomy for giant hemangioma of the liver: an analysis of 26 cases. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(25): 2684-2687

## 摘要

**目的:** 探讨精准肝切除在巨大肝血管瘤治疗中的应用。

**方法:** 回顾性分析南京鼓楼医院2008-01/2010-12手术治疗26例巨大肝血管瘤临床资料。

**结果:** 26例均行精准的肝段或联合肝段切除术治疗, 术中出血100-2 600(平均775 $\pm$ 132) mL。术中输血0-2 200(平均为384 $\pm$ 123) mL。4例出现不同程度并发症, 其中胆漏1例, 胸腔积液和(或)腹腔积液3例, 均经保守治疗后短期治愈。全组无死亡。

**结论:** 对于基本占据肝叶及多肝段的巨大血管瘤可在严格把握适应证的情况下, 行精准的肝段切除术治疗。

**关键词:** 肝肿瘤; 血管瘤; 肝切除术

冯伟, 仇毓东. 精准肝切除巨大肝血管瘤26例. *世界华人消化杂志* 2011; 19(25): 2684-2687

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/2684.asp>

## 0 引言

肝血管瘤是一种常见的肝脏良性肿瘤, 其尸检发生率在0.40%-7.13%<sup>[1]</sup>。分为海绵状血管瘤、硬化性血管瘤、血管内皮细胞瘤、毛细血管瘤4类。临床常见的是海绵状血管瘤。常见人群为30-50岁女性。随着B超等现代体检手段的普及,

## ■同行评议者

金山, 副主任医师, 内蒙古医学院附属医院普外科; 李永翔, 主任医师, 安徽医科大学第一附属医院普外科; 禹正杨, 副教授, 南华大学附属第一医院肿瘤外科

越来越多的肝血管瘤患者被发现,并成为肝脏门诊随诊最主要的人群之一。对于肝血管瘤的治疗也就得以引起重视。根据国外巨大血管瘤的标准<sup>[2]</sup>,我们自2008-01/2010-12对直径 $\geq 4$  cm经B超有典型血管瘤表现的152例成年患者进行每3-6 mo/年的B超随诊,并对其中26例采取了手术治疗。现总结报告如下。

## 1 材料和方法

1.1 材料 本组26例中,男6例,女20例,男女比例约为1:3。年龄28-73(平均47.7)岁。肿瘤单发16例,多发10例。肿瘤最小直径5.5 cm,最大直径20 cm。主要肿瘤位于肝左叶9例,肝右叶12例,肝中叶3例,单独尾叶2例。其中位于左叶的肿瘤中3例位于S2、3;5例位于S2、3、4;1例位于S1、2、3、4。位于右叶12例中5例位于S6、7;5例位于S5、6、7、8;1例位于S4、5、6、7、8;1例位于S1、5、6、7、8。全组合并肝硬化1例。随诊过程中近期明显增大23例,其中有明显上腹胀痛、腰背部酸痛等临床症状7例,紧贴肝门血管16例;无法和肝癌鉴别2例;行介入栓塞术后1例。本组每例患者常规术前评估肝脏功能。结合术前生化检查,进行Child-Pugh评分。26例均为A级5分。同时常规采用脉动色素法检测吲哚氰绿(ICG)排泄试验15 min滞留率进行肝脏储备功能的评估。以明确是否能够耐受肝段以及联合肝段的切除。本组患者26例ICGR15均 $<10\%$ ,行精准肝段切除术治疗。全组检测AFP均正常。对于需行联合肝段切除的患者,常规行CT三维血管重建分型及行余肝体积测定。中央型和尾叶巨大血管瘤加行MRCP。

## 1.2 方法

1.2.1 一般情况:本组病例均采用右上腹反“L”型切口,充分暴露。常规先充分离断周围韧带。然后行术中B超检查确定血管瘤与周围血管关系,并同时检查肿瘤是否多发及位置,是否需行联合肝段切除。最主要是根据精准肝切除的原则,确定预阻断肝段肝蒂位置以及作为规则肝段切除边界标志的肝静脉在肝内的走行。术中一定要保证肝静脉主干的完整,确保残肝静脉回流,并联合麻醉医师将中心静脉压切肝时维持在2-3 mmHg,有利于减少断面肝静脉渗血<sup>[3]</sup>。然后根据肿瘤位置做相应的处理。

1.2.2 根据肿瘤位置的不同采取不同的处理:(1)对于位于左侧肝段(叶)巨大血管瘤,多属边缘外生型,与肝门血管关系不密切。但由于肿瘤巨大,

基本占据整个左侧肝段(叶),且紧靠肝蒂血管,手术需切除左侧联合肝段。牵拉肝圆韧带,显露门静脉脐部肝外段,分别在肝外阻断左侧各肝蒂分支,即可见明显肝段表面分界<sup>[4]</sup>。结合术中B超定位肝左、中静脉主干作为段间分界,即可切除相应联合肝段。肝左静脉可一直追至根部在肝内处理5-0 prolene缝闭。S4由于有来自S5、8的分支供应,在经门静脉脐部行肝段分支离断时应术中B超定位肝中静脉,结合血管三维重建明确段间界面,由浅入深以Kelly钳在断面内精细钳夹出S5、8通向S4各肝蒂分支,分别在肝内予以断扎。断面血管采用电凝及钛夹、结扎的方法处理;(2)对于位于右侧肝段但尚未对肝门造成影响的巨大血管瘤,需先切除胆囊,经胆囊管置入一细硅胶管待用。此时根据术前CT三维重建血管成像,明确门静脉分型<sup>[5]</sup>。如为II型在切除胆囊后经肝十二指肠韧带右侧肝门平面打开肝十二指肠韧带,游离出肝右、中动脉,及门静脉右前、后干,分别根据预切除范围作相应肝段肝蒂的肝外阻断。如为I型,右侧肝蒂分叉较高,无法在肝门处完成Glisson肝蒂阻断。此时需术中B超定位预切除段肝蒂位置,直接劈开肝实质,在肝内以CT三维血管重建影像为指导阻断肝段肝蒂及每一通向肿瘤段肝蒂分支,同时结合术中B超定位肝中或肝右静脉,以肝静脉主干及肝内分支作为段间平面分界,指导完成相应肝段切除。肝实质同样采取精细钳夹离断。肝右静脉在分离至第二肝门处时处理。对S5、6、7、8联合切除病例还可采用Belghiti悬吊<sup>[6,7]</sup>辅助完成;(3)对于中央型且与肝门关系密切的巨大血管瘤(如S4、5、8),由于其对第一、二、三肝门都产生影响,应充分利用血管瘤的可压缩性。先行解剖第三肝门,逐一结扎切断肝短静脉,第二肝门处分离出肝右静脉及肝中、肝左共干,分别预置阻断带预防术中大出血及气栓。处理胆囊同前,并需行胆道造影,再予以阻断中肝动脉及门静脉右前支。如肝门处分离困难,则需根据术前血管重建,通过劈肝径路阻断肝内相应肝蒂,肿瘤缺血后将明显瘪陷。但由于肿瘤的长期挤压致肝门处Glisson鞘已不完整,往往成网格状,与瘤体紧贴,其间无正常肝细胞组织,表现类似于恶性肿瘤的浸润生长,其间往往有大量毛细侧支形成。需在谨慎分辨肝门管道情况下用CUSA进行分离。此时手术时间和出血量明显增加,需备自体血回输装置,充分利用自体血。术中B超显露并严格保护肝中及肝右静脉主干,

