

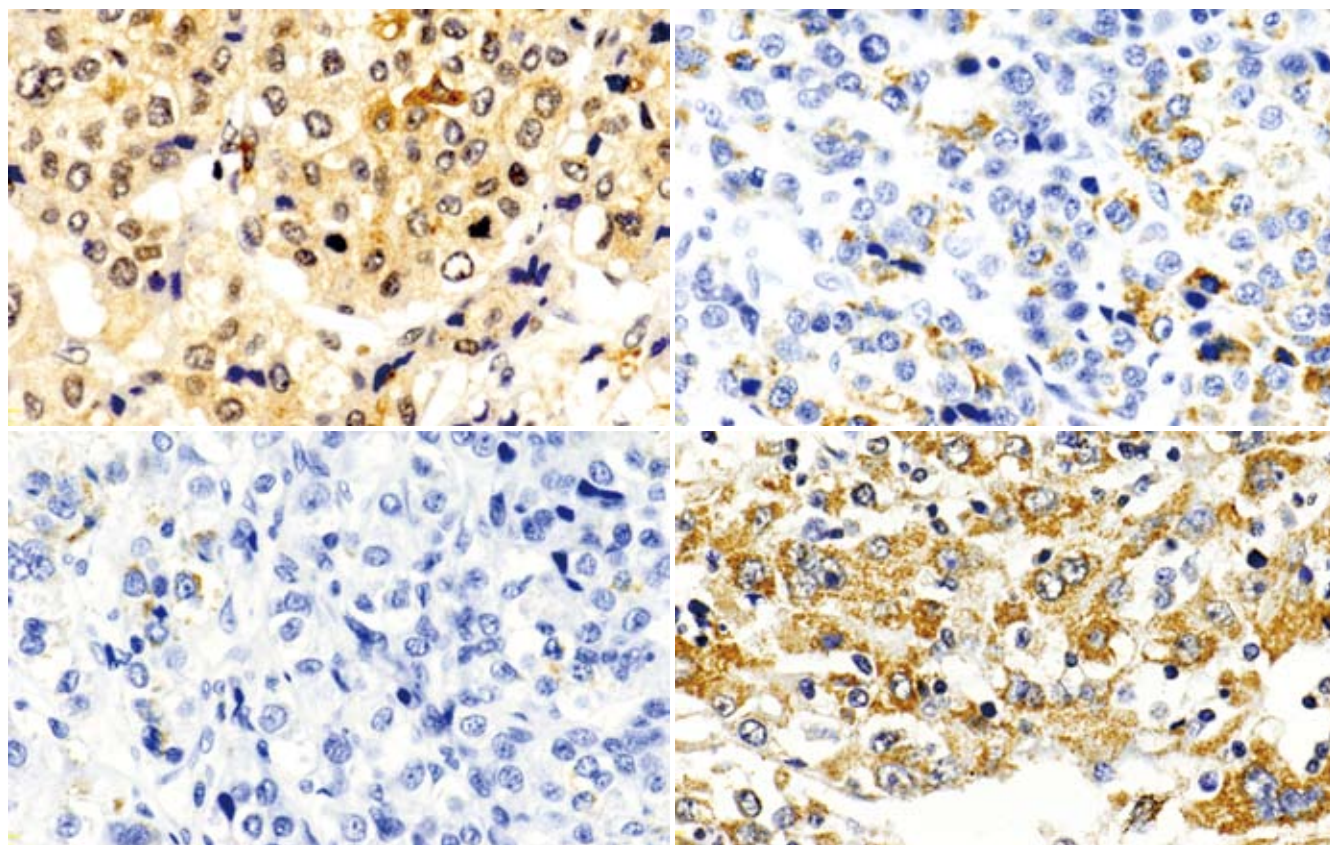
ISSN 1009-3079 (print)
ISSN 2219-2859 (online)
CN 14-1260/R

世界华人消化杂志®

WORLD CHINESE JOURNAL OF DIGESTOLOGY

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

2010 年 11 月 8 日 第 18 卷 第 31 期 (Volume 18 Number 31)



31 / 2010

ISSN 1009-3079



9 771009 307056

名誉总编辑

潘伯荣

总编辑

马连生

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

世界华人消化杂志®

编辑委员会

2009-01-01/2011-12-31

wcjd@wjgnet.com www.wjgnet.com

总顾问

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

名誉总编辑

潘伯荣教授

社长/总编辑

马连生教授

副总编辑

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

常务编委

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

编委

消化内科学

白爱平副教授
栾新明教授
陈国忠副主任医师
陈洪副教授
陈其奎教授
陈卫昌教授
陈贻胜教授
程斌教授
迟宝荣教授

崔立红副教授
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
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
王邦茂教授
王炳元教授
王承党教授
王江滨教授
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

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
陈凜教授
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
王要军教授
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
徐迅迪副主任医师
徐泱副主任医师
许戈良教授
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
杨华副主任医师
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
朱传武主任医师

庄林主任医师

消化中医学

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
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
李璦教授
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
李健丁教授
龙学颖副主任医师
倪才方教授
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
陈志龙教授
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
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
阴赧宏研究员
郁卫东副研究员
喻荣彬副教授
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
季菊玲副教授
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 ● 2010 年 11 月 8 日 第 18 卷 第 31 期 (总第327期)

述 评

3281 直肠脱垂常见的经腹术式选择

马树梅, 王晓锋, 李华山

基 础 研 究

3287 艾灸血浆对乙醇损伤的人胃黏膜上皮细胞的影响

洪金标, 易受乡, 黄芸, 林亚平, 杜燕, 彭宏, 彭艳

3294 缺氧对肝癌血管生成拟态的影响及其机制

刘文斌, 许戈良, 莫卫东, 李建生, 马金良, 葛勇胜, 任维华, 余继海, 王伟, 胡晔

3301 甘草酸二铵对溃疡性结肠炎大鼠Foxp3 mRNA表达的影响

原皓, 崔慎茹, 李时光

3306 线粒体解偶联蛋白2在肠道的分布模式及其对GLP-1分泌的影响

李正阳, 陈燕, 林琳, 蒯筱漪, 于鹏丽, 张红杰

临 床 研 究

3313 肝炎后肝硬化与酒精性肝硬化患者临床特征的比较及防治

周永莉, 段志军

3320 外周血DNA TUSC4基因缺失在大肠癌分子筛查及早期诊断中的应用

裴风华, 赵晶, 杜雅菊, 程艳秋, 王晓芬, 陈晶, 张会涛, 刘冰熔, 高善玲

文 献 综 述

3327 早期胃癌黏膜微细形态的内镜研究进展

王寰, 刘海峰

3332 U II/UT系统在肝硬化门脉高压症中的研究进展

刘殿刚, 王宇

研 究 快 报

3338 强力霉素与碘油栓塞对兔VX2肝种植瘤VEGF、MMP-2表达的影响

邢石磊, 张祥林, 董福仁, 雷振, 王刚, 李国策, 徐娜

3343 黄连素对大鼠结肠隐窝细胞钾通道的影响

尹琬凌, 罗和生, 韩肇木

3347 氟喹诺酮类药物对幽门螺杆菌的防耐药变异浓度

呼闯营, 柴晓哲, 周惠琴, 王少峰

临 床 经 验

3352 原发性胃恶性淋巴瘤的临床、内镜和病理特征24例

汪佩文, 姜海琼, 吴坚炯

3356 高原地区反流性食管炎胃镜检查858例

王晨, 文军宝, 原爱中, 白冬梅, 姚小军, 刘宏生

3359 HPV16E6、TAP2与新疆哈萨克族食管癌交互作用的1:2病例对照

蔡金凤, 马彦清, 徐莉, 曾同霞, 李锋, 廖佩花, 秦江梅

3366 VEGF在胃癌中的表达及其临床意义

刘伟, 余英豪, 欧阳学农, 王烈, 武一曼, 陈娟, 熊喜生

3372 贵州黔西威宁彝族人群HBV感染与IL10-819及CCR5-59029多态性的相关性

单可人, 王婵娟, 谭奎, 何燕, 张婷, 李毅, 赵艳, 吴昌学, 齐晓岚, 官志忠

3378 抗体芯片技术的建立及其对肝癌血清标志物的筛选

吴彩霞, 刘琼明, 赵信利, 王斐, 许丹科, 何为

附 录	3384 《世界华人消化杂志》投稿须知 3389 2010-2011年国内国际会议预告
志 谢	3390 志谢世界华人消化杂志编委
消 息	3286 《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》 3293 <i>WJC, WJGE, WJGO, WJGS, WJH, WJR</i> 6本期刊被PMC收录 3312 <i>WJG</i> 成功通过评审被PMC收录 3319 《世界华人消化杂志》性质、刊登内容及目标 3326 《世界华人消化杂志》参考文献要求 3331 《2009年版中国科技期刊引证报告》(核心版)发布《世界华人消化杂志》2008年影响因子0.547 3337 《世界华人消化杂志》修回稿须知 3342 2009年《世界华人消化杂志》编委审稿总结 3346 《世界华人消化杂志》外文字符标准 3351 汤姆森-路透公布2009年 <i>WJG</i> 影响因子2.092 3355 《世界华人消化杂志》出版流程 3365 2008年内科学类期刊总被引频次和影响因子排序 3371 《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》 3377 《世界华人消化杂志》正文要求 3383 《世界华人消化杂志》栏目设置
封面故事	刘文斌, 许戈良, 荚卫东, 李建生, 马金良, 葛勇胜, 任维华, 余继海, 王伟, 胡晔. 缺氧对肝癌血管生成拟态的影响及其机制. 世界华人消化杂志 2010; 18(31): 3294-3300 http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/3294.asp
本期责任人	编务 刘晓芳; 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 李薇; 审核编辑 李军亮; 形式规范 马连生

世界华人消化杂志 Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 吴阶平 题写封面刊名 陈可冀 题写版权刊名 (旬刊) 创 刊 1993-01-15 改 刊 1998-01-25 出 版 2010-11-08 原刊名 新消化病学杂志 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	编辑 世界华人消化杂志编辑委员会 030001, 山西省太原市双塔西街77号 电话: 0351-4078656 E-mail: wcjd@wjgnet.com http://www.wjgnet.com 出版 世界华人消化杂志编辑部 030001, 山西省太原市双塔西街77号 电话: 0351-4078656 E-mail: wcjd@wjgnet.com http://www.wjgnet.com 印刷 北京科信印刷厂 发行 国内: 北京报刊发行局 国外: 中国国际图书贸易总公司 (100044, 北京市399信箱) 订购 全国各地邮电局 邮购 世界华人消化杂志编辑部 030001, 山西省太原市双塔西街77号 电话: 0351-4078656 E-mail: wcjd@wjgnet.com http://www.wjgnet.com	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. 世界华人消化杂志正式开通了在线办公系统(http://www.baishideng.com/wcjd/ch/index.aspx), 所有办公流程一律可以在线进行, 包括投稿、审稿、编辑、审读, 以及作者、读者、编者之间的信息反馈交流. 特别声明 本刊刊出的所有文章不代表本刊编辑部和本刊编委会的观点, 除非特别声明. 本刊如有印装质量问题, 请向本刊编辑部调换. 2010年版权归世界华人消化杂志所有
---	---	---

World Chinese Journal of Digestology

November 2010 Contents in Brief Volume 18 Number 31

EDITORIAL	3281 Common transabdominal surgical options for rectal prolapse <i>Ma SM, Wang XF, Li HS</i>
BASIC RESEARCH	3287 Plasma of individuals undergoing moxibustion has protective effects against alcohol-induced injury to human gastric epithelial cells <i>in vitro</i> <i>Hong JB, Yi SX, Huang Y, Lin YP, Du Y, Peng H, Peng Y</i> 3294 Hypoxia promotes vasculogenic mimicry formation in hepatocellular carcinoma <i>Liu WB, Xu GL, Jia WD, Li JS, Ma JL, Ge YS, Ren WH, Yu JH, Wang W, Hu Y</i> 3301 Diammonium glycyrrhizinate up-regulates the expression of Foxp3 mRNA in rats with ulcerative colitis <i>Yuan H, Cui SR, Li SG</i> 3306 Distribution of mitochondrial uncoupling protein 2 in the intestinal tract and its effect on GLP-1 secretion <i>Li ZY, Chen Y, Lin L, Kuai XY, Yu PL, Zhang HJ</i>
CLINICAL RESEARCH	3313 Viral versus alcoholic cirrhosis: clinical characteristics, prophylaxis and treatment <i>Zhou YL, Duan ZJ</i> 3320 Significance of detection of TUSC4 gene deletion in peripheral blood DNA for molecular screening and diagnosis of colorectal carcinoma <i>Pei FH, Zhao J, Du YJ, Cheng YQ, Wang XF, Chen J, Zhang HT, Liu BR, Gao SL</i>
REVIEW	3327 Advances in understanding the fine structure of gastric mucosa in patients with early gastric cancer by endoscopic imaging <i>Wang H, Liu HF</i> 3332 Advances in understanding the role of the UII/UT system in the pathogenesis of portal hypertension <i>Liu DG, Wang Y</i>
RAPID COMMUNICATION	3338 Transcatheter arterial embolization with doxycycline and lipiodol down-regulates VEGF and MMP-2 expression in implanted hepatic VX2 tumors in rabbits <i>Zheng SL, Zhang XL, Dong FR, Lei Z, Wang G, Li GC, Xu N</i> 3343 Berberine inhibits basolateral potassium current in rat colonic crypt cells <i>Yin WL, Luo HS, Han ZM</i> 3347 Mutant prevention concentrations of fluoroquinolones against <i>Helicobacter pylori</i> <i>Hu CY, Chai XZ, Zhou HQ, Wang SF</i>
CLINICAL PRACTICE	3352 Clinicopathologic and endoscopic characteristics of primary gastric malignant lymphoma: an analysis of 24 cases <i>Wang PW, Jiang HQ, Wu JJ</i> 3356 Prevalence of endoscopically detected reflux esophagitis in a high-altitude area of China: an analysis of 858 cases <i>Wang C, Wen JB, Yuan AZ, Bai DM, Yao XJ, Liu HS</i> 3359 Association of HPV16 E6 infection and TAP2 gene polymorphisms with esophageal cancer risk in a Kazakh population: a 1 : 2 matched case-control study <i>Cai JF, Ma YQ, Xu L, Zeng TX, Li F, Liao PH, Qin JM</i>

	3366 Clinical significance of VEGF expression in gastric cancer <i>Liu W, Yu YH, Ouyang XN, Wang L, Wu YM, Chen J, Xiong XS</i> 3372 Association of CCR5-59029 and IL10-819 polymorphisms with HBV infection in two Yi minority populations in Guizhou Province, China <i>Shan KR, Wang CJ, Tan K, He Y, Zhang T, Li Y, Zhao Y, Wu CX, Qi XL, Guan ZZ</i> 3378 An antibody microarray assay for screening serum biomarkers for liver cancer <i>Wu CX, Liu QM, Zhao XL, Wang F, Xu DK, He W</i>
APPENDIX	3384 Instructions to authors of World Chinese Journal of Digestology 3389 Meeting events calendar in 2010-2011
ACKNOWLEDGMENT	3390 Acknowledgments to reviewers of World Chinese Journal of Digestology
COVER	<i>Liu WB, Xu GL, Jia WD, Li JS, Ma JL, Ge YS, Ren WH, Yu JH, Wang W, Hu Y.</i> Hypoxia promotes vasculogenic mimicry formation in hepatocellular carcinoma. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2010; 18(31): 3294-3300 http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/3294.asp
RESPONSIBLE EDITORS FOR THIS ISSUE	Assistant Editor: <i>Xiao-Fang Liu</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>Wei 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 November 8, 2010

NAME OF JOURNAL

World Chinese Journal of Digestology

RESPONSIBLE INSTITUTION

Department of Science and Technology
of Shanxi Province

SPONSOR

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

EDITING

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

PRINTING

Beijing Kexin Printing House

PUBLISHING

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

OVERSEAS DISTRIBUTOR

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

HONORARY EDITOR-IN-CHIEF

Bo-Rong Pan

EDITOR-IN-CHIEF

Lian-Sheng Ma

SCIENCE EDITORS

Director: Jun-Liang Li

SUBSCRIPTION

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

CSSN

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

COPYRIGHT

© 2010 Published by *WCJD*. All rights reserved; no part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise without the prior permission of *WCJD*. Authors are required to grant *WCJD* an exclusive licence to publish.

SPECIAL STATEMENT

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

INSTRUCTIONS TO AUTHORS

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

Copyright © 2010 by Editorial Department of *World Chinese Journal of Digestology*

直肠脱垂常见的经腹术式选择

马树梅, 王晓锋, 李华山

马树梅, 王晓锋, 李华山, 中国中医科学院广安门医院肛肠科 北京市 100053
李华山, 主任医师, 主要从事肛肠疾病的防治与研究工作。
国家自然科学基金资助项目, No. 30973757
作者贡献分布: 本文选题及审校由李华山完成; 文献资料搜集由王晓锋与马树梅共同完成; 写作由马树梅完成。
通讯作者: 李华山, 主任医师, 100053, 北京市宣武区北线阁5号, 中国中医科学院广安门医院肛肠科. lihuashan@263.net
电话: 010-88001025 传真: 010-63014195
收稿日期: 2010-08-30 修回日期: 2010-09-27
接受日期: 2010-10-18 在线出版日期: 2010-11-08

Common transabdominal surgical options for rectal prolapse

Shu-Mei Ma, Xiao-Feng Wang, Hua-Shan Li

Shu-Mei Ma, Xiao-Feng Wang, Hua-Shan Li, Department of Proctology, Guang'anmen Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100053, China
Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30973757
Correspondence to: Hua-Shan Li, Department of Proctology, Guang'anmen Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, 5 Beixiang, Xuanwu District, Beijing 100053, China. lihuashan@263.net
Received: 2010-08-30 Revised: 2010-09-27
Accepted: 2010-10-18 Published online: 2010-11-08

Abstract

Rectal prolapse is a troublesome anorectal disorder. Surgical procedures for rectal prolapse contain transabdominal and transperineal approaches. There are hundreds of transabdominal procedures currently available for treatment of the disease, such as Ripstein procedure, Wells procedure, Orr procedure, Nigro procedure, anterior resection, Frykman-Goldberg procedure, and Roscoe Graham procedure. Laparoscopic repair represents the latest advance in surgical treatment of rectal prolapse. As each procedure has its strength and weakness, personalized selection of appropriate procedure can greatly improve surgical outcome. Individualized diagnosis and treatment plan may represent a new direction for transabdominal surgical treatment of rectal prolapse.

Key Words: Rectal prolapse; Transabdominal approach; Laparoscopic surgery

Ma SM, Wang XF, Li HS. Common transabdominal surgical options for rectal prolapse. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2010; 18(31): 3281-3286

摘要

直肠脱垂是肛肠科比较棘手的病症, 手术总体上有经腹和经会阴两种途径. 经腹手术方法百余种, 如经腹直肠前悬吊固定(Ripstein)术、经腹直肠后悬吊固定(Wells)术、阔筋膜直肠固定(Orr)术、耻骨直肠肌悬吊(Nigro)术、直肠前切除术(Anterior resection)、经腹直肠后固定术加左侧结肠切除(Frykman-Goldberg)术、盆底修复(Roscoe graham)术等, 腹腔镜手术显示了其最新的进展, 每一种术式都有其优缺点, 根据患者个体差异, 选择性地应用各种术式较单一使用一种术式能大大地改善结果, 个体化诊疗方案可能是今后研究的重要方向。

关键词: 直肠脱垂; 经腹手术; 腹腔镜手术

马树梅, 王晓锋, 李华山. 直肠脱垂常见的经腹术式选择. 世界华人消化杂志 2010; 18(31): 3281-3286
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/3281.asp>

0 引言

直肠脱垂是直肠、肛管、甚至部分乙状结肠移位下降和外脱的一种疾病. 多见于年轻人和老人, 常引起诸如大便失禁等痛苦的症状. 其最初病因仍旧不是很清楚, 争论也很多, 但有两种学说比较流行, 即滑动疝学说和肠套叠学说. 手术仍是治疗直肠脱垂的主要手段, 有经腹与经会阴两种途径, 但经腹手术方法超过百种, 各有优缺点, 导致临床医生选择困难, 现将常见经腹术式归纳介绍如下。

1 缝线固定术

悬吊和固定的概念最初是Pemberton和Stalker 1939年提出的. 在此术式中, 直肠被充分游离, 乙状结肠固定于前腹壁的腹膜上, 目的是维持一个向上的牵引力, 复发率较高约35%. 1959年, Cutait描述了骶前直肠缝线固定术, 进腹后, 显露直肠

■背景资料

直肠脱垂是肛肠科比较棘手的病症, 长期的完全性直肠脱垂将会导致阴部神经损伤而产生肛门失禁、溃疡、出血、狭窄及坏死的危险, 所以有关直肠脱垂的研究一直是肛肠科较为热点的问题。

■同行评议者

曹杰, 主任医师, 广州医学院附属广州市第一人民医院胃肠外科

■研发前沿

开腹手术在直肠脱垂的治疗中占据着重要地位, 选择性地应用各种术式较之单一使用一种术式能大大地改善结果, 直肠脱垂的个体化诊疗方案可能是今后研究的重点内容。

膀胱陷凹, 提起乙状结肠和直肠, 充分游离直肠至盆底和尾骨尖平面, 避开骶前神经丛和静脉丛以防损伤, 将直肠上提、拉紧、缝合固定在骶骨岬的骨膜上。

2 经腹直肠前悬吊固定术

即Ripstein术。Ripstein(1965)^[1]最初的脱垂修复是为说明在道格拉斯腔的滑动疝, 通过封闭疝囊、折叠肛提肌、用筋膜阔韧带增强这个“薄层”, 然后将直肠的两边固定在骶骨上。接着他又放弃了修复盆底的努力, 而通过使用Teflon补片完成直肠本身的悬吊。他将Teflon网带围绕直肠, 后缘固定于骶骨下的骶前筋膜上, 并与直肠前壁缝合, 避免直肠垂直接受腹腔压力。本术式适用于骶骨直肠分离或是有严重直肠内套叠者。对于直肠固定术所用的网片, 有多种类型, 如聚乙烯乙醇(Ivalon), Teflon网带, Marlex网带(Hoffman 1976改良本术式), 聚乙醇酸(polyglycolic acid), 聚丙烯(polypropylene)和polyglactin meshes等, 在获得治愈、减少脱垂率或是术后便秘的发生率方面, 研究没有显示哪一种网片更具优势。此手术不需切除肠管, 他对于大便失禁的疗效是肯定的, 但是对于严重便秘者不适合^[1], 其原因可能是直肠前方的网片会引起直肠狭窄加重便秘。本术式将直肠提高后悬吊固定于骶前筋膜, 恢复了直肠贴近骶骨的正常弧度, 手术不复杂, 复发率及手术死亡率均低, 疗效肯定。如Tjandra等^[2]报道了142例患者行此术式, 平均随访期4.2年, 复发8%, 其中1/3是在术后3-14年才出现的, 但是并发症较多。1978年Gorden收集了129位医生1 111例手术, 复发26例, 并发症183例, 最常见的并发症是粪嵌塞74例, 骶前出血29例, 狭窄20例, 盆腔脓肿17例, 小肠梗阻15例, 其余还有阳痿、瘘、网带滑脱。近年来Karagulle等^[3]报道了本术式的1例罕见的并发症: 网状物侵入直肠壁; 此例患者在手术前已经罹患直肠脱垂6年, 他的主诉是肛门及腹部不适、里急后重2年, 直肠镜检查腹部CT显示网状物已经穿透直肠壁, 进入直肠腔, 位置距离肛缘7-8 cm。

3 经腹直肠后悬吊固定术

又称Wells术, Ivalon海绵后方植入术。这最初是1959年Wells^[4]阐述的。此种术式在英国比较受欢迎。因为顾虑到前方悬吊物阻塞, 许多外科医生支持后方悬吊。Wells的术式特别选择了Ivalon海绵。术中游离直肠至肛管直肠环后壁, 部分切断直肠侧韧带, 将此海绵薄片剪成十字形, 置于骶

骨前, 缝合到骶骨凹内, 直肠上拉, 置薄片前, 缝合直肠侧壁与薄片, 前壁开放2-3 cm, 以免造成直肠狭窄、粪便嵌塞及悬吊阻塞。治疗的机制一般认为是Ivalon植入后易与组织合成一体, 在组织里, 他刺激纤维化, 产生软骨性的固定作用, 使直肠变硬, 有效防止直肠套叠形成及直肠脱垂发生^[1]。复发率及手术死亡率均较低。Erne等^[5]随访1972-1980年的34例患者, 有2例复发, 值得注目的是大便节制功能的恢复。术前60%的患者不能控制固体粪便, 而术后均能控制正常粪便, 且本随访中无一死亡。但是直肠功能明显下降、便秘及排便困难的发生率仍较高。最严重的并发症是植入薄片引起的盆腔化脓性感染, 此时海绵片成为异物, 须及时取出。另外还有骶前出血、阳痿等。Novell等^[6]随机对照了63例患者, 缝合固定(Goldberg)术组32例和Wells术组31例。两者术后发病率Goldberg术组3/32, Wells术组6/31, 便秘发生率Goldberg术组10/32, Wells术组15/31。Goldberg术组避免了外源物质引起的感染, 并能同时行结肠的部分切除, 从而改善了术后功能, 且其中期结果与传统的Wells术等同。所以, Novell认为“后者可以取消了”。Mann等^[7]报道了59例行扩大的经腹直肠后固定术。44例(75%)患者随访超过2年, 直肠脱垂全部治愈, 没有死亡。本术式可导致阳痿, 青年患者宜选其他手术。

4 阔筋膜直肠固定术

又称Orr术、直肠骶骨悬吊术。Orr等^[8]于1947年首先在4例患者身上取得了良好的结果。该术式是建立在这样的假说之上的: 直肠与周围组织固定结构松弛, 并且有较深的道格拉斯腔的存在是脱垂的病理学特征, 两者导致直肠过于活动, 以致腹部内容物对会阴部产生持续的压力。手术步骤就是首先悬吊直肠到骶骨岬, 其次是消除道格拉斯腔。用2条长10-12 cm宽1-2 cm的大腿外侧阔筋膜, 分别固定于腹膜返折处的直肠与骶岬上方筋膜, 并闭合直肠膀胱或直肠子宫陷凹。手术中需要做2个切口。1951年Levy和Johnson又报道了2例, 取得了同样好的结果。Moreno等^[9]报道了3例, 其中2例为会阴手术失败者, 亦效果显著。Loygue用尼龙网带代替阔筋膜。Portier等^[10]报道了1993-2004年的73例患者, 平均随访28.6 mo, 复发3例(4.1%), 根据患者对脱垂改善、失禁、出口梗阻的满意情况, 依次评定为3级: 治愈45例(61.6%), 好转24例(39%), 失败4例(5.5%)。说明Orr-Loygue腹部直肠固定术,

通过有限的解剖直肠前后壁、保留直肠侧韧带, 对于治疗完全性直肠脱垂或内脱垂合并大便失禁或出口梗阻者来说是安全有效的, 保留侧韧带可阻止术后便秘却不增加脱垂复发的风险. Amorotti等^[11]认为本术式还可治疗生殖器脱垂. Douard等^[12]也认为应用本术式的患者满意度很高, 节制功能改善, 尽管术后排便困难增加10%, 但并无显著意义.

5 耻骨直肠肌悬吊术

又称Nigro术. 最初是Nigro在1970年阐述的^[13]. 是用Teflon网带将直肠下端悬吊在耻骨梳上. Nigro认为由于耻骨直肠肌失去收缩作用, 不能将直肠拉向前方, 盆底缺陷加大, 肛直角消失, 直肠呈垂直位, 以致直肠脱出. 因此他主张重建直肠悬带, 用大弯钳由膀胱前间隙、向下至左侧闭孔水平、进入直肠下端左后方的直肠后间隙, 将Teflon网带中段与直肠下端后及侧方缝合固定, 并将直肠拉向前方, 松紧度要恰到好处, 最后将Teflon带缝合于耻骨梳韧带上, 重建了“肛直角”. 直肠指诊可触及此悬带, 但是没有收缩作用. Nigro报道60例, 10年随访, 均无复发, 本术式能够改善膀胱功能. 但是手术操作难度大, 需要有经验的医师进行手术. 主要并发症为出血和感染.

6 直肠前切除术、直肠乙状结肠部分切除术

即Anterior resection术. 前切除术最初是1951年Conyers等^[14]提出的, Muir^[15], Bacon, Beahrs和Hill都支持这一术式, 认为内套叠和冗长的直肠乙状结肠不合适的定位是最初的解剖学缺陷, 盆底肌薄弱和肛门括约肌松弛通常成为诱因. 手术切除了冗长脱垂的乙状结肠和直肠上段, 可拉直直肠管并且改善便秘症状, 骶前放置引流可促进纤维化和瘢痕形成, 从而固定直肠. Cirocco等^[16]对1971-1991年的41例患者行前切除术, 术后平均随访6年, 3例出现复发, 死亡率为0, 发病率是15%, 并发症包括3例切口疝, 2例小肠梗阻, 1例中风, 没有败血症、溃疡或吻合口裂开发生. 前切除术不需异物植入或是直肠悬吊, 为大家所熟悉和频繁采用的术式, 是治疗完全性直肠脱垂的重要选择, 远期效果好. 有报道称在前切除术后应用吻合器, 效果会更好^[17].

7 经腹直肠后固定术加左侧结肠切除术

即Frykman-Goldberg术, 直肠前切除术加直肠缝线悬吊固定术. 最初是由Karulf等^[18]1955年描述

的, 术中游离直肠到肛提肌, 保留充足血运, 并使直肠保持向上的张力固定于骶骨, 消除道格拉斯腔, 并间断丝线缝合直肠与盆腔内筋膜, 最后切除拉长的乙状结肠和上部直肠, 断端吻合, 并辅以直肠后固定, 加强了术后疗效, 改善了术后功能. 可能的术后并发症主要是肠梗阻、吻合口漏、骶前静脉丛大出血. Husa等^[19]报道术后30 d的死亡率是1%. 对45例患者平均随访4.3年, 复发4例(9%). 没有因为肠切除或吻合而引起的并发症. 32例失禁患者中只有2例没有改善. 肠功能习惯改善23例(56%), 尤其是那些慢性便秘者. 本术式没有植入外源物质而引起感染的危险, 尤其适用于便秘并且能够耐受经腹手术者. Solla等^[20]对于102例患者平均随访4年, 无死亡, 只4例吻合口有轻微并发症, 复发率是1.9%. 该术式临床效果良好, 复发率低, 一般对耐受良好的患者列为首选, 正被外科医生越来越多地应用.

8 盆底修复术

即Roscoe graham术. Graham^[21]1942年创建了此种手术, 他观察了3例, 脱垂长度均>6英寸. 其引用Moschcowitz(1912)的观点: “脱垂复位后, 检查者手指于肛内低位直肠的前壁加压, 同时令患者用力, 脱垂不再, 然而, 如果, 加压力于直肠后壁, 脱垂马上发生.” 结论是直肠脱垂是直肠前壁的滑动疝. 根据这一理论, Graham认为该病治疗原则是移除疝囊, 修补肠壁的解剖缺陷. 解剖缺陷是盆底筋膜, 就像腹股沟直疝. 因此, 必须重建正常的盆底筋膜与直肠壁的关系, 消除腹膜疝囊, 开腹是必要的. 手术步骤: Trendelenburg联合体位, 脊椎麻醉, 左下腹直肌外侧切口, 压紧的纱布垫将小肠推开. 术中注意两点: 一是道格拉斯腔(或是直肠膀胱陷凹)较正常结构深, 二是过度活动的直肠与乙状结肠由于其系膜增长, 已经失去了和骶骨的正常的紧密关系. 卵圆钳将纱布置于道格拉斯腔(或是直肠膀胱陷凹)的底部, 给予向下的压力通过直肠前壁进入直肠腔, 这样盆底肌群的薄弱环节就可以被触诊到. 此检查通过肛门也容易操作. 接着将直乙交界处向上牵引, 开放道格拉斯腔(或是直肠膀胱陷凹), 切除多余的腹膜脂肪组织, 分离输尿管, 并予以保护. 进一步游离直肠, 可以见到精囊腺. 向上提拉直肠, 置于前列腺后方. 间断丝线缝合两侧耻骨直肠肌筋膜, 重建盆底腹膜, 直到直肠回复到骶骨凹弯曲内. 然后关腹, 不需放置引流.

■相关报道

Raftopoulos等对643例成人完全性直肠脱垂经腹手术后复发率进行长期多中心随访观察, 发现术后1年平均复发率为1.06%, 5年为6.61%, 10年为28.92%.

■创新盘点

本文所涉及的内容基本涵盖了目前国内外经腹治疗直肠脱垂的手术方式,腹腔镜手术显示了其最新的进展,对临床实践有一定的借鉴意义。

回病房后,患者保持不活动状态,脚高位10英寸,保留1 wk. 少渣饮食. 控制排便7-10 d. 嘱患者锻炼收缩肛门括约肌,每日数次,以恢复肌肉弹性。

9 Devadhar术

许多治疗直肠脱垂的术式都是根据滑动疝理论来实施的,着重于直肠的固定与切除,并将其作为治愈的方法. Mehendale等^[22]发表了其根据肠套叠理论治疗直肠脱垂25年的经验一文,该文中描述了术式:患者仰卧位. 椎管麻醉下于骨盆两缘之间男性膀胱或女性宫颈的后面腹膜表面做一横切口,切除直肠膀胱陷凹的腹膜,用一钳子将直肠前壁反复推动刺激脱垂,找到脱垂最大处即为脱垂起始点,标记为“关键点”. 以关键点为中心,以该点和脱垂的最低点之间的距离为半径,顺时针方向环状缝合直肠前、侧壁. 该环使直肠反向套叠,助手向肠腔内上推动直肠壁,医生收紧环状缝线. 从紧线点之上至直肠前、侧壁尽可能低的距离纵向折叠缝合,重建盆底腹膜,消除道格拉斯腔. 此术式避免了分离骶前间隙,因此泌尿及性功能紊乱的危险性较小. 所报道的72例患者,唯一的并发症是黏膜脱垂,有3例,随访期3-48(平均10) mo,所有的40例男性中无1例发生勃起功能障碍、逆行射精. 2例复发直肠脱垂,4例患者仍有便秘. 他们的研究例数虽然很大,囊括了72例患者,但是随访期太短,不能准确的判断真正的复发率。

10 腹腔镜手术

在直肠脱垂治疗的进化中,腹腔镜手术(laparoscopic surgery)是最新的进展. 随着腹腔镜手术广泛应用于外科临床,国外腹腔镜手术治疗直肠脱垂报道较多,出现了直肠、结肠切除术,直肠缝线固定术及直肠悬吊术多种方法. 支持这种术式的人认为,腹腔镜手术具有技术操作简单、患者舒适、术中出血少、术后肠功能恢复快、美容、住院时间短、并发症少等诸多优点. 腹腔镜直肠固定术和切除固定术治疗脱垂的结果都很好,在年老体弱者身上都能安全实施. 腹腔镜术式缩短了住院期,老年人耐受良好^[23]. Kariv等^[24]收集了1991-12/2004-04所有与腹腔镜修复(laparoscopic repair, LR)有关的直肠脱垂手术期间的数据,86个患者配对,分别施以LR和开放性经腹修复(open abdominal repair, OR),进行病例对照研究. 结果显示:LR组较之OR组住院期短,在平均5年的随访期内两组的功能结果和直肠全层脱垂复发相似. 个别报道腹腔镜缺点

主要是手术时间长,手术效果受术者技术水平影响较大. 现在,只能获得有限的技术支持这些主张,较少的数据尚未能评估长期复发率和功能结果. 腹腔镜修复直肠脱垂,结合了开放性腹部手术疗效好和微创手术并发症低的双重优点,很有可能代表了未来直肠脱垂经腹手术的发展方向,但仍旧是一个未被证明的希望,在被广泛接受之前值得进一步研究。

11 结论

直肠脱垂仍是一个较为棘手的问题,因其发病是多种因素综合作用的结果,尚没有明确有效的治疗方式选择,手术仍是目前治愈本病的主要手段,手术的基本原则大体包括6点^[25]: (1)切除脱垂的冗长肠管; (2)缩小肛门; (3)重建或加强盆底; (4)经腹悬吊或固定脱垂肠管; (5)消除道格拉斯腔; (6)修补会阴滑动疝. Theuerkauf等^[26]综合了各种手术治疗直肠脱垂的结果(表1). 手术方式的多样性恰恰也证明了没有一种方法适合于所有的患者,对于每一种方法的优劣的评价需要大量的随机对照试验来证明. Raftopoulos等^[27]对643例成人完全性直肠脱垂经腹手术后复发率进行长期多中心随访观察,发现术后1年平均复发率为1.06%,5年为6.61%,10年为28.92%. 且不同的医疗单位、手术入路、手术方法、手术技巧等对术后复发率均无显著影响. 经腹手术不仅复发率低,而且为功能的改善提供了更大的机会,对于年轻体强的患者是理想的. 缝合固定和网片直肠固定术效果相当. 但是, Ivalon海绵直肠固定术增加了感染并发症的危险,在很大程度上被遗弃了. 在直肠固定术时加上切除术的好处是减少了便秘,降低了复发率. 然而,腹部手术需游离或固定直肠、或切除结肠、或二者均有,故并发症相对较高,如感染、吻合口漏、死亡率等相对增高^[28]. 腹腔镜直肠固定术和开放性直肠固定术有相似的结果,并有着腹腔镜手术的所有优点,很有可能代表了未来直肠脱垂经腹手术的发展方向. 对于直肠脱垂复发的患者, Pikarsky等^[29]认为术式选择与初发者可以相同,同样的外科术式对于两种情况都有效,两组在死亡率、平均住院时间、吻合口并发症、吻合口漏、伤口感染、术后失禁评分、复发率等方面都没有显著差别. Marzouk等^[30]将直肠脱垂分为低位型(真正脱垂)和高位型(乙状结肠和固定的低位直肠的套叠). 标准是通过简单的临床试验-数字化评估低位直肠的固定性,来选择术

表 1 文献中各种手术治疗直肠脱垂

手术方式	治疗人数		随访人数	
	总数(n)	死亡n(%)	总数(n)	复发n(%)
Moschcowitz直肠膀胱(子宫)陷凹封闭	128	3(3.0)	115	55(47.8)
Rectosigmoidectomy直肠乙状结肠切除	507	3(0.6)	404	165(40.8)
Graham经腹加固肛提肌	217	6(8.0)	213	17(8.0)
Dunphy直肠乙状结肠切除+悬吊固定腹会阴二期手术	29	0(0.0)	29	1(3.4)
Altemeier经会阴直肠乙状结肠切除	54	0(0.0)	54	2(3.7)
Including Mayo Clinic series	68	0(0.0)	67	7(10.4)
Delorme经会阴直肠黏膜环形切除术	336	8(4.0)	328	82(25.0)
Nigro(levator sling)直肠耻骨梳悬吊	5	0(0.0)	5	0(0.0)
Pemberton直肠乙状结肠固定在侧腹壁	179	1(0.6)	149	19(18)
Including Mayo Clinic series	250	1(0.4)	217	41(18.9)
Kummel	1 029	13(1.3)	591	73(14.0)
Orr阔筋膜直肠固定术	62	0(0.0)	60	3(5.0)
Anterior resection经腹前切除术	174	3(1.7)	170	6(3.5)
Including Mayo Clinic series	202	4(0.0)	197	7(3.6)
Devadhar根据肠套叠理论治疗	28	1(3.6)	27	0(0.0)
Ripstein直肠前悬吊术	128	1(0.8)	127	0(0.0)
Wells(Ivalon)埃维龙海绵后方悬吊术	109	4(3.7)	105	2(1.9)
合计	3 505	48	2 858	480

■同行评价

本文内容全面, 科学性较好, 对临床有较好的指导意义。

式。如, 低位型脱垂选择会阴术式是比较合适的(Delorme术式或直肠乙状结肠切除术加或不加盆底修复), 而高位型脱垂可以考虑选择经腹直肠固定术加或不加前切除术。Marzouk等回顾分析了6年间治疗的病例, 会阴术式复发率6%, 经腹术式0%。所以他们认为通过这种简单的试验和分类, 可以更好的选择术式, 并将麻醉、外科风险降到最小, 会取得更低的复发率。

在我国直肠脱垂的治疗中, 注射疗法具有较为广泛的运用, 特别是消痔灵注射治疗成人完全性直肠脱垂^[31,32], 采取双层四步注射疗法或直肠周围注射法, 或注射配合PPH术, 肛门紧缩术, 均取得了较好的疗效。但是, 开腹手术在直肠脱垂的治疗中仍占据着重要地位, 选择性地应用各种术式较之单一使用一种术式能大大地改善结果, 直肠脱垂的个体化诊疗方案可能是今后研究的重点内容。

12 参考文献

- Madoff RD, Mellgren A. One hundred years of rectal prolapse surgery. *Dis Colon Rectum* 1999; 42: 441-450
- Tjandra JJ, Fazio VW, Church JM, Milsom JW, Oakley JR, Lavery IC. Ripstein procedure is an effective treatment for rectal prolapse without constipation. *Dis Colon Rectum* 1993; 36: 501-507
- Karagulle E, Yildirim E, Turk E, Akkaya D, Moray G. Mesh invasion of the rectum: an unusual late complication of rectal prolapse repair. *Int J Colorectal Dis* 2006; 21: 724-727
- Wells C. New operation for rectal prolapse. *Proc R Soc Med* 1959; 52: 602-603
- Erne P, Bissat A, Streuli HK. [Management of rectal prolapse by rectal mobilization and fixation with Ivalon sponge] *Schweiz Med Wochenschr* 1981; 111: 793-795
- Novell JR, Osborne MJ, Winslet MC, Lewis AA. Prospective randomized trial of Ivalon sponge versus sutured rectopexy for full-thickness rectal prolapse. *Br J Surg* 1994; 81: 904-906
- Mann CV, Hoffman C. Complete rectal prolapse: the anatomical and functional results of treatment by an extended abdominal rectopexy. *Br J Surg* 1988; 75: 34-37
- Orr TG. A Suspension Operation for Prolapse of the Rectum. *Ann Surg* 1947; 126: 833-837
- Moreno AH, Villamil EJ, Petrone C, Galvaliz CA. The treatment of rectal prolapse by the Orr operation. *Ann Surg* 1955; 142: 957-960
- Portier G, Iovino F, Lazorthes F. Surgery for rectal prolapse: Orr-Loygue ventral rectopexy with limited dissection prevents postoperative-induced constipation without increasing recurrence. *Dis Colon Rectum* 2006; 49: 1136-1140
- Amorotti C, Mosca D, Di Blasio P, Trenti C. [Rectal prolapse. Functional results after the Orr-Loygue's rectopexy technique] *Chir Ital* 2003; 55: 399-405
- Douard R, Frileux P, Brunel M, Attal E, Turet E, Parc R. Functional results after the Orr-Loygue transabdominal rectopexy for complete rectal prolapse. *Dis Colon Rectum* 2003; 46: 1089-1096
- Nigro ND. A sling operation for rectal prolapse. *Proc R Soc Med* 1970; 63 Suppl: 106-107
- Conyers CL, Cullen PK Jr. Correction of rectal prolapse by anterior resection. *West J Med* 1974; 121: 270-273
- Muir EG. Rectal prolapse. *Proc R Soc Med* 1955; 48:

- 33-44
- 16 Cirocco WC, Brown AC. Anterior resection for the treatment of rectal prolapse: a 20-year experience. *Am Surg* 1993; 59: 265-269
- 17 Marecik SJ, Chaudhry V, Pearl R, Park JJ, Prasad LM. Single-stapled double-pursestring anastomosis after anterior resection of the rectum. *Am J Surg* 2007; 193: 395-399
- 18 Karulf RE, Madoff RD, Goldberg SM. Rectal prolapse. *Curr Probl Surg* 2001; 38: 771-832
- 19 Husa A, Sainio P, von Smitten K. Abdominal rectopexy and sigmoid resection (Frykman-Goldberg operation) for rectal prolapse. *Acta Chir Scand* 1988; 154: 221-224
- 20 Solla JA, Rothenberger DA, Goldberg SM. Colonic resection in the treatment of complete rectal prolapse. *Neth J Surg* 1989; 41: 132-135
- 21 Graham RR. Operative repair of massive rectal prolapse. *Ann Surg* 1942; 115: 1007-1014
- 22 Mehendale VG, Chaudhari NC, Shenoy SN, Shah SB. Devadhar's operation for complete rectal prolapse: 25 years' experience. *Indian J Gastroenterol* 2005; 24: 9-11
- 23 Carpelan-Holmström M, Kruuna O, Scheinin T. Laparoscopic rectal prolapse surgery combined with short hospital stay is safe in elderly and debilitated patients. *Surg Endosc* 2006; 20: 1353-1359
- 24 Kariv Y, Delaney CP, Casillas S, Hammel J, Nocero J, Bast J, Brady K, Fazio VW, Senagore AJ. Long-term outcome after laparoscopic and open surgery for rectal prolapse: a case-control study. *Surg Endosc* 2006; 20: 35-42
- 25 Altmeier WA, Culbertson WR, Schowengerdt C, Hunt J. Nineteen years' experience with the one-stage perineal repair of rectal prolapse. *Ann Surg* 1971; 173: 993-1006
- 26 Theuerkauf FJ Jr, Beahrs OH, Hill JR. Rectal prolapse. Causation and surgical treatment. *Ann Surg* 1970; 171: 819-835
- 27 Raftopoulos Y, Senagore AJ, Di Giuro G, Bergamaschi R. Recurrence rates after abdominal surgery for complete rectal prolapse: a multicenter pooled analysis of 643 individual patient data. *Dis Colon Rectum* 2005; 48: 1200-1206
- 28 Madiba TE, Baig MK, Wexner SD. Surgical management of rectal prolapse. *Arch Surg* 2005; 140: 63-73
- 29 Pikarsky AJ, Joo JS, Wexner SD, Weiss EG, Nogueras JJ, Agachan F, Iroatulam A. Recurrent rectal prolapse: what is the next good option? *Dis Colon Rectum* 2000; 43: 1273-1276
- 30 Marzouk D, Ramdass MJ, Haji A, Akhtar M. Digital assessment of lower rectum fixity in rectal prolapse (DALR): a simple clinical anatomical test to determine the most suitable approach (abdominal versus perineal) for repair. *Surg Radiol Anat* 2005; 27: 414-419
- 31 李华山, 李国栋, 李东冰, 王春晓, 景建中, 寇玉明, 张建华, 胡占岭. 消痔灵双层四步注射治疗成人完全性直肠脱垂临床疗效评价-附36例报告. 首都医科大学学报 2006; 27: 789-791
- 32 李华山, 王晓锋, 李国栋, 李东冰, 马树梅, 王阶. 消痔灵注射治疗完全性直肠脱垂. 中华临床医师杂志(电子版) 2008; 2: 1181-1183

编辑 李薇 电编 何基才

ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) CN 14-1260/R 2010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)

艾灸血浆对乙醇损伤的人胃黏膜上皮细胞的影响

洪金标, 易受乡, 黄芸, 林亚平, 杜燕, 彭宏, 彭艳

洪金标, 易受乡, 黄芸, 林亚平, 杜燕, 彭宏, 彭艳, 湖南中医药大学针灸推拿学院 经穴与脏腑相关重点实验室 湖南省长沙市 410007

洪金标, 深圳市中医院推拿科 广东省深圳市 518033

洪金标, 博士研究生, 主要从事针灸治病机制的研究。

国家自然科学基金资助项目, No. 30772707

教育部博士点科学基金资助项目, No. 20070541003

作者贡献分布: 洪金标与易受乡对本文所作贡献均等; 此课题设计由易受乡指导洪金标完成; 研究过程由洪金标、黄芸、杜燕、彭宏及彭艳操作完成; 研究所用新试剂及分析工具由林亚平提供; 数据分析由洪金标与黄芸完成; 本论文写作由洪金标与易受乡完成。

通讯作者: 易受乡, 教授, 410007, 湖南省长沙市, 湖南中医药大学针灸推拿学院, yishouxian@yahoo.com.cn

收稿日期: 2010-08-16 修回日期: 2010-09-06

接受日期: 2010-09-13 在线出版日期: 2010-11-08

Plasma of individuals undergoing moxibustion has protective effects against alcohol-induced injury to human gastric epithelial cells *in vitro*

Jin-Biao Hong, Shou-Xiang Yi, Yun Huang, Ya-Ping Lin, Yan Du, Hong Peng, Yan Peng

Jin-Biao Hong, Shou-Xiang Yi, Yun Huang, Ya-Ping Lin, Yan Du, Hong Peng, Yan Peng, Key Laboratory of Meridians and Viscera, College of Acupuncture and Massage, Hunan University of Traditional Chinese Medicine, Changsha 410007, Hunan Province, China

Jin-Biao Hong, Department of Manipulation, Shenzhen Hospital of Traditional Chinese Medicine, Shenzhen 518033, Guangdong Province, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30772707; and the PhD Programs Foundation of Ministry of Education of China, No. 20070541003

Correspondence to: Professor Shou-Xiang Yi, College of Acupuncture and Massage, Hunan University of Traditional Chinese Medicine, Changsha 410007, Hunan Province, China. yishouxian@yahoo.com.cn

Received: 2010-08-16 Revised: 2010-09-06

Accepted: 2010-09-13 Published online: 2010-11-08

Abstract

AIM: To investigate whether plasma of individuals undergoing moxibustion has protective effects against ethanol-induced injury to human gastric epithelial cells (GES-1).