■相关报道  
有研究表明,如术前ICGR15 $>20\%$ 的患者不适合采用精准肝切除治疗。

### ■应用要点

对于基本占据肝叶及多肝段的巨大血管瘤可在严格把握适应证的情况下,可行精准的肝段切除术治疗。

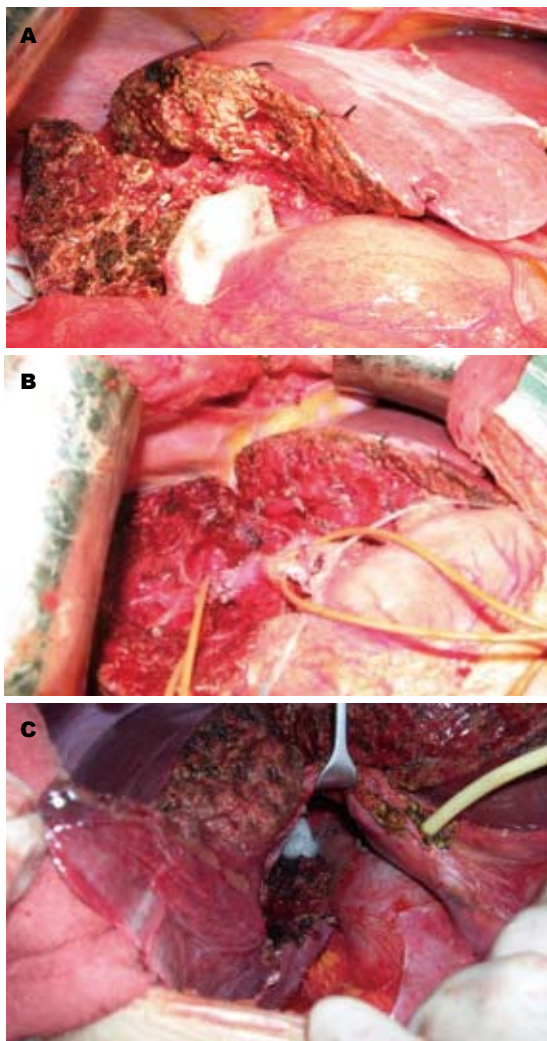


图1 巨大血管瘤精准肝段切除术治疗后的结果。A: S1、5、6、7; B: S4、5、8; C: S1。

分离时沿肝静脉走行分离,而不随意离断,以保证回流。经两侧分别向第二肝门汇合后,可将联合肝段切除;(4)尾叶巨大血管瘤由于其位置的特殊性,除联合肝段切除能得到充分暴露和血管阻断外,单独的切除往往采用肝门肝蒂解剖后先结扎通向尾叶肝蒂,充分游离肝脏,同中央型血管瘤一样处理第三、第二肝门后,劈开肝脏实质将其完整切除<sup>[8,9]</sup>。

## 2 结果

本组病例术中出血100-2 600(平均775±132) mL。术中输血0-2 200(平均为384±123) mL。全组患者无死亡。本组患者均顺利治愈出院。术后在1 wk内肝功能均恢复正常。术后出现一般性并发症:胆漏1例,胸腔积液和(或)腹腔积液3例,均经保守治疗后短期治愈。并发症发生率15.4%。术后病理证实海绵状血管瘤25例,血管内皮细胞瘤1例(图1)。

## 3 讨论

对于肝脏血管瘤的治疗,由于各学科的发展,出现不同的治疗方法,如手术治疗、微波固化治疗、射频热毁损治疗和肝动脉栓塞以及栓塞后手术治疗等<sup>[10,11]</sup>。但是由于微创治疗存在大出血风险和毁损不完全性以及存在胆管炎、胆道狭窄等严重远期并发症<sup>[12,13]</sup>,目前效果尚不肯定。手术治疗仍较广泛地应用于临床上需要处理的巨大血管瘤。但对于明确的巨大血管瘤手术指征仍应该严格掌握。我们总结的适应证包括:(1)位于肝脏边缘外生型,直径≥10 cm,近期增大明显并且出现明显腹胀等临床症状,可排除其他疾病引起者;对于没有临床症状患者,虽然血管瘤破裂很罕见<sup>[14]</sup>,如果患者从事剧烈运动仍建议手术治疗;(2)位于肝内但与血管关系不密切,直径≥10 cm,近期如出现增长明显有腰背酸痛等临床症状,同时基本占据肝叶,并对周围管道造成推移的,可以考虑手术治疗;(3)紧邻肝门血管或位于尾叶,直径≥5 cm,近期增长明显,特别是年轻女性,即使没有临床症状,应尽早手术治疗;(4)合并凝血功能障碍(Kasabach-Merrit综合征)患者<sup>[15]</sup>;(5)合并肝硬化,影像学表现不典型,无法和肝癌鉴别者。

传统手术方式以血管瘤剥除术为主<sup>[16,17]</sup>,兼有部分非规则性肝切除术。但随着血管瘤手术指征的越来越严格,需要手术切除的血管瘤要么巨大占据多个肝段,要么位置特殊与血管关系密切,剥离时术中一旦分破菲薄的瘤包膜出血不易控制,而且此时整个剥离创面大且均为供瘤支血管断端,存在大量渗血的风险。近年随着精准肝切除理念<sup>[18]</sup>及Fan<sup>[19]</sup>提出的循肝静脉肝切除手术技术的进步,解剖性肝段切除目前可作为多种局限性肝脏病变外科治疗的首选<sup>[20]</sup>。由于精准地将荷瘤肝段切除,并不增加较多正常肝脏的损失。相反,由于是在正常肝段组织间隙的乏血管区离断,避开丰富的血管瘤体,使得处理更从容、出血更容易控制也更安全。同时由于完整保留了余肝的回流血管,所以最大程度的保证了余肝功能体积的最大化,也更符合传统血管瘤手术避免损失周围正常肝组织的治疗理念。有研究表明<sup>[21]</sup>,如术前ICG R15>20%的患者不适合采用精准肝切除治疗。所以术前的肝脏储备评估对肝巨大血管瘤能否行精准肝切除治疗具有重要指导作用。

在本组术中通过与CT血管三维重建影像的反复比对,明确预切除肝段的肝蒂。经行肝蒂阻

断可使瘤体瘪陷,除可进一步明确了预切除肝段的表面边界外,还可减少入肝血流阻断时间,减少了正常肝组织的缺血再灌注损伤,也进一步增加了操作空间.而在切肝前采取术中超声明确主要肝静脉主干及分支的肝内走行,术中结合频谱分析,保证在切肝过程中能够清晰显露作为边界保留的肝静脉主干,保障了余肝血液回流,最大程度的保留了余肝功能体积.使得全组术中无不可控大出血,术后肝功能均很快恢复正常而无肝功能衰竭等严重并发症发生.

由于患者无胆道扩张等病理情况存在,本组1例中央型巨大血管瘤虽经精细评估和操作,仍发生术后胆漏并发症,所以术中一定要注意胆道系统的保护,尤其是在中央型巨大血管瘤肝内Glisson鞘不完整的情况.除术前的MRCP评估,常规在切除胆囊后经胆囊管造影检查.术毕需经胆囊管注射亚甲蓝溶液检查肝断面,必要时胆总管“T”管引流防止胆漏的发生.

由于对于肝巨大血管瘤病变,精准肝段切除仍存在正常肝组织的损失,特别是位于特殊部位肿瘤切除时间长,失血量较多,所以术后3 d连续予以羟乙基淀粉应用,减少创面渗出<sup>[22]</sup>.并在术后早期常规予以肠外联合肠内营养1 wk.根据肝功能情况保肝等治疗.1 wk内肝功能均恢复正常.

虽然尚缺乏大宗前瞻性的临床研究分析,但在严格把握手术指征,遵循精准肝切除理念以及个体化治疗原则的情况下,精准肝切除在巨大肝血管瘤特别是特殊位置肝巨大血管瘤治疗中将发挥一定作用.

#### 4 参考文献

- Ishak KG, Rabin L. Benign tumors of the liver. *Med Clin North Am* 1975; 59: 995-1013
- Terkivatan T, Vrijland WW, Den Hoed PT, De Man RA, Hussain SM, Tilanus HW, IJzermans JN. Size of lesion is not a criterion for resection during management of giant liver haemangioma. *Br J Surg* 2002; 89: 1240-1244
- Smyrniotis V, Kostopanagiotou G, Theodoraki K, Tsantoulas D, Contis JC. The role of central venous pressure and type of vascular control in blood loss during major liver resections. *Am J Surg* 2004; 187: 398-402
- Takasaki K. Glissonean pedicle transection method for hepatic resection: a new concept of liver segmentation. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 1998; 5: 286-291
- Nakamura T, Tanaka K, Kiuchi T, Kasahara M, Oike F, Ueda M, Kaihara S, Egawa H, Ozden I, Kobayashi N, Uemoto S. Anatomical variations and surgical strategies in right lobe living donor liver transplantation: lessons from 120 cases. *Transplantation* 2002; 73: 1896-1903
- Belghiti J, Guevara OA, Noun R, Saldinger PF, Kianmanesh R. Liver hanging maneuver: a safe approach to right hepatectomy without liver mobilization. *J Am Coll Surg* 2001; 193: 109-111
- 朱新华, 仇毓东, 吴亚夫, 周建新, 江春平, 丁义涛. Belghiti悬挂法在解剖性半肝切除中的应用. *世界华人消化杂志* 2009; 17: 1680-1683
- 彭淑牖, 李江涛. 肝尾叶切除的策略和技巧. *岭南现代临床外科* 2008; 38: 325-326
- Xu LN, Huang ZQ. Resection of hepatic caudate lobe hemangioma: experience with 11 patients. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2010; 9: 487-491
- Gourgiotis S, Moustafellos P, Zavos A, Dimopoulos N, Vericouki C, Hadjiyannakis EI. Surgical treatment of hepatic haemangiomas: a 15-year experience. *ANZ J Surg* 2006; 76: 792-795
- Seo HI, Jo HJ, Sim MS, Kim S. Right trisegmentectomy with thoracoabdominal approach after transarterial embolization for giant hepatic hemangioma. *World J Gastroenterol* 2009; 15: 3437-3439
- 黄晓强, 黄志强, 段伟东. 肝动脉栓塞术后的肝内外胆道损毁性病变. *中华外科杂志* 2000; 38: 169-172
- Erdogan D, Busch OR, van Delden OM, Bennink RJ, ten Kate FJ, Gouma DJ, van Gulik TM. Management of liver hemangiomas according to size and symptoms. *J Gastroenterol Hepatol* 2007; 22: 1953-1958
- Jr MA, Papaiordanou F, Gonçalves JM, Chaib E. Spontaneous rupture of hepatic hemangiomas: A review of the literature. *World J Hepatol* 2010; 2: 428-433
- Concejero AM, Chen CL, Chen TY, Eng HL, Kuo FY. Giant cavernous hemangioma of the liver with coagulopathy: adult Kasabach-Merritt syndrome. *Surgery* 2009; 145: 245-247
- 李国威, 杨少毅. 肝脏海绵状血管瘤剥离术及组织、解剖学基础. *中华普通外科学文献(电子版)* 2010; 4: 194-196
- Singh RK, Kapoor S, Sahni P, Chattopadhyay TK. Giant haemangioma of the liver: is enucleation better than resection? *Ann R Coll Surg Engl* 2007; 89: 490-493
- 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
- Fan ST. Precise hepatectomy guided by the middle hepatic vein. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2007; 6: 430-434
- Ueno S, Kubo F, Sakoda M, Hiwatashi K, Tatenos T, Mataka Y, Maemura K, Shinchi H, Natsugoe S, Aikou T. Efficacy of anatomic resection vs nonanatomic resection for small nodular hepatocellular carcinoma based on gross classification. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 2008; 15: 493-500
- 何鹏, 仇毓东, 丁义涛, 常俊. 脉动色素浓度测定法行ICG清除试验检测肝储备功能的准确性评价. *中华肝胆外科杂志* 2007; 13: 588-590
- Hiltebrand LB, Kimberger O, Arnberger M, Brandt S, Kurz A, Sigurdsson GH. Crystalloids versus colloids for goal-directed fluid therapy in major surgery. *Crit Care* 2009; 13: R40

#### ■同行评价

论文选题有一定创新,内容对肝血管瘤的外科治疗有一定参考价值.

编辑 李薇 电编 何基才



# 活体肝移植术后受体胆系并发症的影响因素及影像学表现

刘曦娇, 李嘉鑫, 黄子星, 陈光文, 李晨, 宋彬

## ■背景资料

活体肝移植术是目前治疗终末期肝病的最有效方法之一。胆系并发症在其术后并发症中居第二位。探讨并明确MDCT及MRI在LDLT术后胆系并发症中的应用价值对临床术后随访有重要指导意义。

刘曦娇, 黄子星, 宋彬, 四川大学华西医院放射科 四川省成都市 610041

李嘉鑫, 李晨, 四川大学华西临床医学院 四川省成都市 610041

陈光文, 四川省人民医院放射科 四川省成都市 610041

四川省科技厅公益基金资助项目, No. 2008FG0011

作者贡献分布: 刘曦娇负责病例的收集、图像判读、数据统计和论文撰写; 黄子星与陈光文负责图像判读、统计指导和论文的修改; 李嘉鑫与李晨负责病例临床资料的收集; 宋彬负责课题设计与论文的审校。

通讯作者: 宋彬, 教授, 610041, 四川省成都市国学巷37号, 四川大学华西医院放射科. cjr.songbin@vip.163.com

收稿日期: 2011-06-20 修回日期: 2011-08-27

接受日期: 2011-09-01 在线出版日期: 2011-09-08

## Biliary complications in recipients after living donor liver transplantation: influencing factors and imaging manifestations

Xi-Jiao Liu, Jia-Xin Li, Zi-Xing Huang, Guang-Wen Chen, Chen Li, Bin Song

Xi-Jiao Liu, Zi-Xing Huang, Bin Song, Department of Radiology, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, Sichuan Province, China

Jia-Xin Li, Chen Li, West China Medical School, Sichuan University, Chengdu 610041, Sichuan Province, China

Guang-Wen Chen, Department of Radiology, People's Hospital of Sichuan Province, Cheng Du 610041, Sichuan Province, China

Supported by: the Foundation of Technology Department of Sichuan Province, No. 2008FG0011

Correspondence to: Bin Song, Professor, Department of Radiology, West China Hospital, Sichuan University, 37 Guoxue Lane, Chengdu 610041, Sichuan Province, China. cjr.songbin@vip.163.com

Received: 2011-06-20 Revised: 2011-08-27

Accepted: 2011-09-01 Published online: 2011-09-08

## Abstract

**AIM:** To investigate the influencing factors for and imaging manifestations of biliary complications in patients after living donor liver transplantation (LDLT).

**METHODS:** The imaging data for 119 patients who underwent LDLT at West China Hospital from January 2007 to March 2011 were retrospectively analyzed. All biliary system images were read and analyzed independently by two

radiologists.

**RESULTS:** A total of 119 patients were followed up for 1-18 months. During the follow-up period, 22 patients developed biliary complications, including 9 cases of cholestasis, 5 cases of cholangitis, 4 cases of stenosis, and 4 cases of bile leakage. Different complications occurred at different time points. Multidetector computed tomography (MDCT) and magnetic resonance imaging (MRI) can display cholestasis, cholangitis and biliary stenosis well, and MRI has greater diagnostic value than MDCT. Both methods had limited value in the diagnosis of bile leakage.

**CONCLUSION:** The influencing factors for biliary complications in recipients after LDLT are diverse. MDCT and MRI have great value in the detection of these complications.

**Key Words:** Living donor liver transplantation; Post-operative complications; Biliary system; Imaging

Liu XJ, Li JX, Huang ZX, Chen GW, Li C, Song B. Biliary complications in recipients after living donor liver transplantation: influencing factors and imaging manifestations. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(25): 2688-2692

## 摘要

**目的:** 探讨活体肝移植(LDLT)术后受体胆系并发症发生的影响因素及其影像学表现。

**方法:** 纳入2007-01/2011-03在我院接受活体肝移植的患者119例, 回顾性分析其在术后随访的多层螺旋CT(MDCT)及MRI图像, 重点观察胆道系统, 观察有无各种胆系并发症, 必要时结合各种后处理技术, 包括多平面重建、最大密度投影等。将结果与其同期随访的临床及其他辅助检查对照, 并探讨其发生原因。

**结果:** 119例患者术后1-18 mo随访中, 胆系并发症共计22例, 发生率约18.5%。其中包括9例胆汁淤积、5例胆管炎、4例胆管狭窄和4例胆漏。各种并发症的主要发生时间不一致, 发生的影响因素复杂。胆汁淤积、胆管炎及胆管狭

## ■同行评议者

邹小明, 教授, 哈尔滨医科大学附属第二医院普外二科; 宋振顺, 教授, 中国人民解放军第四军医大学西京医院肝胆外科; 于聪慧, 教授, 中国人民解放军北京军区总医院肝胆外科



窄在MDCT、MRI图像上可良好显示, 并有各自的影像学特点, MRI价值大于MDCT. 目前两种检查技术对胆漏的诊断价值有限.