METHODS: Isolated GES-1 cells were divided into four groups: control group, ethanol injury group, test plasma group (plasma from individ-

uals undergoing moxibustion at specific points), and control plasma group (plasma from individuals undergoing moxibustion at non-specific points). Before and after moxibustion at Zusanli, Zhongwan, Guanyuan or non-specific points, blood plasma was prepared. Cells of the ethanol injury group, test plasma group, and control plasma group were treated with 8% ethanol to induce cell injury. After injured cells were incubated with plasma, cell growth was measured by MTT assay; the contents of LDH, SOD and MDA in culture supernatants were determined by colorimetric assay; and cell cycle progression and apoptosis were detected by flow cytometry.

RESULTS: Compared with the control group, A_{490} value significantly decreased ($P < 0.01$) and the reduced rate of cell growth increased in the ethanol injury group. Compared with the ethanol injury group, both A_{490} value ($P < 0.01$) and the reduced rate of cell growth decreased significantly in the test plasma group. The reduced rate of cell growth was significantly higher in the control plasma group than in the test plasma group (26.52% vs 22.06%). Compared with the control group, the contents of LDH, MDA and SOD increased in the ethanol injury group (all $P < 0.01$ or 0.05). Compared with the ethanol injury group, an increase in SOD content ($P < 0.01$) and a decrease in LDH and MDA contents (both $P < 0.01$) were noted in the test plasma group. SOD content decreased ($34.11 \text{ kU/L} \pm 4.14 \text{ kU/L}$ vs $38.73 \text{ kU/L} \pm 4.34 \text{ kU/L}$, $P < 0.05$) and LDH and MDA levels increased ($9.26 \text{ U/L} \pm 1.62 \text{ U/L}$ vs $7.38 \text{ U/L} \pm 1.28 \text{ U/L}$; $3.91 \text{ } \mu\text{mol/L} \pm 0.11 \text{ } \mu\text{mol/L}$ vs $3.75 \text{ } \mu\text{mol/L} \pm 0.11 \text{ } \mu\text{mol/L}$, both $P < 0.05$) in the control plasma group compared with the test plasma group. No significant difference was noted in cell cycle progression between the two plasma treatment groups (all $P > 0.05$) though the apoptosis rate was higher in the control plasma group than in the test plasma group ($1.56\% \pm 0.19\%$ vs $1.24\% \pm 0.08\%$, $P < 0.01$).

CONCLUSION: Plasma of individuals undergoing moxibustion at Zusanli, Zhongwan and Guanyuan has protective effects against alcohol-induced injury to human gastric epithelial cells.

■背景资料

急性胃黏膜损伤是机体在应激状态下或胃黏膜接触某些有害物质引起的急性胃肠黏膜炎症、糜烂和出血的统称。目前认为其损伤的产生与胃黏膜自身保护作用的减弱与保护/防御性因素失衡密切相关。大量研究证实艾灸对胃黏膜损伤具有抑制作用, 他不仅能抗损伤, 还能促进溃疡修复和愈合。

■同行评议者

王富春, 教授, 长春中医药大学针灸推拿学院

■ 研发前沿

艾灸预处理能诱导HSP70的产生,对胃黏膜损伤有抑制作用。针灸血清的研究已成为近期针灸界研究热点,有人认为:“针灸血清”之所以具有和药物相类似的作用,关键在于刺激腧穴后,可通过机体内在生理调节机制,引起血清中活性物质的产生,进而实现对脏腑器官的调节作用。艾灸相关穴位后提取的血浆对胃黏膜细胞是否具有保护作用?其作用机制如何,有待进一步研究。

Key Words: Moxibustion; Human gastric epithelial cell; Apoptosis; Lactate dehydrogenase; Malondialdehyde; Superoxide dismutase

Hong JB, Yi SX, Huang Y, Lin YP, Du Y, Peng H, Peng Y. Plasma of individuals undergoing moxibustion has protective effects against alcohol-induced injury to human gastric epithelial cells *in vitro*. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(31): 3287-3293

摘要

目的: 探讨艾灸血浆对乙醇损伤的离体人胃黏膜上皮细胞(GES-1)的保护作用。

方法: 将离体胃黏膜上皮细胞(GES-1)分为4组,即空白组、乙醇损伤模型组、艾灸穴位血浆组和艾灸非穴位血浆组。艾灸人体足三里、中脘、关元穴及非穴对照点前后提取并制备艾灸前后的血浆。以含8%乙醇培养液作用于后3组胃黏膜上皮细胞,建立胃黏膜上皮细胞损伤模型。各组分别加入预先提取的灸前血浆、艾灸穴位血浆和艾灸非穴位血浆。采用MTT法检测细胞抑制率,比色法检测细胞培养上清液中液乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)、丙二醛(malondialdehyde, MDA)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)的含量,流式细胞技术检测细胞周期及细胞凋亡率。

结果: 模型组与空白组比较,细胞 A_{490} 降低($P<0.01$),抑制率明显上升;与模型组比较,艾灸穴位血浆组 A_{490} 升高($P<0.01$),细胞抑制率降低;艾灸非穴位血浆组 A_{490} 低于艾灸穴位血浆组 A_{490} ($P<0.01$),而细胞抑制率高于艾灸穴位血浆组(26.52% vs 22.06%)。与空白组比较,模型组培养液中LDH、MDA、SOD含量均有所提高($P<0.01$ 或 0.05);艾灸穴位血浆组与模型组比较, SOD水平升高($P<0.01$), LDH、MDA含量降低(均 $P<0.01$);艾灸非穴位血浆组与艾灸穴位血浆组比较, SOD水平下降($34.11 \text{ kU/L} \pm 4.14 \text{ kU/L}$ vs $38.73 \text{ kU/L} \pm 4.34 \text{ kU/L}$, $P<0.05$), LDH和MDA水平升高($9.26 \text{ U/L} \pm 1.62 \text{ U/L}$ vs $7.38 \text{ U/L} \pm 1.28 \text{ U/L}$; $3.91 \mu\text{mol/L} \pm 0.11 \mu\text{mol/L}$ vs $3.75 \mu\text{mol/L} \pm 0.11 \mu\text{mol/L}$, 均 $P<0.05$)。艾灸非穴血浆组与艾灸穴位血浆组比较,细胞周期中各期无明显差异(均 $P>0.05$),凋亡率升高($1.56\% \pm 0.19\%$ vs $1.24\% \pm 0.08\%$, $P<0.01$)。

结论: 艾灸足三里、中脘、关元穴后提取的人体血浆对受损人胃黏膜细胞具有一定的保护作用。

关键词: 艾灸血浆; 人胃黏膜上皮细胞; 细胞凋亡;

乳酸脱氢酶; 丙二醛; 超氧化物歧化酶

洪金标, 易受乡, 黄芸, 林亚平, 杜燕, 彭宏, 彭艳. 艾灸血浆对乙醇损伤的人胃黏膜上皮细胞的影响. *世界华人消化杂志* 2010; 18(31): 3287-3293

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/3287.asp>

0 引言

急性胃黏膜损伤是机体在应激状态下或胃黏膜接触某些有害物质引起的急性胃肠黏膜炎症、糜烂和出血的统称。表现为: 黏膜充血、水肿、糜烂、坏死、脱落、浅表溃疡形成。常见的胃黏膜损伤因子有胃酸和胃蛋白酶、幽门螺杆菌、药物、应激、乙醇、手术等。目前认为其损伤的产生与胃黏膜自身保护作用的减弱与保护/防御性因素失衡密切相关^[1]。大量研究证实艾灸对胃黏膜损伤具有保护作用, 他不仅能抗损伤, 还能促进溃疡修复和愈合^[2,3]。本课题组以往的研究证实艾灸预处理能诱导热休克蛋白70(heat shock protein 70, HSP70)的产生, 抑制和减轻乙醇所诱发的胃黏膜细胞凋亡, 对胃黏膜损伤有保护作用^[4]。近年来“针灸血清”研究方法的提出为直接观察针灸对离体细胞、组织等的影响提供了重要的思路及方法^[5]。本研究采用艾灸足三里、中脘、关元穴后提取的血浆作用于乙醇损伤的人胃黏膜GES-1细胞, 以细胞抑制率、细胞培养上清液乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)、丙二醛(malondialdehyde, MDA)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、细胞周期及凋亡率等为指标。观察艾灸血浆对乙醇造成的离体胃黏膜上皮细胞(GES-1)损伤的干预效应, 进一步在细胞水平上揭示艾灸对胃黏膜细胞保护的作用原理。

1 材料和方法

1.1 材料 DMEM高糖(Gibco, USA)、小牛血清(湘雅医学院实验中心自制)、青/链霉素双抗(华北制药厂)、胰蛋白酶(Gibco, USA)、EDTA(Sigma, USA)、磷酸盐缓冲液PBS(鼎国, 北京)、MTT(Sigma, USA)、DMSO(Sigma, USA)、LDH(中生北控, 北京)、SOD(建成, 南京)、MDA(建成, 南京)、碘化丙啶(PI, Sigma, USA)、18 mm×200 mm温灸纯艾条(汉医牌, 南阳)、无水乙醇(国产分析纯)、细胞培养板(Corning costar, USA)、CO₂培养箱(三洋, 日本)、倒置显微镜(重庆光学仪器厂)、酶标仪(TECAN, 奥地利)、流式细胞仪(COULTER EP-

ICS XL, USA). 人胃黏膜上皮细胞(GES-1)购自湘雅医学院实验中心.

1.2 方法

1.2.1 艾灸血浆来源及制备: (1)血浆来源: 湖南中医药大学在校健康大学生24名(男女各半), 年龄18-25岁, 排除月经周期、妊娠或哺乳期女性. 经常规体检及血尿常规检查无异常, 愿意接受本实验方案; (2)艾灸对象及分组: 24名学生随机分为艾灸穴位组及艾灸非穴位组, 每组12名(男女各半); (3)取穴(非穴位)及定位: 艾灸穴位组取中脘、关元和足三里穴, 穴位定位参照第6版《针灸学》教材. 非穴位组取平行于中脘、关元穴右侧3寸非穴位点, 及平行于足三里穴内侧1寸非穴位点; (4)艾灸方法: 艾灸穴位组: 采用艾条温和灸中脘、关元及双侧足三里穴共4穴; 艾灸非穴位组: 同法灸对应非穴位4点, 两组均每日灸30 min, 连续灸10 d后. 于艾灸前及艾灸后(第11天)早上7点至8点抽取空腹静脉血; (5)血浆制备: 使用真空负压采血管采取空腹静脉血8 mL, 按10:1比例加入1.5% EDTA抗凝, 离心(3 000 r/min, 15 min), 每例吸取血浆1 mL, 将艾灸前后所得血浆按组别分别等量混合分装, -80 °C保存.

1.2.2 GES-1细胞培养及细胞损伤造模: 细胞培养: GES-1细胞株用含100 mL/L小牛血清的DMEM高糖培养基于标准CO₂培养箱中常规培养2-3 d, 约90%满瓶时传代. 细胞损伤模型的制作: 以含8%乙醇浓度的培养液作用胃黏膜上皮细胞3 h, 造成胃黏膜上皮细胞损伤, 经MTT检测使细胞抑制率达到30%左右.

1.2.3 细胞分组及处理: 将实验细胞分为: 空白组, 模型组, 艾灸穴位血浆处理组, 艾灸非穴位血浆处理组. 处理过程如下: 第1步, 取对数生长中期细胞, 调整细胞密度为 4×10^4 /mL, 按照每孔3 mL接种入6孔板, 置于37 °C、50 mL/L CO₂培养箱中常规培养48 h, PBS洗2次, 用不完全培养基同步24 h, PBS洗2次. 第2步, 将GES-1细胞分为以上4组, 每组12孔. 空白组加入完全培养基3 mL培养3 h后, 吸弃培养基, PBS洗2次; 其他3组加入含8%乙醇培养基3 mL培养3 h后, 吸弃培养基, PBS洗2次. 第3步, 空白、模型组加入含10%艾灸前人体血浆DMEM培养液3 mL; 其他2组分别加入含10%艾灸穴位血浆及含10%艾灸非穴位血浆培养基3 mL. 各组细胞于37 °C CO₂培养箱中培养24 h后收集上清液及细胞.

1.2.4 观察指标: 细胞抑制率: 每组随机取5个复孔细胞, 用MTT法检测细胞抑制率. 各组细胞经

分别处理后加入完全培养基100 μ L于37 °C CO₂培养箱中培养3 h后, 每孔加入MTT溶液20 μ L, 于37 °C CO₂培养箱中培养4 h; 吸弃上清液, 加入DMSO 150 μ L, 振荡10 min以溶解结晶; 用酶标仪在490 nm波长处读取光密度值 A_{490} . 测定前以空白孔调零, 以不含乙醇培养细胞作为对照. 细胞抑制率的计算公式为: 细胞抑制率(%) = $[1 - \text{实验孔光密度} A_{490} / \text{对照孔光密度} A_{490}] \times 100\%$; LDH、MDA、SOD检测: 实验结束后收集各组细胞培养上清液, -20 °C保存. 每组随机取8个样本分别用化学比色法、TBA法及羟胺法检测LDH、MDA、SOD含量; 细胞凋亡和细胞周期采用流式细胞仪检测: (1)每组随机选取4孔板细胞移入离心管; (2)3 000 r/min, 离心10 min, 吸弃上清液; (3)每管2 mL PBS洗涤, 2 500 r/min, 离心5 min, 弃上清液, 重复2次; (4)向离心管中加入500 μ L 70%冰乙醇, 重悬细胞, 移入1.5 mL EP管, 再以500 μ L 70%冰乙醇洗涤离心管后移入EP管, 得1 mL样本液; (5)将细胞固定在4 °C、24 h以上; (6)染色: 将固定后的细胞用PBS洗2遍(3 000 r/min, 1 min). 加入100 μ L PBS, 0.66 μ L RNaseA(1 g/L), 37 °C孵育30 min. 加入0.4 mL 50 mg/L PI, 避光染色20 min; (7)用COULTER流式细胞仪检测细胞周期及凋亡率, 每份样品获取 10^4 以上细胞, 分析细胞周期中G₁期、S期以及G₂/M期所占的比值及细胞凋亡率, MCYCLE软件分析结果.

统计学处理 采用SPSS16.0统计软件进行处理. 组间比较, 符合正态分布者, 采用单因素方差分析(One-way ANOVA), 方差齐者用LSD或SNK法, 方差不齐者用Tamhane's T2或Dunnett's T3法; 不符合正态分布, 采用多个独立样本比较的秩和检验(K Independent Samples).

2 结果

2.1 艾灸血浆对受损胃黏膜上皮细胞抑制率的影响 模型组与空白组比较, A_{490} 明显下降($P < 0.01$), 细胞抑制率上升; 艾灸穴位血浆组与模型组比较, A_{490} 上升($P < 0.01$), 细胞抑制率下降; 艾灸非穴位血浆组与艾灸穴位血浆组比较, A_{490} 下降($P < 0.05$), 细胞抑制率高于艾灸穴位血浆组(表1).

2.2 艾灸血浆对受损胃黏膜上皮细胞上清液中LDH、SOD、MDA含量的影响 模型组与空白组比较, LDH、MDA、SOD均有所提高($P < 0.01$ 或 < 0.05); 艾灸穴位血浆组与模型组比较, 上清液中SOD水平升高($P < 0.01$), LDH、MDA含量降低(均 $P < 0.01$); 艾灸非穴位血浆组与艾灸穴位血

■相关报道

王东生等对大黄蟪虫丸含药血浆与血清进行比较, 发现含药血浆抑制血小板聚集作用显著优于含药血清.

■创新盘点

本研究采用艾灸相关腧穴后提取的血浆作为处理因素,以离体人胃黏膜上皮细胞GES-1为受试对象,观察了艾灸血浆对乙醇所致的人胃黏膜上皮细胞损伤的干预效应,发现艾灸血浆能减轻细胞抑制率,抑制胃黏膜细胞凋亡、缩短G₁期,减少LDH及MDA漏出,在细胞水平上揭示了艾灸对胃黏膜细胞的保护作用。

表 1 艾灸血浆对损伤GES-1细胞光密度及抑制率的影响 (mean ± SD, n = 5)

分组	A ₄₉₀	抑制率(%)
空白组	0.547 ± 0.004	6.77
模型组	0.417 ± 0.004 ^b	29.04
艾灸穴位血浆组	0.458 ± 0.004 ^f	22.06
艾灸非穴位血浆组	0.431 ± 0.005 ^c	26.52

^bP<0.01 vs 空白组; ^cP<0.05 vs 艾灸穴位血浆组; ^fP<0.01 vs 模型组。

浆组比较, SOD水平下降(P<0.05), LDH和MDA水平升高(均P<0.05, 表2)。

2.3 艾灸血浆对受损胃黏膜上皮细胞周期及凋亡率的影响 模型组与空白组比较, GES-1细胞周期中, 模型组的G₁期占比及凋亡率提高(均P<0.01), S、G₂/M期占比下降(均P<0.01); 艾灸穴位血浆组与模型组比较, G₁期占比及凋亡率明显下降(均P<0.01), S、G₂期占比提高(均P<0.01); 艾灸非穴血浆组与艾灸穴位血浆组比较, 细胞周期各期占比无明显差异(均P>0.05), 凋亡率升高(P<0.01, 表3)。

3 讨论

中医学认为艾属温性, 其味芳香, 善通十二经脉, 具有散寒通络、回阳固脱、行气活血、防病保健等作用。《医学入门》提出: “凡一年四季各熏一次, 元气坚固, 百病不生”。现代研究表明艾灸时产生的近红外辐射具有较高的穿透能力, 其药性可通过体表穴位渗透诸经, 起到治疗和预防疾病的作用。

研究报道^[6]艾灸具有镇痛, 改善血循环, 调整代谢紊乱, 调节免疫功能等作用。在临床实践中对消化系统疾病有着良好的治疗效应^[7], 实验研究也证明艾灸有明显减轻胃黏膜损伤的作用^[4]。本课题组在艾灸对胃黏膜保护作用方面进行了长期大量的研究, 分别从艾灸对胃黏膜血流量的影响、对内源性保护因子前列腺素; 降钙素基因相关肽、表皮生长因子、转化生长因子-α的合成和释放, 在胃黏膜细胞凋亡的调节作用等方面探讨了各种因素造成胃黏膜损伤状态下, 艾灸对胃黏膜细胞保护的作用机制^[8,9]。近期发现艾灸对胃黏膜的保护作用与其诱导HSP70的表达, 通过线粒体信号转导途径抑制细胞凋亡, 达到保护胃黏膜损伤的作用^[10,11]。为了进一步从细胞水平揭示艾灸对胃黏膜细胞的保护机制, 本

研究将艾灸后提取的血浆作用于离体人胃黏膜上皮GES-1细胞, 探讨艾灸血浆对受损伤的GES-1是否具有保护作用。

GES-1来源于胎儿胃黏膜上皮, 为体外稳定传代的永生化细胞。自1992年建成以来, 已证明其为良好的实用型实验细胞体系, 电镜显示具有正常人体胃黏膜上皮细胞多种特性。该细胞株已广泛用于胃及相关疾病研究。如孙涛等^[12]以蛙皮素作用于GES-1细胞, 观察了其生长的促进作用; 宗红等^[13]以幽门螺杆菌作用于GES-1细胞, 对其进行了凋亡和X凋亡抑制蛋白表达影响的观察; 李军祥等^[14]研究三七提取物对GES-1细胞增殖抑制及促凋亡作用; 王刚石^[15]采用该细胞观察了生长抑素对羟自由基损伤细胞的影响等。

本研究采用GES-1建立了乙醇所致的人胃黏膜上皮细胞损伤模型。在倒置显微镜下观察: 正常GES-1细胞呈菱形或多边形等不规则形状贴壁生长, 中央有圆形核, 生长旺盛, 细胞之间连接紧密, 可见少量细胞老化脱落。乙醇损伤后, 细胞呈圆形或椭圆形状, 随着损伤时间增加或乙醇浓度提高, 细胞间隙变大, 连接减少甚至出现细胞片状脱落, 只有少许细胞贴壁, 大量细胞漂浮于细胞液中, 细胞核固缩, 胞质浓缩, 可见空泡变性, 死亡细胞逐渐增多, 表明乙醇所造成的胃黏膜细胞损伤模型成功。

针灸血浆是指从刺灸处理后的人或动物体上采集到的血浆, 作为效应物质加到另一个反应系统中, 同在体或离体器官、组织、细胞或分子等靶目标接触, 通过他们的功能或形态学的改变, 可观察到针灸处理后产生的效应。其思路来源于“针灸血清”^[16]和贺石林的“血浆药理学”方法^[17]。血清是血液凝固后除去纤维蛋白与血细胞的液体部分, 血浆指抗凝血液离心后去除血细胞的上清液。由于血清不含纤维蛋白原、凝血酶, 且有凝血、抗凝、纤溶、补体等多个系统的活化, 而不能真实反映体内的状态和准确体现药物的有效成分, 故有学者提出在实验中尽量选择使用血浆, 而不使用血清。贺龙刚等^[18]观察丹参注射液的含药血清和血浆对鸡胚绒毛尿囊膜血管生成的影响, 评价两者差异, 发现含药血浆组促进鸡胚绒毛尿囊膜血管新生作用强于其血清对照组。王东生等^[19]对大黄蟪虫丸含药血浆与血清进行比较, 发现含药血浆抑制血小板聚集作用显著优于含药血清。据此本研究尝试采用艾灸血浆作为效应物质加

表 2 艾灸血浆对损伤GES-1细胞上清液中LDH、MDA和SOD的影响 (mean $\pm$ SD, $n = 8$)

分组	LDH(U/L)	MDA(nmol/mL)	SOD(kU/L)
空白组	5.46 $\pm$ 0.80	2.57 $\pm$ 0.13	25.72 $\pm$ 2.28
模型组	10.76 $\pm$ 1.99 ^b	4.05 $\pm$ 0.14 ^b	30.23 $\pm$ 3.29 ^a
艾灸穴位血浆组	7.38 $\pm$ 1.28 ^f	3.75 $\pm$ 0.11 ^f	38.73 $\pm$ 4.34 ^f
艾灸非穴位血浆组	9.26 $\pm$ 1.62 ^c	3.91 $\pm$ 0.11 ^c	34.11 $\pm$ 4.14 ^c

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs 空白组; ^c $P < 0.05$ vs 艾灸穴位血浆组; ^f $P < 0.01$ vs 模型组。

表 3 艾灸血浆对GES-1细胞周期及凋亡率的影响 (mean $\pm$ SD, %, $n = 4$)

分组	G ₁	S	G ₂ /M	凋亡率
空白组	36.98 $\pm$ 2.84	31.28 $\pm$ 2.68	31.78 $\pm$ 1.13	0.84 $\pm$ 0.05
模型组	57.90 $\pm$ 1.43 ^d	21.50 $\pm$ 0.35 ^d	20.53 $\pm$ 1.24 ^d	7.42 $\pm$ 0.16 ^d
艾灸穴位血浆组	49.18 $\pm$ 1.72 ^b	25.93 $\pm$ 1.18 ^b	24.88 $\pm$ 1.17 ^b	1.24 $\pm$ 0.08 ^b
艾灸非穴位血浆组	52.50 $\pm$ 2.84	23.55 $\pm$ 1.54	23.95 $\pm$ 1.58	1.56 $\pm$ 0.19 ^f

^b $P < 0.01$ vs 模型组; ^d $P < 0.01$ vs 空白组; ^f $P < 0.01$ vs 艾灸穴位血浆组。

到受损细胞中, 观察其对胃黏膜细胞的作用。

现代医学表明, 各种理化因素造成组织细胞的急性或慢性损伤, 首先体现在细胞膜的改变, 一旦细胞膜受损, LDH即被释放到细胞外, 造成培养液中该酶活性增高, 且与细胞损伤成正比, 是衡量细胞膜受损的常用指标^[20]。MDA常作为脂质过氧化程度的检测指标, 能间接反映出细胞受损伤的程度^[21]。SOD是生物体防御过氧化损伤的关键酶类, 广泛分布于生物体内组织中的抗氧化剂, 其含量的高低, 决定了体内氧化/抗氧化系统的均衡, 反映机体抗氧化保护系统的强弱^[22]。本实验观察艾灸血浆对受损胃黏膜上皮细胞的影响, 与空白组比较, 模型组A₄₉₀下降($P < 0.01$), 表明乙醇造成了细胞受损, 细胞抑制率上升, 细胞上清液中LDH、MDA含量增加(均 $P < 0.01$), 同时诱导细胞自我应激保护, SOD含量提高($P < 0.01$); 与模型组比较, 艾灸穴位血浆组A₄₉₀上升($P < 0.01$), 提示艾灸人体血浆能降低乙醇对细胞的损伤, 细胞抑制率下降, 上清液中SOD水平升高($P < 0.01$), LDH、MDA含量降低(均 $P < 0.01$); 与艾灸穴位血浆组比较, 艾灸非穴位血浆组A₄₉₀下降($P < 0.05$), 细胞抑制率升高, SOD水平下降($P < 0.05$), LDH和MDA水平升高(均 $P < 0.05$), 提示艾灸穴位血浆能减少受损GES-1细胞LDH和MDA的产生, 提高SOD含量, 对细胞起保护作用, 使细胞抑制率下降, 而对上述指标的影响艾灸非穴位血浆组的作用不如艾

灸穴位血浆组。

细胞凋亡又叫程序性细胞死亡, 是由特定基因调控的自主、有序性的死亡。细胞的增殖遵循细胞周期, 即从G₁→S→G₂→M→G₁, 在细胞周期中至少存在两个重要的“生长控制点(check-points)”, 一是G₁→S转变期; 二是G₂→M转变期。当细胞处于生长活跃状态时, 细胞周期中G₁期将更多转化进入S期, DNA合成增加, 为下一步M期的有丝分裂做准备, 即G₁期占整个细胞周期比例下降, S期、G₂期比例上升^[23]。本研究发现: 与空白组比较, 模型组细胞周期G₁期占比及细胞凋亡率明显升高(均 $P < 0.01$); S、G₂/M占比下降(均 $P < 0.01$)。提示胃黏膜细胞受损后细胞凋亡率增高, 延长的G₁期对G₁→S的转变出现延缓, 至细胞增殖活跃程度降低。而艾灸穴位血浆组与模型组比较, G₁期占比减少($P < 0.01$), 凋亡率下降($P < 0.01$), S、G₂/M占比提高(均 $P < 0.01$); 提示艾灸穴位血浆组能降低胃黏膜细胞凋亡率, 促进细胞由G₁期尽快进入S期, 加速DNA合成, 加快完成细胞增殖和修复过程。

近年来不少研究已证实针灸血清具有抗哮喘作用和体液调节功能, 还具有改善免疫功能及抗衰老作用^[24]。孙双历等^[25]观察艾灸血清对体外培养背根神经节的保护作用, 提示艾灸血清对因衰老所致的机体功能减退有着积极的治疗作用; 杨露晨等^[23]以艾灸血清作用于实验性类风湿关节炎滑膜细胞, 观察对其细胞增殖及

应用要点

在确认艾灸血清(血浆)对疾病模型有效性的基础上, 利用蛋白质组和基因组等现代科学技术, 分析提取与针灸相关的效应活性物质, 从而为阐明针灸治疗疾病的现代生物学机制提供新的战略性研究思路, 并为解决当代生命科学重大疑难问题寻求新的突破, 也将为创新药物的发展提供新的途径。

■同行评价

本文创新性较好, 内容重点突出, 实验设计合理, 结论可靠, 对揭示针灸效应具有一定的启示意义。

细胞周期影响, 发现艾灸血清可抑制其增殖及对G₁/S转换期有延缓作用。在对肿瘤细胞方面影响, 马晓芃等^[26]以艾灸血清作用于小鼠淋巴瘤细胞, 发现艾灸血清具有抑制淋巴瘤细胞增殖、诱导其分化的作用。裴建等^[27]发现艾灸血清能抑制肿瘤细胞生长。陈云飞等^[28,29]观察艾灸血清对荷瘤小鼠的抑瘤效应, 提示艾灸血清具有抑瘤, 并诱导肿瘤细胞凋亡的效应。

研究表明针灸血清还能影响细胞内某些信号分子, 如李瑞午等^[30]及罗明富等^[31]以针刺血清作用于体外神经细胞或心肌细胞, 发现针刺血清对离体神经细胞或心肌细胞内钙离子浓度有影响。邓元江等^[32,33]报道针刺血清能使离体胃窦平滑肌细胞产生收缩效应与其调整细胞内钙离子有关。杨宗保等发现电针胃经穴提取针刺血清能活化表皮生长因子受体和上调胃黏膜细胞c-Myc基因的表达^[34-36]。李岩等^[37]在以针灸血清诱导人卵巢癌细胞凋亡相关因子的研究中, 表明针灸血清可通过增加凋亡相关因子的表达诱导卵巢癌细胞凋亡。马晓芃等^[26]观察艾灸血清对体外小鼠淋巴瘤细胞的作用, 发现艾灸血清能使环核苷酸/环鸟苷酸比值增加, 具有抑制淋巴瘤细胞增殖、诱导其分化的作用。

陈汉平等^[5]提出: “针灸血清”之所以具有和药物相类似的作用, 关键在于刺灸膈穴后, 可通过某种内在生理调节机制, 引起血清中活性物质含量产生有意义的改变。马淑兰等^[38]发现针刺血清能降低肾上腺切除大鼠哮喘模型外周血嗜酸粒细胞数目, 是因为针刺血清中存在非皮质激素类活性因子。王宇等^[39]观察针刺血清对哮喘大鼠模型影响的同时, 以色谱分析方法初步筛选血清中特异成分表明, 针刺血清中存在3种以上的特异性成分。陈云飞等^[40]以双向电泳研究不同时段艾灸血清中内源性蛋白组分的变化, 表明在特定穴位艾灸, 可使血清中的蛋白质组分发生改变, 其中以酸性蛋白点缺失和蛋白峰度下降最为明显。杨永清等^[41]从针刺治疗哮喘大鼠的血清中发现了至少4种特异蛋白, 有1种蛋白已经明确其结构, 并证明该蛋白具有明显的抗哮喘效应, 因而认为刺灸穴位激活的异生性蛋白可能是针灸效应的物质基础。

本研究中所采用的是经过艾灸处理后提取的血浆作为效应物质作用于乙醇损伤的离体人胃黏膜上皮GES-1细胞, 发现艾灸血浆能减少细胞损伤、抑制细胞凋亡, 调整细胞周期, 对GES-1细胞具有一定的保护作用。推测其作用机

制是由于艾灸预处理使血浆内产生了某种保护性异生蛋白, 可对离体受损细胞产生保护作用。本课题组最近的工作已证实艾灸预处理可使外周血液中的HSP升高(待发表), 其作用机制还有待进一步证实。

4 参考文献

- 1 朱立, 杨宗诚. 急性胃粘膜损害及其发病机制. 中国烧伤创疡杂志 1997; 9: 7-15
- 2 易受乡, 彭艳, 常小荣, 彭娜, 严洁, 林亚平. 艾灸预处理对应激性溃疡大鼠胃黏膜增殖修复的影响. 世界中西医结合杂志 2007; 2: 21-24
- 3 孙茂峰, 王茵萍, 林昭庚, 吴旭, 王岱. 针灸保护胃粘膜临床与实验研究进展. 中国针灸 2000; 20: 441-445
- 4 易受乡, 彭艳, 常小荣, 彭娜, 严洁, 林亚平. 艾灸足三里、梁门穴对应激性溃疡大鼠胃黏膜细胞凋亡的干预作用. 世界华人消化杂志 2006; 14: 3163-3168
- 5 陈汉平, 裴建. 关于“针灸血清”方法的研究和应用—四论针灸学的开放性. 上海针灸杂志 1998; 17: 1-2
- 6 王磊, 李学武, 张莉. 艾灸疗法作用机理国内外研究进展. 中国针灸 2001; 21: 567-570
- 7 尚秀葵. 长时间温和灸治疗胃肠病临证举要. 上海针灸杂志 2004; 23: 22-23
- 8 易受乡, 林亚平, 吴芳, 向志勇. 神阙穴隔药饼灸、单纯灸及灯光灸对胃黏膜损伤保护作用的对比研究. 中国中医药信息杂志 2005; 12: 30-32
- 9 杨宗保, 严洁. 表皮生长因子受体及其信号转导通路与胃粘膜损伤修复研究. 中医药导报 2006; 12: 66-68
- 10 常小荣, 彭娜, 易受乡, 彭艳, 严洁. 艾灸足三里和梁门穴诱导热休克蛋白70抗大鼠胃黏膜氧化损伤作用. 世界华人消化杂志 2006; 14: 3405-3408
- 11 常小荣, 彭娜, 易受乡, 彭艳, 严洁. 艾灸预处理对应激性溃疡大鼠胃黏膜HSP70蛋白及mRNA表达的影响. 世界华人消化杂志 2006; 14: 1252-1256
- 12 孙涛, 陈原稼, 柯杨, 侯敏, 钱家鸣, 陈元方, 李晓波. 蛙皮素对人胃黏膜上皮永生细胞系GES-1细胞生长作用和机制的研究. 中华消化杂志 2003; 23: 327-331
- 13 宗红, 李建生, 张金平, 陈香宇, 董子明. 幽门螺杆菌对胃上皮细胞株GES-1凋亡及XIAP表达的影响. 山东医药 2005; 45: 11-12
- 14 李军祥, 王志斌, 朱陵群, 朱福玲, 崔巍. 三七提取物对经MNNG转化后的GES-1细胞增殖抑制及促凋亡作用. 中国中西医结合杂志 2005; 25: 719-722
- 15 王刚石, 孙桂华, 陈慎实. 生长抑素对羟自由基损伤的人胃黏膜上皮细胞系GES-1的影响. 中国应用生理学杂志 1999; 15: 180-183
- 16 孙德利, 陈汉平. “针灸血清”的研究方法及意义. 浙江中医学院学报 1999; 23: 59
- 17 贺石林, 葛金文, 贺蓉, 梅志刚. 质疑血清药理学, 加强多层次半体内实验研究. 中国药理学通报 2005; 21: 277-279
- 18 贺龙刚, 周丽, 黄枚, 吴符火. 丹参注射液含药血浆及血清对CAM血管生成的影响. 福建中医学院学报 2008; 18: 28-30
- 19 王东生, 陈方平, 贺石林, 解勤之, 付斌, 李昕, 曹星玉, 陈焱. 大黄(庶虫)虫丸血浆药理学与血清药理学作用的比较研究. 血栓与止血学 2005; 11: 5-8
- 20 何金生, 宗庭益. LDH释放法检测NK细胞活性的方法学研究. 中国实验临床免疫学杂志 1996; 8: 10-13
- 21 Iimuro M, Kaneko M, Matsumoto Y, Fujise Y, Watanabe T, Hayashi H. Effects of an endothelin receptor antagonist TAK-044 on myocardial energy metabolism in ischemia/reperfusion rat hearts. J Cardiovasc Pharmacol 2000; 35: 403-409
- 22 Mügge A, Elwell JH, Peterson TE, Harrison DG. Release of intact endothelium-derived relaxing fac-

- tor depends on endothelial superoxide dismutase activity. *Am J Physiol* 1991; 260: C219-C225
- 23 杨露晨, 魏铮, 吴巧凤, 刘祖光. 艾灸血清对实验性RA滑膜细胞增殖及细胞周期的影响. *成都中医药大学学报* 2008; 31: 33-35
- 24 赵英侠, 王静, 秦逸人, 余安胜. 针灸血清作用的研究概况. *上海针灸杂志* 2005; 24: 40-42
- 25 孙双历, 汪洋, 宋秀娟, 张海蒙. 艾灸血清对背根神经节神经突起影响的体外观察. *上海针灸杂志* 2003; 22: 19-22
- 26 马晓凡, 赵粹英, 李祖剑, 季凤敏, 陈云飞. 艾灸血清体外对小鼠EL-4淋巴瘤细胞作用的实验研究. *中医药学刊* 2003; 21: 1949-1950
- 27 裴建, 陈汉平, 赵粹英, 孙丽娟. “艾灸血清”对免疫活性细胞功能的影响. *上海针灸杂志* 1999; 18: 38-40
- 28 陈云飞, 赵粹英, 吕琪泳. 艾灸血清抑瘤效应的实验观察. *上海针灸杂志* 2000; 19: 39-41
- 29 陈云飞, 赵粹英, 陈汉平, 秦慧莲, 方舫. 小鼠艾灸血清诱导肿瘤细胞凋亡的实验研究. *针刺研究* 2000; 25: 38-42
- 30 李瑞午, 张静龄, 郭莹, 李翠红. 针刺血清对体外培养神经细胞内钙离子浓度的影响. *中西医结合学报* 2004; 2: 453-455
- 31 罗明富, 李翠红, 张金铃, 郭莹, 陈淑萍, 刘俊, 李瑞午. 针刺血清降低大鼠培养心肌细胞内Ca²⁺含量的研究. *中国针灸* 2006; 26: 367-370
- 32 邓元江, 易受乡, 严洁, 林亚平, 郭晖, 刘卫英, 向志勇, 吴芳. 足阳明经穴针刺血清对家兔离体胃窦平滑肌细胞舒缩活动的影响. *中医杂志* 2005; 46: 264-266
- 33 邓元江, 易受乡, 严洁, 林亚平, 郭晖, 刘卫英, 向志勇, 吴芳. 足阳明经穴针刺血清对家兔离体胃窦平滑肌细胞内钙离子浓度影响的实验研究. *新中医* 2005; 37: 91-93
- 34 杨宗保, 严洁, 邹晓平, 易受乡, 常小荣, 林亚萍, 唐森. 针刺血清对胃溃疡大鼠胃黏膜细胞磷脂酶C γ -1活性的影响. *世界华人消化杂志* 2006; 14: 985-988
- 35 杨宗保, 严洁, 邹小平, 常小荣, 易受乡, 林亚平. 电针大鼠胃经后血清对其胃黏膜细胞表皮生长因子受体表达的影响及浓度效应. *中国临床康复* 2006; 10: 87-89
- 36 严洁, 杨宗保, 常小荣, 易受乡, 林亚平, 钟艳. 电针大鼠胃经穴的血清对胃黏膜细胞表皮生长因子受体后信息物质表达的影响. *中西医结合学报* 2007; 5: 338-342
- 37 李岩, 李彬, 郭刚. 针灸大鼠血清诱导人卵巢癌细胞株SKOV3细胞凋亡及相关因子的研究. *现代妇产科进展* 2006; 15: 690-692
- 38 马淑兰, 杨永清, 崔龙萍, 张英英, 王宇. 针刺血清对高嗜酸粒细胞血症大鼠外周嗜酸粒细胞数目的影响. *针刺研究* 2002; 27: 145-148
- 39 王宇, 马淑兰, 崔建美, 杨永清, 金明明. 针刺抗哮喘大鼠血清差异组份的色谱分析. *上海针灸杂志* 2006; 25: 41-43
- 40 陈云飞, 杨文佳, 马晓凡, 洪娴, 刘莺. 不同时段艾灸血清中内生性蛋白组分双向电泳的实验研究. *上海中医药大学学报* 2007; 21: 57-60
- 41 杨永清, 陈汉平, 王宇, 崔建美, 王燕, 刘艳艳. 针灸效应物质基础研究. *针刺研究* 2007; 32: 399-401

编辑 李薇 电编 何基才

ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) CN 14-1260/R 2010年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

WJC, WJGE, WJGO, WJGS, WJH, WJR 6 本期刊 被 PMC 收录

本刊讯 我们于2010-08-17收到PubMed Central(PMC)的通知, 经过美国国立医学图书馆机构咨询委员会The Literature Selection Technical Review Committee评定, 决定*WJC, WJGE, WJGO, WJGS, WJH, WJR* 6本期刊被PMC收录. PMC是一个提供生命科学期刊文献的全文数据库, 他是由隶属美国国立医学图书馆(National Library of Medicine)的国家生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information)所创建与管理的. (常务副总编辑: 张海宁 2010-08-17)

缺氧对肝癌血管生成拟态的影响及其机制

刘文斌, 许戈良, 英卫东, 李建生, 马金良, 葛勇胜, 任维华, 余继海, 王伟, 胡晔

■背景资料

多年来, 肿瘤血管被认为是由血管内皮细胞单独排列而成。然而, 近些年的一些研究表明, 除了血管内皮细胞之外, 可塑性肿瘤细胞也可能贡献于肿瘤的血管化作用。由可塑性肿瘤细胞形成的血管生成拟态(VM)是对传统肿瘤血管生成理论的重要补充, 为抗肿瘤血管生成治疗提供了崭新的思路。

刘文斌, 许戈良, 英卫东, 李建生, 马金良, 葛勇胜, 任维华, 余继海, 王伟, 胡晔, 安徽医科大学附属医院肝胆外科安徽省合肥市 230001

刘文斌, 天津医科大学研究生院 天津市 300070
刘文斌, 主治医师, 天津医科大学博士研究生, 主要从事肝癌转移与复发方面的研究。

国家自然科学基金面上项目, No. 30972892

安徽省科技攻关基金资助项目, No. 07010302193

安徽省自然科学基金面上项目, No. 090413107

安徽省高校自然科学基金重点基金资助项目, No. KJ2009A178

安徽省优秀青年科技基金资助项目, No. 08040106818

安徽省“115”产业创新团队-肝细胞癌转移复发研究团队基金资助项目

作者贡献分布: 刘文斌、许戈良及英卫东对此文所作贡献均等; 此课题由刘文斌、许戈良及英卫东设计; 研究过程由李建生、马金良、刘文斌、葛勇胜、任维华、余继海、王伟及胡晔操作完成; 数据分析由刘文斌、王伟及胡晔完成; 本论文写作由刘文斌与许戈良完成。

通讯作者: 许戈良, 教授, 博士生导师, 230001, 安徽省合肥市庐江路17号, 安徽医科大学附属医院肝胆外科。

xugeliang2007@163.com

电话: 0551-2283916 传真: 0551-2282121

收稿日期: 2010-08-20 修回日期: 2010-09-17

接受日期: 2010-09-27 在线出版日期: 2010-11-08

Hypoxia promotes vasculogenic mimicry formation in hepatocellular carcinoma

Wen-Bin Liu, Ge-Liang Xu, Wei-Dong Jia, Jian-Sheng Li, Jin-Liang Ma, Yong-Sheng Ge, Wei-Hua Ren, Ji-Hai Yu, Wei Wang, Ye Hu

Wen-Bin Liu, Ge-Liang Xu, Wei-Dong Jia, Jian-Sheng Li, Jin-Liang Ma, Yong-Sheng Ge, Wei-Hua Ren, Ji-Hai Yu, Wei Wang, Ye Hu, Department of Hepatic Surgery, Anhui Provincial Hospital, Anhui Medical University, Hefei 230001, Anhui Province, China

Wen-Bin Liu, Graduate School, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30972892; the Key Science and Technology Project of Anhui Province, No. 07010302193; the Natural Science Foundation of Anhui Province, No. 090413107; the Key Natural Science Project of Colleges and Universities of Anhui Province, No. KJ2009A178; the Scientific and Technological Foundation of Anhui Province for Outstanding Youth, No. 08040106818; and the Anhui Provincial “115” Industrial Innovation Program

Correspondence to: Professor Ge-Liang Xu, Department of Hepatic Surgery, Anhui Provincial Hospital, Anhui Medical University, 17 Lujiang Road, Hefei 230001, Anhui Province, China. xugeliang2007@163.com

Received: 2010-08-20 Revised: 2010-09-17

Accepted: 2010-09-27 Published online: 2010-11-08

■同行评议者

徐泱, 副教授, 上海复旦大学附属中山医院肝肿瘤外科

Abstract

AIM: To investigate the effect of hypoxia on vasculogenic mimicry (VM) formation in hepatocellular carcinoma (HCC) and to explore possible mechanisms involved.

METHODS: A three-dimensional cell culture system for human HCC cell line MHCC97-H was established to observe VM formation under normoxic and hypoxic conditions. Semi-quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and Western blot were used to detect the effect of hypoxia on the mRNA and protein expression of hypoxic inducible factor-1 α (HIF-1 α), matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9, respectively. Immunohistochemistry was used to identify patterned matrix VM and investigate the expression of HIF-1 α , MMP-2 and MMP-9 in 151 HCC samples.

RESULTS: Patterned matrix VM or tubular VM was produced under hypoxic conditions, while cells cultured under normoxic conditions for 48 h failed to form patterned matrix VM or formed shorter tubular VM. After cells were cultured for 48 h, the mRNA and protein expression levels of HIF-1 α , MMP-2 and MMP-9 were significantly higher under hypoxia than under normoxia (mRNA: 0.70 ± 0.05 vs 0.51 ± 0.10 , 0.90 ± 0.09 vs 0.67 ± 0.09 , 0.64 ± 0.10 vs 0.42 ± 0.07 , $P = 0.03$, 0.013 , 0.01 ; protein: 0.52 ± 0.09 vs 0.41 ± 0.09 , 0.63 ± 0.11 vs 0.50 ± 0.11 , 0.50 ± 0.14 vs 0.38 ± 0.09 , $P = 0.035$, 0.023 , 0.008). Thirty-one of 151 HCC samples exhibited evidence of patterned matrix VM. The staining intensity of HIF-1 α , MMP-2 and MMP-9 expression was significantly higher in the VM group than in the non-VM group (4.5 ± 1.6 vs 3.4 ± 1.7 , 4.5 ± 1.6 vs 3.4 ± 1.7 , 3.9 ± 1.9 vs 2.9 ± 1.8 , $P = 0.001$, 0.030 , 0.007).

CONCLUSION: Hypoxia can induce VM formation in HCC by regulating the expression of HIF-1 α , MMP-2 and MMP-9.

Key Words: Vasculogenic mimicry; Hepatocellular carcinoma; Hypoxic inducible factor-1 α ; Matrix metalloproteinase; Immunohistochemistry

Liu WB, Xu GL, Jia WD, Li JS, Ma JL, Ge YS, Ren WH, Yu JH, Wang W, Hu Y. Hypoxia promotes vasculogenic mimicry formation in hepatocellular carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(31): 3294-3300

摘要

目的: 研究缺氧对肝癌血管生成拟态(vasculogenic mimicry, VM)的影响及其可能机制。

方法: 建立基质胶Matrigel三维培养体系, 观察高转移人肝癌细胞系MHCC97-H在常氧(常氧组)和缺氧(缺氧组)条件下形成VM的差异; 应用RT-PCR和Western blot技术检测两组缺氧诱导因子-1 α (HIF-1 α)、基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMP)-2和MMP-9的表达。选择151例肝癌组织标本, 免疫组织化学方法检测VM是否存在及HIF-1 α 、MMP-2和MMP-9的表达。

结果: 三维培养48 h, 缺氧组能形成基质型VM或管形VM, 而常氧组不形成基质型VM或形成较短的管形VM。缺氧组HIF-1 α 、MMP-2和MMP-9 mRNA和蛋白表达水平明显较常氧组高(mRNA: 0.70 ± 0.05 vs 0.51 ± 0.10 , $P = 0.03$; 0.90 ± 0.09 vs 0.67 ± 0.09 , $P = 0.013$; 0.64 ± 0.10 vs 0.42 ± 0.07 , $P = 0.01$; 蛋白: 0.52 ± 0.09 vs 0.41 ± 0.09 , $P = 0.035$; 0.63 ± 0.11 vs 0.50 ± 0.11 , $P = 0.023$; 0.50 ± 0.14 vs 0.38 ± 0.09 , $P = 0.008$)。151例肝癌组织标本中31例存在VM, 存在VM的标本HIF-1 α 、MMP-2和MMP-9免疫组织化学染色综合得分较不存在VM的标本高(4.5 ± 1.6 vs 3.4 ± 1.7 , $P = 0.001$; 4.5 ± 1.6 vs 3.4 ± 1.7 , $P = 0.030$; 3.9 ± 1.9 vs 2.9 ± 1.8 , $P = 0.007$)。

结论: 缺氧能促进肝癌VM的形成, 诱导HIF-1 α 、MMP-2和MMP-9表达可能是其作用机制之一。

关键词: 血管生成拟态; 肝细胞癌; 缺氧诱导因子-1 α ; 基质金属蛋白酶; 免疫组织化学

刘文斌, 许戈良, 英卫东, 李建生, 马金良, 葛勇胜, 任维华, 余继海, 王伟, 胡晔. 缺氧对肝癌血管生成拟态的影响及其机制. *世界华人消化杂志* 2010; 18(31): 3294-3300
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/3294.asp>

0 引言

血管生成拟态(vasculogenic mimicry, VM)是Maniotis等^[1]于1999年发现的一种新的微循环模式, 即在侵袭性黑色素瘤中, 肿瘤细胞获得内皮细胞特性, 形成能传导血液的血管样结构, 这一

过程独立于经典的血管生成和内皮细胞增殖。此后, VM在恶性食管间质瘤、乳癌、胶质瘤、结直肠癌和肝癌等肿瘤中均有报道^[2-7]。VM在肿瘤生物学中可能具有十分重要的意义^[2,6-8]。然而, 形成VM的机制目前还不清楚。缺氧诱导因子-1 α (hypoxic inducible factor-1 α , HIF-1 α)、基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMP)-2或MMP-9可能与卵巢癌、黑色素瘤等肿瘤VM形成具有一定的关系^[9-11]。本课题采用三维培养模型, 观察常、缺氧条件下肝癌细胞VM形成以及HIF-1 α 、MMP-2和MMP-9表达的差异, 并结合肝癌组织VM以及HIF-1 α 、MMP-2和MMP-9免疫组织化学检测, 以研究缺氧对肝癌VM形成的影响及其可能机制。

1 材料和方法

1.1 材料 高转移人肝癌细胞系MHCC97-H购于复旦大学中山医院肝癌研究所, 高糖DMEM培养基及胎牛血清购自美国Hyclone公司, 基质胶Matrigel购自美国BD公司, TRIzol购自美国Invitrogen公司, RT-PCR试剂盒购自日本TaKaRa公司, PCR引物由上海生物工程公司合成, 蛋白酶K购自美国Sigma-Aldrich公司, 鼠抗人层粘连蛋白单克隆抗体购自美国Milipore公司, 鼠抗人CD34单克隆抗体, 兔抗人HIF-1 α 、MMP-2、MMP-9单克隆抗体购自美国Santa Cruz公司, 二步法免疫组织化学检测试剂盒购自北京中杉生物技术公司; Western blot相关试剂、试剂盒购自碧云天生物技术研究。

1.2 方法

1.2.1 基质胶Matrigel三维培养: MHCC97-H于37℃、50 mL/L CO₂及饱和湿度条件下培养在高糖DMEM培养基中, 内含100 mL/L胎牛血清、100 kU/L青霉素和100 mg/L链霉素, 取对数生长期细胞用于实验。于24孔培养板每孔中加入200 μ L Matrigel原液, 37℃培养箱内温育60 min, 再向每孔添加1 mL浓度为 6×10^5 个/mL的细胞悬液。如每孔加25 μ L Matrigel原液则细胞浓度为 2×10^5 个/mL。实验分常氧组(950 mL/L空气和50 mL/L CO₂)和缺氧组(10 mL/L O₂, 50 mL/L CO₂和940 mL/L N₂), 均于37℃培养48 h。使用相差显微镜进行拍照, 所摄照片用美国国立卫生研究院影像软件进行分析, 测量每张照片中血管样结构的长度(长度>200 μ m被定义为血管样结构^[12]), 并计算每张照片的总长度。

1.2.2 RT-PCR检测HIF-1 α 、MMP-2和MMP-9表达: 细胞在常氧与缺氧条件下三维培养48 h, 用

■研究前沿

VM的现象在黑色素瘤、胶质瘤、乳癌、结直肠癌和肝癌等多种肿瘤中均有报道。VM在肿瘤生物学中可能具有十分重要的意义。然而, 形成VM的机制目前还不清楚, 亟待进一步研究。

■相关报道

相比不存在VM的肝癌组织,存在VM的肝癌组织缺氧可能更严重.MMP-2和MMP-9表达水平在存在VM的肝癌组织中也明显较高.此结果与最近Li等在胃腺癌中的报道相似.