**结论:** LDLT术后胆系并发症发生的解剖生理复杂, 影像学价值大, 其中MRI优于MDCT. 建议临床医生在LDLT受体术后随访时如怀疑有胆系并发症首选MRI检查.

**关键词:** 活体肝移植; 术后并发症; 胆系; 影像学

刘曦娇, 李嘉鑫, 黄子星, 陈光文, 李晨, 宋彬. 活体肝移植术后受体胆系并发症的影响因素及影像学表现. 世界华人消化杂志 2011; 19(25): 2688-2692  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/2688.asp>

## 0 引言

活体肝移植(living donor liver transplantation, LDLT)是治疗终末期肝病的最有效方法之一. 但LDLT术后常出现胆道系统的并发症, 严重影响受体的手术疗效和预后. 本文通过分析LDLT术后胆道系统各种并发症的影像表现特点, 评估影像学检查在LDLT术后胆道系统并发症的诊断价值, 并结合解剖生理基础分析胆系并发症出现的原因.

## 1 材料和方法

**1.1 材料** (1)纳入标准: 2007-01/2011-03在我院接受LDLT术的患者, 随访时间为术后1-18 mo, 随访期间行MDCT和(或)MRI检查; (2)排除标准: 肝移植术前行肝脏手术者包括二次肝移植、肝切除等; 检查前行介入性治疗者如支架置入等.

### 1.2 方法

**1.2.1 MDCT扫描:** 采用Philips Brilliance 16或Brilliance 64 MSCT扫描系统(Philips, 荷兰)进行上中腹部平扫及增强扫描, 扫描范围从膈顶至髂窝. 扫描参数: 管电压120 kV, 管电流200 mA, 扫描准直器0.625-1.500 mm, 螺距自动匹配, 层厚5 mm, 重建间隔5 mm, 矩阵512×512. 非粒子型对比剂碘海醇(北陆公司, 中国)75-100 mL(1.5 mL/kg体质量), 静脉推注, 速率为2-3 mL/s, 延迟时间25 s(动脉期)和60 s(门脉期).

**1.2.2 MRI扫描:** 采用Magnetom Sonata 1.5T超导型磁共振成像系统(Siemens, 德国). 体部阵列线圈, 取仰卧位, 头先进, 扫描范围从膈顶至肝下极. 行标准化的上腹部扫描程序, 包括: (1)FLASH 轴位T1WI 序列, TR/TE = 100.0 ms/4.8 ms, 带宽 = 180 Hz/像素; HASTE轴位

T2WI序列, TR/TE = 1 000 ms/82 ms, 带宽 = 475 Hz/像素. FOV(视野) = (240-400) mm×(300-400) mm, 层厚8 mm, 层间隔1.6 mm, 矩阵(250-450)×512; (2)True-FISP true fast imaging with steady state precession)序列冠状面扫描, TR/TE = 4.3 ms/2.1 ms, 带宽 = 500 Hz/像素, 矩阵440×512, FOV = 361 mm×361 mm, 层厚5 mm, 层间隔0 mm; (3)容积式内插值法屏气检查序列(volumetric interpolated breath-hold examination, VIBE)多期动态增强扫描, TR/TE = 4.8 ms/2.2 ms, 翻转角12(带宽 = 488 Hz/像素), FOV = (300×300) mm-(400×400) mm, 矩阵160×160, 层厚1.5-2.0 mm. 对比剂用磁显葡(Gd-DTPA, 北陆公司, 中国), 剂量0.2 mmol/kg体质量, 注射速率2-3 mL/s; 高压注射器或手推经肘静脉注射后即开始VIBE动脉早期扫描, 动脉晚期和门脉期分别于动脉早期结束后10 s及40 s开始扫描, 每期扫描时间平均为22.7 s(17-28 s), 呼气末屏气扫描. VIBE扫描结束后行T1WI增强平衡期扫描, 于对比剂注射开始后80-100 s开始, TR/TE = 124.0 ms/2.5 ms, 翻转角70(TA = 18 s, 带宽 = 260 Hz/像素, 其他同T1WI平扫).

**1.2.3 图像分析:** 两位放射科医师(分别有10年和5年工作经验, 擅长腹部影像诊断)独立分析图像. 将两位医师的诊断结果相比较, 如有分歧, 经商议后最终取得一致意见. 主要观察胆道系统管腔有无狭窄、扩张(薄层横断面图像胆总管直径<4 mm, 肝总管及肝内胆管左右支直径<2 mm诊断狭窄; 肝外胆管直径>8 mm, 肝内胆管直径>3 mm诊断扩张<sup>[1]</sup>)及充盈缺损, 胆管壁有无增厚及强化特征, 胆管周围结构包括有无胆汁外漏/胆汁瘤形成等. 诊断时结合各种后处理技术, 包括多平面重建、最大密度投影等. 将影像结果与其临床信息及其他辅助检查结果对比.

## 2 结果

共纳入患者119例, 其中男108例, 女11例, 6-69(平均43.2)岁. 术前诊断: 肝癌64例, 肝硬化42例, 重症肝炎6例, 肝内胆管结石2例, 肝平滑肌肉瘤1例, 肝豆状核病2例, 肝母细胞瘤2例. 包含肝中静脉的半肝移植107例, 不包含肝中静脉的半肝移植12例. 119例患者Child-Pugh肝功能分级A级10例, B级45例, C级64例. MDCT或MRI随访时间为术后1-18 mo.

随访期间胆系并发症共计22例, 包括胆汁淤积、胆管炎(图1)、胆道狭窄(图2)和胆漏(图3).

### ■研究前沿

目前LDLT术后胆系并发症的影像学研究主要围绕MRI进行, 包括不同扫描序列、特殊造影剂等.

### ■相关报道

国内王宏等前瞻性研究LDLT术后胆系并发症的不同MRCP序列成像、应用肝胆对比性造影剂莫迪司成像等, 取得较多成果.

## ■创新盘点

本文样本量大, 随访时间长, 研究思路清晰, 结论对临床随访有指导意义; 本文还结合胆系并发症发生的各种影响因素, 帮助放射科医生理解和掌握其发生机制。

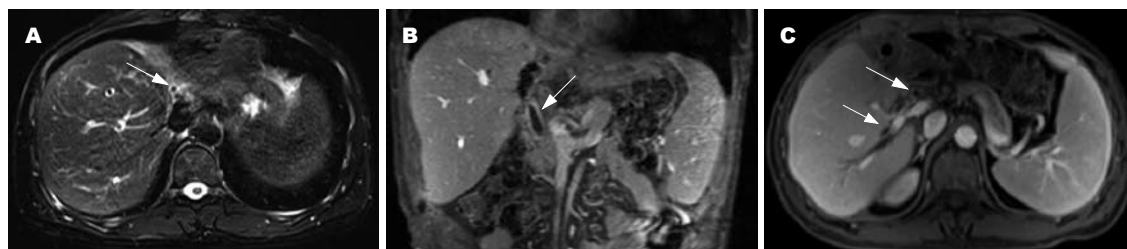


图 1 34Y M, 因肝癌行LDLT术后1 mo肝门胆管炎( $\times 1.06$ ). A: T2WI平扫示胆管壁增厚; B、C: 增强后的冠状位和轴位图像示增厚的胆管壁强化。

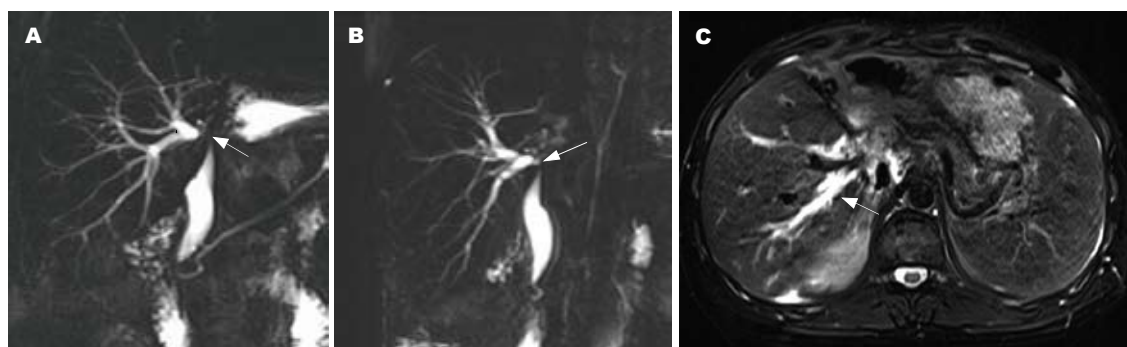


图 2 63Y, F, 肝硬化行LDLT术后13 mo胆管吻合口狭窄( $\times 1.06$ ): A、B: MRCP从不同角度示胆管吻合口狭窄, 肝内胆管扩张; C: T2WI轴位像示肝内胆管扩张, 其内信号不均匀。

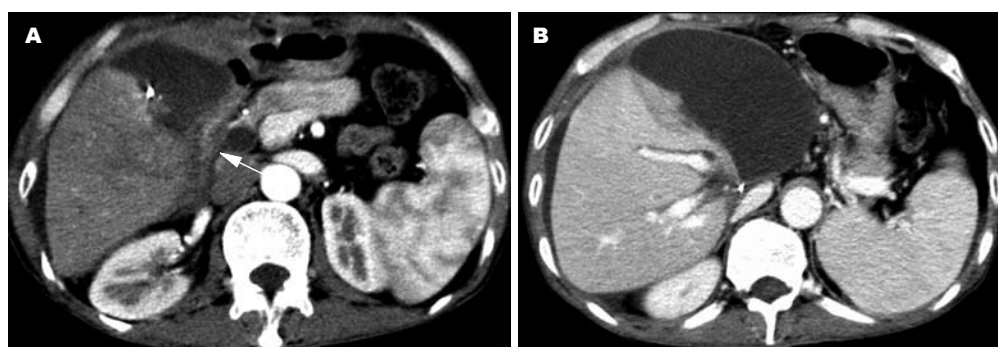


图 3 53Y, M, 因原发性肝癌及肝内胆管结石行LDLT. A: 术后2 wk胆漏, 剖腹探查发现, 肝断面及肝膈面大量淡黄色液体; B: 胆总管吻合口可见淡黄色液体流出( $\times 1.06$ ).

胆汁淤积共9例, 发生率约7.6%; 胆管炎共5例, 发生率4.2%; 胆管狭窄共4例, 发生率3.4%; 胆漏共4例, 发生率3.4%. 胆管炎影像上表现为胆管壁增厚伴轻度强化, 增厚的管壁致相应管腔变窄, 其中4例还伴上段胆管扩张. 胆汁淤积表现为胆管内不均匀密度(信号)影. 胆管吻合口狭窄在MRI横断面图像显示胆管吻合口管径狭小, MRCP图像显示吻合口充盈缺损, 上段胆管不规则扩张, 呈鹰嘴征改变. 胆漏表现为吻合处胆总管壁局部缺损, 胆管腔与外周低密度影连续。

### 3 讨论

目前LDLT术逐渐发展成熟并成为治疗终末期肝

病的最有效方法之一<sup>[2,3]</sup>. 但LDLT术后常发生多种并发症<sup>[4]</sup>, 有时严重影响手术疗效. 胆系并发症在术后并发症中占第二位<sup>[5,6]</sup>, 发生率因移植的术式、胆道吻合方式的不同而有所差异. 胆系并发症临床表现隐匿, 相关实验室检查缺乏特异性, 故影像学检查尤为重要。

胆系并发症一直以来在受体术后并发症中发生率较高, LDLT术后常见胆系并发症包括胆汁淤积、胆管炎、胆道狭窄、胆漏和胆道铸型<sup>[7]</sup>等. 本研究结果显示其发病率为18.5%, 与文献报道一致<sup>[8-10]</sup>. 本研究中胆汁淤积主要发生在肝总管和大的肝内胆管. MDCT图像可显示胆管的扩张, 典型者还可发现管腔内成分的变化. MRI

## ■应用要点

LDLT术后各种胆系并发症发生的原因复杂, 影像学对于其诊断价值大. 在临床随访中怀疑有胆系并发症者建议首选MRI检查。

图像在胆汁淤积的诊断上, 效果与胆道造影相同。同时, T2WI和磁共振胆胰管成像(magnetic resonance cholangiopancreatography, MRCP)序列敏感性较高。胆管炎在MDCT及MRI图像上表现典型-胆管壁增厚、强化, 伴或不伴相应管腔变窄、上段胆管扩张。胆管狭窄是LDLT术后的远期并发症, 好发于吻合口位置。MDCT能提供狭窄段以上胆管扩张的征象, 薄层图像还可显示狭窄平面。MRI薄层横断面图像良好显示胆管狭窄部位及上段胆管的扩张, MRCP图像直观、形象, 并可多方位旋转和多角度观察。本组纳入病人中MRI对胆系狭窄诊断的准确度100%。胆漏均发生在术后3 mo内, 发病率为3.4%。遗憾的是, 目前对于胆漏的诊断MRI及CT均价值有限。4例胆漏病人影像学仅诊断1例, 其余3例影像上均与周围积液分界不清。目前关于胆漏的影像学评价的文献还很少<sup>[11]</sup>。我们认为其原因一方面是目前影像学检查对胆漏的诊断价值有限, 临床胆漏的患者大部分都直接通过T管行胆道造影证实; 另一方面是还没有发现新的合适的研究技术和方法。

胆系并发症发生的原因包括: (1)先天解剖的因素, 肝内胆管结构复杂、变异多见<sup>[12,13]</sup>; (2)术中操作技术影响, 胆道对缺血敏感性高, 若术中分离胆道周围组织过多或胆管游离端过长, 吻合后胆道缺血可能性增大, 易导致胆管狭窄, 同时胆汁动力性改变易导致胆汁淤积、结石形成。如果术中操作造成肝胆管上皮细胞损伤和移植物断面毛细胆管漏, 会使胆系并发症的发生率提高; (3)胆道吻合方式的因素, 胆道吻合方式有胆管-胆管端端吻合和胆肠内引流两种。近年来大多采用端端吻合, 但对于供体和受体大小不相匹配或受体胆管位置不适合时此种吻合方式将导致多种胆系并发症。此时应采用Roux-en-Y胆总管空肠吻合术, 但胆肠吻合后肠道内容物易反流入胆道, 也增加发生胆系并发症的风险。本组4例胆管狭窄伴肝内胆汁淤积中有1例为排斥反应, 另3例考虑是术中吻合不良造成。5例胆管炎中有1例为原发性硬化性胆管炎, 2例怀疑行T管引流时感染, 余2例因受体胆管较细行胆肠吻合感染; (4)术后T管留置的因素, LDLT术后患者常规要留置T管, 通常在术后2-4 mo拔除。由于肝移植受体都使用了免疫抑制剂, 因此在T管通道仅有少许肉芽组织形成。当拔除T管时可发生胆漏, 胆汁瘤等。这与我们的结果完全符合-本组4例术后早期发生胆漏的患者均在T管

拔除后。但需要补充的是小渗漏通常能自行恢复, 但较大的渗漏多是由于手术损伤造成<sup>[14]</sup>。另外, 供肝保存时冷缺血时间过长, 胆管内胆汁未充分冲洗, 再灌注损伤等亦可造成胆系并发症。