胰蛋白酶消化收集细胞,以TRIzol抽提总RNA.依照TaKaRa二步法试剂盒说明步骤反转录和PCR扩增. HIF-1 α 上游引物5'-GAACTTCTGGATGCTGGTG-3',下游引物5'-TATACGTGAATGTGGCCTGT-3',扩增片段长度393 bp; MMP-2上游引物5'-GATGATGCCTTTGCTCG-3',下游引物5'-AGTGGACATGGCGGTCT-3',扩增片段长度597 bp; MMP-9上游引物5'-GAGGTTTCGACGTGAAGGCGCAGATG-3',下游引物5'-AGGTCACGTAGCCCACTTG-GTC-3',扩增片段长度175 bp; β -actin上游引物5'-GGGACCTGACTGACTACCTC-3',下游引物5'-ACTCGTCATACTCCTGCTTG-3',扩增片段长度546 bp. 12.5 μ L PCR反应体系: 5 $\times$ PCR Buffer 2.5 μ L, RNase Free dH₂O 7.188 μ L, 上、下游引物各0.125 μ L, TaKaRa Ex Taq HS 0.063 μ L, cDNA 2.5 μ L. PCR反应条件: 94 $^{\circ}$ C预变性5 min, 94 $^{\circ}$ C变性40 s, 55 $^{\circ}$ C退火30 s, 72 $^{\circ}$ C延伸45 s, 共35个循环后72 $^{\circ}$ C延伸10 min. PCR反应结束后,取5 μ L PCR扩增产物在2%琼脂糖凝胶上电泳,利用Tanon凝胶成像系统采集图像并进行吸光度测定,以目的条带与内参照条带的灰度值比值代表目的基因mRNA的表达水平.

1.2.3 Western blot检测HIF-1 α 、MMP-2和MMP-9表达:细胞在常氧与缺氧条件下三维培养48 h,用胰蛋白酶消化收集细胞,加蛋白裂解液制备总蛋白,采用BCA法检测蛋白浓度.总蛋白100 $^{\circ}$ C加热变性10 min,取50 μ g样品上样检测. 10% SDS-PAGE胶电泳分离蛋白后,半干式电转膜仪17 V 30 min将蛋白转移至PVDF膜上. 5%脱脂奶粉室温下封闭1 h, TBST漂洗3 $\times$ 5 min,抗HIF-1 α ,抗MMP-2,抗MMP-9或抗 β -actin单克隆抗体室温孵育1 h或4 $^{\circ}$ C过夜. TBST漂洗3 $\times$ 5 min后加HRP标记的二抗(1:5 000)室温孵育1 h. TBST漂洗3 $\times$ 5 min后使用ECL化学发光法显影、定影.利用Tanon凝胶成像系统采集图像并进行吸光度测定,以目的条带与内参照条带的灰度值比值代表目的蛋白的表达水平.

1.2.4 免疫组织化学方法检测肝癌组织中VM表达: 151例经病理证实为肝细胞癌的组织标本蜡块来自安徽省立医院肝脏外科2003-2008年手术切除标本.对甲醛溶液固定、石蜡包埋的标本进行4 μ m切片,经二甲苯脱蜡,梯度酒精水化后以3%过氧化氢阻断内源性过氧化物酶活性.柠檬酸盐缓冲液抗原热修复用于对CD34、HIF-1 α 、MMP-2和MMP-9检测.蛋白酶K修复用于

对层粘连蛋白检测. PBS冲洗后以3%山羊血清封闭20 min,每张切片滴加50 μ L一抗(层粘连蛋白1:100、CD34 1:100、HIF-1 α 1:300、MMP-2 1:300、MMP-9 1:300),4 $^{\circ}$ C孵育过夜或37 $^{\circ}$ C孵育2 h. PBS冲洗3次,滴加生物素化的山羊抗鼠二抗, DAB显色,苏木素复染,自来水冲洗,返蓝,酒精脱水,二甲苯透明,中性树胶封片.结果判定:每张切片在400倍视野下随机选择10个视野,每个视野计数100个肿瘤细胞,共计1 000个细胞,计算每张切片阳性染色细胞百分率.阳性细胞数<10%为0分,10%-25%为1分,25%-50%为2分,>50%为3分.细胞不着色为0分,淡黄色为1分,中等黄色为2分,深黄色为3分.每张切片染色综合得分为染色强度与阳性细胞百分率得分之和^[2].

统计学处理 采用SPSS13.0统计软件进行分析,计量资料结果以mean $\pm$ SD表示,组间比较采用两样本 t 检验.非正态分布资料采用Mann-Whitney U检验. $P<0.05$ 为差异有统计学意义.

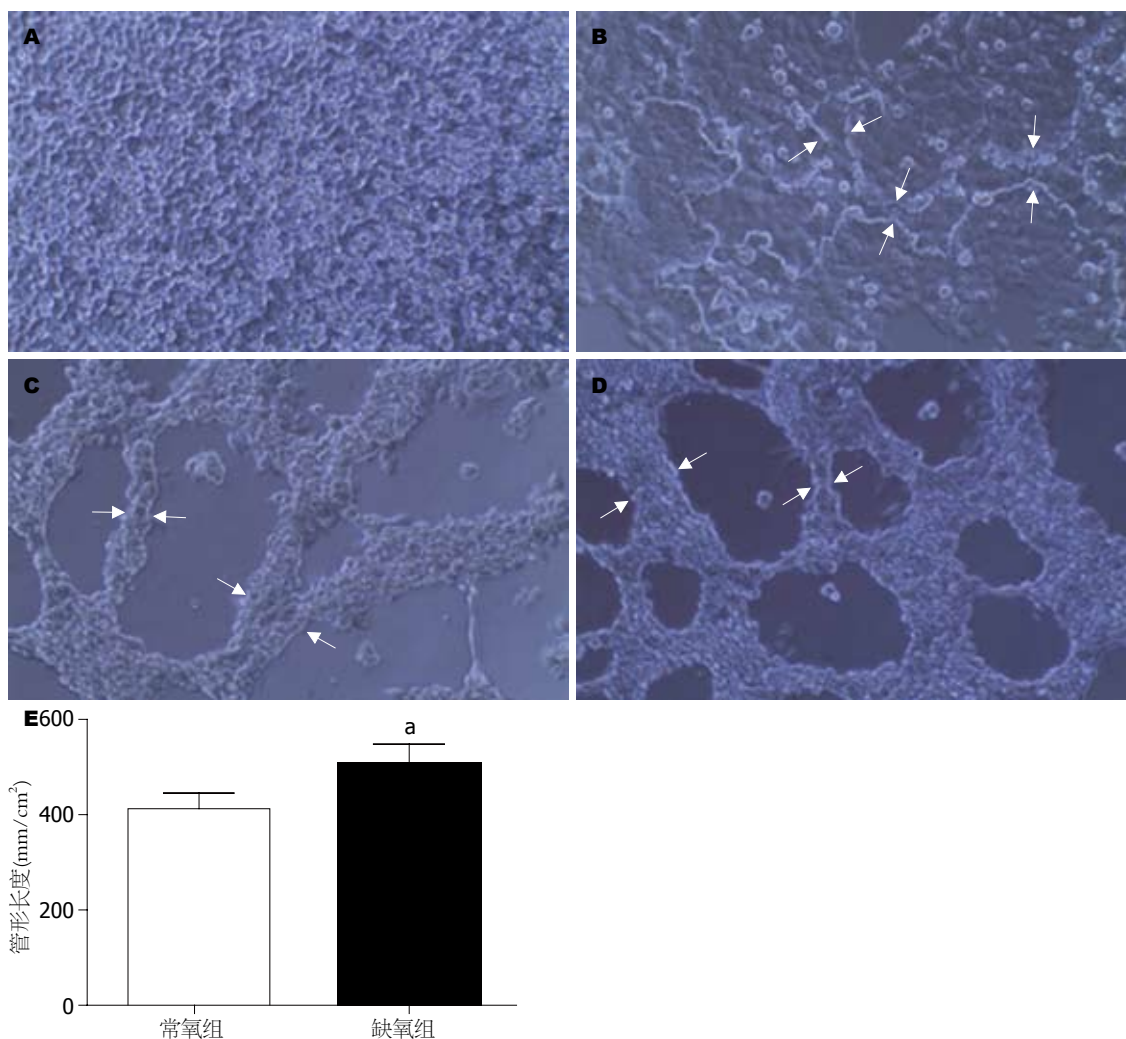
2 结果

2.1 缺氧对肝癌细胞管道形成的影响 在常氧条件下三维培养48 h,生长在厚胶(每孔200 μ L)上的肝癌细胞不能形成基质型VM(patterned matrix VM),而在缺氧条件下则形成明显的基质型VM(图1A, B).生长在薄胶(每孔25 μ L)上的肝癌细胞都能形成管形VM(tubular VM),但缺氧条件下形成的管道明显较常氧条件下长(图1C-E).

2.2 缺氧对肝癌细胞HIF-1 α 、MMP-2和MMP-9基因表达的影响 三维培养48 h后,缺氧组HIF-1 α 、MMP-2和MMP-9 mRNA表达水平均显著高于常氧组(0.70 ± 0.05 vs 0.51 ± 0.10 , $P=0.03$; 0.90 ± 0.09 vs 0.67 ± 0.09 , $P=0.013$; 0.64 ± 0.10 vs 0.42 ± 0.07 , $P=0.01$,图2).

2.3 缺氧对肝癌细胞HIF-1 α 、MMP-2和MMP-9蛋白表达的影响 三维培养48 h后,缺氧组HIF-1 α 、MMP-2和MMP-9蛋白表达水平显著高于常氧组(0.52 ± 0.09 vs 0.41 ± 0.09 , $P=0.035$; 0.63 ± 0.11 vs 0.50 ± 0.11 , $P=0.023$; 0.50 ± 0.14 vs 0.38 ± 0.09 , $P=0.008$,图3).

2.4 VM在肝癌组织中表达 肝癌组织中基质型VM通过包绕3-15个肿瘤细胞的层粘连蛋白阳性环来识别. VM的同一位置不显示内皮细胞标志物CD34,这表明层粘连蛋白阳性环不是肝血窦,而CD34阳性者为肝血窦(图4).比较图4A与图4B,似乎层粘连蛋白阳性环与肝血窦相连通.在151



■创新盘点

本研究采用三维培养模型, 观察常、缺氧条件下肝癌细胞VM形成以及HIF-1 α 、MMP-2和MMP-9表达的差异, 并结合肝癌组织进行免疫组织化学检测, 首次探讨了缺氧对肝癌VM形成的影响及其可能机制。

图1 常氧和缺氧三维培养条件下肝癌管道形成形态. A: 常氧、厚胶培养($\times 200$); B: 缺氧、厚胶培养($\times 200$); C: 常氧、薄胶培养($\times 200$); D: 缺氧、薄胶培养($\times 200$); E: 管形VM形成的长度. ^a $P < 0.05$ vs 常氧组。

例肝癌组织标本中有31例存在基质型VM表达。

2.5 肝癌组织中HIF-1 α 、MMP-2和MMP-9表达

我们应用免疫组织化学方法对存在VM(VM组)和不存在VM(非VM组)的两组肝癌组织中HIF-1 α 、MMP-2和MMP-9进行检测, 发现HIF-1 α 在细胞核或细胞质中表达(图5A, B), MMP-2和MMP-9表达于细胞质(图5C-F)。综合肿瘤细胞染色强度和阳性细胞百分率进行半定量处理, 显示VM组HIF-1 α 、MMP-2和MMP-9染色综合得分明显较非VM组高($P = 0.001, 0.030, 0.007$, 表1)。

3 讨论

肿瘤内微环境明显不同于正常组织, 其主要差别在于肿瘤血管结构缺陷, 肿瘤细胞生长快于血管生成, 造成肿瘤内许多区域血液供应不足, 并因此而缺氧^[13]。缺氧不仅可以诱导肿瘤细胞对放疗、化疗的耐受性, 而且可以促进肿瘤细胞

表1 VM组与非VM组肝癌组织中HIF-1 α 、MMP-2和MMP-9的差异表达 (mean $\pm$ SD, 分)

	分组		Z值	P值
	VM组	非VM组		
HIF-1 α	4.5 $\pm$ 1.6	3.4 $\pm$ 1.7	-3.470	0.001
MMP-2	4.5 $\pm$ 1.6	3.4 $\pm$ 1.7	-2.168	0.030
MMP-9	3.9 $\pm$ 1.9	2.9 $\pm$ 1.8	-2.682	0.007

的生长、侵袭和转移等恶性生物学行为的发生。缺氧调控的一系列基因和蛋白的表达正是这些现象发生的根本原因, 而HIF家族是调控这一系列基因和蛋白的关键因素。在HIF家庭中, HIF-1 α 是一种缺氧依赖性的蛋白质, 在正常氧分压时被泛素依赖的蛋白水解酶水解。缺氧时HIF-1 α 在细胞内很快稳定下来, 与一系列缺氧反应靶基因上的特定结合位点缺氧反应元件结合, 可在转录水平上调控细胞增殖, 激活许多缺氧

■应用要点

本研究表明缺氧能够促进肝癌VM形成,诱导HIF-1 α 、MMP-2和MMP-9表达可能是其机制之一.这可能对肝癌分子靶向治疗具有一定的临床意义.

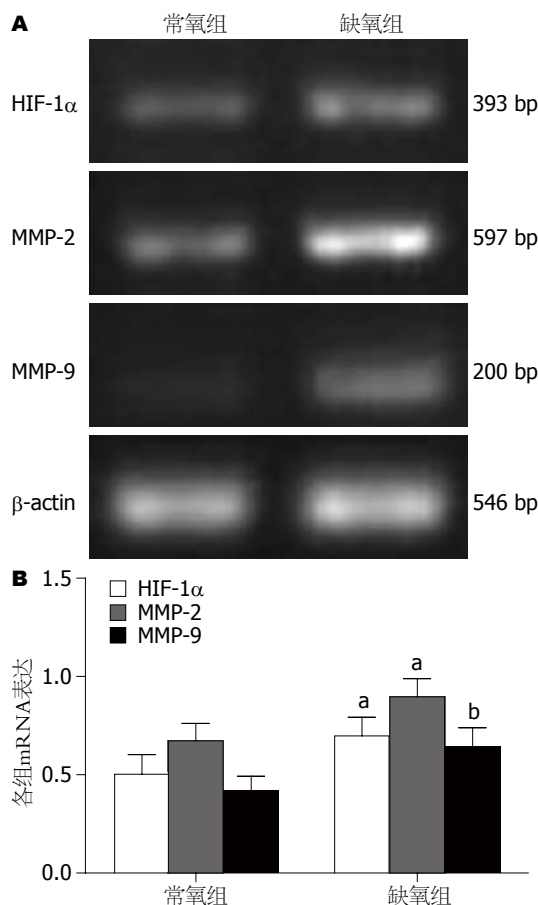


图2 常氧和缺氧培养下HIF-1 α 、MMP-2和MMP-9基因表达. A: RT-PCR检测; B: 灰度扫描. ^a P <0.05, ^b P <0.01 vs 常氧组.

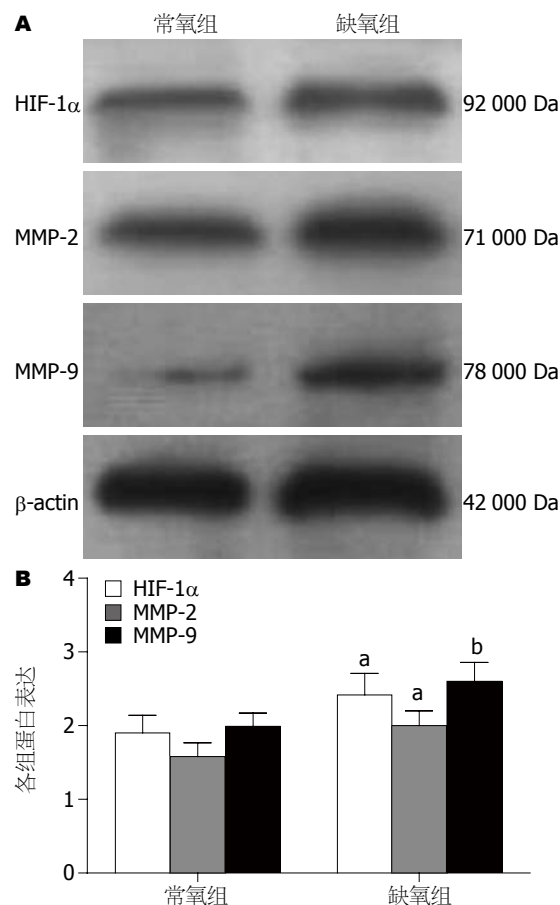


图3 常氧和缺氧培养下HIF-1 α 、MMP-2和MMP-9蛋白表达. A: RT-PCR检测; B: 灰度扫描. ^a P <0.05, ^b P <0.01 vs 常氧组.

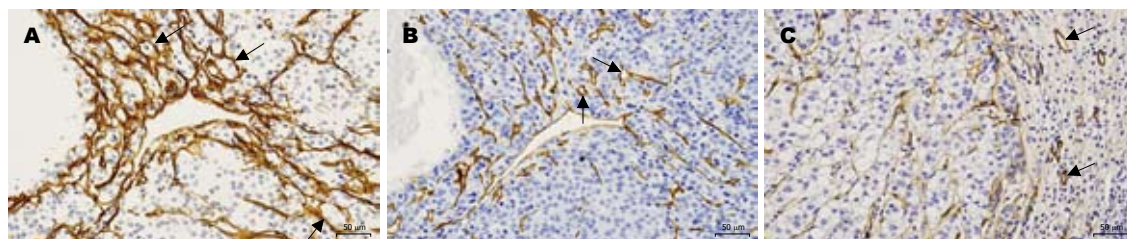


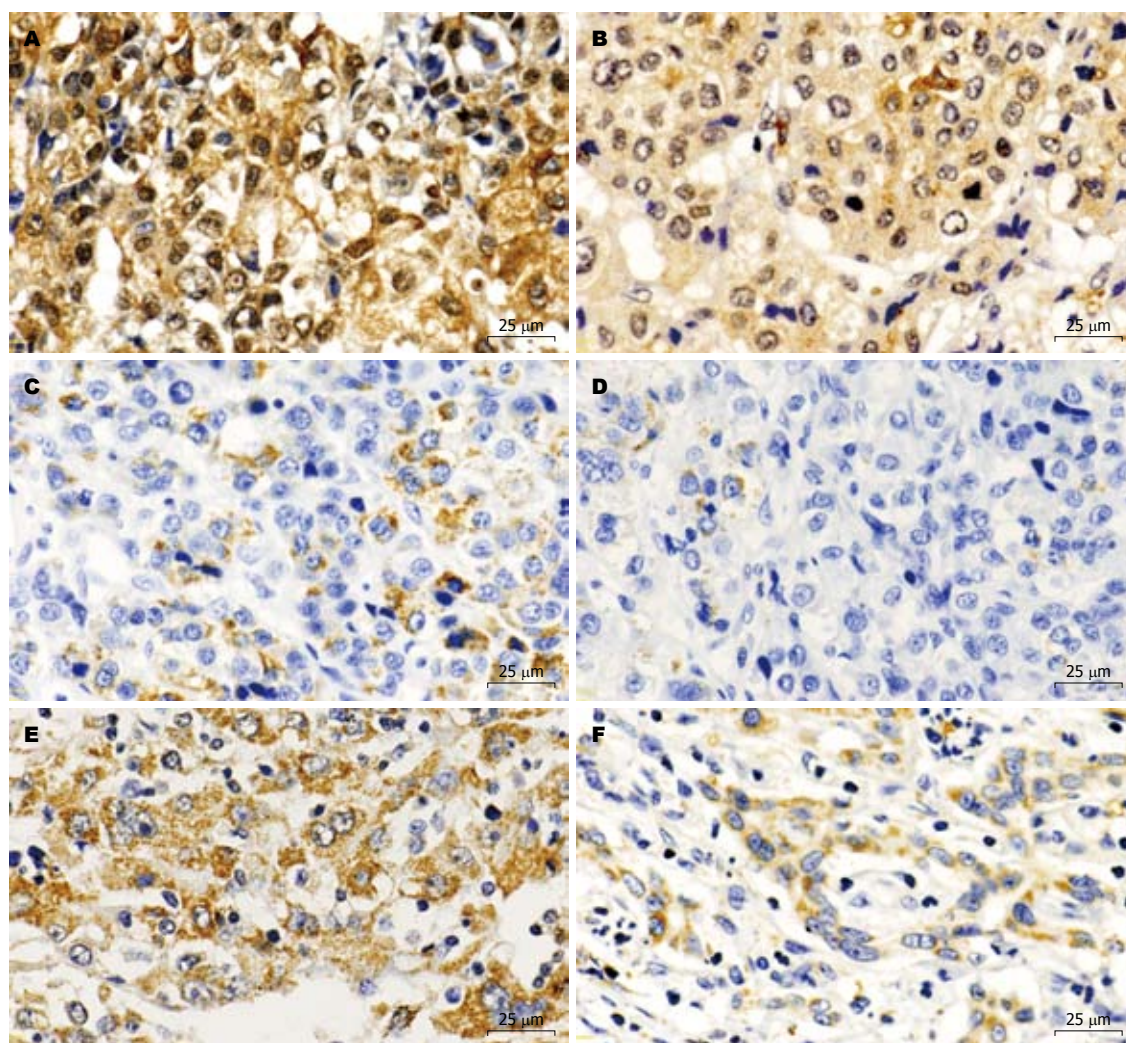
图4 肝癌组织中的VM. A: 层粘连蛋白染色可见包绕肿瘤细胞的环(箭头指示); B: CD34染色阳性者为肝血窦(箭头指示); C: 层粘连蛋白染色未见包绕肿瘤细胞的环(箭头指示为胆管和血管基底膜).

反应性基因的表达,与肿瘤的能量代谢、血管生成、浸润和转移等密切相关^[14-16].

研究表明,缺氧也能促进肿瘤细胞VM的形成,其对VM的调控可能涉及多种机制^[9,17-19].在黑色素瘤鼠模型中,缺氧环境使肿瘤细胞HIF-1 α 表达增加,诱导VM通道形成,以获得充足的血液供应^[10].缺氧也是卵巢上皮性癌细胞形成VM的重要诱导因素,而西罗莫司通过抑制HIF-1 α mRNA的表达阻断VM的形成^[11].在尤因肉瘤组织中,VM周围的肿瘤细胞内存在着缺氧并高表达HIF-1 α 及其靶基因葡萄糖载体GLUT1;当尤因肉瘤细胞被培养在低氧条件下,一些与

VM相关的基因表达增加.表明缺氧可能通过激活HIF-1 α 而促进尤因肉瘤VM形成^[9].我们通过对肝癌细胞系MHCC97-H进行常氧和缺氧条件下三维培养,发现在缺氧条件下,在厚胶上培养48 h的肝癌细胞能形成基质型VM,而常氧环境下的细胞48 h未见基质型VM形成.在薄胶上三维培养48 h,常氧组与缺氧组的肝癌细胞均能形成管形VM,但缺氧组形成的管道长度明显较常氧组长.表明缺氧能促进肝癌VM的形成.我们同时也发现,在缺氧条件下,伴随着VM的形成HIF-1 α 也显著地被缺氧环境所上调.

影响VM通道形成的因素包括肿瘤细胞的



同行评价

本文选题较好, 设计合理, 结果可靠, 具有很好的学术价值.

图 5 VM组与非VM组肝癌组织中HIF-1 α 、MMP-2和MMP-9表达. A: HIF-1 α 在VM组中表达; B: HIF-1 α 在非VM组中的表达; C: MMP-2在VM组中表达; D: MMP-2在非VM组中表达; E: MMP-9在VM组中表达; F: MMP-9在非VM组中表达.

可塑性、细胞外基质(extracellular matrix, ECM)重塑和VM与宿主微循环的连接^[18,20]. ECM重塑为VM形成提供了所需的空間, 其与肿瘤细胞分泌的MMP有关. 在MMP中, MMP-2和MMP-9是最主要的MMP, 能降解各种ECM蛋白, 促进肿瘤血管生成、侵袭和转移, 并能促进VM形成^[2,5,20-25]. 尽管一些关于缺氧或HIF-1 α 对MMP-2和MMP-9作用的研究结果还存在着争议, 但似乎缺氧更可能会诱导MMP-2和MMP-9表达^[23,26,27]. 因此, 我们推测MMP-2和MMP-9可能涉及缺氧诱导的VM形成机制. 我们的三维培养实验也证实, 伴随着VM的形成, MMP-2和MMP-9基因和蛋白表达水平均明显升高, 这表明缺氧也可能通过诱导MMP-2和MMP-9表达而促进肝癌VM形成.

肝癌由肝炎病毒的慢性感染或在肝硬化基础上发展而来, 因肝内纤维化破坏脉管系统及癌基因激活和(或)抑癌基因失活等使癌细胞增殖

失控导致缺氧. HIF-1是特异性低氧状态下发挥活性的转录因子, 其中HIF-1 α 是唯一的氧调节亚基, 广泛参与细胞缺氧诱导的特异性应答^[28]. 鉴于肝癌组织中基质型VM能通过包绕3-15个肿瘤细胞的层粘连蛋白阳性环来识别^[4,29], 我们先用层粘连蛋白免疫组织化学方法证实了151例肝癌标本中31例存在VM, 接着发现存在VM的肝癌组织中HIF-1 α 表达水平明显高于不存在VM的肝癌组织, 表明相比后者, 存在VM的肝癌组织缺氧可能更严重. MMP-2和MMP-9表达水平在存在VM的肝癌组织中也明显较高. 此结果与最近Li等^[30]在胃腺癌中的报道相似. 这也从另一个角度说明缺氧可能促进了肝癌VM的形成.

总之, 缺氧能够促进肝癌VM形成, 诱导HIF-1 α 、MMP-2和MMP-9表达可能是其机制之一. 然而缺氧是否通过激活HIF-1 α 、MMP-2和MMP-9酶活性而诱导肝癌VM形成, 还有待进一

步证实. 肝癌VM形成缺氧机制的阐明可能对肝癌靶向治疗具有一定的临床意义.

4 参考文献

- Maniotis AJ, Folberg R, Hess A, Seftor EA, Gardner LM, Pe'er J, Trent JM, Meltzer PS, Hendrix MJ. Vascular channel formation by human melanoma cells in vivo and in vitro: vasculogenic mimicry. *Am J Pathol* 1999; 155: 739-752
- Sun B, Zhang S, Zhang D, Du J, Guo H, Zhao X, Zhang W, Hao X. Vasculogenic mimicry is associated with high tumor grade, invasion and metastasis, and short survival in patients with hepatocellular carcinoma. *Oncol Rep* 2006; 16: 693-698
- Zhao H, Gu XM. Study on vasculogenic mimicry in malignant esophageal stromal tumors. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 2430-2433
- Guzman G, Cotler SJ, Lin AY, Maniotis AJ, Folberg R. A pilot study of vasculogenic mimicry immunohistochemical expression in hepatocellular carcinoma. *Arch Pathol Lab Med* 2007; 131: 1776-1781
- Robertson FM, Simeone AM, Lucci A, McMurray JS, Ghosh S, Cristofanilli M. Differential regulation of the aggressive phenotype of inflammatory breast cancer cells by prostanoid receptors EP3 and EP4. *Cancer* 2010; 116: 2806-2814
- El Hallani S, Boisselier B, Peglion F, Rousseau A, Colin C, Idhah A, Marie Y, Mokhtari K, Thomas JL, Eichmann A, Delattre JY, Maniotis AJ, Sanson M. A new alternative mechanism in glioblastoma vascularization: tubular vasculogenic mimicry. *Brain* 2010; 133: 973-982
- Baeten CI, Hillen F, Pauwels P, de Bruine AP, Baeten CG. Prognostic role of vasculogenic mimicry in colorectal cancer. *Dis Colon Rectum* 2009; 52: 2028-2035
- 刘文斌, 许戈良, 姜卫东. 肿瘤血管生成拟态研究新进展. *医学综述* 2010; 16: 1001-1004
- van der Schaft DW, Hillen F, Pauwels P, Kirschmann DA, Castermans K, Egbrink MG, Tran MG, Sciort R, Hauben E, Hogendoorn PC, Delattre O, Maxwell PH, Hendrix MJ, Griffioen AW. Tumor cell plasticity in Ewing sarcoma, an alternative circulatory system stimulated by hypoxia. *Cancer Res* 2005; 65: 11520-11528
- Sun B, Zhang S, Zhang D, Gu Y, Zhang W, Zhao X. The influence of different microenvironments on melanoma invasiveness and microcirculation patterns: an animal experiment study in the mouse model. *J Cancer Res Clin Oncol* 2007; 133: 979-985
- 尧良清, 丰有吉, 丁景新, 徐丛剑, 金鸿雁, 殷莲华. 缺氧诱导卵巢上皮性癌细胞形成拟态血管的前期研究. *中华妇产科杂志* 2005; 40: 662-665
- Yamamoto K, Takahashi T, Asahara T, Ohura N, Sokabe T, Kamiya A, Ando J. Proliferation, differentiation, and tube formation by endothelial progenitor cells in response to shear stress. *J Appl Physiol* 2003; 95: 2081-2088
- Crowther M, Brown NJ, Bishop ET, Lewis CE. Microenvironmental influence on macrophage regulation of angiogenesis in wounds and malignant tumors. *J Leukoc Biol* 2001; 70: 478-490
- Huang GW, Yang LY, Lu WQ. Expression of hypoxia-inducible factor 1 α and vascular endothelial growth factor in hepatocellular carcinoma: Impact on neovascularization and survival. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 1705-1708
- 李月明, 姚登福, 姜华, 邱伟伟, 李姗姗, 钱静, 卞银珠. 肝癌组织中HIF-1 α 的表达与HIF-1 α mRNA的扩增分析. *胃肠病学和肝病学杂志* 2009; 18: 327-331
- 华杰, 施瑞华, 张红杰, 于蓬珍, 朱宏, 肖斌, 张国新, 郝波. RNA干扰HIF-1 α 对血管生成拟态相关基因表达的影响. *世界华人消化杂志* 2009; 17: 1913-1918
- Zhang S, Li M, Zhang D, Xu S, Wang X, Liu Z, Zhao X, Sun B. Hypoxia influences linearly patterned programmed cell necrosis and tumor blood supply patterns formation in melanoma. *Lab Invest* 2009; 89: 575-586
- Zhang S, Zhang D, Sun B. Vasculogenic mimicry: current status and future prospects. *Cancer Lett* 2007; 254: 157-164
- 刘文斌. 血管生成拟态与肝癌研究进展. *国际肿瘤学杂志* 2010; 37: 536-539
- Sood AK, Fletcher MS, Coffin JE, Yang M, Seftor EA, Gruman LM, Gershenson DM, Hendrix MJ. Functional role of matrix metalloproteinases in ovarian tumor cell plasticity. *Am J Obstet Gynecol* 2004; 190: 899-909
- Sood AK, Seftor EA, Fletcher MS, Gardner LM, Heidger PM, Buller RE, Seftor RE, Hendrix MJ. Molecular determinants of ovarian cancer plasticity. *Am J Pathol* 2001; 158: 1279-1288
- Sun T, Zhao N, Zhao XL, Gu Q, Zhang SW, Che N, Wang XH, Du J, Liu YX, Sun BC. Expression and functional significance of Twist1 in hepatocellular carcinoma: its role in vasculogenic mimicry. *Hepatology* 2010; 51: 545-556
- Sun B, Zhang D, Zhang S, Zhang W, Guo H, Zhao X. Hypoxia influences vasculogenic mimicry channel formation and tumor invasion-related protein expression in melanoma. *Cancer Lett* 2007; 249: 188-197
- Sun B, Qie S, Zhang S, Sun T, Zhao X, Gao S, Ni C, Wang X, Liu Y, Zhang L. Role and mechanism of vasculogenic mimicry in gastrointestinal stromal tumors. *Hum Pathol* 2008; 39: 444-451
- Xu X, Jia R, Zhou Y, Song X, Fan X. Investigation of vasculogenic mimicry in sebaceous carcinoma of the eyelid. *Acta Ophthalmol* 2010; 88: e160-e164
- Annabi B, Lee YT, Turcotte S, Naud E, Desrosiers RR, Champagne M, Eliopoulos N, Galipeau J, Béliveau R. Hypoxia promotes murine bone-marrow-derived stromal cell migration and tube formation. *Stem Cells* 2003; 21: 337-347
- Ottino P, Finley J, Rojo E, Ottlecz A, Lambrou GN, Bazan HE, Bazan NG. Hypoxia activates matrix metalloproteinase expression and the VEGF system in monkey choroid-retinal endothelial cells: Involvement of cytosolic phospholipase A2 activity. *Mol Vis* 2004; 10: 341-350
- 李姗姗, 姚登福, 董志珍. 肝缺氧诱导因子-1 α 与肝癌发生、发展及治疗研究新进展. *世界华人消化杂志* 2010; 18: 361-367
- Folberg R, Maniotis AJ. Vasculogenic mimicry. *APMIS* 2004; 112: 508-525
- Li M, Gu Y, Zhang Z, Zhang S, Zhang D, Saleem AF, Zhao X, Sun B. Vasculogenic mimicry: a new prognostic sign of gastric adenocarcinoma. *Pathol Oncol Res* 2010; 16: 259-266

编辑 李薇 电编 何基才

甘草酸二铵对溃疡性结肠炎大鼠Foxp3 mRNA表达的影响

原皓, 崔慎茹, 李时光

原皓, 潍坊医学院附属医院消化内科 山东省潍坊市 261042
崔慎茹, 潍坊医学院 山东省潍坊市 261042
李时光, 淄博市第一人民医院消化内科 山东省淄博市 255200
原皓, 副教授, 主要从事炎症性肠病的研究。

作者贡献分布: 此课题由原皓设计; 研究过程由崔慎茹与李时光共同完成; 数据分析由崔慎茹完成; 本论文写作由原皓与崔慎茹完成。

通讯作者: 原皓, 副教授, 261042, 山东省潍坊市胜利东街288号, 潍坊医学院附属医院消化内科。91chuhan@163.com
电话: 0536-8068912

收稿日期: 2010-08-07 修回日期: 2010-09-20

接受日期: 2010-09-27 在线出版日期: 2010-11-08

Diammonium glycyrrhizinate up-regulates the expression of Foxp3 mRNA in rats with ulcerative colitis

Hao Yuan, Shen-Ru Cui, Shi-Guang Li

Hao Yuan, Department of Internal Medicine, the Affiliated Hospital of Weifang Medical College, Weifang 261042, Shandong Province, China

Shen-Ru Cui, Weifang Medical College, Weifang 261042, Shandong Province, China

Shi-Guang Li, Department of Gastroenterology, the First People's Hospital of Zibo, Zibo 255200, Shandong Province, China

Correspondence to: Associate Professor Hao Yuan, Department of Gastroenterology, the Affiliated Hospital of Weifang Medical College, 288 East Shengli Avenue, Weifang 261042, Shandong Province, China. 91chuhan@163.com
Received: 2010-08-07 Revised: 2010-09-20

Accepted: 2010-09-27 Published online: 2010-11-08

Abstract

AIM: To evaluate the protective effect of diammonium glycyrrhizinate (DG) against ulcerative colitis in rats and to investigate potential mechanisms involved.

METHODS: Thirty Sprague-Dawley (SD) rats were equally randomized into normal control group, model group and DG group. Ulcerative colitis was induced in the DG group and model group by rectal administration of trinitrobenzene sulphonic acid (TNBS). Disease activity index (DAI) and histological damage were evaluated, and the expression of forkhead box P3 (Foxp3) mRNA in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) was detected by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR).

RESULTS: Both DAI and histological damage score were significantly higher in the model group than in the normal control group (DAI: 7.1 ± 0.2 vs 0.3 ± 0.6 , $P < 0.05$; histological damage score: 6.7 ± 0.5 vs 0.9 ± 0.2 , $P < 0.05$). Compared with the model group, DAI and histological damage score were significantly improved in the DG group (DAI: 3.1 ± 0.6 vs 7.1 ± 0.2 , $P < 0.05$; histological damage score: 3.3 ± 0.4 vs 6.7 ± 0.5 , $P < 0.05$). Compared with the normal control group, the expression of Foxp3 mRNA was down-regulated in PBMCs in the model group (0.51 ± 0.34 vs 1.09 ± 0.38 , $P < 0.05$). DG treatment significantly up-regulated the expression of Foxp3 mRNA in PBMCs (0.92 ± 0.53 vs 0.51 ± 0.34 , $P < 0.05$).

CONCLUSION: DG can ameliorate colonic inflammation in rats with ulcerative colitis possibly by increasing the expression of Foxp3 mRNA in PBMCs.

Key Words: Ulcerative colitis; Diammonium glycyrrhizinate; Forkhead box P3; T lymphocyte; Peripheral blood mononuclear cell

Yuan H, Cui SR, Li SG. Diammonium glycyrrhizinate up-regulates the expression of Foxp3 mRNA in rats with ulcerative colitis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(31): 3301-3305

摘要

目的: 研究甘草酸二铵(DG)对大鼠溃疡性结肠炎(UC)的疗效及对大鼠外周血单个核细胞中Foxp3 mRNA表达的影响, 继而从自身免疫方面探讨DG治疗大鼠UC的作用机制。

方法: 用2, 4, 6-三硝基苯磺酸(TNBS)/乙醇灌肠复制大鼠UC模型, 健康雌性SD大鼠随机分为正常对照组、模型组、DG组[40 mg/(kg·d)], 每组10只。造模10 d后, 收集标本, 观察大鼠疾病活动指数(DAI)、组织学改变, 应用RT-PCR半定量检测大鼠外周血单个核细胞中Foxp3 mRNA的表达水平。

结果: 正常对照组、模型组和DG组的DAI评分分别为 0.3 ± 0.6 , 7.1 ± 0.2 , 3.1 ± 0.6 ; 组织学

■背景资料

甘草酸二铵(DG)具有抗炎、调节免疫、抗过敏等药理作用, 目前临床上主要用于肝炎的治疗。但探讨其治疗溃疡性结肠炎(UC)的作用及机制的报道不多。

■同行评议者

戈之铮, 教授, 上海交通大学医学院附属仁济医院消化科

■研发前沿

UC的传统治疗药物疗效确切,但严重的副作用限制了其长期应用。因此,寻找毒副作用小、适合于长期服用的治疗药物一直是研究的热点之一。

损伤评分分别为 0.9 ± 0.2 , 6.7 ± 0.5 , 3.3 ± 0.4 , 与正常对照组相比, DG组、模型组上述指标评分均显著增高($P < 0.05$); 而与模型组相比, DG组能显著改善UC症状($P < 0.05$)。模型组大鼠Foxp3 mRNA水平低于正常组(0.51 ± 0.34 vs 1.09 ± 0.38 , $P < 0.05$); 与模型组相比, DG组Foxp3 mRNA的表达显著升高(0.92 ± 0.53 vs 0.51 ± 0.34 , $P < 0.05$)。

结论: DG可显著改善大鼠UC, 通过上调外周血单个核细胞中Foxp3 mRNA的表达抑制自身反应性T淋巴细胞的增殖可能是其机制之一。

关键词: 溃疡性结肠炎; 甘草酸二铵; 叉头状/翅膀状螺旋转录因子; T淋巴细胞; 外周血单个核细胞

原皓, 崔慎茹, 李时光. 甘草酸二铵对溃疡性结肠炎大鼠Foxp3 mRNA表达的影响. 世界华人消化杂志 2010; 18(31): 3301-3305

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/3301.asp>

0 引言

溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)是一种慢性、非特异性结肠炎症性肠病, 主要累及结肠黏膜和黏膜下层, 病因和发病机制至今仍不明确, 目前认为主要与遗传、感染、环境、免疫等多因素有关^[1-3]。其传统治疗药物有氨基水杨酸制剂、糖皮质激素以及免疫抑制剂等, 虽能控制大多数患者的症状, 但长期使用不良反应比较大^[4,5]。甘草酸二铵(diammonium glycyrrhizinate, DG)是甘草有效成分的第3代提取物, 并且是甘草活性成分甘草次酸的左旋构型, 目前主要用于治疗肝炎等疾病, 该药不仅有与皮质类固醇类似的非特异性抗炎作用, 而且有镇痛、保护膜结构、抗脂质氧化、改善肝功能及调节免疫等生物活性^[6]。其特点是疗效好, 不良反应小, 更主要的是激素样的不良反应小。我们初步的研究已证实DG对UC有明显的治疗作用^[7-9]。本实验旨在进一步明确DG对UC大鼠的治疗作用, 并通过研究其对UC大鼠外周血单个核细胞叉头状/翅膀状螺旋转录因子(forkhead/winged helix transcription factor, Foxp3)mRNA的表达水平的影响, 继而从免疫方面探讨DG治疗大鼠UC可能的作用机制, 为其治疗UC提供一定的理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料 健康♀Sprague-Dawley(SD)大鼠, 体重 230 ± 10 g, 购自山东中医药大学实验动物

中心。主要试剂: 2, 4, 6-三硝基苯磺酸(TNBS)购自Sigma公司; DG注射液(商品名: 甘利欣, 批号: H10940190, 江苏正大天晴药业股份有限公司); 大鼠淋巴细胞分离液(CLS1083)、PCR(Taq)扩增试剂盒(SK2501, 上海生工公司); GAPDH、Foxp3引物(上海生工公司合成)。

1.2 方法

1.2.1 造模及分组: 将30只健康♀SD大鼠适应性喂养1 wk后随机分为3组, 每组10只, 禁食不禁水24 h, 10%水合氯醛 4.5 mL/kg腹腔注射麻醉, 参照文献方法, TNBS与无水乙醇以1:1比例混匀, 根据大鼠禁食后体质量将TNBS以50-60 mg/kg计算出DG组和模型组每只大鼠所需的混合药液体积, 用聚乙烯导管经肛门缓慢插入结肠8 cm后, 将混合药液注入肠腔, 正常对照组大鼠仅灌注等量生理盐水。根据人与大鼠的药物剂量折算系数算出DG的应用剂量, 并用生理盐水稀释至2 mL, 腹腔注入; 造模当天作为第1天, DG组第1-10天腹腔注射DG[(40 mg/(kg·d))]; 模型组第1-10天腹腔注射2 mL生理盐水; 正常对照组第1-10天腹腔注射2 mL生理盐水。

1.2.2 标本的制备: 造模10 d时, 进行组织学评分, 后用10%水合氯醛腹腔注射麻醉大鼠, 心脏采血1 mL, 肝素抗凝, 稀释后的血液缓慢加入等体积的淋巴细胞分离液中, 2 000 r/min离心20 min, 分离出单个核细胞, 再加入5倍体积9 g/L生理盐水, 2 000 r/min离心10 min, 洗涤2次, 加入TRIzol(Invitrogen公司)后, -80°C 保存。处死动物, 取距肛门约8 cm的结肠组织, 沿肠系膜纵轴剪开, 冷生理盐水冲洗干净, 肉眼进行大体形态观察, 滤纸吸干称质量, 4%多聚甲醛固定, HE染色观察组织学改变。

1.2.3 结肠炎症的评价: 采用疾病活动指数(disease activity index, DAI)及组织学损伤评分来评价结肠炎症。(1)DAI评分: 造模后10 d, 综合大鼠体质量下降百分率(体质量不变为0, 1-5为1分, 6-10为2分, 11-15为3分, >15为4分), 大便黏稠度(正常为0, 松散大便为2分, 腹泻为4分)和大便出血(正常0分, 隐血阳性为2分, 显性出血为4分)进行积分^[10]。(2)组织学损伤评分: 选10个视野($\times 100$)平均评分。评分标准: 正常结肠黏膜记0分; 隐窝缺损1/3时记1分; 隐窝缺损2/3记2分; 固有层覆盖单层上皮伴轻度炎性细胞浸润记3分; 黏膜糜烂、溃疡伴显著炎性细胞浸润记4分。

1.2.4 RT-PCR半定量检测外周血单个核细胞Foxp3 mRNA的表达: 标本27例, 其中DG组10

■相关报道

近年来研究发现, 免疫紊乱在UC的发病机制中起重要作用, 并且有研究证实, 消化性溃疡患者外周血及组织中有Foxp3基因的过量表达。



图1 各组大鼠结肠大体形态. A: 正常对照组; B: 模型组; C: DG组.

■创新盘点

本研究用DG治疗UC, 并通过研究其对UC大鼠外周血单个核细胞Foxp3 mRNA表达水平的影响, 继而从免疫方面探讨其治疗大鼠UC可能的作用机制, 为其治疗UC提供一定的理论依据.

例, 模型组7例(造模过程中有3例死亡), 正常对照组10例. (1)总RNA的提取: 从-80℃冰箱中取出外周血单个核淋巴细胞, 彻底混匀, 室温静置5 min, 加入0.2 mL氯仿, 震动15 s, 室温静置2 min; 4℃ 12 000 r/min离心15 min, 轻吸出上层水相至另一EP管, 加等体积异丙醇, 混匀静置10 min; 4℃ 12 000 r/min离心5 min; 弃上清, 加入0.7 mL 70%乙醇洗涤沉淀, 4℃ 12 000 r/min离心2 min; 吸干乙醇, 空气中干燥; 加入20 μL无RNA酶水溶解RNA. (2)RNA纯度和含量的测定: 取5 μL抽提的RNA样品上样电泳, 在12 g/L普通琼脂糖凝胶图谱中显示28S, 18S两条带, 且28S带亮度为18S带亮度两倍者入选. 紫外分光光度计检测RNA在260 nm, 280 nm波长处的吸光度值, 并计算 A_{260}/A_{280} 值和RNA浓度[浓度(mg/L) = $A_{260} \times 40 \times$ 稀释倍数]. (3)cDNA的合成: 配置20 μL逆转录反应体系, 其中M-MLV逆转录酶1 μL, DNTP 1 μL, Oligo(dT)1 μL, Buffer 4 μL, 无RNA水10 μL, 标本RNA 3 μL, 加入EP管中, 15 000 r/min 4℃离心10 min, 弃上清, 加入适量无RNA水, 反复吹打至沉淀溶解. 瞬时离心后, 放入PCR仪, 37℃ 1 h. 95℃灭活5 min, 制作标本cDNA. (5)RT-PCR产物的检测: DNA扩增后, 琼脂糖凝胶电泳检测. 上游引物: 5'-GCTTGTTTGCTGTGCGGAGAC-3', 下游引物: 5'-GTTTCTGAAGTAGGCGAACAT-3', 扩增片段为218 bp, 在紫外线分析仪上观察结果, 分析RT-PCR产物的相对对含量. 设GAPDH作为内参照, 上游引物: 5'-AGTGGATATTGTTGCCATCAATG-3', 下游引物: 5'-CCATGAGGTCCACCACCCTG-3', 扩增片段为905 bp. 为了消除样本提取、反转录和PCR反应过程中造成的差异, 以Foxp3 mRNA和GAPDH mRNA含量的比值, 作为Foxp3 mRNA的相对表达水平, 他是评价Foxp3 mRNA表达水平的指标.

统计学处理 数据用mean ± SD表示, 用SPSS16.0软件进行统计分析. $P < 0.05$ 为差异有统

计学意义.

2 结果

2.1 大鼠一般状况 大鼠于造模后出现活动逐渐减少, 进食明显减少, 体质量减轻, 大便稀并有脓血便, 肛周污秽. 治疗后, DG组大鼠上述症状明显减轻, 5-7 d后粪便基本恢复正常, 肛周干净. 与正常对照组相比, DG组、模型组的DAI评分均显著增高(3.1 ± 0.6 , 7.1 ± 0.2 vs 0.3 ± 0.6 , $P < 0.05$); 而与模型组相比, DG组显著改善($P < 0.05$).

2.2 结肠大体形态改变 模型组大鼠结肠黏膜充血水肿, 局部形成浅表溃疡, 病变严重区呈黑褐色, 本实验成功复制了大鼠UC模型. DG组大鼠结肠轻度肿胀, 溃疡较浅, 较模型组明显减轻(图1).