总之, LDLT术后各种胆系并发症发生的解剖生理改变复杂, 影像学对于胆系并发症检出价值大。MDCT检查对于胆管炎、胆管狭窄远端的胆管扩张有一定的诊断价值。MRI横断面图像及MRCP可显示胆管树的全貌及其内胆汁信号的改变, 对多种胆道系统并发症均可良好显示<sup>[15]</sup>。不过对于胆漏, 目前两种检查技术的价值都有限。在临床随访时如果怀疑患者有胆系并发症时首选MRI检查。本研究存在一定的不足, 如果本研究中纳入常规的超声检查以此评估胆系并发症的影像学评价会更加完善。

#### 4 参考文献

- 1 Valls C, Alba E, Cruz M, Figueras J, Andía E, Sanchez A, Lladó L, Serrano T. Biliary complications after liver transplantation: diagnosis with MR cholangiopancreatography. *AJR Am J Roentgenol* 2005; 184: 812-820
- 2 夏德生, 于立新, 夏求明. 器官移植学. 第2版. 上海: 上海科学技术出版社. 2009: 404-490
- 3 陈知水, 王海灏. 中国肝癌肝移植的现状与展望. *世界华人消化杂志* 2006; 14: 939-941
- 4 Singh AK, Nachiappan AC, Verma HA, Uppot RN, Blake MA, Saini S, Boland GW. Postoperative imaging in liver transplantation: what radiologists should know. *Radiographics* 2010; 30: 339-351
- 5 Yuan Y, Gotoh M. Biliary complications in living liver donors. *Surg Today* 2010; 40: 411-417
- 6 Busuttil RW, Farmer DG, Yersiz H, Hiatt JR, McDiarmid SV, Goldstein LI, Saab S, Han S, Durazo F, Weaver M, Cao C, Chen T, Lipshutz GS, Holt C, Gordon S, Gornbein J, Amersi F, Ghobrial RM. Analysis of long-term outcomes of 3200 liver transplantations over two decades: a single-center experience. *Ann Surg* 2005; 241: 905-916; discussion 916-918
- 7 Geurtsen W, Jupitz G. [Fracture resistance of human premolar with regard to morphological factors]. *ZWR* 1991; 100: 98-99
- 8 Haberal M. Liver transplantation: experience at our center. *Transplant Proc* 2006; 38: 2111-2116
- 9 Caruso S, Miraglia R, Maruzzelli L, Gruttadauria S, Luca A, Gridelli B. Imaging in liver transplantation. *World J Gastroenterol* 2009; 15: 675-683
- 10 Hwang S, Lee SG, Sung KB, Park KM, Kim KH, Ahn CS, Lee YJ, Lee SK, Hwang GS, Moon DB, Ha TY, Kim DS, Jung JP, Song GW. Long-term incidence, risk factors, and management of biliary complications after adult living donor liver transplantation. *Liver Transpl* 2006; 12: 831-838
- 11 刘曦娇, 宋彬, 陈光文. 肝移植围手术期的影像学评价. *中国普外基础与临床杂志*, 2010; 17: 1102-1106
- 12 Basaran C, Agildere AM, Donmez FY, Sevmis S, Budakoglu I, Karakayali H, Haberal M. MR cholangio-

#### ■同行评价

本文探讨了MDCT和MRI对胆道并发症的诊断价值, 对开展活体肝移植的同道有借鉴作用, 有临床实用意义。

- pancreatography with T2-weighted prospective acquisition correction turbo spin-echo sequence of the biliary anatomy of potential living liver transplant donors. *AJR Am J Roentgenol* 2008; 190: 1527-1533
- 13 崔东旭, 刘 臻, 刘宝林, 张小薄, 许维雪, 邓永林, 沈中阳. 原位肝移植术后胆道并发症诊治134例. *世界华人消化杂志* 2007; 15: 3045-3048
- 14 Takatsuki M, Eguchi S, Kawashita Y, Kanematsu T. Biliary complications in recipients of living-donor liver transplantation. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 2006; 13: 497-501
- 15 陈军法, 陈卫霞, 宋庆轮, 李昌宪. 肝移植术后胆道并发症的磁共振评价. *世界华人消化杂志* 2007; 15: 3755-3760

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 •

### 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.

# 超声内镜诊断胆管恶性狭窄13例

李大勇, 秦鸣放, 王震宇

李大勇, 天津医科大学研究生院 天津市 300070  
秦鸣放, 王震宇, 天津市南开医院微创外科 天津市 300100  
作者贡献分布: 此文资料总结及论文撰写由李大勇完成; 内镜操作部分由秦鸣放、王震宇完成; 秦鸣放负责全文理论指导。  
通讯作者: 秦鸣放, 主任医师, 300100, 天津市南开区三纬路122号, 天津市南开医院微创外科中心. lidayonglolo@163.com  
电话: 022-27435268  
收稿日期: 2011-06-01 修回日期: 2011-08-23  
接受日期: 2011-09-01 在线出版日期: 2011-09-08

## EUS for diagnosis of malignant biliary stricture: an analysis of 13 cases

Da-Yong Li, Zhen-Yu Wang, Ming-Fang Qin

Da-Yong Li, Graduate School of Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China  
Ming-Fang Qin, Zhen-Yu Wang, Center for Minimally Invasive Surgery, Nankai Hospital, Tianjin 300100, China  
Correspondence to: Ming-Fang Qin, Center for Minimally Invasive Surgery, Nankai Hospital, 122 Sanwei Road, Nankai District, Tianjin 300100, China. lidayonglolo@163.com  
Received: 2011-06-01 Revised: 2011-08-23  
Accepted: 2011-09-01 Published online: 2011-09-08

## Abstract

**AIM:** To compare the clinical value of endoscopic ultrasonography (EUS), endoscopic retrograde cholangiopancreatography (ERCP) and magnetic resonance cholangiopancreatography (MRCP) in the diagnosis of malignant biliary stricture.

**METHODS:** The imaging data for 76 patients with malignant biliary stricture who underwent EUS, ERCP or MRCP from January 2008 to May 2010 were retrospectively analyzed. The sensitivity, specificity, positive predictive value, negative predictive value and accuracy of each test were compared.

**RESULTS:** EUS had significantly higher sensitivity (94.2% vs 78.5%), specificity (84.6% vs 57.1%), positive predictive value (89.1% vs 64.5%), negative predictive value (73.3% vs 41.3%) and accuracy (91.6% vs 71.6%) than MRCP in the diagnosis of malignant biliary stricture. EUS had significantly higher sensitivity (94.2% vs 80.5%), specificity (84.6% vs 68.4%) and accuracy (91.6% vs 71.6%) than ERCP in the

diagnosis of malignant biliary stricture.

**CONCLUSION:** EUS has higher sensitivity, specificity and accuracy than MRCP and ERCP in the diagnosis of malignant biliary stricture.

**Key Words:** Endoscopic ultrasonography; Malignant biliary stricture; Endoscopic retrograde cholangiopancreatography; Magnetic resonance cholangiopancreatography

Li DY, Qin MF, Wang ZY. EUS for diagnosis of malignant biliary stricture: an analysis of 13 cases. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(25): 2693-2695

## 摘要

**目的:** 比较超声内镜(EUS)、内镜下逆行胰胆管造影术(ERCP)及磁共振胰胆管成像(MRCP)在诊断胆管恶性狭窄中的临床价值。

**方法:** 回顾性分析2008-01/2010-05天津市南开医院76例胆管恶性狭窄患者的EUS、ERCP、MRCP检查结果, 比较敏感性、特异性、阳性预测值、阴性预测值及准确率。

**结果:** EUS诊断胆管恶性狭窄敏感性(94.2% vs 78.5%)、特异性(84.6% vs 57.1%)、阳性预测值(89.1% vs 64.5%)、阴性预测值(73.3% vs 41.3%)、准确率(91.6% vs 71.6%)均明显高于MRCP。EUS诊断胆管恶性狭窄敏感性(94.2% vs 80.5%)、特异性(84.6% vs 68.4%)、准确性(91.6% vs 71.6%)明显优于ERCP。

**结论:** EUS诊断胆管恶性狭窄, 具有敏感性、特异性及准确性高的优势。

**关键词:** 超声内镜; 胆管恶性狭窄; 内镜下逆行胰胆管造影术; 磁共振胰胆管成像

李大勇, 秦鸣放, 王震宇. 超声内镜诊断胆管恶性狭窄13例. *世界华人消化杂志* 2011; 19(25): 2693-2695  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/2693.asp>

## 0 引言

胆管狭窄多数为恶性狭窄, 良性狭窄较少见, 但鉴别较困难。由于胆管恶性狭窄早期缺乏特异

## ■背景资料

随着内镜超声的不断发展, 该项技术越来越多的运用于临床, 但仍存在一些问题。

## ■同行评议者

陈进宏, 副主任医师, 复旦大学附属华山医院外科; 杨建民, 教授, 浙江省人民医院消化内科



# ■ 研发前沿

超声内镜诊断胆管疾病目前尚属探讨阶段,随着IDUS的不断发展,越来越多的文章已经报道。

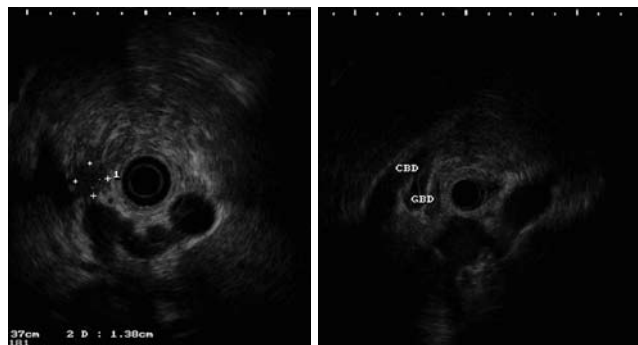


图1 EUS诊断胆管恶性狭窄的超声下所见. 图为一78岁男性, 为梗阻性黄疸的患者, 经EUS诊断为胆管下端恶性狭窄。

症状, 很多患者一旦出现黄疸、上腹疼痛症状, 已经属于晚期, 所以胆管恶性狭窄的诊断具有很重要的意义<sup>[1]</sup>. 天津市南开医院自2007年开展EUS, 通过经验的不断总结, 提高了胆管恶性狭窄的诊断率。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 2008-01/2010-05天津市南开医院共收治101例胆管狭窄患者(其中男54例, 女47例, 平均年龄 67.2岁). 经病理或长期随访证实76例患者为胆管恶性狭窄。

**1.2 方法** 101例胆管狭窄患者入院后常规行B超、肿瘤标志物及生化等相关检查, 其中18例结合上述检查考虑为晚期胆管恶性狭窄患者, 行EMBE或PTCD姑息治疗, 经随访7 mo后全部死于相关并发症. 27例患者行手术治疗, 术后病理证实为胆管恶性狭窄. 13例行EUS考虑患者为胰腺癌或胆囊癌压迫胆管所致胆管恶性狭窄, 行FNA穿刺, 经证实为胰腺癌或胆管癌. 19例患者行ERCP时取组织活检, 证实为胆管恶性狭窄. 回顾性分析76例胆管恶性狭窄患者的EUS、ERCP及MRCP检查. 计算3种检查方法诊断胆管恶性狭窄的敏感性、特异性、阴性预测值、阳性预测值. 敏感性、特异性、假阴性率、假阳性率及诊断准确性的计算公式如下: 敏感性 = 真阳性数/(真阳性数+假阴性数); 特异性 = 真阴性数/(真阴性数+假阳性数); 阴性预测值 = 真阴性数/总阴性数; 阳性预测值 = 真阳性数/总阳性数; 诊断准确性 = 真阳性数+真阴性数/总例数

**统计学处理** 采用SPSS17.0软件进行统计学处理. 组间率的比较采用配对 $\chi^2$ 检验, 检验水准  $P = 0.05$ .

## 2 结果

35例胆管恶性狭窄患者行EUS检查, 诊断正确33例, 误诊2例, 漏诊2例. 35例行ERCP患者, 诊断准确为29例, 误诊7例, 漏诊6例. 39例行MRCP患

表1 EUS、ERCP及MRCP诊断胆管恶性狭窄的敏感性、特异性、阳性预测值、阴性预测值及准确率分析 (%)

诊断方法	EUS	ERCP	MRCP
敏感性	94.2	80.5 <sup>a</sup>	78.5 <sup>c</sup>
特异性	84.6	68.4 <sup>a</sup>	57.1 <sup>c</sup>
阳性预测值	89.1	69.1	64.5 <sup>c</sup>
阴性预测值	73.3	50.0	41.3 <sup>c</sup>
准确性	91.6	76.3 <sup>a</sup>	71.6 <sup>c</sup>

<sup>a</sup> $P < 0.05$ , <sup>c</sup> $P < 0.05$  vs EUS.

者, 诊断正确31例, 误诊9例, 漏诊8例. 从结果可知, EUS诊断胆管恶性狭窄在敏感性、特异性、准确性方面明显优于ERCP, EUS诊断胆管恶性狭窄在敏感性、特异性、阳性预测值、阴性预测值、准确性方面明显优于MRCP(表1, 图1).

## 3 讨论

胆管恶性狭窄的诊断往往需要行MRCP及ERCP检查. MRCP作为一种安全、无创的胆胰管成像技术, 不受梗阻部位的限制, 通过多方位、不同角度的成像进行观察. 定性诊断主要依据梗阻部位、梗阻形态、胰胆管扩张的形态、程度及一些特征性的MRCP征象来帮助进行判定. 但由于MRCP空间分辨率较低, 又依赖于“水”成像, 对胆汁较少的胆管显示欠佳; 若十二指肠降部显影欠佳, 不能反映狭窄胆管的长度<sup>[2]</sup>. 另外MRCP图像重建过程中胆管内小结石等细小病灶常被高信号的胆汁所掩盖, 容易掩盖或遗漏小的病变<sup>[3]</sup>. 本文中有4例下端良性狭窄误诊为占位性病变, 后行ERCP检查证实为乳头旁憩室压迫所致胆总管下端狭窄. 有2例Mirizzi综合征患者误诊为胆管恶性狭窄。

ERCP作为一种直接的胆管造影, 以往一直被认为是胆胰管系统疾病诊断的金标准. 他能提供直接清晰的胰胆管影像, 是诊断胆、胰疾病的有效手段. 对于壶腹部肿瘤, 尤以十二指肠

乳头状肿瘤, ERCP可通过内镜对肿瘤组织的直视观察及活检, 可获取病理学诊断. 但对肿瘤周围情况、浸润范围常难以确定, 同时对胆总管中段至肝门部病变诊断率相对较低<sup>[4]</sup>. 本组病例中1例胆总管中部狭窄患者, ERCP误诊为肝门部胆管癌, 后经病理证实为良性狭窄. 同时ERCP作为有创性检查, 有一定的技术难度, 具有一定的风险, 其成功率与操作者水平呈正相关, 可引起胆道感染、出血、穿孔及胰腺炎<sup>[5]</sup>. 且对于孕妇及血液病患者而言, ERCP为相对禁忌证<sup>[6]</sup>.

EUS是在内镜引导下, 在胃肠道腔内对胃肠道及胃肠道周围的脏器进行超声扫描的方法. EUS既可以在内镜下直接观察病变, 又可以进行超声扫描, 获得脏器的超声图像<sup>[7]</sup>. (1)在EUS下, 炎性狭窄部的胆管为均一性肥厚, 癌性狭窄病灶多为低回声团块, 形态不规则, 内部回声不均匀, 边界不清晰, 病灶内可见散在的血流信号; (2)炎性狭窄胆管恶性狭窄3层结构清晰完整, 各层间分界清晰. 癌性狭窄正常胆管壁结构破坏, 根据低回声病灶侵及胆管壁的层次, 可以对肿瘤分期做出判断; (3)炎性狭窄与周围组织界限清楚. 癌性狭窄可见肿瘤组织侵入周围组织<sup>[8]</sup>.