2.3 组织病理学改变 正常组大鼠结肠黏膜上皮完整, 无溃疡, 间质可见少量白细胞. 模型组大鼠结肠部分肠上皮脱落, 大量炎性细胞浸润, 溃疡形成. DG组大鼠结肠上皮已得到不同程度修复, 炎性细胞浸润明显减轻. 与正常对照组相比, DG组、模型组的组织学损伤评分均显著增高(3.3 ± 0.4 , 6.7 ± 0.5 vs 0.9 ± 0.2 , $P < 0.05$); 而与模型组相比, DG组显著改善(图2).

2.4 细胞总RNA的提取 A_{260}/A_{280} 值均在1.651-1.928, 提示RNA较纯, RNA浓度在330-1 700 mg/L(图3).

2.5 Foxp3 mRNA表达 模型组大鼠单个核细胞中Foxp3 mRNA的含量较正常组降低, 差异有统计学意义(0.51 ± 0.34 vs 1.09 ± 0.38 , $P < 0.05$); 与模型组相比, DG组单个核细胞中Foxp3 mRNA的含量增高, 差异有统计学意义(0.92 ± 0.53 vs 0.51 ± 0.34 , $P < 0.05$, 图4).

3 讨论

UC以腹痛、腹泻、黏液血便、里急后重为主要临床表现^[11], 病情漫长者有发生癌变的可能性^[12]. 流行病学资料提示, UC的发病率不论是在国内和国外都有逐年增高的趋势^[13,14], 但临床上至今没

■应用要点

本研究发现, DG对大鼠UC有良好的治疗作用, 有可能成为UC有效而又不良反应小的治疗药物, 可扩大其临床应用范围。

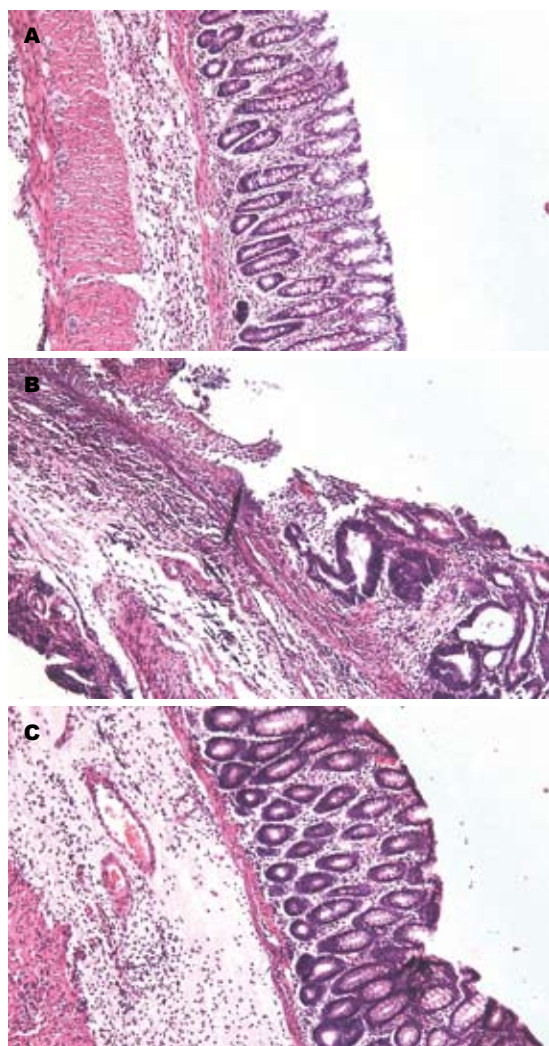


图 2 HE示各组大鼠的结肠病理组织($\times 100$)。A: 正常组; B: 模型组; C: DG组。

有特异性根治措施, 问题的关键是对其确切发病机制仍不清楚。目前对炎症性肠病病因和发病机制的认识可概括为: 环境因素作用于遗传易感者, 在肠道菌丛(或者目前尚未明确的特异性微生物)的参与下, 启动了肠道免疫及非免疫系统, 最终导致免疫反应和炎症过程。可能由于抗原的持续刺激和(或)免疫反应调节紊乱, 这种免疫反应表现为过度亢进和难于自限。

TNBS是一种半抗原物质, 乙醇作为有机溶剂溶解肠黏膜表面的黏液, 破坏肠黏膜屏障, 使TNBS与组织中大分子蛋白质结合后成为完全抗原, 导致针对肠黏膜的免疫反应, 从而诱发UC^[15-17], 本实验成功复制了UC大鼠模型。

Foxp3是新近发现的转录因子, 属于forkhead家族成员, 通过其forkhead结构域与DNA特定定位点结合, 调节目的基因的活化和表达^[18], 主要表达于胸腺、脾脏和淋巴结等淋巴器官和组织, 在

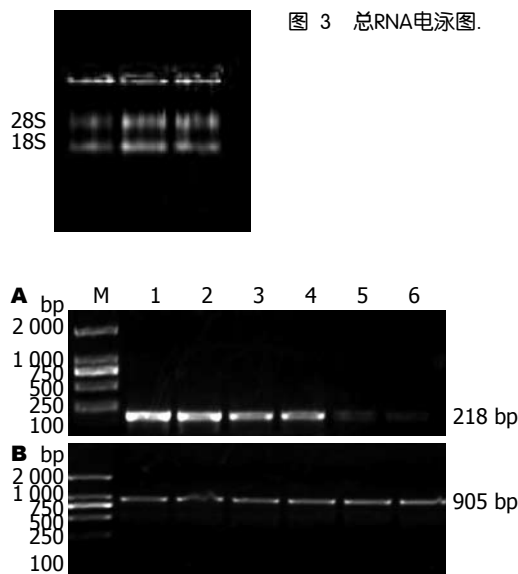


图 3 总RNA电泳图。
图 4 Foxp3 mRNA及GAPDH内参在各组大鼠外周血单个核细胞中的表达。A: Foxp3。M: Marker; 1, 2: 正常组; 3, 4: DG组; 5, 6: 模型组; B: 内参照GAPDH。

鼠类特异性表达于 $CD4^+CD25^+$ Treg细胞^[19,20], 其主要功能在于影响 $CD4^+CD25^+$ Treg细胞的发育, $CD4^+CD25^+$ Treg细胞通过抑制性调节 $CD4^+$ 和 $CD8^+$ T淋巴细胞的活化与增殖, 而具有免疫的负向调节作用^[21-24]。近年来, 免疫紊乱参与了UC的发病机制这一认识已得到了基本的肯定^[25-27], 因此, 研究Foxp3有利于从自身免疫方面探讨UC的发病机制。

在本实验中, 模型组大鼠外周血单个核细胞中Foxp3的表达比对照组低, 这与以往的研究检测UC患者单个核细胞中Foxp3 mRNA的表达结果一致^[28,29]。模型组大鼠外周血单个核细胞中Foxp3 mRNA的表达减少, 表明模型组大鼠体内存在表达Foxp3 mRNA的Treg细胞减少和(或)功能降低。而与模型组相比, DG组却有明显的改善, Foxp3 mRNA的表达增加。实验结果显示, DG能显著改善UC大鼠炎症, 上调外周血单个核细胞中Foxp3 mRNA的表达, 因此推测 $CD4^+CD25^+$ Treg细胞通过Foxp3 mRNA的表达抑制自身反应性T淋巴细胞的增殖, 最终缓解病情, 这也表明DG对自身免疫方面有明显的抑制作用, 从而起到治疗UC的作用, 这一实验结果为该药的临床应用提供了一定的理论依据。

4 参考文献

- Brannigan AE, O'Connell PR, Hurley H, O'Neill A, Brady HR, Fitzpatrick JM, Watson RW. Neutrophil apoptosis is delayed in patients with inflammatory bowel disease. *Shock* 2000; 13: 361-366
- Neurath MF, Finotto S, Fuss I, Boirivant M, Galle

- PR, Strober W. Regulation of T-cell apoptosis in inflammatory bowel disease: to die or not to die, that is the mucosal question. *Trends Immunol* 2001; 22: 21-26
- 3 Suzuki A, Sugimura K, Ohtsuka K, Hasegawa K, Suzuki K, Ishizuka K, Mochizuki T, Honma T, Narisawa R, Asakura H. Fas/Fas ligand expression and characteristics of primed CD45RO⁺ T cells in the inflamed mucosa of ulcerative colitis. *Scand J Gastroenterol* 2000; 35: 1278-1283
- 4 夏冰, 程虹. 溃疡性结肠炎的生物治疗. 临床消化病杂志 2007; 19: 16-19
- 5 Martínez-Montiel MP, Muñoz-Yagüe MT. Biologic therapies for chronic inflammatory bowel disease. *Rev Esp Enferm Dig* 2006; 98: 265-291
- 6 陈雄. 甘草酸二铵注射液对大鼠肾缺血/再灌注损伤的保护作用. 时珍国医国药 2007; 18: 2197-2198
- 7 原皓, 林三仁, 吴克香, 顾芳, 张红梅, 高志星, 焦建新. 甘草酸二铵对大鼠结肠炎的抗炎作用机制研究. 中华消化杂志 2006; 26: 22-25
- 8 Yuan H, Ji WS, Wu KX, Jiao JX, Sun LH, Feng YT. Anti-inflammatory effect of Diammonium Glycyrrhizinate in a rat model of ulcerative colitis. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 4578-4581
- 9 原皓, 吴克香, 史有奎, 高志星, 冯玉光, 李蕾. 甘草酸二铵对溃疡性结肠炎大鼠促炎细胞因子IL-6、IL-8、TNF- α 的影响. 山东医药 2006; 46: 5-6
- 10 Porter SN, Howarth GS, Butler RN. An orally administered growth factor extract derived from bovine whey suppresses breath ethane in colitic rats. *Scand J Gastroenterol* 1998; 33: 967-974
- 11 Kornbluth A, Sachar DB. Ulcerative colitis practice guidelines in adults: American College Of Gastroenterology, Practice Parameters Committee. *Am J Gastroenterol* 2010; 105: 501-523; quiz 524
- 12 Eaden J, Abrams K, Ekbohm A, Jackson E, Mayberry J. Colorectal cancer prevention in ulcerative colitis: a case-control study. *Aliment Pharmacol Ther* 2000; 14: 145-153
- 13 Russel MG. Changes in the incidence of inflammatory bowel disease: what does it mean? *Eur J Intern Med* 2000; 11: 191-196
- 14 Jiang XL, Cui HF. An analysis of 10218 ulcerative colitis cases in China. *World J Gastroenterol* 2002; 8: 158-161
- 15 王皓, 欧阳钦, 胡仁伟. 三硝基苯磺酸结肠炎动物模型的建立. 胃肠病学 2001; 6: 7-10
- 16 Kunin S, Gallily R. Recognition and lysis of altered-self cells by macrophages. I. Modification of target cells by 2,4,6-trinitrobenzene sulphonic acid. *Immunology* 1983; 48: 265-272
- 17 Grisham MB, Volkmer C, Tso P, Yamada T. Metabolism of trinitrobenzene sulfonic acid by the rat colon produces reactive oxygen species. *Gastroenterology* 1991; 101: 540-547
- 18 Bassuny WM, Ihara K, Sasaki Y, Kuromaru R, Kohno H, Matsuura N, Hara T. A functional polymorphism in the promoter/enhancer region of the FOXP3/Scurfin gene associated with type 1 diabetes. *Immunogenetics* 2003; 55: 149-156
- 19 Anderson MS, Venanzi ES, Klein L, Chen Z, Berzins SP, Turley SJ, von Boehmer H, Bronson R, Dierich A, Benoist C, Mathis D. Projection of an immunological self shadow within the thymus by the aire protein. *Science* 2002; 298: 1395-1401
- 20 Ramsdell F. Foxp3 and natural regulatory T cells: key to a cell lineage? *Immunity* 2003; 19: 165-168
- 21 Coffey PJ, Burgering BM. Forkhead-box transcription factors and their role in the immune system. *Nat Rev Immunol* 2004; 4: 889-899
- 22 Brunkow ME, Jeffery EW, Hjerrild KA, Paepers B, Clark LB, Yasayko SA, Wilkinson JE, Galas D, Ziegler SF, Ramsdell F. Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurf, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse. *Nat Genet* 2001; 27: 68-73
- 23 Fontenot JD, Rudensky AY. A well adapted regulatory contrivance: regulatory T cell development and the forkhead family transcription factor Foxp3. *Nat Immunol* 2005; 6: 331-337
- 24 Morgan ME, van Bilsen JH, Bakker AM, Heemskerk B, Schilham MW, Hartgers FC, Elferink BG, van der Zanden L, de Vries RR, Huizinga TW, Ottenhoff TH, Toes RE. Expression of FOXP3 mRNA is not confined to CD4⁺CD25⁺ T regulatory cells in humans. *Hum Immunol* 2005; 66: 13-20
- 25 Kirsner JB. Historical origins of current IBD concepts. *World J Gastroenterol* 2001; 7: 175-184
- 26 Wu HG, Zhou LB, Shi DR, Liu SM, Liu HR, Zhang BM, Chen HP, Zhang LS. Morphological study on colonic pathology in ulcerative colitis treated by moxibustion. *World J Gastroenterol* 2000; 6: 861-865
- 27 MacDonald TT, Monteleone G, Pender SL. Recent developments in the immunology of inflammatory bowel disease. *Scand J Immunol* 2000; 51: 2-9
- 28 李永哲, 孙可歆, 赵臣. 溃疡性结肠炎患者外周血单个核细胞中Foxp3 mRNA的表达水平. 世界华人消化杂志 2006; 14: 810-813
- 29 Maul J, Loddenkemper C, Mundt P, Berg E, Giese T, Stallmach A, Zeitz M, Duchmann R. Peripheral and intestinal regulatory CD4⁺ CD25(high) T cells in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 2005; 128: 1868-1878

■同行评价

本文设计合理, 为甘草酸二铵治疗UC提供一定的理论依据。

编辑 李薇 电编 何基才

线粒体解偶联蛋白2在肠道的分布模式及其对GLP-1分泌的影响

李正阳, 陈燕, 林琳, 蒯筱漪, 于鹏丽, 张红杰

■背景资料

线粒体解偶联蛋白2(UCP2)是线粒体内膜蛋白,具有负性调节胰岛β细胞的胰岛素分泌作用。UCP2 mRNA在体内分布广泛,消化系内也有较高的表达,然而目前其病理生理功能尚不完全明确。

李正阳, 陈燕, 林琳, 蒯筱漪, 于鹏丽, 张红杰, 南京医科大学第一附属医院消化科 江苏省南京市 210029

李正阳, 南京医科大学第一临床医学院内科学消化专业硕士在读,主要从事GLP-1分泌与胃肠道运动与内脏敏感性研究。

国家自然科学基金面上资助项目, No. 30771039

作者贡献分布: 此课题由张红杰设计; 研究过程中大部分工作由李正阳完成, 部分工作由陈燕、蒯筱漪及于鹏丽一同操作完成; 研究所用新试剂及分析工具由张红杰提供; 数据分析由李正阳完成; 本论文写作由李正阳与张红杰完成; 林琳给予指导和修改。

通讯作者: 张红杰, 主任医师, 副教授, 210029, 江苏省南京市, 南京医科大学第一附属医院消化科。hjzhang06@163.com
电话: 025-83718836-6920

收稿日期: 2010-07-13 修回日期: 2010-08-19

接受日期: 2010-08-24 在线出版日期: 2010-11-08

Distribution of mitochondrial uncoupling protein 2 in the intestinal tract and its effect on GLP-1 secretion

Zheng-Yang Li, Yan Chen, Lin Lin, Xiao-Yi Kuai, Peng-Li Yu, Hong-Jie Zhang

Zheng-Yang Li, Yan Chen, Lin Lin, Xiao-Yi Kuai, Peng-Li Yu, Hong-Jie Zhang, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210029, Jiangsu Province, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30771039

Correspondence to: Associate Professor Hong-Jie Zhang, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210029, Jiangsu Province, China. hjzhang06@163.com

Received: 2010-07-13 Revised: 2010-08-19

Accepted: 2010-08-24 Published online: 2010-11-08

Abstract

AIM: To detect the expression of mitochondrial uncoupling protein 2 (UCP2) in the intestinal tissue and to assess the possible effects of UCP2 on GLP-1 secretion in the gastrointestinal tract.

METHODS: The expression of UCP2 mRNA and protein in the gastrointestinal tract was detected by quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (qRT-PCR) and Western blot, respectively. Co-localization of UCP2 with GLP-1 was detected by immunohistochemistry. The level of serum GLP-1 was measured by enzyme-linked immunosorbent assay.

RESULTS: UCP2 was primarily expressed in mucosal epithelial cells and co-localized with GLP-1 in the gastrointestinal mucosa. Glucose administration induced strong expression of UCP2 in the colon of C57BL/6J mice. UCP2-deficient mice showed an increased glucose-induced GLP-1 secretion compared with wild-type littermates (6.9000 ± 0.25 , 5.5600 ± 0.42 vs 3.5408 ± 0.18 , both $P < 0.01$; 9.3500 ± 0.95 , 7.8600 ± 0.25 vs 3.7322 ± 0.13 , both $P < 0.01$). Taken together, these results suggest an inhibitory effect of UCP2 on glucose-induced GLP-1 secretion.

CONCLUSION: The expression of UCP2 in the mouse gastrointestinal tract can be strongly induced by glucose administration. UCP2 serves as a negative regulator of glucose-induced GLP-1 secretion.

Key Words: Mitochondrial uncoupling protein 2; Glucagon-like peptide-1; Mouse; Glucose; Negative regulation

Li ZY, Chen Y, Lin L, Kuai XY, Yu PL, Zhang HJ. Distribution of mitochondrial uncoupling protein 2 in the intestinal tract and its effect on GLP-1 secretion. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(31): 3306-3312

摘要

目的: 探讨线粒体解偶联蛋白2(uncoupling protein 2, UCP2)对胰高血糖素样肽-1(glucagon-like peptide 1, GLP-1)分泌的影响。

方法: 定量PCR及Western blot检测小鼠不同肠段内UCP2的表达情况, 免疫组织化学检测UCP2在肠道中的分布情况, ELISA法测定给予高糖后UCP2基因缺失鼠和野生小鼠血GLP-1的含量变化。

结果: UCP2 mRNA在小肠中表达高于结肠, 而近端结肠中的表达高于远端结肠。Western blot结果显示UCP2蛋白在末端回肠和近端结肠的表达高于远端结肠, UCP2蛋白表达与mRNA变化趋势一致。UCP2主要分布在黏膜上皮层, 平滑肌细胞内也有少量表达。荧光免疫标

■同行评议者

宋军, 副教授, 武汉协和医院消化科

记显示UCP2和GLP-1在肠黏膜层有共表达现象. 葡萄糖可提高肠道组织中UCP2 mRNA表达水平. 给予葡萄糖后15和30 min, 无论是野生型鼠还是UCP2^{-/-}鼠, 血GLP-1水平明显升高, UCP2^{-/-}鼠升高更明显(6.9000 ± 0.25 , 5.5600 ± 0.42 vs 3.5408 ± 0.18 , 均 $P < 0.01$; 9.3500 ± 0.95 , 7.8600 ± 0.25 vs 3.7322 ± 0.13 , 均 $P < 0.01$), 60 min对照组的血GLP-1水平基本降至初始值, 而UCP2^{-/-}鼠血中GLP-1的水平下降缓慢.

结论: 葡萄糖可以诱导肠道内UCP2的表达, 肠黏膜细胞内UCP2升高对肠源性GLP-1的分泌可能具有负调控作用.

关键词: 线粒体解偶联蛋白2; 胰高血糖素样肽-1; 小鼠; 葡萄糖; 负调控

李正阳, 陈燕, 林琳, 蒯筱漪, 于鹏丽, 张红杰. 线粒体解偶联蛋白2在肠道的分布模式及其对GLP-1分泌的影响. 世界华人消化杂志 2010; 18(31): 3306-3312

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/3306.asp>

0 引言

线粒体解偶联蛋白2(uncoupling protein 2, UCP2)是线粒体解偶联蛋白(uncoupling proteins, UCPs)家族成员之一^[1,2], UCP2 mRNA体内分布较广泛, 在消化系内也有较高的表达^[3], 然而目前其病理生理功能尚不完全明确. 已有的研究表明, 在胰岛β细胞中, UCP2介导的线粒体内膜质子渗漏, 减低了通过葡萄糖供能产生的ATP, 负性调节葡萄糖刺激的胰岛素分泌^[4,5]. 高糖、高脂可升高胰岛内UCP2的表达水平^[6-8]. 近来研究显示, 胰岛素的分泌和机体血糖的稳态, 除与胰岛β细胞功能状况有关外, 尚与某些胃肠道产生的胰岛素刺激激素的调节有关, 其中胰高血糖素样肽-1(glucagon-like peptide 1, GLP-1)是来源于肠道的重要的胰岛素分泌调节因子. GLP-1由肠道L细胞产生, 葡萄糖、氨基酸和脂肪酸均可刺激GLP-1的分泌^[9-11]. GLP-1可呈葡萄糖依赖性地促进胰岛素分泌、降低胰高血糖素的分泌、保护胰岛β细胞的功能, 并有抑制胃排空和抑制食欲的作用, 减低体质量, 而且GLP-1具有心脏保护作用, GLP-1的多重机制针对了2型糖尿病的病理生理特点, 使2型糖尿病患者通过基于GLP-1的治疗(如GLP-1类似物)全面获益成为可能^[12-15]. 已知胰岛β细胞是葡萄糖敏感细胞, 具有ATP-sensitive K⁺离子通道(K_{ATP} channel), 这种离子通道由SUR1和Kir6.2两个亚单位组成^[16]. UCP2对葡萄糖刺激的胰岛素分泌具有负性调节作用,

且此作用是通过介导线粒体内膜质子渗漏, 抑制了ATP的合成, 影响K_{ATP}离子通道的功能状态而实现^[4,5]. 肠道分泌GLP-1的L细胞也是葡萄糖敏感细胞, 并且有研究显示GLP-1与K_{ATP}离子通道的SUR1和Kir6.2亚单位存在共表达^[17]. 提示L细胞分泌GLP-1可能也通过影响K_{ATP}离子通道的功能状态实现. 鉴于此, 深入探讨GLP-1的分泌调控机制, 探讨UCP2与GLP-1间的关系, 为寻找糖尿病治疗的新的靶点有着重要意义. 由此我们提出了这样假说, 肠道内L细胞分泌GLP-1可能同样也受到肠道内UCP2的影响, 其可能的作用方式像UCP2对胰岛β细胞分泌胰岛素的调控一样, 即UCP2升高, 质子渗透增加, ATP合成减少, GLP-1分泌减低. 本研究通过对UCP2基因缺失鼠及野生鼠在高糖刺激下GLP-1分泌测定以及UCP2的表达与GLP-1分泌之间关系的研究, 探讨UCP2对GLP-1分泌的影响.

1 材料和方法

1.1 材料 C57BL/6J鼠44只, C57BL/6J背景基础上的UCP2基因缺失鼠20只均购自南京大学动物模式中心. 所有鼠龄为8-10 wk. 鼠饲养在SPF级环境, 温度23 °C, 有着常规的光线与黑暗循环. 动物的饲养和动物实验操作严格按实验动物饲养及操作规程进行. TRIzol试剂(TRIzol Reagent, Invitrogen, USA), 反转录酶(AMV reverse transcriptase, GIBCO Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), TaqMan探针及引物(Shanghai Shinegene Molecular Biotechnology Co., LTD., Shanghai), 引物及探针的序列如下: UCP2 gene: Sense primer: 5'-CCAATGTTGCCCGWAATG-3', Anti-sense primer: 5'-TGAGGTTGGCTTTCAGGAG-3', Probe1: 5'-FAM+CTGGTGACCTATGACCTCA TCA AAG-3', β-actin: Sense primer: 5'-GGCAC-CACACYTTCTACAATG-3', Anti-sense primer: 5'-GGGGGTGTTGAAGGTCTCAAAC-3', Probe2: 5'-FAM+TGTGGCCCCTGAGGAGCAC CC-3'. 定量PCR仪(ABI Prism 7000, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), 线粒体蛋白提取试剂盒, BCA蛋白分析试剂盒(Pierce, Rockford, USA), 酶联免疫测定GLP-1试剂盒(Glucagon Like Peptide-1 active, ELISA kit, Linco Research, Inc).

1.2 方法

1.2.1 组织标本的准备: 为了观察葡萄糖对肠道UCP2表达的影响, 将C57BL/6J鼠分成3组, 每组

■ 研发前沿

胰高血糖素样肽-1(GLP-1)是来源于肠道的重要胰岛素分泌调节因子, GLP-1由肠道L细胞产生, 具有葡萄糖依赖性促进胰岛素分泌、降低胰高血糖素的分泌、保护胰岛β细胞的功能, 抑制胃排空, 降低食欲从而降低体质量, GLP-1的多重机制针对了2型糖尿病的病理生理特点, 使得GLP-1成为关注焦点.

■相关报道

Murase等报道大鼠小肠中有较丰富的UCP2 mRNA, 食物中的脂肪酸可通过激活PPAR α 上调大鼠小肠内UCP2 mRNA的表达。

8只: 第1组给予25%葡萄糖溶液灌胃(2 g/kg体重); 第2组: 给予腹腔注射葡萄糖溶液(2 g/kg体重); 第3组(对照组): 给予相应体积的生理盐水处理。给予葡萄糖的各组鼠在给予葡萄糖后60 min处死, 采集肠道标本。为了观察UCP2对葡萄糖刺激的GLP-1分泌有何影响, 给予UCP2基因缺失鼠(每个时间点的小鼠数量, $n = 5$)以葡萄糖(2 g/kg)灌胃处理, 对照组($n = 20$)给予生理盐水。在给予葡萄糖干预处理前所有鼠禁食12 h, 禁食期间可自由饮水, UCP2基因缺失鼠及野生鼠给予葡萄糖后分别于0, 15, 30, 60 min收集血标本并测定血糖变化。血标本的采集过程中应加入Dipeptidyl peptidase IV抑制剂, 离心3 000 r/min, 收集上清放于-70 °C以备GLP-1的测定。采集末端回肠及结肠标本后即刻放入液氮中以备提取RNA及蛋白, 同时选取上述部位肠道组织放入40 g/L多聚甲醛中以便做组织的免疫组织化学。

1.2.2 RNA的分离: 将前期液氮中留取的末端回肠, 近端及远端结肠标本取出, 放入研钵中, 反复加入少量液氮, 反复研磨后, 按50-100 mg组织/1 mL TRIzol加入TRIzol, 转入离心管。将加TRIzol后的组织, 室温放置5 min, 使其充分裂解。12 000 r/min离心5 min, 弃沉淀。按200 μ L氯仿/1 mL TRIzol加入氯仿, 振荡混匀后室温放置15 min。4 °C, 12 000 g离心15 min。吸取上层水相, 至另一离心管中。按0.5 mL异丙醇/1 mL TRIzol加入异丙醇混匀, 室温放置5-10 min。4 °C, 12 000 g离心10 min, 弃上清, RNA沉于管底。按1 mL TRIzol含有1 mL 750 mL/L乙醇, 加入750 mL/L乙醇混匀, 温和振荡离心管, 悬浮沉淀。4 °C, 8 000 g离心5 min, 尽量弃上清。室温晾干或真空干燥5-10 min。根据RNA量多少加入DEPC水, 20-50 μ L, RNA溶解后放入-70 °C待用。测A值定量RNA浓度, 以 $A_{260/280}$ 测定RNA的纯度。 $A_{260/280} > 1.7$, RNA纯度好。

1.2.3 定量RT-PCR测定UCP2 mRNA: (1)cDNA的逆转录: Oligo(dT)18 primers 1 μ L, 15 $\times$ Buffer 2 μ L, dNTP 0.5 μ L, AMV逆转录酶1 μ L, 模板RNA 1 μ L, DEPC水4.5 μ L, 稍离心, 100 °C沸水浴1 min, 42 °C水浴1 h, 100 °C沸水浴3 min灭活AMV, 立即PCR或-20 °C保存。(2)定量RT-PCR测定UCP2 mRNA: 选用ABI Prism 7000序列探测系统(Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)进行定量PCR检测, 选用TaqMan标记探针(Shanghai Shinegene Molecular Biotechnology Co., LTD., Shanghai, China)。用ABI Prism

7000 SDS software version 1.0. 获得曲线循环数量。UCP2 gene: 每一反应体系20 μ L, 10 $\times$ Buffer 2 μ L, Mg²⁺ 1.6 μ L, dNTPs 0.6 μ L, Primer UCP2 0.8 μ L, Taq酶0.2 μ L, Probe1 0.07 μ L, dH₂O 13.73 μ L。 β -actin: 每一反应体系20 μ L, 10 $\times$ Buffer 2 μ L, Mg²⁺ 1.6 μ L, dNTPs 0.6 μ L, Primer UCP2 0.8 μ L, Taq酶0.2 μ L, Probe1 0.07 μ L, dH₂O 13.73 μ L。引物和探针序列见前(材料部分)。每一标本3个复孔, 每一反应体系加cDNA 1 μ L。扩增条件为95 °C 5 min, 40循环95 °C 30 s, 60 °C 1 min, 最后1循环为72 °C 3 min。

1.2.4 Western blot检测肠道中UCP2的表达: (1)线粒体蛋白提取及蛋白定量(选取BCA-100蛋白定量测定试剂盒), 按说明书进行操作; (2)电泳: 制胶浓度选择为12.5%, 电泳, 按每块胶20 mA恒流电泳; (3)转膜: 取出完成的电泳的SDS胶, 浸入转膜Buffer中15 min, 取滤纸浸入缓冲液中, 剪取合适大小的PVDF膜, 转膜时间90 min; (4)免疫标记及显影: 将膜浸入Blocking Buffer(5%脱脂牛奶-PBST)中, 摇床上Blocking 1 h。吸去Blocking Buffer, 将一抗在1% BSA-1 $\times$ PBST中按一定比例稀释(UCP2 1 : 1 000), 加入装有PVDF膜的小袋中, 确保含有一抗的液体覆盖膜, 4 °C孵育过夜。取出PVDF膜, 在脱色摇床上用Washing Buffer洗3遍, 每次15 min。在1% BSA-1 $\times$ PBST中按比例稀释HRP标记的二抗(1 : 2 000), 与膜共同孵育1 h。取出PVDF膜, 在脱色摇床上用Washing Buffer洗3遍, 每次15 min。将ECL底物以1 : 20的比例稀释, 与膜共同孵育60 s, 吸水纸吸干残余底物, 夹入塑料膜中, 并在膜上放一张X光片。将膜在显影液中浸泡40 s, 清水洗后放入定影液中, 待胶片变透明后清水洗后, 晾干, 排片。

1.2.5 ELISA法测定不同实验组小鼠血GLP-1的含量: ELISA试剂盒购自Linco Research, Inc。每一样品分析时做复孔测定, 取均值。按试剂盒说明书操作步骤进行。第1天: 测定板孔内加冲洗缓冲液, 室温下孵育5 min后倒掉液体; 加分析缓冲液200 μ L到非特异结合孔A1, A2和100 μ L到剩余孔; 加100 μ L的标准品按升序到孔A3, A4, 接着的一系列孔中加100 μ L QC1(孔B3和B4)及QC2(孔B5和B6); 加100 μ L待测样品到剩余孔, 轻轻摇动反应板, 封膜封闭反应板, 4 °C过夜。第2天: 倒掉反应板中液体, 冲洗缓冲液洗反应板5次, 完成后吸干液体, 立即在每个反应孔中加200 μ L的共价结合检测液, 室温下孵育2 h后倒掉液体, 加冲洗缓冲液洗3次, 吸净缓冲液; 每孔

中加200 μL 稀释底物, 避光暗处室温下孵育至少20 min. 调整反应时间以保证在标准曲线的最低点也有明显的反应信号, 在最高标准点(100 pmol/L)对应有最大荧光反应值可以读出, 有充足的荧光物产生后加50 μL 的反应终止液, 孵育5 min; 在荧光免疫酶标仪上选择激发/发射波长为355 nm/460 nm进行测定.

1.2.6 免疫组织化学检测UCP2在肠道中分布: 免疫组织化学法检测UCP2在肠道中分布, 常规脱蜡和水化后PBS洗片; 滴加3% H_2O_2 在TMA上, 室温静置10 min后PBS洗; 抗原修复10 min; PBS洗片后滴加UCP2抗体50 μL , (按1:70 V/V, 在稀释液中加入0.05% Tween)4 $^\circ\text{C}$ 过夜; 第2天室温平衡, PBS洗片后滴加二抗(1:1 500, V/V)50 μL , 37 $^\circ\text{C}$ 1 h; PBS洗片, DAB显色, 自来水冲洗10 min, 苏木素复染40 s; 常规洗片、脱水、透明、封片, 进行镜检. 每次染色同时设置阴性对照的片子.

统计学处理 结果以mean $\pm$ SD表示, 显著性统计比较, 采用单因素方差分析及 t 检验. $P<0.05$ 为有统计学意义.

2 结果

2.1 肠道不同部位UCP2的表达水平 应用定量RT-PCR技术对8只C57BL/6J小鼠不同肠段组织UCP2 mRNA表达进行检测, 发现小鼠末端回肠、近端结肠及远端结肠UCP2 mRNA的表达呈逐渐下降趋势(图1A). UCP2 mRNA在小肠中表达高于结肠, 而近端结肠中的表达高于远端结肠, 小鼠不同肠段UCP2 mRNA表达存在差异, 且差异有显著性. 关于UCP2蛋白的表达, Western blot的结果显示其在末端回肠和近端结肠的表达高于远端结肠(图1B). 这种蛋白表达的变化趋势与UCP2 mRNA表达变化趋势一致.

2.2 UCP2和GLP-1在肠道组织内存在着共表达 UCP2主要表达在黏膜上皮层的细胞质内, 在平滑肌细胞内也有少量表达. 用抗GLP-1和UCP2的抗体进行荧光免疫标记分析, 发现UCP2和GLP-1在肠黏膜层有共同表达现象存在, 提示具有分泌GLP-1功能的黏膜上皮细胞有UCP2的表达, 而L细胞是肠内分泌GLP-1的特异性细胞, 提示分泌GLP-1的肠道L细胞可能有UCP2的表达(图2).

2.3 葡萄糖上调UCP2 mRNA在小鼠肠道中的表达 在禁食12 h后, 分别给予小鼠灌胃和腹腔注射葡萄糖液的处理, 给予葡萄糖量按2.0 g/kg, 对照

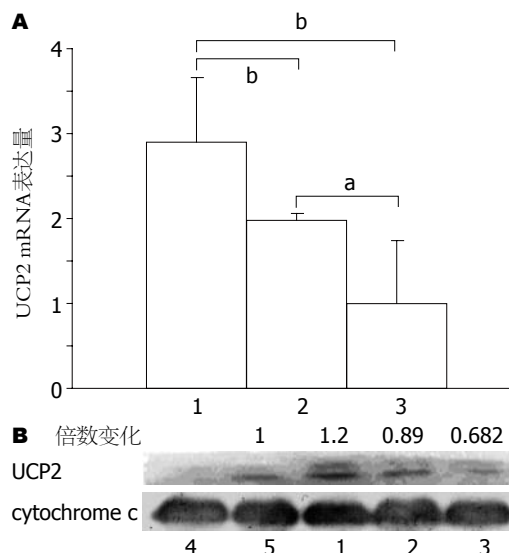


图1 UCP2在C57BL/6J小鼠不同肠段组织中的表达. 1: 小肠; 2: 近端结肠; 3: 远端结肠; 4: 阴性对照; 5: 阳性对照. ^a $P<0.05$, ^b $P<0.01$.

组给予相应体积的生理盐水灌胃. 经上述处理1 h后处死动物, 取组织做定量RT-PCR检测UCP2 mRNA的表达水平. 与对照组比较, 给予葡萄糖可提高肠道组织中UCP2 mRNA表达水平, 尤其给予葡萄糖灌胃的小鼠, 其UCP2 mRNA的表达高于腹腔内注射葡萄糖小鼠肠道组织中UCP2 mRNA的表达(图3). 在远端结肠: 腹腔给予葡萄糖后肠黏膜组织UCP2 mRNA表达高于对照组($P<0.05$); 葡萄糖灌胃后肠黏膜组织中UCP2 mRNA表达高于对照组($P<0.01$); 近端结肠组织中葡萄糖灌胃与腹腔给予葡萄糖后UCP2 mRNA表达比较, 差异显著($P<0.001$).

2.4 给予葡萄糖刺激后UCP2基因缺失鼠具有高GLP-1水平 为了评估UCP2对GLP-1分泌的影响, 分别采集UCP2基因缺失鼠和野生鼠在禁食状况和给予葡萄糖后15, 30, 60 min的血标本, 测定GLP-1分泌情况同时测定血清葡萄糖, 结果显示: GLP-1表现为给予葡萄糖后15和30 min无论是野生型鼠还是UCP2^{-/-}鼠, 血GLP-1水平明显升高, UCP2^{-/-}鼠升高更明显(15 min时UCP2^{-/-}鼠GLP-1为 9.35 ± 0.95 , 野生鼠 6.9 ± 0.25 ; 30 min时UCP2^{-/-}鼠GLP-1为 7.86 ± 0.25 , 野生鼠 5.56 ± 0.42), 60 min对照组的血GLP-1水平基本降至初始值, 而UCP2^{-/-}鼠血中GLP-1的水平下降缓慢(每个时间点小鼠数量, $n=5$)(图4).

3 讨论

UCP2 mRNA在体内分布广泛, 在脾, 胸腺, 胰岛的 β -细胞, 心脏, 肺, 白色和棕色脂肪组织, 巨噬

■应用要点

UCP2可负性调节胰岛 β 细胞的胰岛素分泌, UCP2也参与了肠源性激素GLP-1的分泌, GLP-1进而影响胰岛 β 细胞的胰岛素分泌, 参与了机体糖稳态的调节. 因而进一步开展有关UCP2在肠源性激素分泌的调节作用的研究, 为寻找新的治疗靶点提供了理论基础.

同行评价

本文有较好的科学性和一定的创新性,可读性较强,能较好地反映我国胃肠病学基础研究的先进水平.

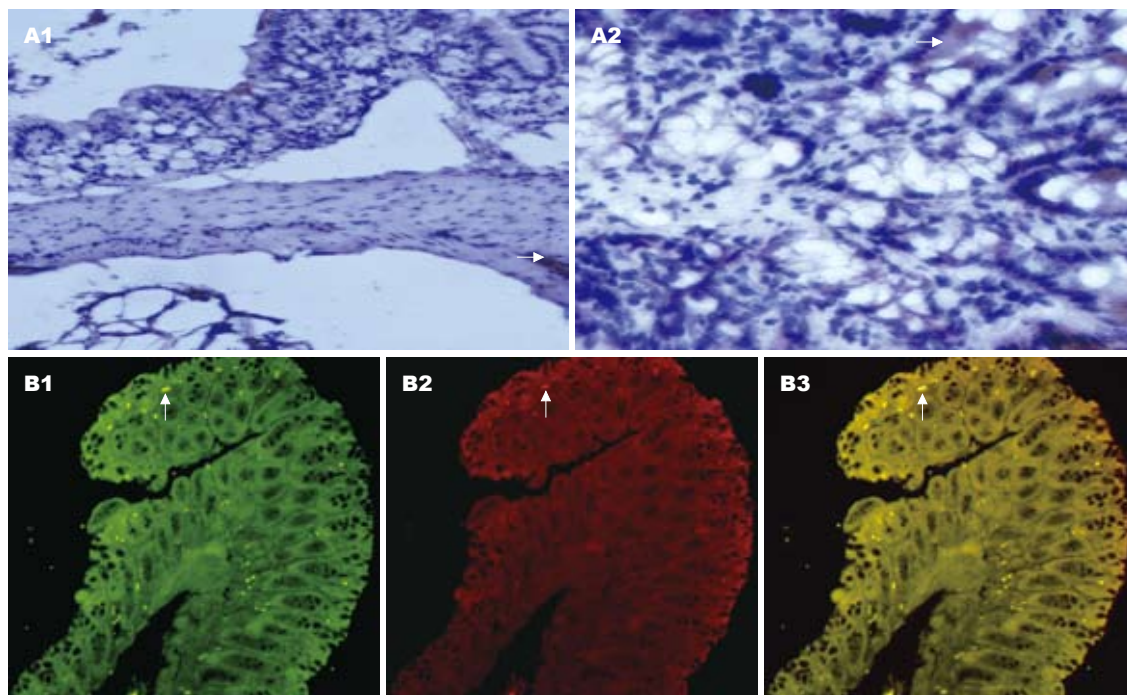


图2 UCP2和GLP-1在肠道组织中的分布及其与GLP-1共表达情况. A: 免疫组织化学检测UCP2在小肠中的分布情况, A1: $\times 200$; A2: $\times 400$; B: UCP2及GLP-1在肠黏膜组织中共表达情况($\times 200$); B1: GLP-1; B2: UCP2; B3: Merge.

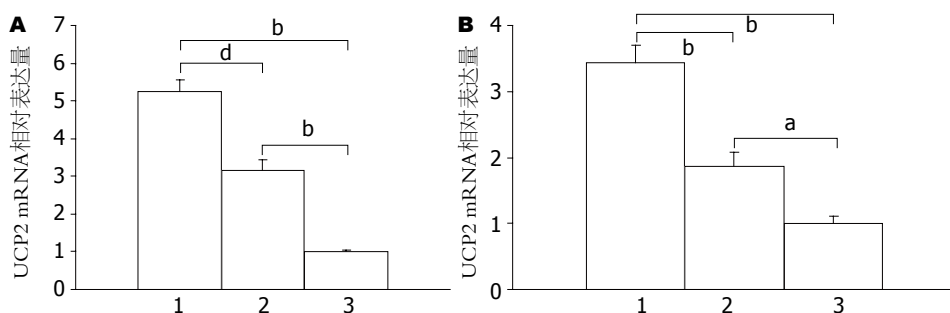


图3 葡萄糖对小鼠肠道UCP2 mRNA表达的影响. A: 近端结肠; B: 远端结肠; 1: 口服葡萄糖; 2: 腹腔给予葡萄糖; 3: 生理盐水. ^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$, ^d $P < 0.001$.

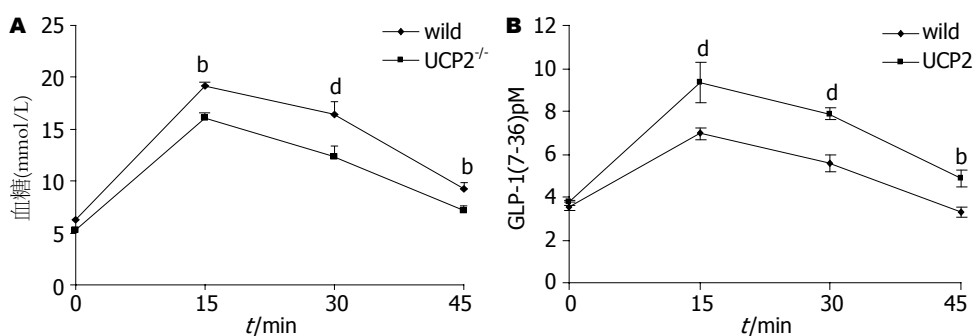


图4 UCP2对葡萄糖负荷后GLP-1分泌的影响. A: UCP2^{-/-}; B: UCP2^{+/+}. ^b $P < 0.01$, ^d $P < 0.001$ vs 0 min.

细胞内以及消化系有大量的UCP2 mRNA. UCP2在mRNA水平广泛分布,但其蛋白水平在某些组织中呈低表达,甚至含量不易测出,如在心肌细胞内有大量的UCP2 mRNA,而UCP2蛋白未能

检出^[18-20]. UCP2在胰岛特异性表达且葡萄糖可提高UCP2的表达,而升高的UCP2抑制胰岛素的分泌^[7,18], UCP2在表达上分布的差异似乎也暗示着其在生理功能上的组织特异性.

我们应用定量RT-PCR技术对小鼠不同肠段的UCP2 mRNA表达情况进行了检测, 发现从小肠到近端结肠到远端结肠, UCP2 mRNA的表达呈逐渐减低趋势, 即UCP2 mRNA表达量在小肠高于结肠, 而近端结肠中的表达量高于远端结肠且这种表达有显著性差异. 我们同时用Western blot方法检测了UCP2蛋白的表达水平, 发现其蛋白表达水平与mRNA表达水平是一致的, 即UCP2的mRNA和蛋白表达在小肠均高于结肠, 在结肠的表达是近端结肠表达高于远端结肠, 有显著性差异. 提示在小鼠肠道不同部分UCP2的表达存在差异. 我们采用免疫组织化学技术对UCP2在肠道中的组织分布进行观察, 发现UCP2主要表达在黏膜层, 在平滑肌细胞也有少量的表达, 且UCP2在细胞内分布主要在细胞质内. UCP2在人类肠道组织中的分布与Horimoto等^[21]报道的结肠癌及其癌旁组织中的分布是一致的. Murase等^[22]报道大鼠小肠中有较丰富的UCP2 mRNA, 食物中的脂肪酸可通过激活PPAR α 上调大鼠小肠内UCP2 mRNA的表达.

高血糖对UCP2 mRNA表达的影响研究结果不一致, 但多数研究表明^[7,8]高血糖能上调胰岛 β 细胞线粒体的UCP2表达, 抑制胰岛素的分泌, 葡萄糖对肠道组织内UCP2表达有着怎样的影响? 我们将C57BL/6J小鼠分为3个组, 分别给予口服葡萄糖, 腹腔注射葡萄糖和口服生理盐水的处理发现, 给予葡萄糖后小鼠肠道组织中UCP2 mRNA的表达上调, 且口服葡萄糖组高于腹腔给予组, 提示葡萄糖可诱导肠道内UCP2的表达, 且口服葡萄糖后诱导肠内UCP2 mRNA的表达上调更明显. 造成口服葡萄糖和腹腔注射葡萄糖后肠内UCP2的表达差异可能与腔内葡萄糖的直接作用和腹腔注射葡萄糖后引起血糖的升高继而引起UCP2的mRNA表达升高的系统作用有关.

UCP2在消化系的病理生理功能尚不清楚, UCP2在消化系内的这种分布与其功能有着怎样的联系?

众所周知, 消化系除执行食物的消化、吸收和排泄外, 其还是体内最大的一个内分泌组织, 在消化系的胃和肠道黏膜组织内含有具有分泌功能的内分泌细胞, 肠道内的UCP2是否像其介导胰岛素分泌一样, 也介导肠源性激素的分泌呢?

我们利用UCP2基因缺失鼠为研究载体发现, UCP2基因缺失鼠血GLP-1基础水平较野生

鼠稍高, 但无显著性差异(0 min, 3.7322 ± 0.13 vs 3.5408 ± 0.18 , $P > 0.05$). 给予葡萄糖后15及30 min, 无论是UCP2基因缺失鼠还是野生鼠血GLP-1均明显升高, UCP2基因缺失鼠升高更明显, 以后随时间延长GLP-1下降, 但UCP2基因缺失鼠血GLP-1水平下降缓慢, 60 min UCP2基因缺失鼠血GLP-1水平明显高于野生鼠(60 min, 4.87 ± 0.16 vs 3.40 ± 0.18 , $P < 0.01$)而血糖低于野生鼠. 提示UCP2对GLP-1的分泌似乎具有负调控作用.

口服葡萄糖可提高GLP-1的分泌, 然而目前其机制尚不完全清楚. 来自佛罗里达大学的Jang等^[23]通过对人和小鼠的肠道L细胞的研究发现, L细胞表达味蛋白和味觉受体以及其他几种味觉信号, 他们调控了GLP-1的分泌. Lim等^[24]通过对MKR鼠和L细胞的模型: 鼠源性的GLUTag和人源性的NCI-H716细胞的研究发现, 肠道L细胞对胰岛素有反应, 胰岛素的抵抗可损害GLP-1的分泌. 我们的结果提示肠黏膜细胞内UCP2升高对肠源性GLP-1的分泌可能具有负调控作用, 但肠黏膜细胞内升高的UCP2对肠源性GLP-1的分泌的调控通路有待进一步研究. 深入研究UCP2对肠源性激素-GLP-1分泌的调控机制以及其对糖稳态的影响, 为寻找糖尿病治疗的新的靶点提供有益的理论依据.

4 参考文献

- 1 Borecký J, Maia IG, Arruda P. Mitochondrial uncoupling proteins in mammals and plants. *Biosci Rep* 2001; 21: 201-212
- 2 Fleury C, Neverova M, Collins S, Raimbault S, Champigny O, Levi-Meyrueis C, Bouillaud F, Seldin MF, Surwit RS, Ricquier D, Warden CH. Uncoupling protein-2: a novel gene linked to obesity and hyperinsulinemia. *Nat Genet* 1997; 15: 269-272
- 3 Saleh MC, Wheeler MB, Chan CB. Uncoupling protein-2: evidence for its function as a metabolic regulator. *Diabetologia* 2002; 45: 174-187
- 4 Chan CB, MacDonald PE, Saleh MC, Johns DC, Marbàn E, Wheeler MB. Overexpression of uncoupling protein 2 inhibits glucose-stimulated insulin secretion from rat islets. *Diabetes* 1999; 48: 1482-1486
- 5 Zhang CY, Baffy G, Perret P, Krauss S, Peroni O, Grujic D, Hagen T, Vidal-Puig AJ, Boss O, Kim YB, Zheng XX, Wheeler MB, Shulman GI, Chan CB, Lowell BB. Uncoupling protein-2 negatively regulates insulin secretion and is a major link between obesity, beta cell dysfunction, and type 2 diabetes. *Cell* 2001; 105: 745-755
- 6 Krauss S, Zhang CY, Scorrano L, Dalgaard LT, St-Pierre J, Grey ST, Lowell BB. Superoxide-mediated activation of uncoupling protein 2 causes pancreatic beta cell dysfunction. *J Clin Invest* 2003; 112: 1831-1842
- 7 Langin D. Diabetes, insulin secretion, and the pan-

- creatic beta-cell mitochondrion. *N Engl J Med* 2001; 345: 1772-1774
- 8 Yamashita T, Eto K, Okazaki Y, Yamashita S, Yamauchi T, Sekine N, Nagai R, Noda M, Kadowaki T. Role of uncoupling protein-2 up-regulation and triglyceride accumulation in impaired glucose-stimulated insulin secretion in a beta-cell lipotoxicity model overexpressing sterol regulatory element-binding protein-1c. *Endocrinology* 2004; 145: 3566-3577
- 9 Holst JJ. Enteroglucagon. *Annu Rev Physiol* 1997; 59: 257-271
- 10 Eissele R, Göke R, Willemer S, Harthus HP, Vermeer H, Arnold R, Göke B. Glucagon-like peptide-1 cells in the gastrointestinal tract and pancreas of rat, pig and man. *Eur J Clin Invest* 1992; 22: 283-291
- 11 Mortensen K, Christensen LL, Holst JJ, Orskov C. GLP-1 and GIP are colocalized in a subset of endocrine cells in the small intestine. *Regul Pept* 2003; 114: 189-196
- 12 Toft-Nielsen MB, Madsbad S, Holst JJ. Determinants of the effectiveness of glucagon-like peptide-1 in type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86: 3853-3860
- 13 Nagell CF, Wettergren A, Ørskov C, Holst JJ. Inhibitory effect of GLP-1 on gastric motility persists after vagal deafferentation in pigs. *Scand J Gastroenterol* 2006; 41: 667-672
- 14 Nyström T, Gutniak MK, Zhang Q, Zhang F, Holst JJ, Åhrén B, Sjöholm A. Effects of glucagon-like peptide-1 on endothelial function in type 2 diabetes patients with stable coronary artery disease. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2004; 287: E1209-E1215
- 15 Asmar M, Holst JJ. Glucagon-like peptide 1 and glucose-dependent insulinotropic polypeptide: new advances. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 2010; 17: 57-62
- 16 Donley VR, Hiskett EK, Kidder AC, Schermerhorn T. ATP-sensitive potassium channel (KATP channel) expression in the normal canine pancreas and in canine insulinomas. *BMC Vet Res* 2005; 1: 8
- 17 Nielsen LB, Ploug KB, Swift P, Ørskov C, Jansen-Olesen I, Chiarelli F, Holst JJ, Hougaard P, Pörksen S, Holl R, de Beaufort C, Gammeltoft S, Rorsman P, Mortensen HB, Hansen L. Co-localisation of the Kir6.2/SUR1 channel complex with glucagon-like peptide-1 and glucose-dependent insulinotropic polypeptide expression in human ileal cells and implications for glycaemic control in new onset type 1 diabetes. *Eur J Endocrinol* 2007; 156: 663-671
- 18 Nedergaard J, Cannon B. The 'novel' 'uncoupling' proteins UCP2 and UCP3: what do they really do? Pros and cons for suggested functions. *Exp Physiol* 2003; 88: 65-84
- 19 Mattiasson G, Sullivan PG. The emerging functions of UCP2 in health, disease, and therapeutics. *Antioxid Redox Signal* 2006; 8: 1-38
- 20 Pecqueur C, Alves-Guerra MC, Gelly C, Levi-Meyrueis C, Couplan E, Collins S, Ricquier D, Bouillaud F, Miroux B. Uncoupling protein 2, in vivo distribution, induction upon oxidative stress, and evidence for translational regulation. *J Biol Chem* 2001; 276: 8705-8712
- 21 Horimoto M, Resnick MB, Konkin TA, Routhier J, Wands JR, Baffy G. Expression of uncoupling protein-2 in human colon cancer. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 6203-6207
- 22 Murase T, Kondo H, Hase T, Tokimitsu I, Saito M. Abundant expression of uncoupling protein-2 in the small intestine: up-regulation by dietary fish oil and fibrates. *Biochim Biophys Acta* 2001; 1530: 15-22
- 23 Jang HJ, Kokrashvili Z, Theodorakis MJ, Carlson OD, Kim BJ, Zhou J, Kim HH, Xu X, Chan SL, Juhászova M, Bernier M, Mosinger B, Margolske RF, Egan JM. Gut-expressed gustducin and taste receptors regulate secretion of glucagon-like peptide-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; 104: 15069-15074
- 24 Lim GE, Xu M, Sun J, Jin T, Brubaker PL. The rho guanosine 5'-triphosphatase, cell division cycle 42, is required for insulin-induced actin remodeling and glucagon-like peptide-1 secretion in the intestinal endocrine L cell. *Endocrinology* 2009; 150: 5249-5261

编辑 李军亮 电编 何基才

ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) CN 14-1260/R 2010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)

肝炎后肝硬化与酒精性肝硬化患者临床特征的比较及防治

周永莉, 段志军

周永莉, 段志军, 大连医科大学附属第一医院消化内科 辽宁省大连市 116011

周永莉, 西安医学院附属医院消化内科 陕西省西安市 710077

周永莉, 大连医科大学硕士, 主要从事慢性肝病研究.

国家自然科学基金资助项目, No. 30970886

大连市科技计划基金资助项目, No. 2008E13SF193

作者贡献分布: 本文由段志军设计及修改; 周永莉收集资料并完成论文写作.

通讯作者: 段志军, 教授, 主任医师, 博士生导师, 116011, 辽宁省大连市西岗区中山路222号, 大连医科大学附属第一医院消化内科. cathydoctor@yahoo.com

电话: 0411-83635963-7132

收稿日期: 2010-08-19 修回日期: 2010-09-13

接受日期: 2010-09-25 在线出版日期: 2010-11-08

Viral versus alcoholic cirrhosis: clinical characteristics, prophylaxis and treatment

Yong-Li Zhou, Zhi-Jun Duan

Yong-Li Zhou, Zhi-Jun Duan, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Dalian Medical University, Dalian 116011, Liaoning Province, China

Yong-Li Zhou, the First Affiliated Hospital of Xi'an Medical College, Xi'an 710077, Shaanxi Province, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30970886; and the Science and Technology Project of Dalian, No. 2008E13SF193

Correspondence to: Professor Zhi-Jun Duan, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Dalian Medical University, Dalian 116011, Liaoning Province, China. cathydoctor@yahoo.com

Received: 2010-08-19 Revised: 2010-09-13

Accepted: 2010-09-25 Published online: 2010-11-08

Abstract

AIM: To compare the clinical characteristics, prophylaxis and treatment between viral and alcoholic cirrhosis.

METHODS: The clinical data for 952 cirrhotic patients who were treated at the First Affiliated Hospital of Dalian Medical University from April 2004 to May 2009 were collected. These patients were divided into three groups: viral cirrhosis (VC) group, alcoholic cirrhosis (AC) group, and VC plus AC group. Sex, age, medical history, clinical manifestations, liver function, complications, and the main cause of death were compared among the three groups of patients.

RESULTS: Of all cases, 63.66% had VC. In the VC plus AC group, two-thirds of patients had alcoholic hepatitis and hepatitis B. Male patients were more commonly seen in the three groups, especially in the AC group (M : F = 48.5 : 1). Compared to the AC group, the VC group and VC plus AC group had a high prevalence of splenomegaly. Upper gastrointestinal bleeding was the most common complication in all the groups. The prevalence of hepatocellular carcinoma in the VC group was higher than that in the AC group, and the prevalence of spontaneous bacterial peritonitis in the AC group was higher than that in the VC group (13.1% vs 5.2%, $P < 0.01$). Hepatic encephalopathy was the common death cause in both the VC and AC groups, followed by upper gastrointestinal bleeding and hepatocellular carcinoma. The most common cause of death in the AC plus VC group was hepatocellular carcinoma.

CONCLUSION: Prophylaxis and treatment of upper gastrointestinal bleeding and hepatic encephalopathy are important for patients with AC or VC. Prophylaxis of intestinal infection is important for AC patients. Prophylaxis of hepatocellular carcinoma is important for patients with both AC and VC.

Key Words: Viral cirrhosis; Alcoholic cirrhosis; Comparative analysis; Preventive treatment

Zhou YL, Duan ZJ. Viral versus alcoholic cirrhosis: clinical characteristics, prophylaxis and treatment. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(31): 3313-3319

摘要

目的: 探讨肝炎病毒与酒精引起的肝硬化防治的不同侧重点.

方法: 选取2004-04/2009-05大连医科大学第一附属医院住院的952例肝硬化患者, 按照病因不同分为肝炎后肝硬化(viral cirrhosis, VC)组、酒精性肝硬化(alcoholic cirrhosis, AC)组以及酒精与肝炎病毒混合性因素所致肝硬化(AC+VC)组, 对比3组肝硬化患者性别、入院时年龄、病程、临床表现、肝功能分级、并

■背景资料

肝硬化是一世界性疾病, 年死亡人数约50-70万. 肝硬化的病因很多, 最常见的是肝炎病毒感染和慢性酒精中毒. 目前肝硬化的治疗除了肝移植外尚无确切、有效的根治方法.

■同行评议者

范小玲, 主任医师, 北京地坛医院综合科

■ 研发前沿

目前除肝移植外,肝硬化尚无确切有效的治疗方法,这是世界性难题。

发病,以及直接死因等差异。

结果: 在所有肝硬化中, VC所占比例最大(63.66%), AC居第2位。AC+VC组中最多见的是酒精+乙型肝炎患者, 占该组肝硬化总数的2/3以上。3组肝硬化患者均以男性为主, AC组尤为突出(男:女=48.5:1)。VC组与AC+VC组脾大的发生率明显高于AC组; 3组肝硬化最常见的并发症都是上消化道出血。VC组原发性肝癌的发生率较AC组高, 而AC组自发性腹膜炎的发生率明显高于VC组, 二者差异显著(13.1% vs 5.2%, $P<0.01$); 无论是VC组还是AC组, 最常见的死亡原因都是肝性脑病, 然后依次是上消化道出血和原发性肝癌。AC+VC组最常见的死因是原发性肝癌。

结论: 对于肝炎后肝硬化和酒精性肝硬化患者, 积极预防上消化道出血和肝性脑病的发生是防治病情加重的关键, 对于后者还要加强预防肠道感染, 而对于混合因素存在的肝硬化则更要更加积极防治原发性肝癌的发生。

关键词: 肝炎后肝硬化; 酒精性肝硬化; 对比分析; 防治

周永莉, 段志军. 肝炎后肝硬化与酒精性肝硬化患者临床特征的比较及防治. 世界华人消化杂志 2010; 18(31): 3313-3319
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/3313.asp>

0 引言

肝硬化(liver cirrhosis)是一世界性疾病, 年死亡人数约50-70万人, 占有死亡病例的2.7%。发达国家每年因肝硬化而死亡的人数居死亡原因第5位^[1-4]。引起肝硬化的病因很多, 但以肝炎病毒感染所致的肝炎后肝硬化(viral cirrhosis, VC)和慢性酒精中毒引起的酒精性肝硬化(alcoholic cirrhosis, AC)最常见。不同国家不同地区、不同年龄段其疾病特点、病因和发病率也有较大差异。西方发达国家AC占有肝硬化的2/3以上, 而VC尤其是乙型肝炎后肝硬化则是我国肝硬化的主要组成部分, 近年来AC的发病率逐年上升^[5-7]。目前肝硬化的治疗除了肝移植外尚无确切、有效的根治方法^[8,9]。研究表明肝硬化的形成、发展除与病毒感染或慢性酒精中毒等所致的特殊病理改变有关外, 还与临床治疗策略偏差有重要关系^[10,11]。早期经过积极防治可以延缓病程进展, 一旦肝硬化形成后治疗非常困难, 而且一部分会进展为肝癌, 预后极差, 因此肝硬化的早期防治非常重要^[12,13]。国内外多项临床研究显示, AC与VC在早期阶段, 二者发病过程、临床表

现以及对治疗的反应等方面有很大差别^[7,14]。因此, 对比分析不同原因肝硬化在临床表现、并发症、治疗预后等方面异同, 对不同的患者进行有针对性的预防及治疗是非常必要的。以往也有不少学者比较这两种常见病因肝硬化的临床特点, 但是样本量都偏小, 且只是针对部分临床表现加以对比, 缺乏大样本、全方位的分析。因此, 本研究旨在通过大样本的临床病例分析, 对比两种常见病因肝硬化的临床表现、并发症和治疗预后等方面异同, 从而对不同病因的肝硬化患者作出有针对性的预防及治疗策略。

1 材料和方法

1.1 材料 收集2004-04/2009-05在大连医科大学附属第一医院消化内科住院的明确诊断为肝硬化患者的入院时病历资料并收集最终死亡患者病历资料(本研究所收集资料均经患者及其家属同意并签署知情同意书, 且经过院伦理会批准后采集的, 所有患者治疗上均采用大连医科大学附属第一医院规范的保肝、利尿和防治并发症方案)。根据下述诊断标准及排除标准共入选VC 656例、AC 198例, VC+AC 98例。诊断标准如下: VC的发生与肝炎病毒(hepatitis virus, HV)感染密切相关^[15-17], 需具备以下条件者即可诊断为VC: 有慢性肝炎病史和(或)HBV、HCV的抗原抗体标记或DNA检查阳性; 有肝功能减退和门脉高压的临床表现, 影像学检查支持肝硬化改变; 除外饮酒等其他原因引起的肝硬化。根据2006年中华医学会肝脏病学分会脂肪肝和酒精性肝病学组推行的酒精性肝病诊疗指南^[18], AC的诊断标准为: 具有长期大量饮酒史, 每日摄入酒精量>40 g, 连续5年以上; 临床上有肝功能减退及门脉高压的表现, 影像学检查支持肝硬化改变; 无肝炎病史, HV标记阴性; 除外其他类型肝硬化(如: 胆汁性、血吸虫性、肝吸虫性肝硬化等)。AC+VC诊断标准为: 具有上述两种病因并存, 有肝功能减退和门脉高压的临床表现, 影像学检查支持肝硬化改变。排除标准: 除酒精性、HV因素之外的其他原因引起的肝硬化, 如胆汁淤积性肝硬化、循环障碍性肝硬化、自身免疫性肝硬化、毒物和药物性肝硬化、代谢性肝硬化、营养不良性肝硬化、血吸虫性肝硬化、先天梅毒性肝硬化、隐源性肝硬化以及非酒精性脂肪性肝病等原因引起的肝硬化。

1.2 方法

1.2.1 一般情况: 记录入选肝硬化患者的性别、

表 1 3组肝硬化性别、年龄及病程的比较

分组	<i>n</i>	男性 <i>n</i> (%)	女性 <i>n</i> (%)	平均年龄(岁)	病程(年)
VC组	656	394(60.06)	262(39.94)	59.81 ± 13.72	4.34 ± 5.60
AC组	198	194(97.98) ^b	4(2.02) ^b	54.18 ± 10.56 ^b	2.86 ± 3.50
AC+VC组	98	94(95.92) ^b	4(4.08) ^b	54.99 ± 10.20 ^b	3.94 ± 4.47

^b*P* < 0.01 vs VC组.

年龄、病程资料进行对比分析.

1.2.2 对比3组肝硬化患者的临床表现异同: 包括: 肝病面容、乏力、腹胀、食欲下降、肝区疼痛、黄疸、双下肢水肿、鼻衄、齿龈出血、肝掌、蜘蛛痣及腹水、脾大、食管胃底静脉曲张和其他侧枝循环建立情况, 并记录患者入院时肝功能Child-Pugh情况. 所有资料均来自于患者入院时全面系统的病史采集、规范的体格检查及实验检查数据和胃镜、彩超、CT及核磁共振结果.

1.2.3 对比3组肝硬化常见并发症的发生率: 上消化道出血(upper gastrointestinal bleeding, HGB)、原发性肝癌(hepatocellular carcinoma, HCC)、肝性脑病(hepatic encephalopathy, HE)、肝肾综合征(hepatorenal syndrome, HRS)及自发性腹膜炎(spontaneous bacterial peritonitis, SBP).

1.2.4 分别统计3组肝硬化患者直接死因: 对比分析不同病因对于肝硬化患者直接死因构成的影响.

统计学处理 所有数据均输入SPSS13.0软件进行分析. 计数资料采用 χ^2 检验, 计量资料采用多组独立样本的秩和检验, 以 $P < 0.05$ (双侧)为差异有统计学意义. 3组之间两两比较时, 按照校正检验水准取 $\alpha = 0.05/3 = 0.0167$.

2 结果

2.1 3组肝硬化病因、性别、平均年龄及病程情况的比较 在各种不同病因的肝硬化中, VC所占比例最大(63.66%), AC居第2位, 占19.17%, AC+VC占9.50%, 其他原因肝硬化占7.63%. 其中乙型肝炎后肝硬化占所有肝硬化总数的一半以上, 丙型肝炎后肝硬化占7.36%, 乙型肝炎与丙型肝炎重叠感染所致的肝硬化占1.74%. 在AC+VC组中, 最多见的是酒精+乙型肝炎患者, 占该组肝硬化总数的2/3以上. 所有肝硬化患者均以男性为主, 尤以AC组突出(男:女 = 48.5:1). 在发病年龄方面, VC组平均发病年龄最大, AC组最小, AC+VC最居中, VC与AC及AC+VC组之间

之间差异显著($P = 0.001$, $P = 0.002$, 表1).

2.2 3组肝硬化临床表现及肝功能分级的比较

(1)3组肝硬化患者在乏力、腹胀、食欲下降、肝区疼痛、黄疸、鼻衄、齿龈出血、肝掌、腹水、双下肢水肿、食管胃底静脉曲张及其他侧枝循环建立(包括腹壁静脉曲张、腹膜后静脉曲张、肝门区及脾门区静脉曲张)和肝功能Child-Pugh分级方面无统计学差异(均 $P > 0.05$). (2)在脾大、蜘蛛痣、肝病面容方面三者之间差异显著. VC组与AC+VC组脾大的发生率明显高于AC组, 差异有统计学意义($P = 0.000$, $P = 0.012$). AC组与AC+VC组蜘蛛痣的发生率明显高于VC组, 差异有统计学意义($P = 0.004$, $P = 0.008$). 在肝性面容方面VC组以面色晦暗为主, AC组则以面部毛细血管扩张多见, 二者差异显著($P = 0.000$), AC+VC组以面色晦暗为主, 但与VC组和AC组之间无统计学差异($P = 0.032$, 表2).

2.3 3组肝硬化并发症发生情况的比较 在所有并发症中各组HGB的发生率均居第1位. VC组和AC+VC组中, 按照其并发症发生率的高低排在前3位的分别是HGB、HCC和HE. 而AC组患者的并发症中居前3位的依次是HGB、HE和HCC. AC组SBP的发生率较VC组高, 二者差异显著($P = 0.000$). VC组与AC+VC组HCC的发生率明显高于AC组, 差异有统计学意义($P = 0.000$, $P = 0.004$, 表3).

2.4 3组肝硬化患者直接死因的比较 无论是AC组还是VC组最常见的直接死亡原因均为HE, 然后依次是HGB和HCC. AC+VC组常见的死亡原因依次是HCC、HE、HGB和HRS. 3组肝硬化直接死因之间无统计学差异(图1).

3 讨论

研究表明, 在我国大连地区肝炎病毒感染仍然是肝硬化最常见的病因, 酒精性因素居第2位. 本研究中乙型肝炎后肝硬化占所有肝硬化总数的一半以上, 丙型肝炎后肝硬化占7.36%, 乙型肝炎与丙型肝炎重叠感染所致的肝硬化占1.74%.

■相关报道

美国的一项关于382例肝硬化患者的回顾性研究显示, AC患者SBP的发生率高于非AC患者, 酒精是肝硬化患者并发SBP的易感因素.

■创新盘点

本研究通过大样本的临床病例分析,对比两种常见病因肝硬化的临床表现、并发症和治疗预后等方面异同,从而对不同病因的肝硬化患者作出有针对性的预防及治疗策略。

表 2 3组肝硬化脾大、蜘蛛痣及肝病面容两两比较 $n(\%)$

分组	n	脾大	蜘蛛痣	面色晦暗	面部毛细血管扩张
VC组	656	590(89.8) ^d	218(33.2) ^d	242(36.9) ^d	14(2.1) ^d
AC组	198	154(77.8)	88(44.4)	42(21.2)	68(34.3)
AC+VC组	98	88(89.8) ^d	46(46.9) ^b	32(32.7)	2(2.0) ^d

^b $P<0.01$ vs VC组; ^d $P<0.01$ vs AC组。

表 3 3组肝硬化各种并发症发生率的比较 $n(\%)$

分组	n	HGB	HE	HRS	HCC	SBP
VC组	656	246(37.5)	138(21.0)	54(8.2)	188(28.7) ^b	34(5.2) ^b
AC组	198	88(44.4)	52(26.3)	8(4.0)	32(16.2)	26(13.1)
AC+VC组	98	46(46.9)	14(14.3)	2(2.0)	30(30.6) ^b	8(8.2)

^b $P<0.01$ vs AC组。

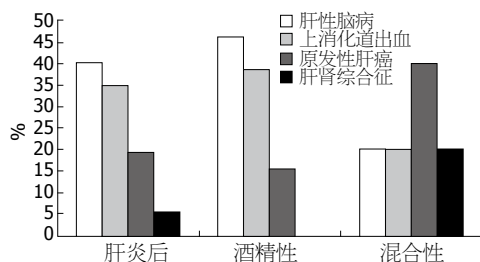


图 1 3组肝硬化直接死因构成图。

研究表明HCC的发生与乙型肝炎病毒基因型有关,乙型肝炎病毒分为A、B、C、D、E、F、G、H 8个基因型,而基因型C和F发生HCC的风险较高。与乙型肝炎病毒C基因型相比,基因型B进展至肝硬化的时间较长,发生HCC的几率相对较低^[19-26]。丙型肝炎与乙型肝炎病毒重叠感染者发生HCC的危险性更高^[27]。因此,应该加强医学知识宣传,最大限度的长期、持续抑制或清除肝炎病毒,尽量延缓肝炎向肝硬化、肝癌的进展。在性别比例方面,肝硬化患者均以男性为主,AC组尤其明显(男:女=48.5:1)。不排除与我国饮酒者男性居多,女性较少饮酒有关。VC平均年龄比AC组及混合组均高,差异有统计学意义,这与国内外文献报道基本一致^[28,29]。韩国一项长达10年的病例随访研究发现,年龄是乙型肝炎进展至肝硬化以及肝癌的独立性致病因素,也就是说对于乙型肝炎患者,年龄越大发生HCC的危险性越高^[30]。

在腹胀、乏力、食欲下降、肝区疼痛、腹水、侧枝循环建立(包括食管胃底静脉曲张、腹

壁静脉曲张、腹膜后静脉曲张、肝门区及脾门区静脉曲张)、双下肢浮肿、黄疸、鼻衄、齿龈出血以及肝功能Child-Pugh分级等方面AC与VC两组之间差异无统计学意义($P>0.05$)。本研究显示VC患者的肝病面容主要以面色晦暗为主,而AC患者则多表现为面部及颈部毛细血管扩张。因此,对于慢性肝损害门脉高压患者,其面部特征在某种程度上可能会对病因推断有一定的指导意义。AC患者蜘蛛痣的出现较VC患者多见,这可能与酒精影响肝脏芳香化酶活性,使雄激素转化为雌激素增加有关。VC患者脾大的发生率较AC患者明显升高,二者差异有统计学意义($P=0.000$),因此对于VC脾大的患者应该注意加强感染与出血的预防。肝硬化脾大的发病机制目前尚不清楚,多数学者认为与肝硬化时门静脉高压,脾脏血液回流受阻,引起脾脏淤血、水肿及炎症反应有关^[31],但对于VC患者脾大的发生率高于AC患者,其具体机制有待于进一步研究。金国花等^[32]研究发现乙型肝炎后肝硬化全血细胞减少患者如做脾切除术,血小板升高可能不明显,而AC全血细胞减少患者做脾切除术血小板升高较明显,因其血小板减少主要是外周破坏所致,这对肝硬化全血细胞减少而有严重出血倾向的患者是否选择脾切除术有一定的指导意义。

本研究显示VC与AC患者HGB的发生率分别为37.50%和44.40%,在肝硬化各种并发症中居首位,当慢性酒精中毒与肝炎病毒感染共同损伤时HGB发生率则更高(46.9%),因此,对后者

应提早胃镜随诊, 早发现早预防. 本研究资料显示VC患者HCC的发生率明显高于AC患者, 二者差异具有统计学意义($P = 0.000$), 而酒精性因素与肝炎病毒感染共同参与者则HCC的发生率更高, 占30.6%, 这一结果证实了“酒精与肝炎病毒在肝脏损伤方面有协同作用”的观点^[33-35]. 因此, 对于既有肝炎病毒感染又有慢性酒精中毒两种混合性因素参与的肝硬化患者, 应该积极戒酒并及早抗病毒治疗, 预防肝癌发生. 本研究发现AC患者SBP的发生率明显高于VC患者, 分别为13.1%和5.2%, 二者差异有统计学意义($P = 0.000$). 国外有研究表明, AC患者易发生小肠内细菌过度生长, 而SBP的发生与小肠内细菌过度生长、肠道运动功能异常有关^[36-38]. 美国的一项关于382例肝硬化患者的回顾性研究显示, AC患者SBP的发生率高于非AC患者, 酒精是肝硬化患者并发SBP的易感因素^[39]. 因此, 对于AC患者应该注意加强肠道菌群调节治疗. 本研究显示, 对于AC, HE是除HGB之外第2大常见并发症, 其发病率有高于VC组及混合组的趋势, 但3组相比差异无统计学意义. 3组肝硬化最常见的死亡原因都是肝性脑病, 其次为HGB和HCC, 这与国外研究一致^[40,41]. 因此, 对于肝硬化晚期患者应积极预防感染、出血、便秘及电解质紊乱等肝性脑病诱因发生.

总之, 肝硬化男性患者发病率较女性高, 尤以AC为著. AC患者平均年龄相对较小, 蜘蛛痣与面部毛细血管扩张更多见, 而VC脾大及面色晦暗发生率较高. 肝硬化患者最常见的并发症是HGB, 最主要的死亡原因则是HE. AC患者的SBP的发生率较VC患者高, VC患者更易发生HCC, 而对于酒精与肝炎病毒混合性因素所导致的肝硬化患者其HCC发生率更高. 文献报道提示, 持续的HBeAg阳性和/或HBV DNA $>2\,000\text{ IU/mL}$ 是肝硬化、肝癌非常重要的危险因素^[20,42-45]. 因此对于VC患者最大限度的抑制或清除肝炎病毒, 尽早使HBeAg阳性患者转阴, 或努力将HBV DNA病毒数量控制在 $2\,000\text{ IU/mL}$ 以下, 积极预防肝硬化进展及肝癌的发生是治疗的关键. 对于AC患者, 戒酒是首要任务. 嗜酒是SBP的易感因素, 因此应注意调节AC患者肠道菌群失调、预防感染, 避免SBP的发生.

本研究下一步将注重观察上述防治侧重点在临床应用中肝硬化患者预后的实际作用. 肝硬化的防治作为世界性难题迫切需要新的诊

治手段研制和应用. 近年来随着无创性肝纤维化诊断指标的研究越来越多, 肝纤维化的有效治疗已经成为可能^[46-48]. 随着基因序列信息研究的不断进展, 有理由相信今后关于肝硬化相关基因及其功能的研究将会为肝硬化的防治提供新的、更加有效的技术平台.

4 参考文献

- 1 Lavanchy D. Hepatitis B virus epidemiology, disease burden, treatment, and current and emerging prevention and control measures. *J Viral Hepat* 2004; 11: 97-107
- 2 Maddrey WC. Hepatitis B--an important public health issue. *Clin Lab* 2001; 47: 51-55
- 3 Kondili LA, Taliani G, Cerga G, Tosti ME, Babameto A, Resuli B. Correlation of alcohol consumption with liver histological features in non-cirrhotic patients. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2005; 17: 155-159
- 4 Zatoński WA, Sulkowska U, Mańczuk M, Rehm J, Boffetta P, Lowenfels AB, La Vecchia C. Liver cirrhosis mortality in Europe, with special attention to Central and Eastern Europe. *Eur Addict Res* 2010; 16: 193-201
- 5 Rehm J, Mathers C, Popova S, Thavorncharoensap M, Teerawattananon Y, Patra J. Global burden of disease and injury and economic cost attributable to alcohol use and alcohol-use disorders. *Lancet* 2009; 373: 2223-2233
- 6 Tao N, Sussman S, Nieto J, Tsukamoto H, Yuan JM. Demographic characteristics of hospitalized patients with alcoholic liver disease and pancreatitis in los angeles county. *Alcohol Clin Exp Res* 2003; 27: 1798-1804
- 7 全国酒精性肝病调查协作组. 全国酒精性肝病的多中心调查分析. *中华消化杂志* 2007; 27: 231-234
- 8 Horiguchi K, Hirano T, Ueki T, Hirakawa K, Fujimoto J. Treating liver cirrhosis in dogs with hepatocyte growth factor gene therapy via the hepatic artery. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 2009; 16: 171-177
- 9 Sugawara Y, Makuuchi M. Liver transplantation for hepatitis B-related cirrhosis: recent advances. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 2006; 13: 378-381
- 10 Liang TJ. Hepatitis B: the virus and disease. *Hepatology* 2009; 49: S13-S21
- 11 Liaw YF, Leung N, Kao JH, Piratvisuth T, Gane E, Han KH, Guan R, Lau GK, Locarnini S. Asian-Pacific consensus statement on the management of chronic hepatitis B: a 2008 update. *Hepatol Int* 2008; 2: 263-283
- 12 Wang Y, Liu YH, Mai SJ, He LJ, Liao YJ, Deng HX, Guan XY, Zeng YX, Kung HF, Xie D. Evaluation of serum clusterin as a surveillance tool for human hepatocellular carcinoma with hepatitis B virus related cirrhosis. *J Gastroenterol Hepatol* 2010; 25: 1123-1128
- 13 Gramenzi A, Caputo F, Biselli M, Kuria F, Loggi E, Andreone P, Bernardi M. Review article: alcoholic liver disease--pathophysiological aspects and risk factors. *Aliment Pharmacol Ther* 2006; 24: 1151-1161
- 14 Toshikuni N, Izumi A, Nishino K, Inada N, Sakanoue R, Yamato R, Suehiro M, Kawanaka M, Yamada G. Comparison of outcomes between patients with alcoholic cirrhosis and those with hepatitis C virus-related cirrhosis. *J Gastroenterol Hepatol*

■应用要点

把对不同病因肝硬化的防治侧重点应用于指导临床, 将对肝硬化的防治起到非常重要的作用.

■同行评价

本文结果分析可靠,具有一定的临床价值.

- 2009; 24: 1276-1283
- 15 中华医学会分会、中华医学会感染病学分会. 慢性乙型肝炎防治指南. 中华传染病杂志 2005; 23: 421-430
- 16 中华医学会肝病学会分会、中华医学会传染病与寄生虫病学分会. 丙型肝炎防治指南. 中华肝脏病杂志 2004; 12: 194-198
- 17 中华医学会传染病与寄生虫学分会、肝病学会. 病毒性肝炎防治方案. 中华肝脏病杂志 2000; 8: 324-329
- 18 中华医学会肝脏病学分会脂肪肝和酒精性肝病学组. 酒精性肝病诊疗指南. 中华肝脏病杂志 2006; 14: 164-166
- 19 Chu CM, Liaw YF. Genotype C hepatitis B virus infection is associated with a higher risk of reactivation of hepatitis B and progression to cirrhosis than genotype B: a longitudinal study of hepatitis B e antigen-positive patients with normal aminotransferase levels at baseline. *J Hepatol* 2005; 43: 411-417
- 20 Yu MW, Yeh SH, Chen PJ, Liaw YF, Lin CL, Liu CJ, Shih WL, Kao JH, Chen DS, Chen CJ. Hepatitis B virus genotype and DNA level and hepatocellular carcinoma: a prospective study in men. *J Natl Cancer Inst* 2005; 97: 265-272
- 21 Kao JH. Role of viral factors in the natural course and therapy of chronic hepatitis B. *Hepatol Int* 2007; 1: 415-430
- 22 Livingston SE, Simonetti JP, Bulkow LR, Homan CE, Snowball MM, Cagle HH, Negus SE, McMahon BJ. Clearance of hepatitis B e antigen in patients with chronic hepatitis B and genotypes A, B, C, D, and F. *Gastroenterology* 2007; 133: 1452-1457
- 23 Ni YH, Chang MH, Wang KJ, Hsu HY, Chen HL, Kao JH, Yeh SH, Jeng YM, Tsai KS, Chen DS. Clinical relevance of hepatitis B virus genotype in children with chronic infection and hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 2004; 127: 1733-1738
- 24 Mahmood S, Niiyama G, Kamei A, Izumi A, Nakata K, Ikeda H, Suehiro M, Kawanaka M, Togawa K, Yamada G. Influence of viral load and genotype in the progression of Hepatitis B-associated liver cirrhosis to hepatocellular carcinoma. *Liver Int* 2005; 25: 220-225
- 25 Kao JH, Chen PJ, Lai MY, Chen DS. Hepatitis B virus genotypes and spontaneous hepatitis B e antigen seroconversion in Taiwanese hepatitis B carriers. *J Med Virol* 2004; 72: 363-369
- 26 Chan HL, Hui AY, Wong ML, Tse AM, Hung LC, Wong VW, Sung JJ. Genotype C hepatitis B virus infection is associated with an increased risk of hepatocellular carcinoma. *Gut* 2004; 53: 1494-1498
- 27 Kew MC. Interaction between hepatitis B and C viruses in hepatocellular carcinogenesis. *J Viral Hepat* 2006; 13: 145-149
- 28 Syed VA, Ansari JA, Karki P, Regmi M, Khanal B. Spontaneous bacterial peritonitis (SBP) in cirrhotic ascites: a prospective study in a tertiary care hospital, Nepal. *Kathmandu Univ Med J (KUMJ)* 2007; 5: 48-59
- 29 Shen Z, Li YM, Yu CH, Shen Y, Xu L, Xu CF, Chen JJ, Ye H, Xu GY. Risk factors for alcohol-related liver injury in the island population of China: a population-based case-control study. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 2255-2261
- 30 Park BK, Park YN, Ahn SH, Lee KS, Chon CY, Moon YM, Park C, Han KH. Long-term outcome of chronic hepatitis B based on histological grade and stage. *J Gastroenterol Hepatol* 2007; 22: 383-388
- 31 Djordjević J, Svorcan P, Vrinčić D, Dapcević B. [Splenomegaly and thrombocytopenia in patients with liver cirrhosis] *Vojnosanit Pregl* 2010; 67: 166-169
- 32 金国花, 朴云峰, 陈兆杰. 乙型肝炎肝硬化与酒精性肝硬化患者血小板相关参数变化的比较. 临床肝胆病杂志 2007; 23: 102-104
- 33 Mueller S, Millonig G, Seitz HK. Alcoholic liver disease and hepatitis C: a frequently underestimated combination. *World J Gastroenterol* 2009; 15: 3462-3471
- 34 Plumlee CR, Lazaro CA, Fausto N, Polyak SJ. Effect of ethanol on innate antiviral pathways and HCV replication in human liver cells. *Virol J* 2005; 2: 89
- 35 Kim KA. Current status of liver diseases in Korea: toxic and alcoholic liver diseases. *Korean J Hepatol* 2009; 15 Suppl 6: S29-S33
- 36 Strauss E, Aersa JP. [Alcoholic hepatitis: bad prognosis due to concomitant bacterial infections] *Rev Soc Bras Med Trop* 2004; 37: 199-203
- 37 Chang CS, Chen GH, Lien HC, Yeh HZ. Small intestine dysmotility and bacterial overgrowth in cirrhotic patients with spontaneous bacterial peritonitis. *Hepatology* 1998; 28: 1187-1190
- 38 Casafont Morencos F, de las Heras Castaño G, Martín Ramos L, López Arias MJ, Ledesma F, Pons Romero F. Small bowel bacterial overgrowth in patients with alcoholic cirrhosis. *Dig Dis Sci* 1996; 41: 552-556
- 39 Rosa H, Silvério AO, Perini RF, Arruda CB. Bacterial infection in cirrhotic patients and its relationship with alcohol. *Am J Gastroenterol* 2000; 95: 1290-1293
- 40 Pathak OK, Paudel R, Panta OB, Pant HP, Giri BR, Adhikari B. Retrospective study of the clinical profile and prognostic indicators in patients of alcoholic liver disease admitted to a tertiary care teaching hospital in Western Nepal. *Saudi J Gastroenterol* 2009; 15: 171-175
- 41 Spadaro A, Luigiano C, De Caro G, Morace C, Tortorella V, Bonfiglio C, Pagano N, Consolo P, Alibrandi A, Ajello A, Ferrà O, Freni MA. Prognostic factors of survival in complicated viral and alcoholic cirrhosis without hepatocellular carcinoma. A retrospective study. *Minerva Gastroenterol Dietol* 2007; 53: 311-319
- 42 Yang HI, Lu SN, Liaw YF, You SL, Sun CA, Wang LY, Hsiao CK, Chen PJ, Chen DS, Chen CJ. Hepatitis B e antigen and the risk of hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med* 2002; 347: 168-174
- 43 Iloeje UH, Yang HI, Su J, Jen CL, You SL, Chen CJ. Predicting cirrhosis risk based on the level of circulating hepatitis B viral load. *Gastroenterology* 2006; 130: 678-686
- 44 Chen CJ, Yang HI, Su J, Jen CL, You SL, Lu SN, Huang GT, Iloeje UH. Risk of hepatocellular carcinoma across a biological gradient of serum hepatitis B virus DNA level. *JAMA* 2006; 295: 65-73
- 45 Chou YC, Yu MW, Wu CF, Yang SY, Lin CL, Liu CJ, Shih WL, Chen PJ, Liaw YF, Chen CJ. Temporal relationship between hepatitis B virus enhancer II/basal core promoter sequence variation and risk of hepatocellular carcinoma. *Gut* 2008; 57: 91-97
- 46 Bataller R, Brenner DA. Hepatic stellate cells as a

- target for the treatment of liver fibrosis. *Semin Liver Dis* 2001; 21: 437-451
- 47 Thabut D, Imbert-Bismut F, Cazals-Hatem D, Messous D, Muntenau M, Valla DC, Moreau R, Poynard T, Lebrech D. Relationship between the Fibrotest and portal hypertension in patients with liver disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2007; 26: 359-368
- 48 Iredale JP. A cut above the rest? MMP-8 and liver fibrosis gene therapy. *Gastroenterology* 2004; 126: 1199-1201

编辑 李薇 电编 何基才

ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) CN 14-1260/R 2010年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

《世界华人消化杂志》性质、刊登内容及目标

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

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

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

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

外周血DNA TUSC4基因缺失在大肠癌分子筛查及早期诊断中的应用

裴风华, 赵晶, 杜雅菊, 程艳秋, 王晓芬, 陈晶, 张会涛, 刘冰熔, 高善玲

■背景资料

大肠癌是常见恶性肿瘤, 发病率逐年增高。尽管近些年对大肠癌的诊治水平有明显提高, 但其关键仍是早期诊断。目前基因检测受到越来越多的关注, 利用基因筛查技术可大大提前大肠癌的确诊时间, 甚至在出现典型病理变化之前就可明确诊断。

裴风华, 赵晶, 杜雅菊, 陈晶, 张会涛, 刘冰熔, 高善玲, 哈尔滨医科大学附属第二医院消化内科 黑龙江省哈尔滨市 150086

程艳秋, 王晓芬, 哈尔滨医科大学附属第二医院消化内镜中心 黑龙江省哈尔滨市 150086

裴风华, 副主任医师, 主要从事消化系肿瘤基础与临床研究。

黑龙江省卫生厅科研课题基金资助项目, No. 2007-303

作者贡献分布: 该课题由高善玲与杜雅菊设计; 实验操作、论文写作由裴风华、赵晶及陈晶完成; 标本采集由程艳秋与王晓芬完成; 刘冰熔检索文献; 张会涛协助试验。

通讯作者: 高善玲, 主任医师, 150086, 黑龙江省哈尔滨市, 哈尔滨医科大学附属第二医院消化内科。gaoshanling8@hotmail.com

收稿日期: 2010-08-15 修回日期: 2010-09-20

接受日期: 2010-09-27 在线出版日期: 2010-11-08

Significance of detection of TUSC4 gene deletion in peripheral blood DNA for molecular screening and diagnosis of colorectal carcinoma

Feng-Hua Pei, Jing Zhao, Ya-Ju Du, Yan-Qiu Cheng, Xiao-Fen Wang, Jing Chen, Hui-Tao Zhang, Bing-Rong Liu, Shan-Ling Gao

Feng-Hua Pei, Jing Zhao, Ya-Ju Du, Jing Chen, Hui-Tao Zhang, Bing-Rong Liu, Shan-Ling Gao, Department of Gastroenterology, the Second Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150086, Heilongjiang Province, China

Yan-Qiu Cheng, Xiao-Fen Wang, Digestive Endoscopy Center, the Second Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150086, Heilongjiang Province, China

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

Correspondence to: Shan-Ling Gao, Department of Gastroenterology, the Second Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150086, Heilongjiang Province, China. gaoshanling8@hotmail.com

Received: 2010-08-15 Revised: 2010-09-20

Accepted: 2010-09-27 Published online: 2010-11-08

Abstract

AIM: To detect tumor suppressor candidate 4 (TUSC4) gene deletion in peripheral blood DNA and to evaluate its significance for molecular screening and diagnosis of colorectal carcinoma.

METHODS: Polymerase chain reaction was used

to detect TUSC4 gene deletion in peripheral blood DNA samples from 238 subjects, including 117 subjects with normal colonoscopic findings, 38 patients with adenoma polyp, and 83 patients with colorectal carcinoma.

RESULTS: TUSC4 gene deletion was detected in peripheral blood DNA samples in 14.5%, 44.7% and 77.1% of normal subjects, adenoma polyp patients and colorectal carcinoma patients, respectively. The percentage of subjects carrying TUSC4 gene deletion differed significantly among the three groups of subjects (all $P = 0.000$). The sensitivity, specificity, positive predictive value (PPV) and negative predictive value (NPV) of detection of TUSC4 gene deletion in peripheral blood DNA for diagnosis of adenoma polyp were 44.7% (95%CI 28.9%-60.5%), 85.5% (95%CI 79.1%-91.9%), 50.0% (95%CI 33.2%-66.8%) and 82.6% (95%CI 75.8%-89.4%), respectively, while the corresponding values for diagnosis of colorectal carcinoma were 77.1% (95%CI 68.1%-86.1%), 85.5% (95%CI 79.1%-91.9%), 79.0% (95%CI 70.1%-87.9%) and 84.0% (95%CI 77.4%-90.6%). TUSC4 gene deletion in peripheral blood DNA was not significantly related to tumor site, differentiation degree and Dukes stage. Compared with detection of CEA and CA19-9, the specificity and PPV of detection of TUSC4 gene deletion for diagnosis of colorectal carcinoma were not significantly different (all $P > 0.05$). However, the sensitivity and NPV of detection of TUSC4 gene deletion for diagnosis of colorectal carcinoma were significantly higher than those of detection of CEA and CA19-9 (all $P = 0.000$).

CONCLUSION: TUSC4 gene deletion in peripheral blood DNA can be detected in patients with colorectal carcinoma. The sensitivity of detection of TUSC4 gene deletion for diagnosis of colorectal carcinoma is significantly higher than that of detection of CEA and CA19-9. Detection of TUSC4 gene deletion in peripheral blood DNA has significant value for molecular screening and diagnosis of colorectal carcinoma.

■同行评议者

徐宁志, 研究员, 中国医学科学院肿瘤医院细胞生物与分子生物学实验室

Key Words: Tumor suppressor candidate 4; Tumor suppressor gene; Colorectal carcinoma; Molecular screening; Molecular diagnosis

Pei FH, Zhao J, Du YJ, Cheng YQ, Wang XF, Chen J, Zhang HT, Liu BR, Gao SL. Significance of detection of TUSC4 gene deletion in peripheral blood DNA for molecular screening and diagnosis of colorectal carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(31): 3320-3326

摘要

目的: 探讨外周血DNA中肿瘤抑制候选基因4(tumor suppressor candidate 4, TUSC4)缺失在大肠癌的筛查与早期诊断中的意义。

方法: 采集外周静脉血标本238例, 分为结肠镜正常组(117例), 腺瘤型息肉组(38例)和大肠癌组(83例), 应用PCR法检测TUSC4基因表达及缺失情况。同时检测各组血浆CEA、CA19-9水平。

结果: 结肠镜正常组TUSC4阴性率14.5%, 腺瘤型息肉组阴性率44.7%, 大肠癌组阴性率77.1%, 3组之间均有统计学差异($P = 0.000$)。TUSC4阴性在诊断腺瘤型息肉的敏感度为44.7%(95%CI 28.9%-60.5%), 特异度85.5%(95%CI 79.1%-91.9%), PPV为50.0%(95%CI 33.2%-66.8%), NPV为82.6%(95%CI 75.8%-89.4%)。TUSC4阴性在诊断大肠癌的敏感度为77.1%(95%CI 68.1%-86.1%), 特异度为85.5%(95%CI 79.1%-91.9%), PPV为79.0%(95%CI 70.1%-87.9%), NPV为84.0%(95%CI 77.4%-90.6%)。TUSC4基因缺失与大肠癌发生部位、分化程度及Dukes分期无关。TUSC4阴性在诊断大肠癌时与CEA、CA19-9相比较, 其特异度和PPV无统计学差异($P > 0.05$), 其敏感度和NPV明显高于CEA和CA19-9($P = 0.000$)。

结论: 大肠癌患者外周血DNA中TUSC4基因出现明显缺失, 在诊断大肠癌时其敏感度明显高于CEA和CA19-9, 在大肠癌分子筛查和分子诊断中具有一定应用价值。

关键词: 肿瘤抑制候选基因4; 抑癌基因; 大肠癌; 分子筛查; 分子诊断

裴凤华, 赵晶, 杜雅菊, 程艳秋, 王晓芬, 陈晶, 张会涛, 刘冰熔, 高善玲. 外周血DNA TUSC4基因缺失在大肠癌分子筛查及早期诊断中的应用. *世界华人消化杂志* 2010; 18(31): 3320-3326
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/3320.asp>

0 引言

大肠癌的发生、发展是由于一系列癌基因的激

活和抑癌基因的失活引起的。肿瘤抑制候选基因4(tumor suppressor candidate 4, TUSC4, GeneID: 10641)是近年新发现的一个抑癌基因^[1], 无论在体内还是体外均能抑制肿瘤的活性, 亦称为NPRL2(nitrogen permease regulator-like 2)基因。TUSC4基因表达于许多正常组织, 在多种上皮性肿瘤组织中的表达明显降低^[2], 但在外周血DNA中的缺失情况目前国内外尚无报道。本文通过研究外周血DNA中TUSC4缺失情况, 探讨该基因对大肠癌的诊断意义, 为寻找新的大肠癌早期筛查方法提供依据。

1 材料和方法

1.1 材料 选取2008-12/2010-04在哈尔滨医科大学附属第二医院消化内镜中心行结肠镜检查者共238例。根据结肠镜和组织病理结果, 将其分为结肠镜正常组(117例)、腺瘤型息肉组(38例)和大肠癌组(83例)。凡入选患者均签署知情同意书, 并经我院伦理委员会讨论批准。外周血DNA提取试剂盒购自TIANGEN公司, Premix Taq DNA聚合酶购自TaKaRa公司, PCR引物由上海超世生物科技有限公司设计并合成, 癌胚抗原(carcinoembryonic antigen, CEA)、癌抗原19-9(cancer antigen 19-9, CA19-9)ELISA试剂盒购自Adlitteram Diagnostic Laboratories公司。PCR仪(BIOER XP cyclor)。

1.2 方法

1.2.1 样本处理: 抗凝管采集患者空腹静脉血5-10 mL, 立即离心分离血浆, 将血浆和血细胞成分分别-20 °C保存备用。

1.2.2 总DNA提取: 按照DNA提取试剂盒说明书进行, 提取出的DNA在紫外分光光度计下测定浓度。

1.2.3 内参 β -actin PCR扩增: 扩增体系20 μ L: 2 $\times$ Premix Taq DNA聚合酶10 μ L, 上、下游引物各1 μ L(10 μ mol/L), DNA 2 μ L, 去离子水6 μ L。内参 β -actin引物序列: F: GGCACCCAGCACAATGAA; R: GGAAGGTGGACAGCGAGG。PCR扩增条件95 °C预变性5 min, 95 °C 30 s, 58 °C 30 s, 72 °C 30 s, 35个循环, 72 °C延伸5 min, PCR产物片段长度210 bp。

1.2.4 内参 β -actin PCR产物鉴定: 取PCR产物5 μ L加样于2%琼脂糖凝胶进行电泳, 电压150 V, 电泳20 min, 用紫外光凝胶成像系统扫描并拍摄, 以肉眼明确判定有目标条带为内参阳性。

1.2.5 TUSC4 PCR扩增: 选取内参阳性的DNA标

■ 研发前沿

TUSC4基因是近年来新发现的肿瘤抑制基因, 在多种上皮性肿瘤组织中表达明显降低, 但在外周血中的表达情况国内外尚无报道。

■相关报道

Schenk等发现, 酵母细胞中的NPR2基因失活后, 该酵母细胞能抵抗顺铂的细胞毒性作用, 而人类NPRL2蛋白与酵母NPR2蛋白的结构十分相似, 可能其也有相同的生物学功能, 恢复耐药肿瘤细胞中NPRL2的正常表达后可以使肿瘤细胞对化疗药物重新敏感。

表 1 各组性别及年龄的比较

分组	n	男n(%)	女n(%)	平均年龄(岁, mean ± SD)	t值	P值
结肠镜正常组	117	64(54.7)	53(45.3)	47.67 ± 11.26		
腺瘤型息肉组	38	29(76.3)	9(23.7)	55.89 ± 12.79 ^b	-3.784	0.000
大肠癌组	83	50(60.2)	33(39.8)	58.51 ± 11.66 ^b	-6.611	0.000
直肠n(%)	38(45.8)	21(55.3)	17(44.7)	59.89 ± 11.54		
结肠n(%)	45(54.2)	29(64.4)	16(35.6)	57.33 ± 11.76	0.997	0.322
高分化n(%)	30(36.1)	20(66.7)	10(33.3)	57.30 ± 12.39		
中分化n(%)	41(49.4)	23(56.1)	18(43.9)	59.32 ± 11.63	-0.702	0.485
低分化n(%)	12(14.5)	7(58.3)	5(41.7)	58.75 ± 10.52	-0.357	0.723
合计	238	143(60.1)	95(39.9)			

^bP<0.01 vs 结肠镜正常组年龄。

本, 扩增体系20 μL: 2×Premix Taq DNA聚合酶10 μL, 上、下游引物各1 μL(10 μmol/L), DNA 2 μL, 去离子水6 μL. TUCS4引物序列: F: CA-CAACAAATCCTGCCCTACA; R: TCTTCATA-AGCCCGAAGTGG. PCR扩增条件95 °C预变性5 min, 95 °C 30 s, 58 °C 30 s, 72 °C 30 s, 35个循环, 72 °C延伸5 min, PCR产物片段长度910 bp.