有文献报道, EUS诊断胆管恶性疾病的总体准确性、敏感性、阳性预测值、阴性预测值及特异性分别为86.0%-94.1%、82.3%-84.0%、80.0%-84.2%、85.0%-93.3%、90.0%-96.0%. 同时EUS对胆道恶性狭窄患者的T、N、M分期具有很高的准确性<sup>[9]</sup>, 对于评估行手术治疗恶性狭窄的可能性具有很高的临床价值<sup>[10]</sup>.

通过我们临床经验的总结, 相比ERCP及MRCP, EUS在诊断胆管恶性狭窄方面具有准确性、特异性、敏感性高的优势, EUS同时具备内镜下直接观察和超声扫描的优点<sup>[11]</sup>, 必要时可行FNA穿刺诊断, 从而提高诊断的特异性. 对于胆道狭窄的诊断, EUS-FNA较现有的方式(如MRCP, ERCP)准确性更高<sup>[12]</sup>, 是目前最佳的诊断手段, 但其对于仅胆管壁局部增厚者的诊断敏感性仍较低, 如何提高其敏感性仍需进一步研究, 如结合IDUS、行EUS-FNA穿刺时部位的选择等<sup>[5]</sup>.

随着现在EUS技术的发展, EUS不仅可以早期诊断胆管恶性狭窄, 同时可以用于胆管恶性狭窄的治疗<sup>[13]</sup>, 如EUS介导下肝胃吻合术, 其步骤与胆总管十二指肠吻合术相仿, 不过穿刺部

位为贲门或胃小弯侧, 建立左肝胆管与胃之间的分流, 已经有很多相关的文献<sup>[14]</sup>报道. 但是, EUS具有其相对的缺点, 例如EUS对于医师的要求比较高, 必须同时具备超声学方面及内镜两方面的技术, 所以EUS在很多医院无法广泛开展, 限制了他的应用. 不过我们坚信随诊现代医学的发展, EUS会越来越多的应用于很多疾病的早期诊断及微创治疗.

## 4 参考文献

- 1 陈俊辉. 超声内镜的临床应用. 实用医学杂志 2008; 18: 347
- 2 Common Bile Duct Carcinoid Mimicking the Clinical, EUS, and ERCP Findings of Cholangiocarcinoma: A Rare but Potentially Curable Cause of Obstructive Jaundice. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2011; Jun 30. [Epub ahead of print]
- 3 Mohamadnejad M, DeWitt JM, Sherman S, LeBlanc JK, Pitt HA, House MG, Jones KJ, Fogel EL, McHenry L, Watkins JL, Cote GA, Lehman GA, Al-Haddad MA. Role of EUS for preoperative evaluation of cholangiocarcinoma: a large single-center experience. *Gastrointest Endosc* 2011; 73: 71-78
- 4 曾安祥, 王胜利, 张德强. ERCP和MRCP对胆管微小结石诊治价值比较. 现代消化及介入治疗 2009; 14: 151-152
- 5 Tamada K, Ushio J, Sugano K. Endoscopic diagnosis of extrahepatic bile duct carcinoma: Advances and current limitations. *World J Clin Oncol* 2011; 2: 203-216
- 6 Lazaridis KN, Gores GJ. Cholangiocarcinoma. *Gastroenterology* 2005; 128: 1655-1667
- 7 Rauws EA, Kloek JJ, Gouma DJ, Van Gulik TM. Staging of cholangiocarcinoma: the role of endoscopy. *HPB (Oxford)* 2008; 10: 110-112
- 8 秦鸣放. 腹部外科腹腔镜及内镜治疗学. 第1版. 北京: 人民军医出版社, 243-244
- 9 刘变英. 内镜超声技术的临床应用. 人人健康 2011; (1): 23-24
- 10 Krishna NB, Saripalli S, Safdar R, Agarwal B. Intraductal US in evaluation of biliary strictures without a mass lesion on CT scan or magnetic resonance imaging: significance of focal wall thickening and extrinsic compression at the stricture site. *Gastrointest Endosc* 2007; 66: 90-96
- 11 Chen CW, Liu YS, Chen CY, Tsai HM, Chen SC, Chuang MT. Use of carbon dioxide as negative contrast agent for magnetic resonance cholangiopancreatography. *World J Radiol* 2011; 3: 47-50
- 12 Giovannini M, Bories E. EUS-Guided Biliary Drainage. *Gastroenterol Res Pract* 2012; 2012: 348-719
- 13 吴毓麟, 杨连生, 邹晓平. ERCP与MRCP对胆胰疾病诊断的比较研究. 华夏医学 2009; 10: 19-21
- 14 Perez-Miranda M, de la Serna C, Diez-Redondo P, Vila JJ. Endosonography-guided cholangiopancreatography as a salvage drainage procedure for obstructed biliary and pancreatic ducts. *World J Gastrointest Endosc* 2010; 2: 212-222

## ■同行评价

本文总结分析了EUS、MRCP及ERCP三种影像技术对胆管狭窄的诊断价值, 表明EUS在诊断准确性等方面具明显优势, 对临床工作有一定指导意义.

编辑 何基才 电编 何基才

# 《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<sup>H</sup>, *H. pylori*不能写成HP,  $T_{1/2}$ 不能写成tl/2或T<sub>1/2</sub>, Vmax不能Vmax,  $\mu$ 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),  $\rho$ (密度, 体积质量, g/L), c(浓度, mol/L),  $\phi$ (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 $1 \times 10^{12}$ /L, WBC数用 $1 \times 10^9$ /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、CO<sub>2</sub>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 $1 \times 10^{-3}$  g与 $5 \times 10^{-7}$  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% CO<sub>2</sub>, 50 mL/L CO<sub>2</sub>; 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 =  $45 \times 10^{-6}$ ; 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 $\chi^2$ ; (4)样本的相关系数用英文小写 $r$ ; (5)自由度用希文小写 $\nu$ ; (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 $\leq 100$ , 百分数到个位;  $101 \leq \text{分母} \leq 1000$ , 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志谢中. 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 $t/\text{min}$ ,  $c/(\text{mol/L})$ ,  $p/\text{kPa}$ ,  $V/\text{mL}$ ,  $t/^\circ\text{C}$ 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<sup>[1]</sup>报告……, 潘伯荣等<sup>[2-5]</sup>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<sup>[6-7]</sup>. 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](mailto: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](mailto: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  
中国人民解放军解放军第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

陈卫昌 教授  
苏州大学附属第一医院消化内科

崔云甫 教授  
哈尔滨医科大学第二附属医院普外一科

杜顺达 副主任医师  
北京协和医院肝外科

杜雅菊 主任医师  
哈尔滨医科大学附属第二医院消化内科

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

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

洪天配 教授  
北京大学第三医院内分泌科

黄培林 教授  
东南大学

李军祥 教授  
北京中医药大学附属东方医院消化内科

李胜 研究员  
山东省肿瘤防治研究院肝胆外科

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

齐清会 教授  
大连医科大学附属第一医院普通外科

秦建民 副教授  
上海中医药大学附属普陀医院肝胆外科

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

沈琳 主任医师  
北京大学临床肿瘤医院消化内科

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

王健生 教授  
西安交通大学医学院第一附属医院肿瘤外科

王悦华 副主任医师  
首都医科大学宣武医院普外科

王振宁 教授  
中国医科大学附属第一医院肿瘤外科

许文燮 教授  
上海交通大学生命科学院生物医学工程系

宣世英 教授  
山东省青岛市市立医院肝病内科

姚树坤 教授  
中日友好医院消化内科

殷正丰 教授  
中国人民解放军第二军医大学东方肝胆外科医院

袁红霞 教授  
天津中医药大学消化科

张明辉 副主任医师  
河北医科大学第一医院肝病中心

周南进 研究员  
江西省医学科学研究所

朱亮 副教授  
大连医科大学生理教研室