1.2.6 TUCS4 PCR产物鉴定: 取PCR产物5 μL加样于2%琼脂糖凝胶进行电泳, 电压150 V, 电泳20 min, 用紫外光凝胶成像系统扫描并拍摄, 以肉眼明确判定有目标条带为阳性。

1.2.7 外周血浆CEA、CA19-9检测: 按照ELISA试剂盒说明书进行。

统计学处理 采用统计描述进行分析。计算敏感度, 特异度, 阳性预测值(positive predictive value, PPV), 阴性预测值(negative predictive value, NPV)及其相应的95%可信区间(95% confidence interval, 95%CI)。计量资料用t检验, 计数资料用 χ^2 检验或Fisher's检验, 数据处理用SPSS13.0软件包, P<0.05为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般资料结果 入选病例共238例, 其中男143例, 女95例。结肠镜正常117例, 平均年龄47.67岁±11.26岁。腺瘤型息肉38例, 平均年龄55.89岁±12.97岁。大肠癌83例, 平均年龄58.51岁±11.66岁, 其中直肠癌38例(45.8%), 结肠癌45例(54.2%), 高分化30例(36.1%), 中分化41例(49.4%), 低分化12例(14.5%)。年龄与大肠癌部位和分化程度无关(表1)。

2.2 内参 β -actin PCR产物和TUCS4 PCR产物鉴定 各组内参 β -actin PCR产物在210 bp均有清晰条带。TUCS4 PCR产物阳性者在910 bp有清晰条

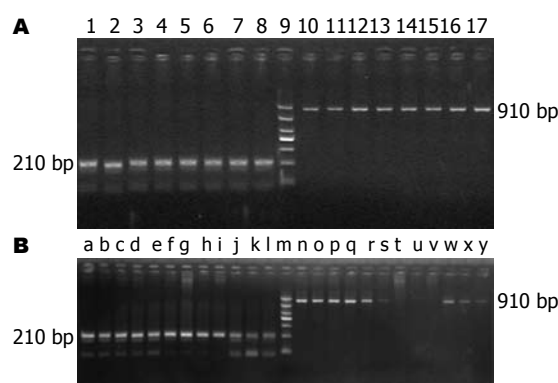


图 1 外周血DNA β -actin和TUCS4 PCR扩增产物2%琼脂糖凝胶电泳结果。1-8, a-l: β -actin阳性; 9, m: DNA Marker(DL1000); 10-17, n-s, w-y: TUCS4阳性; t-w: TUCS4 阴性。

带, TUCS4基因缺失者无条带(图1)。

2.3 外周血DNA TUCS4基因缺失检测结果 结肠镜正常组、腺瘤型息肉组和大肠癌组TUCS4基因缺失率分别为14.5%、44.7%和77.1%, 3组之间均有统计学差异($P = 0.000$)。结肠镜正常组TUCS4缺失者中有结肠癌家族史占41.2%(7/17), 胃癌家族史占5.9%(1/17)。该基因缺失在诊断腺瘤型息肉的敏感度为44.7%(95%CI: 28.9%-60.5%), 特异度85.5%(95%CI: 79.1%-91.9%), PPV为50.0%(95%CI: 33.2%-66.8%), NPV为82.6%(95%CI: 75.8%-89.4%)。在诊断大肠癌的敏感度为77.1%(95%CI: 68.1%-86.1%), 特异度为85.5%(95%CI: 79.1%-91.9%), PPV为79.0%(95%CI: 70.1%-87.9%), NPV为84.0%(95%CI: 77.4%-90.6%, 表2)。

2.4 不同部位、分化程度及Dukes分期的大肠癌TUCS4缺失检测结果 直肠癌和结肠癌TUCS4缺失率分别为68.4%和84.4%, 二者无统计学差异($\chi^2 = 2.997, P = 0.083$)。不同分化程度大肠癌

表 2 外周血TUSC4缺失对腺瘤型息肉和大肠癌的诊断价值

分组	<i>n</i>	-	+	缺失率(%)	χ^2 值	<i>P</i> 值	(-)敏感度% (95%CI)	(-)特异度% (95%CI)	(-)PPV% (95%CI)	(-)NPV% (95%CI)
结肠镜正常组	117	17	100	14.5						
腺瘤型息肉组	38	17	21	44.7	15.280 ^b	0.000	44.7 (28.9-60.5)	85.5 (79.1-91.9)	50.0 (33.2-66.8)	82.6 (75.8-89.4)
大肠癌组	83	64	19	77.1	12.343 ^d	0.000	77.1 (68.1-86.1)	85.5 (79.1-91.9)	79.0 (70.1-87.9)	84.0 (77.4-90.6)
合计	238	98	140							

^b*P*<0.01 vs 结肠镜正常组; ^d*P*<0.01 vs 腺瘤型息肉组。

表 3 不同部位、分化程度和Dukes分期大肠癌的外周血TUSC4缺失检测结果

	<i>n</i>	-	+	缺失率(%)	χ^2 值	<i>P</i> 值
部位					2.997	0.083
直肠	38	26	12	68.4		
结肠	45	38	7	84.4		
分化程度					1.770	0.413
高	30	22	8	73.3		
中	41	34	7	82.9		
低	12	8	4	66.7		
Dukes分期						0.416 ^a
A+B	78	60	18	76.9		
C+D	5	4	1	80.0		
合计	83	64	19	77.1		

^aFisher's Exact Test.

的TUSC4缺失率无统计学差异($\chi^2 = 1.770$, $P = 0.413$). Dukes分期A期和B期与C期和D期相比较, TUSC4缺失率无统计学差异($P = 0.416$, 表3).

2.5 外周血CEA、CA19-9检测结果 结肠镜正常组和腺瘤型息肉组CEA和CA19-9均为阴性, CEA诊断大肠癌的敏感度为36.7%, 特异度为100%, PPV为100%, NPV为44.1%; CA19-9敏感度为16.7%, 特异度100%, PPV 100%, NPV 37.5%; 二者联合检测敏感度40.0%, 特异度100%, PPV 100%, NPV 45.5%(表4-6).

2.6 TUSC4和CEA、CA19-9在诊断大肠癌价值的比较 TUSC4阴性与CEA、CA19-9、CEA+CA19-9比较, 其特异度和PPV无统计学差异($P > 0.05$), 其敏感度和NPV明显高于后者($P = 0.000$, 表7).

3 讨论

大肠癌是一种常见恶性肿瘤, 随着生活水平的提高, 生活习惯的改变, 大肠癌的发病有逐年增高的趋势, 大肠癌的病死率在美国上升到恶性

肿瘤死亡率的第3位, 在中国上升到恶性肿瘤死亡率的第5位. 尽管近些年临床对大肠癌的诊治水平有明显提高, 但手术仍旧是主要的治疗方法, 若早期发现并进行手术治疗, 可以大大提高肿瘤患者的生存率, 因此治疗癌症的关键是早期诊断.

大肠癌常用的筛查方法有: 便潜血检测、血液肿瘤标志物检查、X线钡剂灌肠检查、结肠镜检查等. 较新的大肠癌筛查方法有: PET/CT、外周血或粪便基因检查、胶囊内镜检查等. 其中, 内镜检查或其他影像学检查均具有侵袭性或费用高等缺点, 无法针对普通人群进行大规模的筛查. 便潜血的检测虽然简单, 取材方便, 是大规模筛查的首选方法^[3], 但是其影响因素较多, 且需在肿瘤形成后破溃出血的情况下才能检测到阳性结果. 目前, 外周血或粪便的基因检测受到越来越多的关注. 利用基因技术筛查可大大提前早期大肠癌的诊断时间, 甚至在出现典型病理变化之前就可明确诊断.

在结肠癌的发生和发展过程中伴有显著的

■创新盘点

本研究发现在大肠癌癌变过程中, 外周血TUSC4基因缺失率明显上升, 其敏感性和特异性明显高于传统的肿瘤标志物, 因此在大肠癌的早期筛查中可能具有重要意义.

■应用要点

大肠癌的早期筛查对提高人群生存质量具有重要意义, 外周血TUSC4基因的缺失检测为早期筛查提供了新的分子生物学标记。

表 4 外周血CEA在大肠腺瘤型息肉和大肠癌中的检测结果

分组	<i>n</i>	阳性数 <i>n</i> (%)	敏感度%(95%CI)	特异度%(95%CI)	PPV%(95%CI)	NPV%(95%CI)
结肠镜正常组	15	0				
腺瘤型息肉组	20	0	0.0	100(78.0–100.0)	–	42.9(26.0–61.0)
大肠癌组	30	11(36.7)	36.7(20.0–56.0)	100(78.0–100.0)	100(72.0–100.0)	44.1(27.0–62.0)

表 5 外周血CA19-9在大肠腺瘤型息肉和大肠癌中的检测结果

分组	<i>n</i>	阳性数 <i>n</i> (%)	敏感度%(95%CI)	特异度%(95%CI)	PPV%(95%CI)	NPV%(95%CI)
结肠镜正常组	15	0				
腺瘤型息肉组	20	0	0.0(0.0–17.0)	100(78.0–100.0)	–	42.9(26.0–61.0)
大肠癌组	30	5(16.7)	16.7(6.0–35.0)	100(78.0–100.0)	100(48.0–100.0)	37.5(23.0–54.0)

表 6 外周血CEA+CA19-9在大肠腺瘤型息肉和大肠癌中的检测结果

分组	<i>n</i>	阳性数 <i>n</i> (%)	敏感度%(95%CI)	特异度%(95%CI)	PPV%(95%CI)	NPV%(95%CI)
结肠镜正常组	15	0				
腺瘤型息肉组	20	0	0.0(0.0–17.0)	100(78.0–100.0)	–	42.9(26.0–61.0)
大肠癌组	30	12(40.0)	40.0(23.0–59.0)	100(78.0–100.0)	100(74.0–100.0)	45.5(28.0–64.0)

表 7 外周血DNA TUSC4缺失与CEA、CA19-9诊断大肠癌价值的比较

	敏感度%(<i>n</i>)	χ^2 (<i>P</i>)值	特异度%(<i>n</i>)	<i>P</i> 值 ¹	PPV%(<i>n</i>)	<i>P</i> 值 ¹	NPV%(<i>n</i>)	χ^2 (<i>P</i>)值
TUSC4缺失	77.1(64/83)		85.5(100/117)		79.0(64/81)		84.0(100/119)	
CEA	36.7(11/30) ^b	16.147(0.000)	100.0(15/15)	0.216	100.0(11/11)	0.207	44.1(15/34) ^b	22.570(0.000)
CA19-9	16.7(5/30) ^b	33.857(0.000)	100.0(15/15)	0.216	100.0(5/5)	0.578	37.5(15/40) ^b	32.388(0.000)
CEA+CA19-9	40.0(12/30) ^b	13.779(0.000)	100.0(15/15)	0.216	100.0(12/12)	0.114	45.5(15/33) ^b	20.879(0.000)

^b*P*<0.01 vs TUSC4缺失. ¹Fisher's Exact Test.

基因改变. 其中, 原癌基因(如K-ras等)和肿瘤抑制基因(如APC, P53, DCC, DPC1, Bim等)的突变在结肠癌发生中起重要作用. 很多学者在大肠癌患者外周血和粪便中检测到了原癌基因^[4,5]的表达和肿瘤抑制基因的失活, 并发现这种诊断方法比结肠镜检查有更高的特异性和敏感性.

TUSC4基因是Lerman等^[1]从人3号染色体短臂上克隆得到的一种抑癌基因, 定位于人染色体3p21.3区, 其cDNA全长1 351 bp, 有11个外显子和10个内含子, 编码380个氨基酸的蛋白质, 从低级生物酵母到人类都具有一个高度保守的序列. 人类TUSC4基因表达于许多正常组织(包括心脏、脑、骨骼肌、肝脏、肾脏、胰腺和肺等), 在多种上皮性肿瘤组织中的表达明显降低(如肺癌^[6]、肝癌^[7]、食管癌^[8]、鼻咽癌^[9]、乳

腺癌、肾细胞癌和卵巢癌等). 研究发现该基因的失活与多种肿瘤的发生、发展关系密切, 但其具体的机制尚不清楚. 该基因可能具有参与DNA错配修饰、调控细胞周期信号转导以及诱导细胞凋亡的生物学功能, 其作用机制可能与TUSC4启动子区纯合子缺失和微卫星不稳定性^[10,11]有关, 可能使该基因的表达下调, 并改变了该基因的功能, 这一改变已通过Northern blot获得证实^[12]. Li等^[2]分析了8种肾癌细胞株, 发现肾癌细胞中TUSC4基因不存在DNA甲基化, 因此推测, TUSC4基因的失活可能与DNA甲基化无关. Kurata等^[13]认为TUSC4是一种新的PDK1相关蛋白, 在调节Src/PDK1信号途径和细胞对多种抗癌化疗药的敏感性方面起到重要作用.

本研究应用常规PCR法, 通过检测TUSC4基

因在大肠癌和癌前病变中外周血DNA中的缺失情况,旨在寻找新的大肠癌分子肿瘤标志物,为大肠癌的筛查与早期诊断提供新的依据。在检测过程中,我们应用了DNA的内参 β -actin作为参照,这样就最大限度地避免了其他因素造成的PCR扩增阴性结果对本研究的影响。

本研究发现,在结肠镜正常组、腺瘤型息肉组和大肠癌组中,外周血DNA TUSC4缺失率依次上升(分别为14.5%, 44.7%和77.1%),3组之间互相均有显著性差异($P = 0.000$),说明在大肠癌发生发展过程中TUSC4基因即出现缺失的趋势,在癌前病变即有近一半的患者出现该基因缺失。值得高度关注的是,在正常对照组中,TUSC4基因缺失者有肿瘤家族史者占47.1%(8/17),其中41.2%(7/17)有大肠癌家族史。这些患者作为高危人群,出现TUSC4基因的缺失是否是发生肿瘤的高危信号,还有待于密切的随访。同时我们还发现,TUSC4基因缺失与大肠癌发生部位和分化程度无关,因此推测该基因缺失是肿瘤发生的早期事件,这更值得我们进一步关注该基因在肿瘤发生中的重要作用。该基因的缺失还和大肠癌的Dukes分期无关(A、B期与C、D期缺失率无显著差异, $P = 0.416$),这表明,本研究所检测到的基因缺失能代表外周血淋巴细胞DNA(即胚系)所携带的突变,而不是外周血中肿瘤细胞DNA所携带的突变,这为进一步研究该基因在肿瘤发生和发展中的作用提供了依据。

外周血肿瘤标志物CEA、CA19-9一直是大肠癌传统的筛查和判断预后的指标^[14,15],本研究将TUSC4基因缺失与CEA、CA19-9在诊断大肠癌的价值做比较,发现二者特异度和PPV无统计学差异($P > 0.05$),而TUSC4基因缺失的敏感度和NPV明显高于CEA和CA19-9($P = 0.000$)。鉴于其高敏感性,TUSC4基因缺失可作为一个选择性的基因用于大肠癌的筛查。但目前尚无其他器官肿瘤外周血DNA中TUSC4基因缺失情况的资料,推测在其他器官肿瘤中也可能有该基因的缺失,如果事实如此,该基因作为大规模筛查肿瘤的目标基因就有更大的应用价值。

大肠癌的防治已成为大肠癌研究的一大热点^[16],寻找与大肠癌发生、发展及预后相关基因和新的干预治疗靶点具有重要意义。TUSC4基因是一个新发现的肿瘤抑制基因,该基因在多种肿瘤中失活,表明他是参与肿瘤发生、发展的重要分子。随着人们对TUSC4基因研究的深入,

其在肿瘤发生、发展过程中的作用将得到更全面、更透彻的阐明,并能在分子水平上为肿瘤的基因诊断和治疗提供新的思路。

4 参考文献

- 1 Lerman MI, Minna JD. The 630-kb lung cancer homozygous deletion region on human chromosome 3p21.3: identification and evaluation of the resident candidate tumor suppressor genes. The International Lung Cancer Chromosome 3p21.3 Tumor Suppressor Gene Consortium. *Cancer Res* 2000; 60: 6116-6133
- 2 Li J, Wang F, Haraldson K, Protopopov A, Duh FM, Geil L, Kuzmin I, Minna JD, Stanbridge E, Braga E, Kashuba VI, Klein G, Lerman MI, Zabarovsky ER. Functional characterization of the candidate tumor suppressor gene NPRL2/G21 located in 3p21.3C. *Cancer Res* 2004; 64: 6438-6443
- 3 Young GP, St John DJ, Winawer SJ, Rozen P. Choice of fecal occult blood tests for colorectal cancer screening: recommendations based on performance characteristics in population studies: a WHO (World Health Organization) and OMED (World Organization for Digestive Endoscopy) report. *Am J Gastroenterol* 2002; 97: 2499-2507
- 4 Villa E, Dugani A, Rebecchi AM, Vignoli A, Grotola A, Buttafoco P, Losi L, Perini M, Trande P, Merighi A, Lerose R, Manenti F. Identification of subjects at risk for colorectal carcinoma through a test based on K-ras determination in the stool. *Gastroenterology* 1996; 110: 1346-1353
- 5 Smith-Ravin J, England J, Talbot IC, Bodmer W. Detection of c-Ki-ras mutations in faecal samples from sporadic colorectal cancer patients. *Gut* 1995; 36: 81-86
- 6 Senchenko VN, Anedchenko EA, Kondratieva TT, Krasnov GS, Dmitriev AA, Zabarovska VI, Pavlova TV, Kashuba VI, Lerman MI, Zabarovsky ER. Simultaneous down-regulation of tumor suppressor genes RBSP3/CTDSPL, NPRL2/G21 and RASSF1A in primary non-small cell lung cancer. *BMC Cancer* 2010; 10: 75
- 7 Otani S, Takeda S, Yamada S, Sakakima Y, Sugimoto H, Nomoto S, Kasuya H, Kanazumi N, Nagasaka T, Nakao A. The tumor suppressor NPRL2 in hepatocellular carcinoma plays an important role in progression and can be served as an independent prognostic factor. *J Surg Oncol* 2009; 100: 358-363
- 8 Yi Lo PH, Chung Leung AC, Xiong W, Law S, Duh FM, Lerman MI, Stanbridge EJ, Lung ML. Expression of candidate chromosome 3p21.3 tumor suppressor genes and down-regulation of BLU in some esophageal squamous cell carcinomas. *Cancer Lett* 2006; 234: 184-192
- 9 Chow LS, Lo KW, Kwong J, To KF, Tsang KS, Lam CW, Dammann R, Huang DP. RASSF1A is a target tumor suppressor from 3p21.3 in nasopharyngeal carcinoma. *Int J Cancer* 2004; 109: 839-847
- 10 Economidou F, Tzortzaki EG, Schiza S, Antoniou KM, Neofytou E, Zervou M, Lambiri I, Siafakas NM. Microsatellite DNA analysis does not distinguish malignant from benign pleural effusions. *Oncol Rep* 2007; 18: 1507-1512
- 11 Castagnaro A, Marangio E, Verduri A, Chetta A, D'Ippolito R, Del Donno M, Olivieri D, Di Cola G. Microsatellite analysis of induced sputum DNA in

■同行评价

本文选题恰当,科学性一般,具有一定的临床参考意义。

- patients with lung cancer in heavy smokers and in healthy subjects. *Exp Lung Res* 2007; 33: 289-301
- 12 Takahashi Y, Kondo K, Hirose T, Nakagawa H, Tsuyuguchi M, Hashimoto M, Sano T, Ochiai A, Monden Y. Microsatellite instability and protein expression of the DNA mismatch repair gene, hMLH1, of lung cancer in chromate-exposed workers. *Mol Carcinog* 2005; 42: 150-158
- 13 Kurata A, Katayama R, Watanabe T, Tsuruo T, Fujita N. TUSC4/NPRL2, a novel PDK1-interacting protein, inhibits PDK1 tyrosine phosphorylation and its downstream signaling. *Cancer Sci* 2008; 99: 1827-1834
- 14 Kim JY, Kim NK, Sohn SK, Kim YW, Kim KJ, Hur H, Min BS, Cho CH. Prognostic value of postoperative CEA clearance in rectal cancer patients with high preoperative CEA levels. *Ann Surg Oncol* 2009; 16: 2771-2778
- 15 Filiz AI, Sucullu I, Kurt Y, Karakas DO, Gulec B, Akin ML. Persistent high postoperative carcinoembryonic antigen in colorectal cancer patients--is it important? *Clinics (Sao Paulo)* 2009; 64: 287-294
- 16 Pignone M, Levin B. Recent developments in colorectal cancer screening and prevention. *Am Fam Physician* 2002; 66: 297-302

编辑 李薇 电编 何基才

ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) CN 14-1260/R 2010年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

《世界华人消化杂志》参考文献要求

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

早期胃癌黏膜微细形态的内镜研究进展

王 寰, 刘海峰

王寰, 刘海峰, 中国人民武装警察部队总医院消化科 北京市 100039

武警部队科研基金资助项目, No. WZ200701

作者贡献分布: 本文由王寰综述; 刘海峰审校。

通讯作者: 刘海峰, 主任医师, 100039, 北京市, 中国人民武装警察部队总医院消化科. liuhaifeng333@163.com

收稿日期: 2010-07-19 修回日期: 2010-08-17

接受日期: 2010-08-24 在线出版日期: 2010-11-08

Advances in understanding the fine structure of gastric mucosa in patients with early gastric cancer by endoscopic imaging

Huan Wang, Hai-Feng Liu

Huan Wang, Hai-Feng Liu, Department of Gastroenterology, General Hospital of Armed Police Forces, Beijing 100039, China

Supported by: the Scientific Research Foundation of the Chinese People's Armed Police Force, No. WZ200701

Correspondence to: Hai-Feng Liu, Department of Gastroenterology, General Hospital of Armed Police Forces, Beijing 100039, China. liuhaifeng333@163.com

Received: 2010-07-19 Revised: 2010-08-17

Accepted: 2010-08-24 Published online: 2010-11-08

Abstract

The development of endoscopic techniques has allowed us to more clearly observe the fine structure of gastric mucosa (gastric pits and microvessels). Patients with different precancerous lesions or early gastric cancer have different mucosal microstructure. Analysis and classification of the fine structure of gastric mucosa by endoscopic imaging can help improve the diagnosis of early gastric cancer. In this paper, we review the advances in understanding the fine structure of gastric mucosa in patients with early gastric cancer by endoscopic imaging.

Key Words: Early gastric cancer; Fine mucosal structure; Gastric pit; Microvessel; Endoscope; Diagnosis

Wang H, Liu HF. Advances in understanding the fine structure of gastric mucosa in patients with early gastric cancer by endoscopic imaging. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(31): 3327-3331

摘要

随着内镜技术的发展, 胃黏膜表面的微细结构(胃小凹和微血管)得以更清晰的观察。各种癌前病变及早期胃癌, 具有不同的黏膜微细结构。研究和分析内镜下胃黏膜微细结构(胃小凹及微血管)的分型及形态特征, 有利于提高早期胃癌的诊断率。本文就早期胃癌的胃黏膜微细结构形态作一综述。

关键词: 早期胃癌; 黏膜微细结构; 胃小凹; 微血管; 内镜; 诊断

王寰, 刘海峰. 早期胃癌黏膜微细形态的内镜研究进展. *世界华人消化杂志* 2010; 18(31): 3327-3331

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/3327.asp>

0 引言

近年来, 各种内镜技术的发展, 使得胃黏膜表面的微细结构(胃小凹和微血管)的研究更加深入。当胃黏膜发生病变时, 胃小凹和微血管必然发生形态学上的改变。研究和分析早期胃癌内镜下黏膜微细形态特征是提高早期胃癌诊断率的有效方法。本文就内镜下早期胃癌的黏膜微细形态研究的相关内容综述如下。

1 内镜下胃黏膜微细形态分型

随着内镜技术的发展, 尤其是放大内镜、电子染色及共聚焦内镜的发展, 内镜医生不仅可以清晰地观察到胃小凹形态, 还可以观察到微血管形态。早在20世纪60-70年代, 日本的学者就开始应用放大内镜观察研究正常及病态胃黏膜表面的微细结构及形态特征。1974年吉井隆博根据切除胃标本染色实体显微镜的观察, 将胃小凹的微细结构分为点状及沟状2大类。1978年Sakaki等^[1]应用放大内镜观察, 将胃小凹, 胃小沟等微细的胃黏膜结构分为以下4类: A: 点状; B: 短线状; C: 条纹状; D: 网状。并认为幽门部小凹常成条纹状, 而胃体部小凹呈点状, B型改变介于A、C之间, 而D型多出现在炎症、溃疡等病变的区域。黄永辉等^[2]将胃小凹形态分为5型: A

■背景资料

近年来, 各种内镜技术的发展, 使得胃黏膜表面的微细结构(胃小凹和微血管)的研究更加深入, 但目前关于早期胃癌的黏膜微细形态分型及特征还没有统一的标准。研究和分析早期胃癌内镜下黏膜微细形态特征是提高早期胃癌诊断率的有效方法。

■同行评议者

江米足, 教授, 浙江大学医学院附属儿童医院儿科

■研发前沿

随着电子染色技术发展,微血管形态的观察变得更加直观、清晰。研究早期胃癌胃小凹及微血管形态特征是目前研究的方向。

型(圆点状小凹),主要分布于正常和轻度慢性浅表性胃炎的胃体及胃底黏膜;B型(线状小凹),分布于正常的胃窦黏膜和浅表性胃炎的胃窦黏膜;C型(稀疏而粗大的线状小凹),轻度或中度萎缩性胃炎的胃黏膜及部分伴有轻度肠上皮化生的胃黏膜;D型(斑块状小凹),分布于中重度萎缩性胃炎及伴有中重度肠上皮化生的胃黏膜;E型(绒毛状小凹),分布于重度萎缩性胃炎伴有重度肠上皮化生的胃黏膜。袁海峰等^[3]研究发现随着黏膜炎症的发展,E型胃小凹逐渐向一种结构模糊不清、消失,排列极度不规则,病灶与周境界限不清,或病灶内出现颗粒状隆起状态演化,并将此类细微结构定义为F型,这一特征提示着异性增生的出现。Zhang等^[4]通过共聚焦显微内镜的观察将胃小凹分为7型:A型:圆形开口的圆形小凹,分布于正常的胃底腺黏膜;B型:具有短线状开口的非连续性短棒状小凹,分布于慢性胃炎的胃体黏膜;C型:具有裂隙样开口的连续性短棒状小凹,分布于正常的幽门腺黏膜;D型:延长或扭曲的树枝样小凹,分布于慢性胃炎的胃窦黏膜;E型:小凹数目减少,小凹明显扩张,分布于慢性萎缩性胃炎黏膜;F型:出现杯状细胞,绒毛样外观,分布于肠上皮化生黏膜;G1型:正常的胃小凹消失,出现弥漫性的异性细胞,见于印戒细胞癌或低分化管状腺癌;G2型:正常的胃小凹消失,出现异性腺体,见于分化型管状腺癌。

Nakayoshi等^[5]采用放大内镜对胃黏膜血管研究后,将胃黏膜微血管变化分为4型:A型:未见黏膜微血管;B型:海星状;C型:细网状或螺旋状;D型:不规则或粗大新生血管。幽门螺杆菌相关性胃炎在放大内镜下多表现为:A型微血管改变;B型微血管改变仅在正常胃黏膜或良性病变中出现;C、D型微血管改变均出现在癌中。其中C型多见于分化型癌,D型多见于未分化型癌。Tahara等^[6]将胃黏膜微细形态分为4型:正常型:小的、圆点状小凹,具有规则的上皮下毛细血管网;A型:轻微增大的圆点状小凹,上皮下毛细血管网模糊或不清;B型:明显增大的、卵圆形或延长的小凹,不规则的血管密度增大;C型:边界清晰的卵圆形或绒毛状小凹,同时出现清晰的蜷曲、蜿蜒的血管。随着电子染色技术发展,微血管形态的观察变得更加直观、清晰。研究早期胃癌胃小凹及微血管形态特征是目前研究的方向。

■相关报道

Ezoe等通过放大内镜联合NBI内镜在研究中规定,若同时存在明确的边界线(DL)和不规则微血管结构(IMVP),则诊断为癌。

2 胃黏膜癌前病变及早期胃癌的内镜下黏膜微细形态研究

2.1 胃癌前病变黏膜微细形态 目前癌发生学中

普遍认为胃癌是由慢性胃炎-萎缩性胃炎-肠上皮化生-不典型增生发展而来,这一系列变化称为Correa序列。研究和分析癌前病变包括萎缩、肠化、不典型增生,尤其是不典型增生的黏膜微细形态特征,有利于研究早期胃癌黏膜微细形态特征。不典型增生在放大内镜下有3种直接征象:(1)轻度凹陷伴细微结构消失或呈不规则的细微小凹,病变较大时在内镜下形似糜烂;(2)轻度隆起伴细微结构消失或呈不规则的细微小凹,病变较大时在普通内镜下形似结节样的轻度隆起;(3)平坦而细微结构消失或粗糙紊乱。间接征象为其周边呈现中重度肠化生的D、E型小凹。关于放大内镜对不典型增生的诊断仅描述了凹陷或轻度隆起伴细微结构消失两种形态学改变^[7]。有些不典型增生病变在放大内镜下仅表现为表面黏膜细微结构消失或粗糙紊乱的平坦区域。凹陷或隆起的不典型增生病变中也发现并非均呈现完全的无结构区,而是有部分表现为不规则的细微小凹。黄永辉等^[8]制定了胃小凹形态基本分型:A型为圆点状;B型为线状;C型为稀疏而粗大的线状;D型为斑块状;E型为绒毛状。在此基础上制定放大胃镜的诊断分型及放大胃镜对胃黏膜萎缩、肠化生和不典型增生的判断标准:I型即无肠化生无不典型增生的胃黏膜,包括Ia:圆点状小凹;Ib:线状小凹;Ic:稀疏而粗大的线状小凹;Id:斑块状小凹。II型即肠化生胃黏膜,包括IIa:线状小凹伴美兰着色;IIb:稀疏而粗大的线状小凹伴美兰着色;IIc:斑块状小凹伴美兰着色;IId:绒毛状小凹。III型即不典型增生胃黏膜,包括IIIa:轻度凹陷伴细微结构消失或呈不规则的细微小凹;IIIb:轻度隆起伴细微结构消失或呈不规则的细微小凹;IIIc:平坦伴细微结构消失或粗糙紊乱。放大胃镜判定标准:萎缩:小凹增宽,分布稀疏,色泽浅淡,小凹形态呈现C、D或E型。肠化生:低倍放大时呈颗粒状不平或鱼鳞状,高倍放大时符合上述II型标准。不典型增生:符合上述II型标准并结合放大胃镜下的间接征象进行诊断。研究发现,胃黏膜萎缩主要表现为胃小凹粗大而分布稀疏,肠化生表现为C、E、D型小凹形态伴亚甲蓝着色阳性,不典型增生表现为轻度凹陷、隆起或平坦性病变伴细微结构消失、细微小凹或细微结构粗糙紊乱。

2.2 早期胃癌的胃黏膜微细形态 随着各种内镜技术不断应用于临床,内镜医师得以观察和研究早期胃癌的黏膜微细形态。目前临床上常用

的内镜技术包括放大内镜、窄带成像技术(narrow-band Imaging, NBI)、富士能智能电子分光技术(fuji intelligent color enhancement/fujinon intelligent chromoendoscopy, FICE)及其聚焦内镜, 其在表现早期胃癌的黏膜微细形态上有各自的特点。

2.2.1 放大内镜下早期胃癌胃黏膜微细形态: 放大内镜可以将胃黏膜的图像放大几十倍甚至上百倍, 有利于观察黏膜微细结构包括胃小凹及微血管形态。放大内镜可以通过观察胃黏膜的微细结构对病灶进行良、恶性鉴别, 预测其恶性程度和分期。条纹状、网格状的小凹以及肿瘤血管的出现和集合静脉、真毛细血管网的消失为放大内镜下早期胃癌的特征性改变。放大内镜下的微血管变化有助于胃黏膜内癌的分化程度的判断。在分化型, 癌变区界限清楚, 癌变区上皮皮下毛细血管和集合静脉消失, 并出现大小、外形和分布不规则的肿瘤微血管。在未分化型, 癌细胞向黏膜深层侵袭而不破坏表层上皮, 因此可观察到上皮下的毛细血管。对肿瘤浸润深度的判断, 一般认为黏膜下癌影响集合静脉和真毛细血管形态的程度与固有层内癌细胞的密度有关, 黏膜内癌对集合静脉和真毛细血管的影响相对要小些。Tajiri等^[9]应用放大胃镜观察早期胃癌, 隆起型呈现粗糙的和不规则的黏膜形态, 凹陷型早期胃癌黏膜微细结构破坏或消失、出现异常的毛细血管。Nakayoshi等^[5]将胃黏膜微血管变化分为4型, 其中C型(细网状或螺旋状)、D型(不规则或粗大新生血管)微血管改变均出现在癌中, 且C型多见于分化型癌, D型多见于未分化型癌。Totiba等^[10]根据黏膜表面的微细结构分为4类: 圆点状、条纹状、棒状及无定形。以此为基础将凹陷性胃病变表面的微细结构分为以下4种(d-depression, 凹陷性病变): (1) 不规则突出型(dIP): 表现为不规则隆起; (2) 正常乳头型(dN): 具有与非病变区相类似的圆点状或棒状结构; (3) 假乳头型(dP): 具有比非病变区粗大的圆点状、条纹状或棒状结构; (4) 不定形型(dA): 外观平坦, 其中可见微血管。通过与病理对比, dIP仅在胃癌出现, dN在良性糜烂及胃癌出现, dP在开放型溃疡及胃癌出现, dA在所有凹陷性病变中出现, dIP、dN、dP多见于低分化癌, 几乎所有的分化型癌及未分化型癌均可见dA。在dA微细结构中可见到特征性的微血管, 其形态分6种(v-vessel, 血管): (1)vS: 沙粒状; (2)vF: 栅栏状; (3)vRN: 圆网状; (4)vFN: 椭圆形网状;

(5)vB: 血管伴有不规则口径的分支; (6)vC: 血管呈螺旋状, 口径不规则。通过与病理对照, vS、vF仅在良性病变中出现, vS出现在良性糜烂, vF出现在溃疡瘢痕; vRN、vFN、vB、vC均出现在癌中, 其中vRN及vFN多见于分化型癌, 而vB和vC多见于未分化型癌, 特别是vFN仅见于分化型癌, vC则仅见于未分化型癌。

2.2.2 NBI下早期胃癌内镜下微细形态: NBI的基本原理是通过RGB滤光器将传统的电子内镜使用的氙灯照明光(白光)的宽带光谱中的宽带光波进行过滤, 仅留下415、540和600 nm波长的蓝、绿、红色窄带光波。因窄带光波波长包含在血红蛋白可吸收光波波长范围内, 且难以扩散, 能被血液吸收, 能够增加黏膜上皮和黏膜下血管模式的对比度和清晰度。不同波长的窄带光波穿透胃肠道黏膜的深度不同, 蓝色波段(415 nm)穿透较浅, 被黏膜表面的毛细血管反射, 使黏膜表层毛细血管呈褐色; 红色波段(600 nm)可深达黏膜下层, 用于显示黏膜下层的集合血管, 使黏膜下小血管呈绿色; 绿色波段(540 nm)的穿透能力介于上述两种光波之间, 能较好地显示中间层的血管。Yao等^[11]在窄带成像放大内镜(narrow-band imaging system with magnifying endoscopy, NBI-ME)下观察黏膜内胃癌的微小血管像特征, 可见分化型癌微小血管像有如下特点: (1) 排列规则, 上皮皮下毛细血管网(subepithelial capillary network, SECN)结构消失; (2) 分界限存在; (3) 不规则微血管结构。未分化型癌为微血管结构减少或消失。八尾等对分界限存在, SECN消失和不规则微血管结构进行比较, 慢性胃炎分别24.3%、31.3%、0.7%, 早期胃癌分别94.1%、100%、98.0%。分化型癌细胞在腺管内形成, 间质内微血管增生, 其密度高于正常黏膜微血管, 血管直径大小不等或不规则微血管增生; 未分化型癌细胞在黏膜肌层内形成, 破坏微血管和正常黏膜结构, 表面微血管明显减少或呈皱绸样血管^[12]。Nakayoshi等^[5]认为分化型癌表现为细网结构, 未分化型癌为螺旋状结构。前者与组织病理相符率达72%, 后者为86%。Ezoe等^[13]通过NBI-ME内镜系统与单纯放大白光内镜对胃黏膜小凹陷型病变(SDLs)的诊断, 进行了前瞻性研究后发现, NBI-ME能够更精确地诊断胃SDLs病变。在研究中规定: (1) 若同时存在明确的边界线(demarcation line, DL)和不规则微血管结构(irregular microvascular pattern, IMVP), 则诊断为癌; (2) 若DL或IMVP模糊难以辨认, 则诊断

■创新盘点

本文总结了各种内镜下, 包括放大内镜、NBI、FICE技术及共聚焦内镜下早期胃癌的黏膜微细形态特征。

■应用要点

本文总结早期胃癌黏膜的内镜下微细形态特征, 提高早期胃癌诊断率。

■名词解释

FICE技术: 富士能智能电子分光技术(FICE), 又称作多带显像(MBI)或计算机虚拟色素内镜(CVC), 他通过电子分光技术将彩色CCD采集到得不同色彩元素进行分解、纯化, 从白光显像的全部光谱信息中抽提出相应信息后进行图像再合成, 可提供400-600 nm间任意波长组合的图像处理模式, 并能通过位于内镜操作部的按键快速切换。

不确定; (3)若DL和IMVP两者一个或都不可见, 则诊断为非癌性病变。结果NBI-ME诊断的准确性、敏感性明显高于单纯放大白光内镜(79% vs 44%, $P=0.001$; 70% vs 33%, $P=0.005$)。

2.2.3 FICE下早期胃癌胃黏膜微细形态: FICE又称作多带显像(multiple band imaging, MBI)或计算机虚拟色素内镜(computed virtual chromoendoscopy, CVC), 是由日本Chiba大学Yoichi Miyake发明, 他与NBI不同, 他通过电子分光技术将彩色CCD采集到得不同色彩元素进行分解、纯化, 根据内镜主机预设的参数, 从白光显像的全部光谱信息中抽提出相应信息后进行图像再合成, 可提供400-600 nm间任意波长组合的图像处理模式, 并能通过位于内镜操作部的按键快速切换。波长组合亦可根据操作者的喜好及经验进行个性化调整, 并可为每位操作者预存10组不同参数, 以期达到最佳的观察效果。目前对于早期胃癌采用何种波段组合观察为最佳尚无统一认识。Pohl等^[14]对比后发现使用B波段波长较短的组合可同时对黏膜凹陷及血管纹理进行有效观察, 其提出3个波长组合包括R = 500 nm、G = 445 nm、B = 415 nm, R = 500 nm、G = 470 nm、B = 420 nm与R = 500 nm、G = 480 nm、B = 420 nm, 其中又以R = 500 nm、G = 480 nm、B = 420 nm观察效果最好。毛利等总结发现使用530 nm附近的光波对浅表凹陷型早期胃癌的边界诊断价值最大。吴云林等^[15]在应用FICE技术辅助筛查早期胃癌的工作中发现, FICE技术对检出扁平隆起病变、判断浅凹陷性或黏膜糜烂病变的浸润边界及色泽改变、可疑病变处黏膜小凹的形态改变、黏膜下新生血管的观察等有较明显的辅助作用。

2.2.4 共聚焦激光显微内镜下早期胃癌胃黏膜微细形态: 共聚焦激光显微内镜是在普通内镜的头端安装一个共聚焦激光显微组织中的荧光经激光激发后汇聚在焦平面上, 依次在组织的不同层面上得到光学横断面图像, 即“光学切片”, 共聚焦显微镜将内镜图像放大1 000倍, 不仅可以观察到消化系黏膜组织和细胞, 而且可以观察到黏膜层内的毛细血管网等间质结构, 这一新技术也被誉为“光学活检技术”。激光显微内镜(confocal laser endomicroscopy, CLE)检查被称为“光学活检”。Zhang等^[4]通过共聚焦显微内镜的观察将胃小凹分为7型: 其中G1型: 正常的胃小凹消失, 出现弥漫性的异性细胞, 见于印戒细胞癌或低分化管状腺癌。G2型: 正

常的胃小凹消失, 出现异性腺体, 见于分化型管状腺癌。应用共聚焦内镜可以在体内实时观察毛细血管网的形态, 共聚焦图像可以清晰地显示微血管网细微的变化, 包括血管管径、血管壁, 甚至血细胞都可以辨认。刘红等^[16]将共聚焦图像微血管形态改变分化3型: I型: 微血管数目增多, 粗细不等, 排列不规则; II型: 微血管数目减少, 排列不规则; III型: 规则排列的微血管网, 呈蜂窝状或线圈状, 沿胃小凹排列。I型微血管形态预测高分化早期胃癌的敏感度、特异度、准确度、阳性预测值和阴性预测值分别为70.0%、95.2%、87.1%、87.5%和87.0%。II型微血管形态预测低分化早期胃癌的敏感性、特异性、准确度、阳性预测值和阴性预测值分别为83.3%、96.0%、93.5%、83.3%和96.0%。

3 结论

深入研究早期胃癌黏膜的内镜下微细形态特征, 是提高早期胃癌诊断率的有效方法, 但目前关于早期胃癌的黏膜微细形态分型及特征还没有统一的标准。虽然各种内镜技术在观察胃黏膜微细形态上有其独特优势, 但是目前仍没有一种内镜技术能代替组织学诊断确诊早期胃癌。放大内镜可以清晰地观察到早期胃癌胃小凹及微血管形态结构, 电子染色技术包括NBI及FICE技术不但使黏膜形态更加清晰, 并且在显示微血管形态上具有独特价值。共聚焦显微内镜在观察早期胃癌黏膜微细形态甚至可以达到细胞水平。放大内镜、NBI和FICE技术能清晰的展现黏膜的微细形态, 但仅局限于黏膜表层。共聚焦内镜能观察到细胞变化, 有望到达组织学诊断水平, 但目前其扫描深度为250 μm , 仍限于黏膜层, 不能对早期胃癌的浸润深度进行客观的判断。根据内镜技术的特点, 有效的联合应用, 使其在表现早期胃癌的黏膜微细形态特点上互补, 这是目前提高早期胃癌诊断率的有效措施。如果能够对图像进行同步三维重建, 并根据需要行数字减影技术, 立体显示胃黏膜微细结构的变化, 或许是内镜技术的发展方向。

4 参考文献

- 1 Sakaki N, Iida Y, Okazaki Y, Kawamura S, Take-moto T. Magnifying endoscopic observation of the gastric mucosa, particularly in patients with atrophic gastritis. *Endoscopy* 1978; 10: 269-274
- 2 黄永辉, 周丽雅, 林三仁, 金珠, 刘建军, 丁士刚, 夏志伟, 段丽萍, 常红. 放大内镜下胃小凹形态学分类及其临床病理意义. *中国内镜杂志* 2004; 10: 14-16
- 3 袁海峰, 唐少波, 溪锦要. 放大色素内镜下90例胃黏膜

- 癌前病形态学分析. 中国内镜杂志 2009; 15: 255-258
- 4 Zhang JN, Li YQ, Zhao YA, Yu T, Zhang JP, Guo YT, Liu H. Classification of gastric pit patterns by confocal endomicroscopy. *Gastrointest Endosc* 2008; 67: 843-853
- 5 Nakayoshi T, Tajiri H, Matsuda K, Kaise M, Ikegami M, Sasaki H. Magnifying endoscopy combined with narrow band imaging system for early gastric cancer: correlation of vascular pattern with histopathology (including video). *Endoscopy* 2004; 36: 1080-1084
- 6 Tahara T, Shibata T, Nakamura M, Yoshioka D, Okubo M, Arisawa T, Hirata I. Gastric mucosal pattern by using magnifying narrow-band imaging endoscopy clearly distinguishes histological and serological severity of chronic gastritis. *Gastrointest Endosc* 2009; 70: 246-253
- 7 American Society for Gastrointestinal Endoscopy annual meeting. May 19-23, 2002. San Francisco, California, USA. Abstracts. *Gastrointest Endosc* 2002; 55: AB77-AB280
- 8 黄永辉, 周丽雅, 林三仁, 金珠, 刘建军, 丁士刚, 夏志伟, 段丽萍. 胃黏膜萎缩、肠上皮化生及异型增生的放大内镜表现及其诊断价值. 中华消化内镜杂志 2005; 22: 231-235
- 9 Tajiri H, Doi T, Endo H, Nishina T, Terao T, Hyodo I, Matsuda K, Yagi K. Routine endoscopy using a magnifying endoscope for gastric cancer diagnosis. *Endoscopy* 2002; 34: 772-777
- 10 Tobita K. Study on minute surface structure of the depressed-type early gastric cancer with magnifying endoscopy. *Digestive Endoscopy* 2001; 13: 121-126
- 11 Yao K, Oishi T, Matsui T, Yao T, Iwashita A. Novel magnified endoscopic findings of microvascular architecture in intramucosal gastric cancer. *Gastrointest Endosc* 2002; 56: 279-284
- 12 殷萍, 黄傲霜. 早期胃癌内镜形态学研究进展. 中国消化内镜杂志 2008; 2: 37-40
- 13 Ezoe Y, Muto M, Horimatsu T, Minashi K, Yano T, Sano Y, Chiba T, Ohtsu A. Magnifying narrow-band imaging versus magnifying white-light imaging for the differential diagnosis of gastric small depressive lesions: a prospective study. *Gastrointest Endosc* 2010; 71: 477-484
- 14 Pohl J, May A, Rabenstein T, Pech O, Ell C. Computed virtual chromoendoscopy: a new tool for enhancing tissue surface structures. *Endoscopy* 2007; 39: 80-83
- 15 吴云林. 早期胃癌的内镜与FICE诊断. 第1版. 上海: 上海科技教育出版社, 2008: 13-17
- 16 刘红, 李延青, 赵幼安, 于涛, 张建平, 张建娜, 郭玉婷, 刘福国. 用共聚焦内镜对早期胃癌血管形态变化规律的研究. 中国消化内镜 2007; 1: 31-34

■同行评价

本文可读性一般, 综述全面, 具有一定的科学价值.

编辑 曹丽鸥 电编 李薇

ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) CN 14-1260/R 2010年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

《2009年版中国科技期刊引证报告》(核心版)发布 《世界华人消化杂志》2008年影响因子 0.547

本刊讯 中国科学技术信息研究所发布2008年《世界华人消化杂志》的总被引频次为2 480, 位居1 868种中国科技论文统计源期刊的第100位, 41种内科学类期刊的第6位. 2008年《世界华人消化杂志》的影响因子为0.547, 41种内科学类期刊的第17位. 大家最为关注的是《2009年版中国科技期刊引证报告》(核心版)中新增一个综合评价指标, 即综合评价总分, 该指标根据科学计量学原理, 系统性地综合考虑被评价期刊的各影响力指标(总被引频次、影响因子、他引率、基金论文比、引文率等)在其所在学科中的相对位置, 并按照一定的权重系数将这些指标进行综合集成, 对期刊进行综合评价. 《世界华人消化杂志》总分为49.5, 在41种内科学类期刊中排名第8位, 在1 868种中国科技期刊排名第341位. (编辑部主任: 李军亮 2010-01-08)

U II /UT系统在肝硬化门脉高压症中的研究进展

刘殿刚, 王宇

■背景资料

肝硬化门脉高压症形成的机制主要是肝内阻力增加和门脉血流量增多。血管活性物质在其中发挥重要作用, 尾加压素 II 是有效的血管活性物质, 在肝硬化门脉高压症病理生理改变中起重要作用。

刘殿刚, 首都医科大学宣武医院普外科 北京市 100053
王宇, 首都医科大学附属北京友谊医院普外科 北京市 100050
作者贡献分布: 本文综述由刘殿刚完成; 王宇审校。
通讯作者: 王宇, 主任医师, 教授, 100050, 北京市宣武区永安路 95号, 首都医科大学附属北京友谊医院普外科。
wangyu0319@126.com
电话: 010-63138662
收稿日期: 2010-07-25 修回日期: 2010-08-10
接受日期: 2010-08-17 在线出版日期: 2010-11-08

Advances in understanding the role of the U II/UT system in the pathogenesis of portal hypertension

Dian-Gang Liu, Yu Wang

Dian-Gang Liu, Department of General Surgery, Xuanwu Hospital, Capital Medical University, Beijing 100053, China
Yu Wang, Department of General Surgery, Beijing Friendship Hospital, Capital Medical University, Beijing 100050, China

Correspondence to: Professor Yu Wang, Department of General Surgery, Beijing Friendship Hospital, Capital Medical University, 95 Yong'an Road, Xuanwu District, Beijing 100053, China. wangyu0319@126.com
Received: 2010-07-25 Revised: 2010-08-10
Accepted: 2010-08-17 Published online: 2010-11-08

Abstract

Urotensin II (U II), a vasoactive peptide with structural similarity to somatostatin, is the most potent vasoconstrictor known in systemic resistance vessels and has multiple biological effects related to a variety of human diseases. Numerous studies have found that U II and its receptor (UT) play an important role in the pathogenesis of portal hypertension. This paper reviews the recent advances in understanding the role of the U II/UT system in the pathogenesis of portal hypertension.

Key Words: Urotensin II; Urotensin II receptor; Cirrhosis; Portal hypertension

Liu DG, Wang Y. Advances in understanding the role of the U II/UT system in the pathogenesis of portal hypertension. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(31): 3332-3337

摘要

尾加压素 II (urotensin II, U II) 是一种生长抑

素样环肽, 是目前发现的最强的缩血管物质, 其生物学作用多样, 与多种疾病密切相关。越来越多的研究发现 U II 及其受体 (urotensin II receptor, UT) 系统与肝硬化门脉高压症密切相关, 本研究就 U II /UT 系统在肝硬化门脉高压症中的研究进展作一总结。

关键词: 尾加压素 II; 尾加压素 II 受体; 肝硬化; 门脉高压症

刘殿刚, 王宇. U II /UT 系统在肝硬化门脉高压症中的研究进展. *世界华人消化杂志* 2010; 18(31): 3332-3337
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/3332.asp>

0 引言

肝硬化门脉高压症形成的机制主要是肝内阻力增加和门脉血流量增多。肝内阻力增加是始动因素, 其原因主要分机械性和动力性因素, 机械性因素是不可逆的, 而动力性因素是可逆的^[1,2]。血管活性物质可以解除或是减弱这种可逆性的因素^[3]。尾加压素 II (urotensin II, U II) 是有效的血管活性物质, 在肝硬化门脉高压症病理生理改变中起重要作用^[4]。U II 需与其受体 (urotensin II receptor, UT) 结合才能发挥各种生物学作用^[5]。近来研究发现 U II /UT 系统参与肝硬化门脉高压症的发病并可能成为新的潜在的治疗靶点^[6]。

1 U II 的化学结构及生物学活性

1.1 U II 的化学结构及分布 U II 最早是 1985 年自硬骨鱼的脊髓尾部神经分泌系统分离出来的一种生长抑素样环肽, 属于神经肽范围, 是迄今发现的体内最强缩血管活性物质^[7]。人类 U II 由 11 个氨基酸组成, 相对分子质量为 1 388, 编码 U II 的基因位于 1p36, 有 5 个外显子^[8]。1999 年 Ames 等首次报道人体内一种孤儿 G 蛋白偶联受体 14 (G protein coupled receptor, GPR14) 是 U II 的特异性受体, 后更名为 UT。U II 与 UT 结合后导致细胞内钙离子浓度升高, 引起多种生物学作用^[9-11]。U II /UT 主要分布于心血管和神经系统^[12,13], 随着研究深入, 还发现其分布广泛、生物学活性多样, 它能够作用于多系统、多器官, 发挥多种生物学效应^[14]。

■同行评议者

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

1.2 U II 的生物学活性 U II 的生物学作用多样, 与心血管疾病^[15-18]、糖尿病^[19,20]、肾脏疾病^[18,21,22]等多种疾病密切相关. 最近研究发现其在肝硬化门脉高压症中起重要作用. U II 参与肝硬化门脉高压症的生物学作用主要包括血管活性作用、丝裂原活性及纤维化作用, 其中血管活性性质研究最多, 资料最充分. 近年来其丝裂原活性及纤维化作用越来越受到人们重视.

1.2.1 血管活性功能: U II 的血管活性作用分为收缩血管作用及舒张血管作用, 由GPR14介导, 经Rho-A/Rho-kinase途径激活平滑肌细胞导致血管收缩^[23,24], 经内皮型一氧化氮合酶(endothelial constitutive NO synthase, eNOS)信号通路激活内皮细胞导致血管舒张^[11]. U II 的血管活性作用因种属、解剖位置、血管大小不同, 其生理作用可出现相反的结果, 其机制仍待进一步研究. 如U II 可引起全身阻力血管收缩, 其缩血管作用为内皮素的10余倍^[5], 而U II 对大鼠肠系膜血管、人腹部阻力血管是舒张作用^[25,26]. U II 可引起啮齿类动物大静脉收缩, 而对人肺静脉是舒张作用^[26]. 离子渗透方法发现U II 可引起健康人血管舒张, 而引起高血压和慢性心衰患者血管收缩. 这种差异可能与上述患者内皮细胞损伤, 不能产生舒张血管的物质有关^[27]. 肝硬化门脉高压患者肝窦内皮细胞受损, 窦周系统不能产生舒张血管物质一氧化氮(nitric oxide, NO)导致窦周阻力增加, 而肝硬化时肝内阻力的增加主要来源于肝窦^[28-31].

1.2.2 促增殖及促纤维化作用: 随着对U II 丝裂原活性及纤维化活性的深入研究, 发现U II 是一种内源性丝裂原. 有研究报道U II 可引起血管平滑肌细胞和内皮细胞增殖分化, 加速巨噬细胞泡沫细胞的形成, 刺激心肌细胞肥大, 并上调转化生长因子 β (transforming growth factor beta, TGF β)表达而诱导心肌成纤维细胞分泌胶原^[32-34]. 我们前期结果发现肝星状细胞表达UT, U II 可以促进肝星状细胞增殖, 促进肝星状细胞 I、III型胶原的合成以及 I、III型胶原和金属蛋白酶抑制物-1(tissue inhibitor of metalloproteinase 1, TIMP-1)mRNA表达. 提示U II 可直接促进肝星状细胞增殖, 促进胶原合成, 抑制胶原降解而加速肝脏纤维化^[35].

此外, U II 还参与神经系统^[36-38]和代谢^[39,40]功能的调节, 是否参与肝硬化门脉高压症的发病还有待研究.

2 U II 与肝硬化门脉高压症的研究

U II 参与心力衰竭、高血压、糖尿病、肾脏衰竭等多种疾病的发生发展^[41-43]. 近来研究发现U II 与肝硬化门脉高压症有一定关系^[6,44-47].

最初研究U II 与肝硬化门脉高压症的关系是从临床资料开始的. Heller等^[45]研究发现肝硬化患者血浆U II 水平明显高于健康对照组, 与门脉压力呈正相关. 肝静脉U II 水平明显高于门静脉, 提示肝硬化时U II 来源于肝细胞. Kemp等^[48]发现血浆U II 水平在肝硬化患者明显升高, 且血浆U II 升高的程度与门脉压力及疾病严重程度成正比(Child-Pugh分级). U II 基线的水平可以预测肝硬化并发症的发生, 如难治性腹水及患者的存活率.

近期研究发现对正常SD大鼠经微量泵持续注入U II 评估其对肝纤维化及门脉高压的作用, 研究分为正常组, U II 低剂量组, U II 高剂量组. 结果发现U II 可以剂量依赖性的增加门脉压力, U II 还可以促进肝脏羟脯氨酸、I型胶原及纤维化细胞因子, TGF β 1、结缔组织生长因子(connective tissue growth factor, CTGF)等的表达, 提示U II 通过调节内脏血管和体循环的血管舒缩, 而介导了肝硬化门脉高压时血流动力学的失调, 此外U II 还可以诱导纤维化细胞因子分泌而促进肝纤维化^[49]. 肝星状细胞在肝纤维化过程中起重要作用, 它的活化决定肝纤维化的形成、发展与转归, 是肝纤维化的关键环节^[50,51]. U II 是一种内源性丝裂原, 具有促增殖作用. 我们研究发现U II 可以促进肝星状细胞增殖, 增加胶原合成, 抑制胶原降解, 促进细胞外基质沉积, 而发挥促纤维化作用^[35].

上述资料提示U II 在肝硬化门脉高压症患者升高, U II 还可以通过其血管活性作用、丝裂原活性、纤维化作用加速肝硬化门脉高压血流动力学的失调并促进肝纤维化进程而参与肝硬化门脉高压的病理生理学改变.

2.1 U II/UT在肝硬化门脉高压症中的肝脏表达 关于U II/UT分布的一系列研究表明, U II 只有和UT受体结合, 才能完成其生物学效应, 因此检测正常肝组织和肝硬化肝组织U II/UT表达的变化, 能进一步阐明U II 在肝硬化门脉高压中的意义. Trebicka等^[52]研究发现胆管结扎的肝硬化大鼠其肝脏表达U II/UT较正常大鼠明显升高, 且UT在肝脏表达定位于动静脉及胆管的内皮细胞、库普弗细胞. 我们前期研究也发现肝硬化门脉高压患者肝脏U II/UT基因水平较正常对照

■研发前沿

目前U II/UT系统对门脉压力及纤维化程度的影响是研究的热点、重点, U II/UT系统有望成为肝硬化门脉高压治疗的新靶点.

■相关报道

Heller等研究发现肝硬化患者血浆U II水平明显高于健康对照组,与门脉压力呈正相关。肝静脉U II水平明显高于门静脉,提示肝硬化时U II来源于肝细胞。

人群明显升高,血U II水平也显著升高且与肝脏U II mRNA水平呈正相关。此外,肝脏UT蛋白表达也明显升高,肝脏库普弗细胞、肝窦内皮细胞表达UT^[6],而这些细胞在肝硬化门脉高压中发挥重要作用,U II/UT可能通过调节这些细胞而在肝硬化门脉高压中发挥重要作用。但Leifeld等^[53]研究肝硬化及暴发性肝炎患者中U II/UT表达时,发现U II/UT的表达在肝硬化肝组织和正常肝组织表达没有明显差异,这与Trebecka及我们的研究不一致,这种差异的可能与以下因素有关:(1)所选择患者不同;(2)U II是一自分泌和旁分泌物质^[54,55],推测U II分泌后马上降解;(3)方法和敏感度不同,我们分别用基因检测U II/UT的表达,免疫组织化学和免疫荧光双标方法检测UT的细胞定位,Western blot定量分析UT蛋白表达。(4)除了病因方面的不同,我们选择的患者均证实具有门脉高压的存在。

总之,目前研究提示肝硬化门脉高压时肝脏表达U II/UT明显升高,阻断U II/UT的作用有望成为治疗肝硬化门脉高压症的新靶点。

2.2 UT拮抗剂在肝硬化门脉高压中的研究 研究特异性受体拮抗剂在理解U II/UT的生理作用以及揭示其治疗潜力方面非常重要。如同血管紧张素 II (angiotensin II, Ang II)受体拮抗剂^[2,56-58]和内皮素受体拮抗剂^[31,59-63]能够用于门脉高压的治疗,尾加压素受体拮抗剂不久将可能为这种疾病治疗的提供另一种选择^[54]。

2002年, Behm等^[65,66]首先发现生长激素释放抑制因子(somatostatin, SST)拮抗剂SB-710411,在离体的大鼠主动脉,10 $\mu\text{mol/L}$ 的SB-710411能显著地抑制hU II引起的收缩反应,但却没有抑制Ang II、氯化钾、苯肾上腺素引起的收缩作用。随后Patacchini等^[67]又发现新的人类U II受体拮抗剂,命名为Urantide,在离体的大鼠主动脉研究中发现,其拮抗人类U II的作用是其其他任何化学物的50-100倍。该拮抗剂能与人类U II受体高选择性结合,极低水平时可能产生激动效能。Palosuran(ACT-058362)^[68]是一种新合成的非肽类U II受体拮抗剂,具有高度特异性,Clozel等证实其能以剂量依赖的方式抑制U II引起的兔主动脉环收缩,与人类U II受体的结合能力明显高于兔U II受体^[69,70]。

关于UT拮抗剂在肝硬化门脉高压症中的作用已成为国内外研究的热点。研究发现UT拮抗剂SB-710411预防给药可以改善CCl₄肝硬化大鼠模型的高动力循环状态,降低肝硬化大鼠

的肝纤维化评分、肝组织中羟脯氨酸含量、肝纤维化指标透明质酸和层粘连蛋白水平,下调大鼠肝脏的I型胶原、III型胶原以及TIMP-1 mRNA表达,从而改善肝脏纤维化^[35]。提示UT拮抗剂SB-710411可以预防肝纤维化,改善门脉高压的血流动力学紊乱,可用于预防肝硬化门脉高压的发生发展。Trebecka等^[52]研究Palosuran对胆管结扎肝硬化大鼠血流动力学的影响,结果发现Palosuran可以增加内脏血管阻力,降低门脉血流,而降低门脉压力,其机制与上调肠系膜血管RhoA/Rho-kinase,增加Rho-kinase活性,降低一氧化氮/环磷酸鸟苷(nitric oxide/cyclic guanosine monophosphate, NO/cGMP)信号通路,导致血管收缩有关。此外Palosuran可以增加胆管结扎肝硬化大鼠的肾小球率过滤,促进水钠排泄。有研究发现Urantide对心肌缺血具有保护作用^[71],但目前尚无Urantide与肝硬化门脉高压的研究报道。

近来肝硬化门脉高压的治疗取得了重大进展,但目前尚无有效的治疗肝硬化门脉高压的药物,上述研究提示UT拮抗剂可以降低肝硬化门脉高压症的门脉压力,降低纤维化指标,并促进水钠排泄,因而在肝硬化门脉高压症方面具有潜在治疗作用。

3 结论

肝硬化门脉高压症时U II/UT水平表达增加,U II可加速肝硬化门脉高压血流动力学的失调并促进肝纤维化进程。随着研究的深入,UT拮抗剂可能成为防治肝硬化门脉高压症的重要治疗工具,尤其是Palosuran作为一种新合成的特异性高、与人类UT结合能力强的非肽类化合物,理化特性稳定,用药途径简单,且已在二期临床用于治疗糖尿病、肾病,安全性高,可用来进一步研究U II的生理病理特性,并为肝硬化门脉高压症的药物治疗提供新的思路。

4 参考文献

- 1 Cichoz-Lach H, Celiński K, Słomka M, Kasztelan-Szczerbińska B. Pathophysiology of portal hypertension. *J Physiol Pharmacol* 2008; 59 Suppl 2: 231-238
- 2 Bonis PA, Friedman SL, Kaplan MM. Is liver fibrosis reversible? *N Engl J Med* 2001; 344: 452-454
- 3 Gatta A, Bolognesi M, Merkel C. Vasoactive factors and hemodynamic mechanisms in the pathophysiology of portal hypertension in cirrhosis. *Mol Aspects Med* 2008; 29: 119-129
- 4 Newby DE, Jalan R. Urotensin ii: better than somatostatin for portal hypertension? *Hepatology* 2000; 31: 1201-1202
- 5 Ames RS, Sarau HM, Chambers JK, Willette RN,

- Aiyar NV, Romanic AM, Loudon CS, Foley JJ, Sauermelch CF, Coatney RW, Ao Z, Disa J, Holmes SD, Stadel JM, Martin JD, Liu WS, Glover GI, Wilson S, McNulty DE, Ellis CE, Elshourbagy NA, Shabon U, Trill JJ, Hay DW, Ohlstein EH, Bergsma DJ, Douglas SA. Human urotensin-II is a potent vasoconstrictor and agonist for the orphan receptor GPR14. *Nature* 1999; 401: 282-286
- 6 Liu D, Chen J, Wang J, Zhang Z, Ma X, Jia J, Wang Y. Increased expression of urotensin II and GPR14 in patients with cirrhosis and portal hypertension. *Int J Mol Med* 2010; 25: 845-851
- 7 Bern HA, Pearson D, Larson BA, Nishioka RS. Neurohormones from fish tails: the caudal neurosecretory system. I. "Urophysiology" and the caudal neurosecretory system of fishes. *Recent Prog Horm Res* 1985; 41: 533-552
- 8 Ong KL, Lam KS, Cheung BM. Urotensin II: its function in health and its role in disease. *Cardiovasc Drugs Ther* 2005; 19: 65-75
- 9 Gardiner SM, March JE, Kemp PA, Davenport AP, Bennett T. Depressor and regionally-selective vasodilator effects of human and rat urotensin II in conscious rats. *Br J Pharmacol* 2001; 132: 1625-1629
- 10 Nothacker HP, Wang Z, McNeill AM, Saito Y, Merten S, O'Dowd B, Duckles SP, Civelli O. Identification of the natural ligand of an orphan G-protein-coupled receptor involved in the regulation of vasoconstriction. *Nat Cell Biol* 1999; 1: 383-385
- 11 Gardiner SM, March JE, Kemp PA, Maguire JJ, Kuc RE, Davenport AP, Bennett T. Regional heterogeneity in the haemodynamic responses to urotensin II infusion in relation to UT receptor localisation. *Br J Pharmacol* 2006; 147: 612-621
- 12 Kemp W, Roberts S, Krum H. Urotensin II: a vascular mediator in health and disease. *Curr Vasc Pharmacol* 2005; 3: 159-168
- 13 Vaudry H, Do Rego JC, Le Mevel JC, Chatenet D, Tostivint H, Fournier A, Tonon MC, Pelletier G, Conlon JM, Leprince J. Urotensin II, from fish to human. *Ann N Y Acad Sci* 2010; 1200: 53-66
- 14 Ross B, McKendry K, Giaid A. Role of urotensin II in health and disease. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2010; 298: R1156-R1172
- 15 Hirose T, Takahashi K, Mori N, Nakayama T, Kikuya M, Ohkubo T, Kohzuki M, Totsune K, Imai Y. Increased expression of urotensin II, urotensin II-related peptide and urotensin II receptor mRNAs in the cardiovascular organs of hypertensive rats: comparison with endothelin-1. *Peptides* 2009; 30: 1124-1129
- 16 Leonard AD, Thompson JP, Hutchinson EL, Young SP, McDonald J, Swanevelder J, Lambert DG. Urotensin II receptor expression in human right atrium and aorta: effects of ischaemic heart disease. *Br J Anaesth* 2009; 102: 477-484
- 17 Chen YH, Yandle TG, Richards AM, Palmer SC. Urotensin II immunoreactivity in the human circulation: evidence for widespread tissue release. *Clin Chem* 2009; 55: 2040-2048
- 18 Hirose T, Mori N, Totsune K, Morimoto R, Maejima T, Kawamura T, Metoki H, Asayama K, Kikuya M, Ohkubo T, Kohzuki M, Takahashi K, Imai Y. Gene expression of (pro)renin receptor is upregulated in hearts and kidneys of rats with congestive heart failure. *Peptides* 2009; 30: 2316-2322
- 19 Tian L, Li C, Qi J, Fu P, Yu X, Li X, Cai L. Diabetes-induced upregulation of urotensin II and its receptor plays an important role in TGF-beta1-mediated renal fibrosis and dysfunction. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2008; 295: E1234-E1242
- 20 Dai HY, Guo XG, Ge ZM, Li ZH, Yu XJ, Tang MX, Zhang Y. Elevated expression of urotensin II and its receptor in diabetic cardiomyopathy. *J Diabetes Complications* 2008; 22: 137-143
- 21 Takahashi K, Hirose T, Mori N, Morimoto R, Kohzuki M, Imai Y, Totsune K. The renin-angiotensin system, adrenomedullins and urotensin II in the kidney: possible renoprotection via the kidney peptide systems. *Peptides* 2009; 30: 1575-1585
- 22 Mosenkis A, Kallem RR, Danoff TM, Aiyar N, Bazley J, Townsend RR. Renal impairment, hypertension and plasma urotensin II. *Nephrol Dial Transplant* 2010 Jul 9. [Epub ahead of print]
- 23 Watanabe T, Kanome T, Miyazaki A, Katagiri T. Human urotensin II as a link between hypertension and coronary artery disease. *Hypertens Res* 2006; 29: 375-387
- 24 Zhu YC, Zhu YZ, Moore PK. The role of urotensin II in cardiovascular and renal physiology and diseases. *Br J Pharmacol* 2006; 148: 884-901
- 25 Bottrill FE, Douglas SA, Hiley CR, White R. Human urotensin-II is an endothelium-dependent vasodilator in rat small arteries. *Br J Pharmacol* 2000; 130: 1865-1870
- 26 Stirrat A, Gallagher M, Douglas SA, Ohlstein EH, Berry C, Kirk A, Richardson M, MacLean MR. Potent vasodilator responses to human urotensin-II in human pulmonary and abdominal resistance arteries. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001; 280: H925-H928
- 27 Shah V, Toruner M, Haddad F, Cadelina G, Papapetropoulos A, Choo K, Sessa WC, Groszmann RJ. Impaired endothelial nitric oxide synthase activity associated with enhanced caveolin binding in experimental cirrhosis in the rat. *Gastroenterology* 1999; 117: 1222-1228
- 28 Lee JS, Semela D, Iredale J, Shah VH. Sinusoidal remodeling and angiogenesis: a new function for the liver-specific pericyte? *Hepatology* 2007; 45: 817-825
- 29 Povero D, Busletta C, Novo E, di Bonzo LV, Cannito S, Paternostro C, Parola M. Liver fibrosis: a dynamic and potentially reversible process. *Histol Histopathol* 2010; 25: 1075-1091
- 30 Manning DS, Afdhal NH. Diagnosis and quantitation of fibrosis. *Gastroenterology* 2008; 134: 1670-1681
- 31 Laleman W. Role of vasoactive substances and cellular effectors in the pathophysiology of cirrhotic portal hypertension: the past, the present and the future--Georges Brohée Lecture. *Acta Gastroenterol Belg* 2009; 72: 9-16
- 32 Zhang YG, Li YG, Liu BG, Wei RH, Wang DM, Tan XR, Bu DF, Pang YZ, Tang CS. Urotensin II accelerates cardiac fibrosis and hypertrophy of rats induced by isoproterenol. *Acta Pharmacol Sin* 2007; 28: 36-43
- 33 Watanabe T, Miyazaki A. New Frontiers in Life-style-Related Diseases. In: Miyazaki A, Imawari M, Eds. Roles of Vasoactive Agents in Macrophage Foam Cell Formation and Atherosclerosis. 1st Edition. Japan: Springer Japan, 2008: 89-96
- 34 Gruson D, Ginion A, Decroly N, Lause P, Vanoverschelde JL, Ketelslegers JM, Bertrand L, Thissen JP. Urotensin II induction of adult cardiomyocytes hypertrophy involves the Akt/GSK-3beta signaling

■创新盘点

U II /UT系统与肝硬化门脉高压的关系是国外研究的热点,但国内文献报道较少,且未有人进行详细总结.本文对其研究进展进行详细总结,并结合本实验室的研究成果,对读者可以起到很好的参考作用.

■应用要点

U II/UT与肝硬化门脉高压症密切相关。在肝硬化门脉高压中发挥重要作用, UT拮抗剂可能成为防治肝硬化门脉高压症的重要治疗工具, 为肝硬化门脉高压症的药物治疗提供新的思路。

- 35 Liu DG, Wang J, Zhang ZT, Wang Y. The urotensin II antagonist SB-710411 arrests fibrosis in CCL4cirrhotic rats. *Mol Med Rep* 2009; 2: 953-961
- 36 Douglas SA. Human urotensin-II as a novel cardiovascular target: 'heart' of the matter or simply a fishy 'tail'? *Curr Opin Pharmacol* 2003; 3: 159-167
- 37 Matsumoto Y, Abe M, Watanabe T, Adachi Y, Yano T, Takahashi H, Sugo T, Mori M, Kitada C, Kurokawa T, Fujino M. Intracerebroventricular administration of urotensin II promotes anxiogenic-like behaviors in rodents. *Neurosci Lett* 2004; 358: 99-102
- 38 Hunt BD, Ng LL, Lambert DG. A rat brain atlas of urotensin-II receptor expression and a review of central urotensin-II effects. *Naunyn Schmiedeberg Arch Pharmacol* 2010; 382: 1-31
- 39 Suguro T, Watanabe T, Ban Y, Kodate S, Misaki A, Hirano T, Miyazaki A, Adachi M. Increased human urotensin II levels are correlated with carotid atherosclerosis in essential hypertension. *Am J Hypertens* 2007; 20: 211-217
- 40 Bousette N, Patel L, Douglas SA, Ohlstein EH, Gaiad A. Increased expression of urotensin II and its cognate receptor GPR14 in atherosclerotic lesions of the human aorta. *Atherosclerosis* 2004; 176: 117-123
- 41 Kemp W, Roberts S, Krum H. Increased circulating urotensin II in cirrhosis: potential implications in liver disease. *Peptides* 2008; 29: 868-872
- 42 McDonald J, Batuwangala M, Lambert DG. Role of urotensin II and its receptor in health and disease. *J Anesth* 2007; 21: 378-389
- 43 Suguro T, Watanabe T, Kodate S, Xu G, Hirano T, Adachi M, Miyazaki A. Increased plasma urotensin-II levels are associated with diabetic retinopathy and carotid atherosclerosis in Type 2 diabetes. *Clin Sci (Lond)* 2008; 115: 327-334
- 44 Charles CJ, Rademaker MT, Richards AM, Yandle TG. Urotensin II: evidence for cardiac, hepatic and renal production. *Peptides* 2005; 26: 2211-2214
- 45 Heller J, Schepke M, Neef M, Woitas R, Rabe C, Sauerbruch T. Increased urotensin II plasma levels in patients with cirrhosis and portal hypertension. *J Hepatol* 2002; 37: 767-772
- 46 Kemp W, Roberts S, Komesaroff PA, Zomer E, Krum H. Urotensin II in chronic liver disease: in vivo effect on vascular tone. *Scand J Gastroenterol* 2008; 43: 103-109
- 47 Hennenberg M, Trebicka J, Sauerbruch T, Heller J. Mechanisms of extrahepatic vasodilation in portal hypertension. *Gut* 2008; 57: 1300-1314
- 48 Kemp W, Krum H, Colman J, Bailey M, Yandle T, Richards M, Roberts S. Urotensin II: a novel vasoactive mediator linked to chronic liver disease and portal hypertension. *Liver Int* 2007; 27: 1232-1239
- 49 Kemp W, Kompa A, Phrommintikul A, Herath C, Zhiyuan J, Angus P, McLean C, Roberts S, Krum H. Urotensin II modulates hepatic fibrosis and portal hemodynamic alterations in rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2009; 297: G762-G767
- 50 Tacke F, Weiskirchen R. [Liver fibrosis - pathogenesis and novel therapeutic approaches] *Internist (Berl)* 2010; 51: 21-29
- 51 Wynn TA. Cellular and molecular mechanisms of fibrosis. *J Pathol* 2008; 214: 199-210
- 52 Trebicka J, Leifeld L, Hennenberg M, Biecker E, Eckhardt A, Fischer N, Pröbsting AS, Clemens C, Lammert F, Sauerbruch T, Heller J. Hemodynamic effects of urotensin II and its specific receptor antagonist palosuran in cirrhotic rats. *Hepatology* 2008; 47: 1264-1276
- 53 Leifeld L, Clemens C, Heller J, Trebicka J, Sauerbruch T, Spengler U. Expression of urotensin II and its receptor in human liver cirrhosis and fulminant hepatic failure. *Dig Dis Sci* 2010; 55: 1458-1464
- 54 Matsushita M, Shichiri M, Fukai N, Ozawa N, Yoshimoto T, Takasu N, Hirata Y. Urotensin II is an autocrine/paracrine growth factor for the porcine renal epithelial cell line, LLCPK1. *Endocrinology* 2003; 144: 1825-1831
- 55 Zhang Y, Li Y, Wei R, Wang Z, Bu D, Zhao J, Pang Y, Tang C. Urotensin II is an autocrine/paracrine growth factor for aortic adventitia of rat. *Regul Pept* 2008; 151: 88-94
- 56 Wagatsuma Y, Naritaka Y, Shimakawa T, Kanako H, Keiichi I, Shunichi S, Konno S, Katsube T, Ogawa K. Clinical usefulness of the angiotensin II receptor antagonist losartan in patients with portal hypertensive gastropathy. *Hepatogastroenterology* 2006; 53: 171-174
- 57 Lubel JS, Herath CB, Burrell LM, Angus PW. Liver disease and the renin-angiotensin system: recent discoveries and clinical implications. *J Gastroenterol Hepatol* 2008; 23: 1327-1338
- 58 Bataller R, Sancho-Bru P, Ginès P, Brenner DA. Liver fibrogenesis: a new role for the renin-angiotensin system. *Antioxid Redox Signal* 2005; 7: 1346-1355
- 59 Reichen J, Lebrech D. The future treatment of portal hypertension. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2007; 21: 191-202
- 60 顾杰, 洪嘉禾, 徐列明. 内皮素在门脉高压症中的作用研究进展. *临床肝胆病杂志* 2006; 22: 306-308
- 61 Urbanowicz W, Sogni P, Moreau R, Tazi KA, Barriere E, Poirel O, Martin A, Guimont MC, Cazals-Hatem D, Lebrech D. Tezosentan, an endothelin receptor antagonist, limits liver injury in endotoxin challenged cirrhotic rats. *Gut* 2004; 53: 1844-1849
- 62 Feng HQ, Weymouth ND, Rockey DC. Endothelin antagonism in portal hypertensive mice: implications for endothelin receptor-specific signaling in liver disease. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2009; 297: G27-G33
- 63 Debernardi-Venon W, Martini S, Biasi F, Vizio B, Termine A, Poli G, Brunello F, Alessandria C, Bonardi R, Saracco G, Rizzetto M, Marzano A. AT1 receptor antagonist Candesartan in selected cirrhotic patients: effect on portal pressure and liver fibrosis markers. *J Hepatol* 2007; 46: 1026-1033
- 64 Krum H, Kemp W. Therapeutic potential of blockade of the urotensin II system in systemic hypertension. *Curr Hypertens Rep* 2007; 9: 53-58
- 65 Behm DJ, Herold CL, Ohlstein EH, Knight SD, Dhanak D, Douglas SA. Pharmacological characterization of SB-710411 (Cpa-c[D-Cys-Pal-D-Trp-Lys-Val-Cys]-Cpa-amide), a novel peptidic urotensin-II receptor antagonist. *Br J Pharmacol* 2002; 137: 449-458
- 66 Behm DJ, Ao Z, Camarda V, Aiyar NV, Johns DG, Douglas SA. Inhibitory effects of putative peptidic urotensin-II receptor antagonists on urotensin-II-induced contraction of cat isolated respiratory smooth muscle. *Eur J Pharmacol* 2005; 516: 276-281
- 67 Patacchini R, Santicoli P, Giuliani S, Grieco P, Novellino E, Rovero P, Maggi CA. Urantide: an ultrapotent urotensin II antagonist peptide in the rat aorta. *Br J Pharmacol* 2003; 140: 1155-1158
- 68 Carotenuto A, Grieco P, Rovero P, Novellino E.

- Urotensin-II receptor antagonists. *Curr Med Chem* 2006; 13: 267-275
- 69 Clozel M, Binkert C, Birker-Robaczewska M, Boukhadra C, Ding SS, Fischli W, Hess P, Mathys B, Morrison K, Müller C, Müller C, Nayler O, Qiu C, Rey M, Scherz MW, Velker J, Weller T, Xi JF, Ziltener P. Pharmacology of the urotensin-II receptor antagonist palosuran (ACT-058362; 1-[2-(4-benzyl-4-hydroxy-piperidin-1-yl)-ethyl]-3-(2-methyl-quinolin-4-yl)-urea sulfate salt): first demonstration of a pathophysiological role of the urotensin System. *J Pharmacol Exp Ther* 2004; 311: 204-212
- 70 Sidharta PN, van Giersbergen PL, Dingemanse J. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of the urotensin-II receptor antagonist palosuran in healthy male subjects. *J Clin Pharmacol* 2009; 49: 1168-1175
- 71 Yao H, Chen ZW. [Protective effect of urantide against myocardial ischemia injury] *Yaoxue Xuebao* 2008; 43: 150-156

■同行评价
本文选题恰当, 新颖性较好, 具有一定的参考作用.

编辑 曹丽鸥 电编 何基才

ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) CN 14-1260/R 2010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)所有作者均审读过该文并同意发表, 所有作者均符合作者条件, 所有作者均同意该文代表其真实研究成果, 保证文责自负; (4)列出通讯作者的姓名、地址、电话、传真和电子邮件; 通讯作者应负责与其他作者联系, 修改并最终审核复核稿; (5)列出作者贡献分布; (6)来稿应附有作者工作单位的推荐信, 保证无泄密, 如果是几个单位合作的论文, 则需要提供所有参与单位的推荐信; (7)愿将印刷版和电子版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.

强力霉素与碘油栓塞对兔VX2肝种植瘤VEGF、MMP-2表达的影响

郑石磊, 张祥林, 董福仁, 雷振, 王刚, 李国策, 徐娜

■背景资料

经导管肝动脉化疗栓塞术(TACE)是治疗不能手术切除原发性肝癌及转移性肝癌的主要手段之一,但由于术后肿瘤血管新生等原因,残存肿瘤细胞得以继续生长或转移,其远期疗效尚不理想。因此,TACE联合抗肿瘤新生血管生成将成为治疗肝癌的重要手段。

郑石磊, 辽宁医学院 辽宁省锦州市 121000

张祥林, 董福仁, 雷振, 王刚, 李国策, 徐娜, 辽宁医学院附属第一医院放射科 辽宁省锦州市 121000

作者贡献分布: 郑石磊与张祥林对此文所作贡献均等; 此课题由郑石磊、雷振及王刚设计; 研究过程由郑石磊、张祥林、董福仁、王刚、李国策及徐娜完成; 数据分析由郑石磊完成; 论文写作由郑石磊完成。

通讯作者: 张祥林, 教授, 主任医师, 硕士生导师, 121000, 辽宁省锦州市, 辽宁医学院附属第一医院放射科。

zhangxianglinjr1030@126.com

收稿日期: 2010-08-05 修回日期: 2010-09-15

接受日期: 2010-09-23 在线出版日期: 2010-11-08

Transcatheter arterial embolization with doxycycline and lipiodol down-regulates VEGF and MMP-2 expression in implanted hepatic VX2 tumors in rabbits

Shi-Lei Zheng, Xiang-Lin Zhang, Fu-Ren Dong, Zhen Lei, Gang Wang, Guo-Ce Li, Na Xu

Shi-Lei Zheng, Liaoning Medical University, Jinzhou 121000, Liaoning Province, China

Xiang-Lin Zhang, Fu-Ren Dong, Zhen Lei, Gang Wang, Guo-Ce Li, Na Xu, Department of Radiology, the First Affiliated Hospital of Liaoning Medical University, Jinzhou 121000, Liaoning Province, China

Correspondence to: Professor Xiang-Lin Zhang, Department of Radiology, the First Affiliated Hospital of Liaoning Medical University, Jinzhou 121000, Liaoning Province, China. zhangxianglinjr1030@126.com

Received: 2010-08-05 Revised: 2010-09-15

Accepted: 2010-09-23 Published online: 2010-11-08

Abstract

AIM: To investigate the effect of transcatheter arterial embolization with doxycycline and lipiodol on tumor growth and the expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and matrix metalloproteinases-2 (MMP-2) in hepatic tumors.

METHODS: VX2 carcinoma was implanted in the left lobe of the liver of rabbits. Two weeks later, 32 tumor-bearing rabbits were randomly and equally divided into four groups: normal saline group, lipiodol group, adriamycin plus

lipiodol group, and doxycycline plus lipiodol group. Tumor size was measured by CT to calculate tumor growth rate. Tumor necrosis rate was assessed pathologically. The expression levels of VEGF and MMP-2 in tumors were examined by immunohistochemistry. The staining intensity of VEGF and MMP-2 was evaluated with a computer-assisted image analyzer.

RESULTS: One week after treatment, the growth of tumors was significantly suppressed in the lipiodol group, adriamycin plus lipiodol group, and doxycycline plus lipiodol group compared with the normal saline group ($136.4\% \pm 42.8\%$, $125.8\% \pm 30.8\%$, $116.7\% \pm 25.2\%$ vs $325.3\% \pm 75.0\%$, all $P < 0.05$). Tumor necrosis rate was significantly higher in the doxycycline plus lipiodol group than in the lipiodol group and adriamycin plus lipiodol group ($84.5\% \pm 5.2\%$ vs $67.3\% \pm 8.5\%$, $71.4\% \pm 7.6\%$, both $P < 0.05$). The expression of VEGF was significantly up-regulated in the lipiodol group and adriamycin plus lipiodol group compared with the normal saline group (0.164 ± 0.021 , 0.162 ± 0.021 vs 0.141 ± 0.018 , both $P < 0.05$). MMP-2 was slightly up-regulated in the lipiodol group and adriamycin plus lipiodol group compared with the normal saline group (both $P > 0.05$). The expression levels of VEGF and MMP-2 were significantly lower in the doxycycline plus lipiodol group than in the normal saline group (0.121 ± 0.019 vs 0.141 ± 0.018 ; 0.135 ± 0.027 vs 0.158 ± 0.016 , both $P < 0.05$). There is a positive correlation between the expression of MMP-2 and VEGF.

CONCLUSION: Transcatheter arterial embolization with doxycycline and lipiodol can suppress tumor growth, increase tumor necrosis, and decrease VEGF and MMP-2 expression in implanted hepatic VX2 tumors in rabbits.

Key Words: Doxycycline; Implanted hepatic VX2 tumor; Transcatheter arterial chemoembolization; Animal experiment

Zheng SL, Zhang XL, Dong FR, Lei Z, Wang G, Li GC, Xu

■同行评议者

戴朝六, 教授, 中国医科大学第二临床学院(盛京医院)肝胆外科

N. Transcatheter arterial embolization with doxycycline and lipiodol down-regulates VEGF and MMP-2 expression in implanted hepatic VX2 tumors in rabbits. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2010; 18(31): 3338-3342

摘要

目的: 观察经肝动脉强力霉素与碘油栓塞对兔VX2肝种植瘤生长、血管内皮生长因子(VEGF)及基质金属蛋白酶-2(MMP-2)表达的影响。

方法: 32只日本大耳白兔肝VX2瘤种植后2 wk, 随机分为4组: 生理盐水组(A组)、碘化油栓塞组(B组)、阿霉素+碘化油组(C组)及强力霉素+碘化油组(D组)。治疗1 wk后, 采用CT检测肿瘤大小, 计算肿瘤的生长率, 病理观察肿瘤坏死率, 免疫组织化学方法测定瘤区的VEGF及MMP-2表达强度, 免疫组织化学分析采用计算机图像分析系统。

结果: 治疗1 wk后, 各栓塞治疗组肿瘤生长受到明显抑制($136.4\% \pm 42.8\%$, $125.8\% \pm 30.8\%$, $116.7\% \pm 25.2\%$ vs $325.3\% \pm 75.0\%$, 均 $P < 0.05$), 组间差异无统计学意义($P > 0.05$); D组肿瘤坏死率大于B、C组($84.5\% \pm 5.2\%$ vs $67.3\% \pm 8.5\%$, $71.4\% \pm 7.6\%$, 均 $P < 0.05$)。B、C组残余肿瘤区的VEGF表达升高, 高于A组(0.164 ± 0.021 , 0.162 ± 0.021 vs 0.141 ± 0.018 , 均 $P < 0.05$); B、C组残留区MMP-2表达强度与A组相比统计学无显著性意义。D组肿瘤残留区的VEGF及MMP-2表达与A组相比均减弱(0.121 ± 0.019 vs 0.141 ± 0.018 ; 0.135 ± 0.027 vs 0.158 ± 0.016 , 均 $P < 0.05$), 且VEGF与MMP-2表达强度之间存在正相关($P < 0.05$)。

结论: 强力霉素与碘油栓塞可抑制肿瘤生长, 增加肿瘤的坏死率, 降低栓塞后残留的VEGF及MMP-2表达。

关键词: 强力霉素; VX2肝种植瘤; 经肝动脉化疗栓塞; 动物实验

郑石磊, 张祥林, 董福仁, 雷振, 王刚, 李国策, 徐娜. 强力霉素与碘油栓塞对兔VX2肝种植瘤VEGF、MMP-2表达的影响. 世界华人消化杂志 2010; 18(31): 3338-3342
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/3338.asp>

0 引言

强力霉素(又称多西环素, doxycycline, DOXY)是一种经过特殊化学修饰的四环素, 细胞培养及一些体内实验证实, 其对某些实体肿瘤也有一定的抑制效应, DOXY能选择性地诱导肿瘤细

胞凋亡, 同时具有降低肿瘤细胞血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)及基质金属蛋白酶2(matrix metalloproteinases 2, MMP-2)表达的作用。经导管肝动脉化疗栓塞术(transcatheter arterial chemoembolization, TACE)是目前非手术治疗肝癌的首选方法, 但TACE的远期疗效并不令人满意, 术后肿瘤新生血管形成是影响TACE疗效的重要因素, 肝癌的生长、转移及癌栓形成与MMP-2及VEGF有密切关系, 该实验旨在观察栓塞后肿瘤坏死程度, 残存肿瘤区MMP-2、VEGF的表达及DOXY对其作用的影响, 为DOXY进一步的临床应用提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 材料 超液态碘化油(含碘38%, 法国Guerbet公司); 盐酸阿霉素(ADM, 浙江海正药业); DOXY(上海源叶生物科技有限公司); 碘普罗胺(iopromide, 300 g/L, 德国拜耳公司); 兔VX2瘤株由辽宁医学院附属第一医院放射线科雷振教授惠赠。VEGF、MMP-2抗体, 即用型SABC免疫组织化学染色试剂盒, 均购自北京博奥森生物技术有限公司。仪器: GE Lightspeed 16 CT机, Siemens AX10-M Artis dTA DSA。

1.2 方法

1.2.1 兔VX2肝种植瘤模型的建立: 由辽宁医学院实验动物中心提供健康的日本大耳白兔33只, 体重2.5-3.5 kg, 雌雄不限, 取1只做传代兔。将VX2冻存块缓慢解冻至室温, 剪碎加适量生理盐水制成悬液, 注射于传代兔后腿内侧肌肉, 2 wk后可扣及实性包块, 剥离瘤块取生长活跃的瘤组织剪成每块约1-2 mm³置于生理盐水中备用, 各实验兔麻醉后, 开腹直视下暴露肝左叶, 以5F导管鞘刺破肝包膜约5 mm, 用其内芯推入瘤块3-5个, 以明胶海绵封堵穿刺通道, 观察穿刺道无出血后回纳肝脏, 缝合上腹切口。

1.2.2 分组及处理: 随机将实验动物分为A、B、C、D 4组, 每组8只, 于植入肿瘤后2 wk, 荷瘤兔麻醉后仰卧位固定, 兔右侧股动脉根部搏动处皮肤常规脱毛消毒, 切开皮肤钝性分离暴露股动脉, 采用3F SP导管经股动脉插至腹腔动脉, 手推60%碘普罗胺5 mL行腹腔动脉造影, 明确肝动脉走行, 并超选择至肝左动脉, A组: 生理盐水组, 经导管缓慢注入10 mL生理盐水; B组: 碘化油栓塞组, 0.3 mL/kg超液态碘化油经导管缓慢注入, 术中严密观察碘油沉积情况, 生理盐水冲刷导管后撤出导管; C组: 阿霉素+碘化油栓塞

■ 研发前沿

随着人们对强力霉素药理作用认识的深入, 发现其还具有抑制肿瘤细胞生长及转移的作用, 可能作为TACE的辅助治疗, 但具体作用机制尚不十分清楚。

■创新盘点

强力霉素抑制肿瘤细胞生长、侵袭的研究多为体外研究,本实验在体研究了强力霉素联合碘油栓塞对兔VX2肝种植瘤VEGF、MMP-2表达的影响,强力霉素经肝动脉给药方式治疗肝癌未见相关报道。

表 1 家兔经肝动脉治疗后1 wk各组体质量、肿瘤生长率及坏死率 (mean ± SD)

分组	体质量(kg)		肿瘤体积(cm ³)		生长率(%)	坏死率(%)
	治疗前	治疗后	治疗前	治疗后		
A组	2.85 ± 0.22	2.72 ± 0.21	1.25 ± 0.32	3.65 ± 0.55 ^c	325.3 ± 75.0 ^c	50.2 ± 9.8 ^c
B组	2.84 ± 0.20	2.61 ± 0.21	1.27 ± 0.30	1.70 ± 0.37	136.4 ± 42.8	67.3 ± 8.5
C组	2.83 ± 0.19	2.57 ± 0.20	1.32 ± 0.37	1.74 ± 0.35 ^a	125.8 ± 30.8 ^a	71.4 ± 7.6 ^a
D组	2.86 ± 0.20	2.60 ± 0.19	1.28 ± 0.43	1.63 ± 0.33 ^a	116.7 ± 25.2 ^a	84.5 ± 5.2 ^{ac}

^a*P*<0.05 vs A组; ^c*P*<0.05 vs B组。

组: 0.3 mL/kg超液态碘化油与2 mg/kg ADM采用“泵法”反复混合后制成乳剂,经导管缓慢注入; D组: DOXY+碘化油组: 0.3 mL/kg超液态碘化油与3 mg/kg DOXY, 剂量选择参照甘萍等^[1]的实验研究计算,其混合及注药方法同C组。

1.2.3 观测指标及方法: (1)治疗前及治疗后1 wk, 测量家兔体质量; (2)CT观察肿瘤大小, 测量肿瘤的长、短径, 肿瘤的体积(*V*) = 1/2 × *a* × *b*² (*a*为最大径, *b*为最小径), 肿瘤生长率(growth rate, GR) = (*V*_{治疗后}/*V*_{治疗前} - 1) × 100%; (3)CT检查结束后取肿瘤组织标本, 常规HE染色, 测定肿瘤坏死率, 肿瘤坏死率 = 坏死区面积(cm²)/肿瘤面积(cm²) × 100%; (4)VEGF、MMP-2免疫组织化学检测, VEGF阳性表达表现为肿瘤细胞胞质内的棕黄色颗粒状染色区, 其判定标准参照吴文娟等^[2]报道的方法, VEGF表达强度采用光密度值表示, 根据多个光密度值计算得出平均光密度值, 并计算标准差。切片厚度、染色及图像采集条件一致。免疫组织化学分析采用CIAS-1000型细胞图像分析系统。MMP-2阳性表达为肿瘤细胞胞质及间质组织内的棕黄色颗粒状染色区, 分析方法同VEGF。免疫组织化学染色采用SP法, 具体步骤参考说明书进行, 以PBS缓冲液替代一抗作为空白对照。

统计学处理 计量资料表达均采用mean ± SD, 组间比较采用单因素方差分析。两个变量间是否存在相关, 采用双变量相关分析。统计学分析使用SPSS16.0统计软件, *P*<0.05差异有显著性意义。

2 结果

2.1 体质量、肿瘤生长率及坏死率 治疗后, 各组动物体质量均有轻度下降, 组间差异无显著性意义。CT观察肿瘤大小及各碘油栓塞组的碘油沉积情况, 经栓塞治疗后肿瘤大小均有不同程度抑制, B、C、D 3组间差异无显著性意义, A组肿瘤呈几何级数增长。D组肿瘤坏死率高于其他

表 2 家兔肿瘤经肝动脉治疗后1 wk各组VEGF及MMP-2的表达强度

分组	VEGF	MMP-2	<i>t</i> 值	<i>P</i> 值
A组	0.141 ± 0.018 ^c	0.158 ± 0.016	0.896	0.003
B组	0.164 ± 0.021	0.161 ± 0.017	0.821	0.013
C组	0.162 ± 0.021 ^a	0.161 ± 0.019	0.857	0.006
D组	0.121 ± 0.019 ^{ac}	0.135 ± 0.027 ^{ac}	0.804	0.016

^a*P*<0.05 vs A组; ^c*P*<0.05 vs B组。

3组, 差异有显著性意义(表1)。

2.2 肿瘤区VEGF及MMP-2表达 VEGF呈弥漫性或集中表达于几个瘤巢中, 在靠近肿瘤边缘区域及坏死组织周围的癌巢中表达较强, B、C组的VEGF表达强度最高; MMP-2表达主要定位于癌细胞胞质和部分间质组织内, 靠近窦汇区的癌细胞表达明显。A、B、C组残余肿瘤MMP-2表达统计学无显著性意义, D组VEGF及MMP-2表达均减弱(图1), 统计学有显著性差异。VEGF与MMP-2表达强度之间存在正相关(表2)。

3 讨论

随着人们对DOXY药理作用认识的深入, 发现其尚具有多种非抗生素特性, 如免疫抑制、抗肿瘤、清除氧自由基等。近年来研究表明, DOXY能通过上调Fas/FasL途径^[3]及P53依赖途径^[4], 抑制VEGF^[5]、MMP-2、9及血管生成拟态结构^[6], 还可通过线粒体依赖途径诱导细胞凋亡, 从而杀伤多种肿瘤, 并能起到抑制肿瘤细胞复发、生长及转移的作用, 如前列腺癌、肝癌、血液系统肿瘤、淋巴瘤、乳腺癌及其骨转移瘤等, 且抗肿瘤效应具有时间及浓度依赖性。

TACE是非手术治疗中晚期肝癌及转移性肝癌的主要手段之一^[7], 通过选择性阻断肝癌的动脉血供而发挥栓塞化疗抗癌作用, 据统计近期有效率达30%-70%, 但有前瞻性对照研究

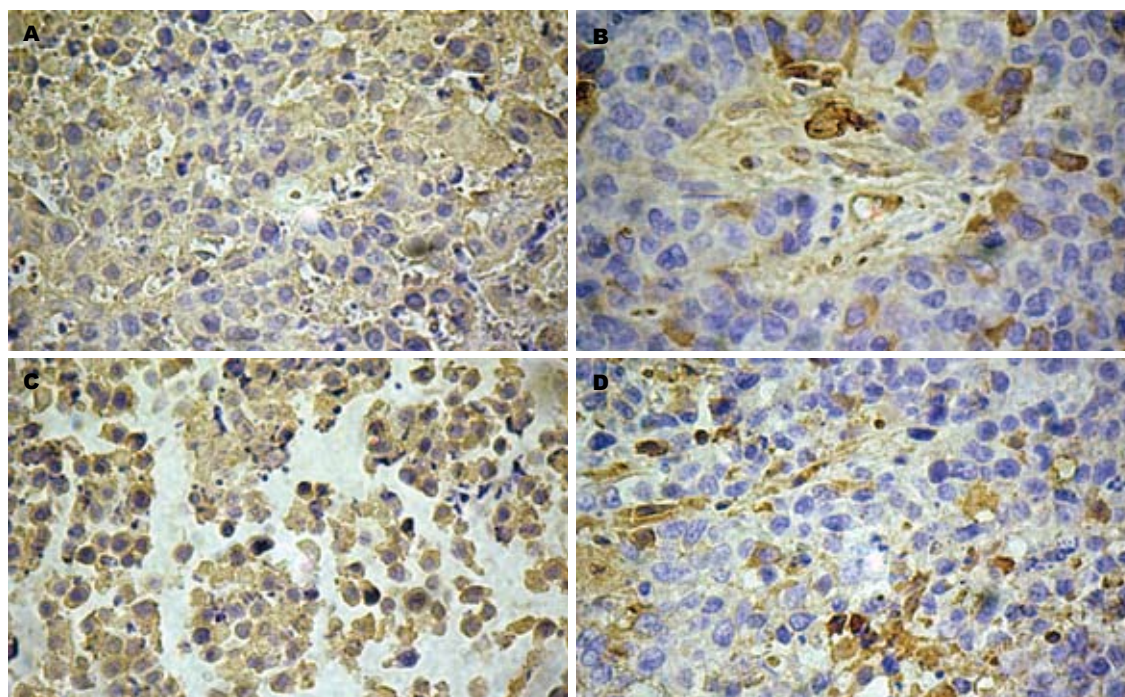


图1 免疫组织化学示治疗后残存肿瘤区VEGF及MMP-2的表达(×400). A: C组VEGF阳性细胞; B: D组VEGF阳性细胞; C: A组MMP-2阳性细胞; D: D组MMP-2阳性细胞.

■应用要点

本研究通过观察强力霉素联合碘油栓塞对兔VX2肝种植瘤残存肿瘤VEGF及MMP-2表达的影响,发现强力霉素能够在一定程度上减少残存肿瘤组织内VEGF和MMP-2表达,为临床强力霉素联合TACE治疗肝癌提供实验依据.

发现, TACE治疗使肝癌患者的肝外转移率明显升高, 且转移时间提前^[8], 肿瘤新生血管形成是重要原因之一. VEGF是目前所知作用最强的一种促血管生长的因子, 经自分泌机制直接作用于肿瘤细胞, 上调肿瘤细胞MMP的表达来增加肿瘤细胞的侵袭性^[9], 其在诱导肿瘤血管生成、促进肿瘤生长、侵袭及转移中起着重要作用. MMP-2降解基底膜和细胞外基质, 为新血管的形成创造通路, 利于肿瘤细胞通过结缔组织和血管壁以形成转移灶或癌栓, 加速肿瘤的生长及转移. VEGF与MMP-2在促进肿瘤血管新生、肿瘤细胞侵袭及转移方面有相互作用, 本实验对各组VEGF与MMP-2进行相关性分析, 发现二者之间均存在正相关关系($P<0.05$), 与郭荣平等^[10]的研究结果相同, 原因可能是由于MMP-2对基质的降解导致微血管密度、分布发生改变, 而VEGF刺激内皮细胞产生MMP-2, 引发了基质降解、新生血管形成的连锁反应, 继而加强了VEGF诱导肿瘤血管新生的能力. VEGF及MMP-2在肝癌组织中的表达与肝外转移、临床分期、门脉癌栓及肿瘤直径相关^[11], 所以, VEGF与MMP-2都是影响肝癌术后复发、转移及癌栓形成的重要因素.

本实验栓塞治疗后短期内各组实验兔食欲下降, 体质量有轻微下降趋势, 可能与栓塞治疗损伤部分肝功能有关, 后几日逐渐恢复. 镜下观

各栓塞组肿瘤病灶内大部分呈凝固性坏死, 多数仍可见残余癌巢组织, 新生血管形成是肿瘤无法完全坏死的重要因素之一, D组肿瘤坏死率高于其他栓塞治疗组, DOXY通过上调FasL、下调MMP-2蛋白表达启动Fas/FasL膜受体途径诱导肿瘤细胞凋亡^[12], 可能进一步促进肿瘤坏死. 栓塞治疗后残存区VEGF表达增强, 与A组具有明显差异($P<0.05$), 由于TACE减少了肝癌灶的血供, 大部分癌细胞处于乏氧状态, 缺氧等局部微环境的改变是VEGF表达升高的重要因素之一. B、C组残存区MMP-2表达与A组无明显差异($P>0.05$), 说明碘化油及阿霉素对于MMP-2无明显抑制作用. DOXY联合碘化油栓塞后残余肿瘤VEGF、MMP-2表达均降低, 与其他3组均具有明显差异($P<0.05$), 主要是由于DOXY具有较强的 Zn^{2+} 、 Ca^{2+} 结合能力, 能与MMP-2酶活性中心的金属离子结合形成螯合物, 消除其催化活性位点, 从而在一定程度上抑制了MMP-2表达^[13-15], 同时也导致VEGF表达的下调, 在肿瘤血管新生过程中二者之间存在某种协同关系, DOXY具体通过何种信号传递途径来抑制VEGF的表达尚需更深入的研究.

DOXY联合碘油栓塞治疗, 抑制肿瘤区VEGF、MMP-2表达, 在肿瘤病灶内较长时间存积, 提高了灭活病变的效能, 其治疗后对肝肿瘤转移的影响, 我们将进一步行实验观察.

■同行评价

本文创新性较好, 设计合理, 有一定的科学价值。

4 参考文献

- 1 甘萍, 李艾珊, 聂桂丽, 范英昌. 多西环素对乳腺癌移植瘤小鼠MMP-2及TIMP-2 mRNA表达的影响. 中国老年学杂志 2010; 30: 182-184
- 2 吴文娟, 邹英华, 刘禧, 李海涛, 刘向东, 杨春, 崔慧先. As₂O₃碘油栓塞对兔VX2肝移植瘤生长及血管新生的作用. 实用放射学杂志 2005; 21: 449-453
- 3 Liu J, Kuszynski CA, Baxter BT. Doxycycline induces Fas/Fas ligand-mediated apoptosis in Jurkat T lymphocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 260: 562-567
- 4 Wang P, Dorante G, Powell SR, Hilton E. The relationship of HLA antigens to doxycycline induced apoptosis in immortalized B cells. *Front Biosci* 2004; 9: 154-158
- 5 Kothari M, Simon SR. Chemically modified tetracyclines inhibit VEGF secretion by breast cancer cell lines. *Cytokine* 2006; 35: 115-125
- 6 Sun B, Zhang S, Zhang D, Yin X, Wang S, Gu Y, Wang Y. Doxycycline influences microcirculation patterns in B16 melanoma. *Exp Biol Med (Maywood)* 2007; 232: 1300-1307
- 7 王凤山, 刘永峰. 转移性肝癌的治疗. 世界华人消化杂志 2008; 16: 115-119
- 8 Liou TC, Shih SC, Kao CR, Chou SY, Lin SC, Wang HY. Pulmonary metastasis of hepatocellular carcinoma associated with transarterial chemoembolization. *J Hepatol* 1995; 23: 563-568
- 9 顾宇, 陆枫林. VEGF促进肝癌SMC-7721细胞侵袭性的自分泌机制. 世界华人消化杂志 2009; 17: 3292-3295
- 10 郭荣平, 钟崇, 石明, 张昌卿, 韦玮, 张亚奇, 李锦清. 血管内皮生长因子和基质金属蛋白酶-2在肝细胞肝癌中的表达及临床意义. 中华肿瘤杂志 2006; 28: 285-288
- 11 吴飞翔, 曹骥, 赵荫农, 刘剑勇, 杨春, 李丽萍. 肝细胞肝癌组织中VEGF、MMP-2及MVD的表达及其相关性研究. 肿瘤学杂志 2007; 13: 474-476
- 12 张强波, 李杰, 时昌文, 李捷, 孙克杰, 曹莉莉. Doxycycline抑制人肝癌细胞系HepG2生长的实验研究. 中国现代普通外科进展 2008; 11: 156-159, 110
- 13 Roach DM, Fitridge RA, Laws PE, Millard SH, Varelias A, Cowled PA. Up-regulation of MMP-2 and MMP-9 leads to degradation of type IV collagen during skeletal muscle reperfusion injury; protection by the MMP inhibitor, doxycycline. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2002; 23: 260-269
- 14 刘志勇, 张诗武, 张丹芳, 戚红, 刘岩雪, 赵秀兰, 孙保存. 多西环素对小鼠黑色素瘤基质金属蛋白酶-2、基质金属蛋白酶-9表达和活性的抑制作用. 中华实验外科杂志 2008; 25: 1427-1429
- 15 高晓康, 王禾, 杨波, 张米娜, 张庆诗. 强力霉素对恶性肿瘤细胞金属蛋白酶表达和分泌的调节及其意义. 西北国防医学 2004; 25: 203-206

编辑 李薇 电编 李薇

ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) CN 14-1260/R 2010年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

2009年《世界华人消化杂志》编委审稿总结

本刊讯 《世界华人消化杂志》(*World Chinese Journal of Digestology, WCJD*)编辑委员会共计400人, 全部为副教授及副主任医师以上. *WCJD*编委会审稿费结算工作于次年01-05开始. 本次统计为2008-01-01/2009-12-31编委审稿费用, 共计40 850元, 数据以稿件审回日期为准. *WCJD*共计审稿1 418篇, 其中送审专家377位, 共计送审次数2 094次, 成功审回次数1 634, 成功率78.03%. 其中审稿次数排前三位的为: 西安交通大学医学院第二附属医院感染科党双锁教授和福建医科大学附属医院消化内科王小众教授并列第一位, 各17篇; 南京医科大学附属南京第一医院肿瘤中心曹秀峰教授第二位, 16篇; 中国医科大学附属第一医院消化内科王炳元教授和苏州大学附属第一医院消化科陈卫昌教授并列第三位, 各15篇.

*WCJD*编辑部感谢各位编委2009年对*WCJD*工作的支持, 同时希望各位编委更加积极主动的配合我们今后的工作. 审稿费已经通过邮局汇款, 如有审稿费未收到或者审稿稿件有误差, 请各位编委与编辑部联系, 联系电话: 010-85381892, 联系人: 李军亮. (编辑部主任: 李军亮 2010-04-20)

黄连素对大鼠结肠隐窝细胞钾通道的影响

尹琬凌, 罗和生, 韩肇木

尹琬凌, 武汉市中心医院消化内科 湖北省武汉市 430014
罗和生, 武汉大学人民医院消化内科 湖北省武汉市 430060
韩肇木, 武汉市中心医院内一科 湖北省武汉市 430014
作者贡献分布: 此文主要由尹琬凌、罗和生及韩肇木设计、实验、分析及撰写; 课题经费由罗和生提供; 尹琬凌与罗和生承担了大部分实验工作; 韩肇木参与部分实验及数据统计工作; 论文写作由尹琬凌完成。
通讯作者: 尹琬凌, 430014, 湖北省武汉市江汉区姑嫂树14号, 武汉市中心医院内一科. ywl312@hotmail.com
电话: 027-85883314
收稿日期: 2010-05-11 修回日期: 2010-07-27
接受日期: 2010-08-24 在线出版日期: 2010-11-08

Berberine inhibits basolateral potassium current in rat colonic crypt cells

Wan-Ling Yin, He-Sheng Luo, Zhao-Mu Han

Wan-Ling Yin, Department of Gastroenterology, the Central Hospital of Wuhan, Wuhan 430014, Hubei Province, China

He-Sheng Luo, Department of Gastroenterology, Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan 430060, Hubei Province, China

Zhao-Mu Han, Department of Internal Medicine, the Central Hospital of Wuhan, Wuhan 430014, Hubei Province, China

Correspondence to: Wan-Ling Yin, Department of Gastroenterology, the Central Hospital of Wuhan, 14 Gusaoshu Road, Hanjiang District, Wuhan 430014, Hubei Province, China. ywl312@hotmail.com

Received: 2010-05-11 Revised: 2010-07-27

Accepted: 2010-08-24 Published online: 2010-11-08

Abstract

AIM: To clarify the mechanism behind therapeutic effects of berberine against secretory diarrhea by investigating the effects of berberine on basolateral cAMP-activated potassium current [$I_{K(cAMP)}$] in rat colonic crypt cells.

METHODS: Intact colonic crypt cells were isolated using an EDTA solution. The effects of berberine on $I_{K(cAMP)}$ in isolated colonic crypt cells were detected using the conventional whole-cell patch-clamp technique.

RESULTS: Berberine could significantly inhibit $I_{K(cAMP)}$ in rat colonic crypt cells ($P < 0.05$). At concentrations of 50, 100 and 500 $\mu\text{mol/L}$, berberine reduced $I_{K(cAMP)}$ to $71.43\% \pm 3.61\%$, 54.56%

$\pm 5.13\%$ and $38.66\% \pm 3.85\%$ of that in control cells when depolarizing at +80 mV.

CONCLUSION: Berberine exerts therapeutic effects against secretory diarrhea possibly by inhibiting $I_{K(cAMP)}$ in rat colonic crypt cells.

Key Words: Berberine; Colonic crypt cell; Patch clamp; cAMP-activated potassium current

Yin WL, Luo HS, Han ZM. Berberine inhibits basolateral potassium current in rat colonic crypt cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(31): 3343-3346

摘要

目的: 探讨黄连素对结肠上皮隐窝细胞基底膜cAMP依赖的钾通道 [$I_{K(cAMP)}$] 的影响, 以研究其治疗分泌性腹泻的机制。

方法: 用EDTA溶液分离结肠上皮隐窝细胞, 以-60 mV为钳制电压钳制细胞, 20 mV为阶跃, 用EPC10膜片钳放大器测量全细胞模式下50、100、500 $\mu\text{mol/L}$ 的黄连素对结肠上皮细胞基底膜 $I_{K(cAMP)}$ 的影响。

结果: 50、100、500 $\mu\text{mol/L}$ 的黄连素可显著抑制大鼠结肠上皮隐窝细胞基底膜 $I_{K(cAMP)}$ ($P < 0.05$), 且抑制效应具有浓度依赖性。当阶跃刺激为+80 mV时, 其 $I_{K(cAMP)}$ 分别为生理盐水对照组的 $78.55\% \pm 5.72\%$, $60.42\% \pm 6.33\%$, $43.78\% \pm 6.47\%$ ($P < 0.05$)。

结论: 黄连素能抑制大鼠结肠隐窝细胞基底膜cAMP依赖的钾通道开放, 这可能是其治疗分泌性腹泻的机制之一。

关键词: 黄连素; 结肠上皮隐窝细胞; 膜片钳; cAMP依赖的钾通道

尹琬凌, 罗和生, 韩肇木. 黄连素对大鼠结肠隐窝细胞钾通道的影响. *世界华人消化杂志* 2010; 18(31): 3343-3346
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/3343.asp>

0 引言

黄连素(又称小檗碱, Berberine, Ber)是从毛茛科

■背景资料

黄连素即小檗碱, 在中国及印度被用做止泻药已有三千余年的历史, 中医上他属清热解毒药, 临床上主要用于治疗肠道细菌的感染性疾病。近年来国内外学者研究发现, 黄连素具有抑制小肠黏膜分泌的作用, 但其治疗分泌性腹泻的相关研究甚少。

■同行评议者

黄颖秋, 教授, 本溪钢铁(集团)有限责任公司总医院消化内科

■相关报道

陈明锴等发现,黄连素可抑制豚鼠回肠正常电解质分泌,对霍乱毒素所致的回肠黏膜电解分泌亢进亦有逆转作用,能有效地治疗分泌性腹泻。

黄连属植物根状茎中提取的一种异喹啉生物碱,是一种作用范围广、价格低廉、使用方便、不良反应少的止泻药物,在临床上主要用于治疗感染引起的分泌性腹泻。近年来不少研究发现,Ber具有抑制肠黏膜分泌的作用^[1,2],但对Ber治疗分泌性腹泻的离子转运机制不甚明了。本实验采用膜片钳技术探讨Ber对大鼠结肠上皮隐窝细胞基底膜环磷酸腺苷(cyclic adenosine monophosphate, cAMP)依赖的钾通道 $I_{K(cAMP)}$ 的影响,以研究其治疗分泌性腹泻的离子转运机制。

1 材料和方法

1.1 材料 SD大鼠购自华中科技大学同济医学院。黄连素、小牛血清白蛋白购自Sigma公司。

1.2 方法

1.2.1 结肠上皮隐窝细胞的分离:健康SD大鼠1只,♂,8-12 wk,断颈处死,迅速取近端结肠,沿肠系膜纵向切开,用通有体积分数为95% O₂和5% CO₂的预冷的克-汉二氏溶液(krebs-henseleit solution, KHS)将组织的黏膜面冲洗干净,黏膜面朝下固定在底部铺有硅胶的容器中,容器中盛有上述通入混合气的溶液。在解剖显微镜下,将黏膜下层、肌层和浆膜层与黏膜层钝性分离,得到上皮层和一些粘连的结缔组织^[4]。将黏膜剪成1 mm×1 mm的小块,转入EDTA中7-9 min,振荡30 s,用高钾台式液(high K⁺ tyrode)收集,保存在4℃冰箱备用,实验前用吸管反复吹打直至液体浑浊,取上清液即可得到单个结肠上皮隐窝细胞^[5]。

1.2.2 $I_{K(cAMP)}$ 的记录:取细胞悬液约0.1 mL于细胞灌流槽中,放置30 min使细胞自然沉降、贴壁,PSS灌流20 min。用 $I_{K(cAMP)}$ 电极内液^[3]充灌玻璃微电极(上海神经生物研究所)。在倒置显微镜(IX71-Olympus,日本)下通过微操纵器(MWO-3 Narishige,日本)调节电极封接细胞。当细胞膜与玻璃微电极形成高阻封接(封接电阻>1 GΩ)后电击破细胞膜,然后分别用PSS(对照组)和含Ber 50、100、500 μmol/L的PSS灌流,以-60 mV为钳制电压钳制细胞,20 mV为阶跃,用EPC10膜片钳放大器(HEKA, Darmstadt,德国)检测 $I_{K(cAMP)}$ 。每次测定一个浓度的Ber后均用PSS洗脱1 min,只有当洗脱后其 $I_{K(cAMP)}$ 才能恢复原来水平,此数据才能用于统计^[6]。

统计学处理 实验结果均以mean±SD表示,采用单因素方差分析,用膜片钳数据软件Clampfit8.0和统计软件SPSS11.5进行统计分析。

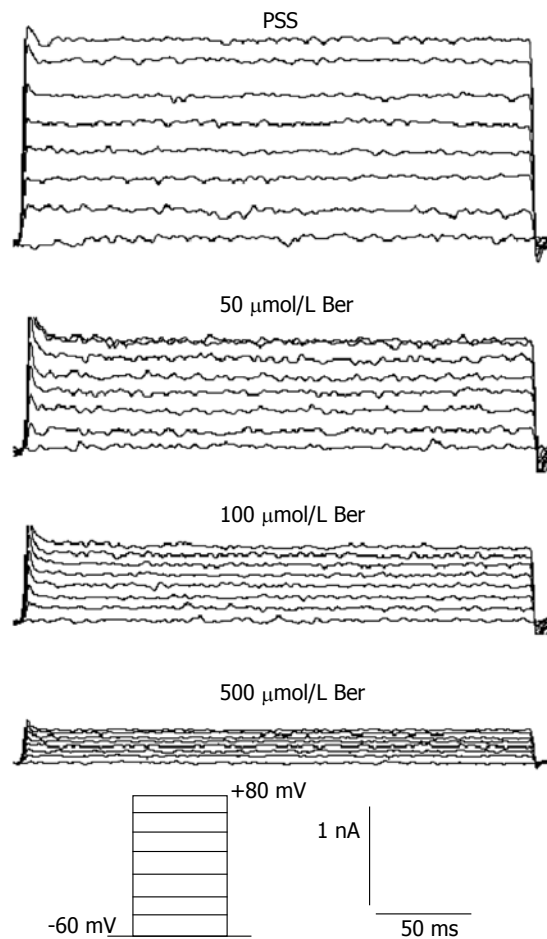


图1 Ber对结肠隐窝细胞基底膜 $I_{K(cAMP)}$ 的作用。

2 结果

Ber对大鼠结肠上皮隐窝细胞基底膜 $I_{K(cAMP)}$ 的影响:在全细胞模式下,将膜电位钳制在-60 mV,以每20 mV阶跃去极化至+80 mV,维持200 ms,刺激间隔为10 s,记录 $I_{K(cAMP)}$ (表1)。在阶跃刺激下,Ber能显著性抑制 $I_{K(cAMP)}$,其效应呈浓度依赖性,差异有统计学意义($n=8$, $P<0.05$,图1)。不同浓度Ber作用后,绘出 $I_{K(cAMP)}$ 电流-电压曲线(图2)。当阶跃刺激为+80 mV时,浓度为50、100、500 μmol/L Ber作用后的 $I_{K(cAMP)}$ 与对照组相比,分别为对照组的78.55%±5.72%, 60.42%±6.33%, 43.78%±6.47%,差异均有显著意义($n=8$, $P<0.05$)。

3 讨论

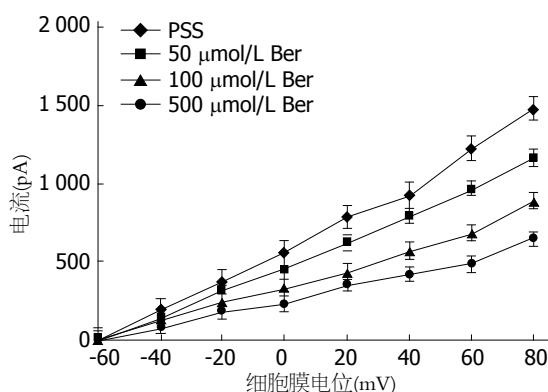
Ber是黄连的主要有效成分,是一种传统的物美价廉的止泻药物,主要用于治疗细菌感染引起的分泌性腹泻。研究证明,Ber治疗腹泻的机制有很多,如Ber是一种广谱抗菌药,能抑制细菌对蛋白的合成;Ber可恢复肠道致病菌对抗生素的敏感性;Ber可通过抑制豚鼠结肠平滑肌细胞膜钙离子激活钾通道和延迟整流钾通道,降低

■创新盘点

本实验采用膜片钳技术研究黄连素对大鼠结肠上皮隐窝细胞基底膜cAMP依赖的钾通道 $I_{K(cAMP)}$ 的影响,以探讨其治疗分泌性腹泻的离子转运机制。

表 1 对照组和各个处理组在阶跃刺激下的 $I_{K(cAMP)}$ 电流值 (pA)

分组	阶跃刺激(mV)							
	-60	-40	-20	0	20	40	60	80
PSS对照组	0	185.23	365.23	556.23	782.23	925.23	1 220.23	1 478.69
50 $\mu\text{mol/L}$ Ber组	0	136.23	310.25	440.44	615.23	790.25	956.23	1 161.51
100 $\mu\text{mol/L}$ Ber组	0	115.25	240.23	320.13	432.00	562.32	678.95	893.42
500 $\mu\text{mol/L}$ Ber组	0	85.23	200.55	268.13	380.55	480.12	520.89	707.97

图 2 $I_{K(cAMP)}$ 电流-电压曲线。

平滑肌的收缩和肠道运动, 治疗动力性腹泻^[6]。长期以来, 对于Ber治疗分泌性腹泻的机制研究很多^[1,2,7,8], 但其离子转运机制尚未明了。

细菌毒素引起分泌性腹泻的机制是: 内毒素先与上皮细胞刷状缘上的受体结合继而激活了肠黏膜细胞内的腺苷酸环化酶, 使细胞内第二信使cAMP、环磷酸鸟苷(cyclic guanosine monophosphate, cGMP)及钙离子增加, 促进细胞内一系列酶反应的进行, 使细胞分泌功能大大强化, 引起水及电解质大量分泌。大量无蛋白等渗液及电解质分泌入肠腔, 其碳酸氢根含量是血浆的2倍, 其氯离子含量是血浆的5倍。

由此可见, 分泌性腹泻主要是大量阴离子分泌到肠腔引起的。而阴离子分泌到细胞外需要两个前提条件, 即细胞膜上存在有阴离子通道和促分泌的驱动力。因为细胞内的阴离子浓度低于肠腔, 促使阴离子分泌到细胞外的驱动力不是化学梯度, 而是膜电位差。研究表明结肠上皮引起的阴离子分泌能被基底膜非选择性的K通道阻断剂 Ba^{2+} 完全阻断^[11], 表明基底膜的K⁺通道对阴离子的分泌起着重要的作用, 而cAMP依赖的钾通道是结肠上皮隐窝细胞中主要存在的基底膜钾通道之一^[2], 因此该通道与结肠分泌有十分密切的关系。Cl⁻是细胞内主要的阴离子, Cl⁻分泌的过程是首先通过基底膜钠-钾-氯共转

运体进入细胞内, 由于要维持离子电荷平衡, K⁺通过基底膜的K⁺通道由上皮细胞内转运到细胞外, 导致膜的超极化, 然后Cl⁻依靠这种基底膜K⁺的跨基底膜运动使膜超极化所提供电驱动力, 经顶膜的Cl⁻通道分泌到肠腔。K⁺的这种跨基底膜运动为维持Cl⁻分泌提供必需的电驱动力, 这种作用是肠腔Cl⁻分泌的必要条件^[2,4,9,10]。说明这种K⁺通道可能是分泌性腹泻的离子转运基础之一。

本实验结果表明, 50、100、500 $\mu\text{mol/L}$ 的Ber能明显抑制大鼠结肠上皮细胞基底膜 $I_{K(cAMP)}$, 并呈浓度依赖性。据此可推测, Ber有可能是通过抑制这种钾通道, 减少K⁺通过基底膜的K⁺通道转运到细胞外, 减少维持阴离子分泌的电驱动力, 从而减少阴离子的分泌来发挥治疗分泌性腹泻的作用。由此可见, Ber对结肠上皮细胞基底膜K⁺通道的作用可能是其治疗分泌性腹泻的机制之一, 要深入探讨其作用机制, 还应研究Ber对结肠上皮细胞膜Cl⁻及碳酸 HCO_3^- 分泌的影响。

4 参考文献

- 1 黄晓东, 罗和生, 余保平, 汤剑清. 小檗碱治疗分泌性腹泻的实验研究. 世界华人消化杂志 1998; 6: 801-803
- 2 Taylor CT, Winter DC, Skelly MM, O'Donoghue DP, O'Sullivan GC, Harvey BJ, Baird AW. Berberine inhibits ion transport in human colonic epithelia. *Eur J Pharmacol* 1999; 368: 111-118
- 3 Barrière H, Rubera I, Belfodil R, Tauc M, Tonnerieux N, Poujeol C, Barhanin J, Poujeol P. Swelling-activated chloride and potassium conductance in primary cultures of mouse proximal tubules. Implication of KCNE1 protein. *J Membr Biol* 2003; 193: 153-170
- 4 Hintz KK, Ren J. Tetramethylpyrazine elicits disparate responses in cardiac contraction and intracellular Ca^{2+} transients in isolated adult rat ventricular myocytes. *Vascu Pharmacol* 2003; 40: 213-217
- 5 Perry MD, Sandle GI. Regulation of colonic apical potassium (BK) channels by cAMP and somatostatin. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2009; 297: G159-G167
- 6 陈明锴, 罗和生, 余保平. 黄连素对结肠平滑肌细胞膜钙激活钾通道和延迟整流钾通道的影响. 中国药理学通报 2004; 20: 632-635
- 7 陈明锴, 罗和生. 黄连素及其衍生物对钙、钾离子通道的作用. 世界华人消化杂志 2002; 10: 361-362
- 8 Wang F, Zhou HY, Zhao G, Fu LY, Cheng L, Chen

■应用要点

本研究证实, 黄连素有可能是通过抑制大鼠结肠上皮细胞基底膜cAMP依赖钾通道, 减少K⁺通过基底膜的K⁺通道转运到细胞外, 减少维持阴离子分泌的电驱动力, 从而减少阴离子的分泌来发挥治疗分泌性腹泻的作用。

■同行评价

本文学术价值较好,为黄连素治疗分泌性腹泻的药理机制提供了实验依据。

- JG, Yao WX. Inhibitory effects of berberine on ion channels of rat hepatocytes. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 2842-2845
- 9 Sandle GI, Warhurst G, Butterfield I, Higgs NB, Lomax RB. Somatostatin peptides inhibit basolateral potassium channels in human colonic crypts. *Am J Physiol* 1999; 277: G967-G975
- 10 Joiner WJ, Basavappa S, Vidyasagar S, Nehrke K, Krishnan S, Binder HJ, Boulpaep EL, Rajendran VM. Active K⁺ secretion through multiple KCa-type channels and regulation by IKCa channels in rat proximal colon. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2003; 285: G185-G196
- 11 Lam RS, Shaw AR, Duszyk M. Membrane cholesterol content modulates activation of BK channels in colonic epithelia. *Biochim Biophys Acta* 2004; 1667: 241-248

编辑 曹丽鸥 电编 何基才

ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) CN 14-1260/R 2010年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

《世界华人消化杂志》外文字符标准

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

氟喹诺酮类药物对幽门螺杆菌的防耐药变异浓度

呼闯营, 柴晓哲, 周惠琴, 王少峰

呼闯营, 柴晓哲, 王少峰, 苏州大学附属第二医院消化科 江苏省苏州市 215004

周惠琴, 苏州大学附属第二医院检验科 江苏省苏州市 215004

作者贡献分布: 此课题由呼闯营与王少峰设计; 研究过程由柴晓哲与周惠琴操作完成; 数据分析和论文写作由呼闯营完成。

通讯作者: 呼闯营, 副教授, 215004, 江苏省苏州市三香路1055号, 苏州大学附属第二医院消化科. huchuangying@163.com

电话: 0512-67784807 传真: 0512-68284303

收稿日期: 2010-08-06 修回日期: 2010-09-09

接受日期: 2010-09-13 在线出版日期: 2010-11-08

Mutant prevention concentrations of fluoroquinolones against *Helicobacter pylori*

Chuang-Ying Hu, Xiao-Zhe Chai, Hui-Qin Zhou, Shao-Feng Wang

Chuang-Ying Hu, Xiao-Zhe Chai, Shao-Feng Wang, Department of Gastroenterology, the Second Affiliated Hospital of Soochow University, Suzhou 215004, Jiangsu Province, China

Hui-Qin Zhou, Department of Clinical Microbiology Laboratory, the Second Affiliated Hospital of Soochow University, Suzhou 215004, Jiangsu Province, China

Correspondence to: Associate Professor Chuang-Ying Hu, Department of Gastroenterology, the Second Affiliated Hospital of Soochow University, 1055 Sanxiang Road, Suzhou 215004, Jiangsu Province, China. huchuangying@163.com
Received: 2010-08-06 Revised: 2010-09-09
Accepted: 2010-09-13 Published online: 2010-11-08

Abstract

AIM: To compare the mutant prevention concentrations (MPC) of four fluoroquinolones against fluoroquinolone-susceptible clinical *Helicobacter pylori* (*H.pylori*) isolates.

METHODS: Sixteen clinical isolates of *H.pylori* were enriched in broth and adjusted to 10^{10} colony-forming units per milliliter. The minimal inhibitory concentration (MIC) and provisional MPC (MPC_{pr}) of moxifloxacin, gatifloxacin, levofloxacin and ciprofloxacin were determined using the agar plate dilution method. The 50% MIC (MIC₅₀), 90% MIC (MIC₉₀), and 90% provisional MPC (MPC_{pr90}) for fluoroquinolone-susceptible *H.pylori* isolates were then calculated.

RESULTS: When the breakpoints for fluoroqui-

nolone resistance were defined as >1.0 mg/L, there were 2, 1, 4 and 2 *H.pylori* strains resistant to moxifloxacin, gatifloxacin, levofloxacin and ciprofloxacin, respectively. The MIC₅₀ of moxifloxacin, gatifloxacin, levofloxacin and ciprofloxacin for fluoroquinolone-susceptible *H.pylori* isolates were 0.13, 0.13, 0.25 and 0.50, respectively, while the MIC₉₀ were 0.50, 0.50, 1.00 and 0.50 mg/L, respectively. The MPC_{pr90} of moxifloxacin, gatifloxacin, levofloxacin and ciprofloxacin were 8.0, 2.0, 8.0 and 2.0 mg/L, and the ratios of MPC_{pr90} to MIC₉₀ were 16.0, 4.0, 8.0 and 4.0, respectively.

CONCLUSION: The anti-*H.pylori* activity of gatifloxacin and moxifloxacin might be stronger than that of levofloxacin and ciprofloxacin, and the capacity of gatifloxacin and ciprofloxacin restricting the selection of resistant mutants appears to be stronger than that of moxifloxacin and levofloxacin in the treatment of *H.pylori* infection.

Key Words: Fluoroquinolones; *Helicobacter pylori*; Mutant prevention concentration; Minimal inhibitory concentration

Hu CY, Chai XZ, Zhou HQ, Wang SF. Mutant prevention concentrations of fluoroquinolones against *Helicobacter pylori*. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(31): 3347-3351

摘要

目的: 比较4种氟喹诺酮类药物对幽门螺杆菌(*H.pylori*)的防耐药变异浓度(MPC)。

方法: 肉汤法富集 1×10^{10} CFU/mL的*H.pylori*临床分离菌16株, 采用标准琼脂二倍稀释法测定4种氟喹诺酮类药物莫西沙星、加替沙星、左氧氟沙星和环丙沙星的最低抑菌浓度(MIC)、初测MPC(MPC_{pr}), 计算50%和90%菌株的MIC即MIC₅₀和MIC₉₀, 计算90%菌株的MPC即MPC_{pr90}, 计算选择指数(MPC_{pr90}/MIC₉₀)。

结果: 在16株*H.pylori*临床分离菌株中, 莫西沙星、加替沙星、左氧氟沙星和环丙沙星对*H.pylori*耐药分别为2、1、4和2株。莫西沙星、加替沙星、左氧氟沙星和环丙沙星的

■背景资料

幽门螺杆菌对多种抗生素的耐药率逐年增加。在幽门螺杆菌治疗过程中科学选择既有效又可避免产生耐药菌株的同类药物, 对于预防幽门螺杆菌继发性耐药尤为重要。但是目前尚缺少预防幽门螺杆菌耐药的有效指标。

■同行评议者

傅春彬, 主任医师, 吉化集团公司总医院一院消化内科

■创新盘点

本实验建立了幽门螺杆菌防耐药变异浓度的体外检测方法,测定了莫西沙星、加替沙星、左氧氟沙星和环丙沙星对幽门螺杆菌临床分离菌株的防耐药变异浓度,从耐药角度分析和比较氟喹诺酮类药物限制幽门螺杆菌耐药发生的能力。

*H.pylori*敏感菌株的MIC₅₀分别为0.13、0.13、0.25和0.50 mg/L, MIC₉₀为0.50、0.50、1.00和0.50 mg/L, MPCpr₉₀为8.0、2.0、8.0和2.0 mg/L, 选择指数为16.0、4.0、8.0和4.0。

结论: 莫西沙星和加替沙星的抗*H.pylori*活性强于左氧氟沙星和环丙沙星, 而加替沙星和环丙沙星限制*H.pylori*耐药突变株选择的能力优于左氧氟沙星和莫西沙星。

关键词: 氟喹诺酮药物; 幽门螺杆菌; 防耐药变异浓度; 最低抑菌浓度

呼闯营, 柴晓哲, 周惠琴, 王少峰. 氟喹诺酮类药物对幽门螺杆菌的防耐药变异浓度. 世界华人消化杂志 2010; 18(31): 3347-3351
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/3347.asp>

0 引言

我国幽门螺杆菌(*H.pylori*)感染率居高不下, 虽然目前已有经典的抗*H.pylori*三联或四联治疗等多种方案, 但*H.pylori*的根除率仍逐年下降, 其对抗生素的耐药率却逐年增加^[1], 即使是近年来用左氧氟沙星等氟喹诺酮类药物补救治疗*H.pylori*, 其耐药率也迅速上升^[2,3]. 因此, 为了在*H.pylori*治疗过程中预防和减少继发性耐药, 科学选择如氟喹诺酮类既要有效又可避免产生耐药菌株的同类药物, 显得尤为重要. 防耐药变异浓度(mutant prevention concentration, MPC)是指防止第一步或下一步耐药突变株被选择性富集扩增所需的最低抗菌药物浓度, 他可作为一个新的指标来反映药物限制耐药突变株选择的能力^[4]. 但是由于*H.pylori*培养的微需氧条件、生长较为缓慢等特殊特性, 目前尚未见关于抗*H.pylori*药物MPC的相关报道. 为此, 我们参照有关MPC的研究方法, 通过*H.pylori*原代和传代培养, 建立*H.pylori*菌株MPC的体外检测方法, 测定4种目前临床常用的氟喹诺酮类药物莫西沙星、加替沙星、左氧氟沙星和环丙沙星对16株*H.pylori*临床分离菌的最低抑菌浓度(minimal inhibitory concentration, MIC)和MPC, 结合文献报道的药代动力学参数, 从耐药角度分析和比较氟喹诺酮类药物限制*H.pylori*耐药发生的能力, 为氟喹诺酮类药物治疗*H.pylori*提供科学选择和临床指导。

1 材料和方法

1.1 材料 16例临床*H.pylori*菌株来源于苏州大

学附属第二医院门诊慢性胃炎或胃十二指肠溃疡患者, 经患者知情同意、并通过苏州大学附属第二医院伦理委员会的批准后, 随机选自原代培养且传代生长良好者; *H.pylori*标准菌株ATCC43504购自上海仁济医院消化研究所. *H.pylori*添加剂SRO147E、Muller-Hinton (MH)肉汤、MH琼脂、哥伦比亚琼脂、2.5 L微需氧产气袋CN0025A、2.5 L密封罐均为英国Oxoid公司产品. 抗菌素加替沙星(批号: 130518-200402, 含量: 97.2%)、左氧氟沙星(批号: 130455-200604, 含量: 97.3%)、环丙沙星(批号: 130451-200302, 含量: 84.9%) 标准品购自中国药品生物制品检定所. 莫西沙星(批号: J20040068, 浓度1.6 g/L) 为拜耳公司产品、购自苏州大学附属第二医院药剂科。

1.2 方法

1.2.1 *H.pylori*的培养和液体增菌: 活检钳取胃窦黏膜, 用无菌接种环接种涂布至哥伦比亚血培养基(含有*H.pylori*添加剂)中, 置密封罐内, 加入微需氧产气袋(其内含有混合气体50 mL/L O₂、100 mL/L CO₂、850 mL/L N₂, 湿度≥90%), 于37 °C恒温孵育箱中培养3-7 d. 细菌生长阳性者传代继续培养, 约3 d左右观察传代培养结果, 进行菌株鉴定. 将存活的菌株接种于MH肉汤, 37 °C微需氧、250 r/min震荡培养72 h液体增菌, 调整菌液浓度进行MIC和MPC实验. *H.pylori*标准菌株ATCC43504复苏后, 传代、增菌同临床菌株。

1.2.2 MIC测定: 采用倍比稀释法, 含药MH琼脂平板的浓度分别为环丙沙星0.125-64.000 g/L、左氧氟沙星0.03-128.00 g/L、加替沙星0.015-32.000 g/L、莫西沙星0.006-64.000 g/L. 采用标准琼脂二倍稀释法, 将细菌稀释成1×10⁵ CFU/mL, 取3 μL接种于上述含不同药物浓度的琼脂表面, 置于37 °C微需氧培养, 以96 h时没有菌落生长的最低药物浓度为MIC, 计算敏感菌株的MIC₅₀和MIC₉₀. *H.pylori*标准菌株ATCC43504作为质控菌株, 参照Zhao等^[5]报道的方法测定MIC₉₀。

1.2.3 MPC测定: 按照崔俊昌等^[6]介绍的方法, 进行MPC测定. 以MIC为基准, 倍比递增药物浓度, 制备8个浓度梯度的含不同药物浓度的MH琼脂平板用于初测MPC(provisional MPC, MPCpr)检测. 将菌液浓度调整为3×10¹⁰ CFU/mL, 分别取菌液100 μL均匀涂抹在各个MH琼脂平板上, 37 °C微需氧环境下孵育, 以120 h没有菌落生长的最低药物浓度为MPCpr. 对临床分离菌株, 只

表 1 4种氟喹诺酮类药物对*H.pylori*临床分离菌株的MIC和MPC (mg/L)

<i>H.pylori</i> 菌株	莫西沙星		加替沙星		左氧氟沙星		环丙沙星	
	MPC	MIC	MPC	MIC	MPC	MIC	MPC	MIC
No.1	4.0	0.25	1.0	0.25	4.0	0.25	1.0	0.50
No.2	1.0	0.13	0.5	0.13	8.0	0.25	1.0	0.25
No.3	4.0	0.25	2.0	0.50	8.0	0.50	2.0	0.50
No.4	8.0	0.50	0.5	0.13	4.0	0.25	1.0	0.25
No.5	16.0	4.00 ^a	8.0	2.00 ^a	16.0	8.00 ^a	8.0	4.00 ^a
No.6	1.0	0.06	1.0	0.06	8.0	2.00 ^a	2.0	1.00
No.7	4.0	0.13	1.0	0.13	2.0	0.25	1.0	0.25
No.8	8.0	0.25	0.5	0.13	16.0	2.00 ^a	8.0	2.00 ^a
No.9	8.0	0.13	1.0	0.25	8.0	1.00	1.0	0.50
No.10	4.0	0.25	0.5	0.13	2.0	0.13	2.0	0.50
No.11	2.0	0.13	1.0	0.25	2.0	0.25	1.0	0.50
No.12	1.0	0.13	1.0	0.50	8.0	1.00	2.0	0.50
No.13	2.0	0.13	1.0	0.13	2.0	0.25	1.0	0.13
No.14	8.0	2.00 ^a	2.0	0.50	16.0	4.00 ^a	2.0	0.50
No.15	2.0	0.13	0.5	0.13	2.0	0.13	1.0	0.25
No.16	2.0	0.50	2.0	0.25	2.0	0.50	2.0	0.50

^aMIC>1 mg/L定义为耐药菌株。

测MPC_{pr}。对于ATCC25923, 测定MPC_{pr}后, 再以MPC_{pr}为基准, 线性递减(20%)抗菌药物浓度, 不出现菌落生长的最低药物浓度即为MPC。对接近MPC的药物浓度筛选出的菌株再接种于无药平板上, 传代2次后, 再接种于原筛选浓度的抗菌药物平板上, 确保所筛选出的菌株为耐药突变株。

1.2.4 数据处理: 对于临床分离菌株, 计算MIC₅₀、MIC₉₀、MPC_{pr90}以及选择指数MPC_{pr90}/MIC₉₀; 对*H.pylori*标准菌株ATCC43504, 计算MIC₉₀和MPC。

2 结果

2.1 标准琼脂二倍稀释法测定4种氟喹诺酮类药物对16株*H.pylori*临床分离菌株的MIC测定结果参照文献[7]将MIC>1 mg/L定义为耐药, 本实验16株临床菌株中, 莫西沙星、加替沙星、左氧氟沙星和环丙沙星对*H.pylori*敏感分别为14、15、12和14株, 耐药分别为2、1、4和2株。

2.2 4种氟喹诺酮类药物对*H.pylori*临床菌株的MIC及MPC测定 选择*H.pylori*敏感菌株进行MIC和MPC比较, 从MIC结果看, 莫西沙星、加替沙星、左氧氟沙星和环丙沙星对*H.pylori*的MIC₅₀分别为0.13、0.13、0.25和0.50 mg/L, MIC₉₀为0.50、0.50、1.00和0.50 mg/L, 提示莫西沙星和加替沙星的抗菌活性强于左氧氟沙星

和环丙沙星; 从MPC结果看, 莫西沙星、加替沙星、左氧氟沙星和环丙沙星的MPC_{pr90}为8.0、2.0、8.0和2.0 mg/L, 选择指数(MPC_{pr90}/MIC₉₀)为16.0、4.0、8.0和4.0, 提示加替沙星和环丙沙星限制*H.pylori*耐药突变株选择的能力优于左氧氟沙星和莫西沙星(表1)。

2.3 4种氟喹诺酮类药物对*H.pylori*标准菌株ATCC43504的MIC₉₀和MPC测定 结果同临床菌株类似。莫西沙星、加替沙星、左氧氟沙星和环丙沙星对*H.pylori*的MIC₉₀分别为0.048、0.018、0.060和0.100 mg/L, MPC分别为2.0、0.3、1.6和1.2 mg/L, 选择指数(MPC_{pr90}/MIC₉₀)为42、16、26和12。

3 讨论

多项研究表明, *H.pylori*继发性耐药与用药史密切相关, 在*H.pylori*治疗过程中, 血药浓度及持续时间与耐药发生相关, 用药或根治失败可增加*H.pylori*对各类抗菌药物耐药的机会^[8,9], 但是目前尚缺少预防*H.pylori*耐药的有效指标。MPC概念在着眼于临床控制感染的同时, 也考虑到药物限制耐药突变株选择的能力^[10,11]。根据MPC理论, 当抗菌药物浓度低于MIC时, 虽然不能杀灭敏感细菌, 也不会导致致病菌耐药; 当药物浓度在MPC以上时, 病原菌必须同时至少发生2次突变才能生长, 而能够同时发生2次耐药性突变的

■应用要点

将防耐药变异浓度理论引入幽门螺杆菌耐药研究, 可能为预防和减少幽门螺杆菌的继发耐药提供指导作用。

■名词解释

防耐药变异浓度: 是指防止第一步或下一步耐药突变株被选择性富集扩增所需的最低抗菌药物浓度, 他可作为一个新的指标来反映药物限制耐药突变株选择的能力。

机率极小, 因此不仅得以清除细菌, 还可阻止或抑制细菌耐药突变株的选择性扩增; 但当抗菌药物浓度在MIC与MPC之间时, 敏感菌株虽被抑制, 但耐药突变株易被筛选出来, 继而富集生长, 导致耐药。MPC与MIC之比又称选择指数, 用于比较药物限制耐药突变株扩增的能力, 指数越小, 抑制耐药变异菌株选择和富集扩增的能力越强^[12,13]。

本实验采用标准琼脂二倍稀释法测定了4种氟喹诺酮类药物对16株*H.pylori*临床分离菌株的MIC, 如参照文献将MIC>1 mg/L定义为耐药, 莫西沙星、加替沙星、左氧氟沙星和环丙沙星对*H.pylori*耐药分别为2、1、4和2株, 较苏州大学附属第二医院原报道的药敏纸片法检出的耐药率高^[14], 但由于本实验样本量较少, 统计学不适宜比较。按照多个菌株之间比较统计法, 选择*H.pylori*敏感菌株, 计算50%和90%菌株的MIC即MIC₅₀和MIC₉₀, 计算90%菌株的MPC即MPCpr₉₀, 并以MPCpr₉₀/MIC₉₀为选择指数进行比较。从MIC结果看, 莫西沙星和加替沙星的MIC₅₀和MIC₉₀均低于左氧氟沙星和环丙沙星, 提示莫西沙星和加替沙星的抗菌活性强于左氧氟沙星和环丙沙星; 从MPC结果看, 加替沙星的MPCpr₉₀低于莫西沙星和左氧氟沙星, 提示加替沙星和环丙沙星在同等剂量下限制*H.pylori*耐药突变株选择的能力强于莫西沙星和左氧氟沙星; 从选择指数结果看, 加替沙星和环丙沙星明显小于左氧氟沙星和莫西沙星, 提示使用加替沙星和环丙沙星不易产生耐药, 而左氧氟沙星和莫西沙星则容易筛选出耐药突变株。*H.pylori*标准菌株ATCC43504的MIC和MPC结果与临床菌株一致。

虽然根据MPC和选择指数, 在临床上具有低MPC和低选择指数的加替沙星和环丙沙星较左氧氟沙星和莫西沙星应该更能预防和减少*H.pylori*出现或发生耐药, 但由于氟喹诺酮类药物分子结构的多样性, 体外实验结果需要结合药物体内的药代动力学参数如血药最大浓度(maximum concentration, C_{max})、药时曲线下面积[total areas under the curve, AUC(tot)]和半衰期等综合分析药物临床使用时的防耐药突变能力^[15,16]。文献报道单次口服莫西沙星、加替沙星、左氧氟沙星和环丙沙星400、400、500和250 mg, C_{max}分别为4.34 mg/L±1.61 mg/L、3.42 mg/L±0.74 mg/L、6.21 mg/L±1.34 mg/L和1.50 mg/L±0.43 mg/L, AUC(tot)分别为39.3 (g·h)/L±5.35 (g·h)/L、30.0 (g·h)/L±3.80 (g·h)/L、44.8

(g·h)/L±4.40 (g·h)/L和5.75 (g·h)/L±1.25 (g·h)/L^[17,18]。如果给予上述剂量, 莫西沙星、加替沙星、左氧氟沙星和环丙沙星的MIC₉₀均低于C_{max}, 说明这4种药物均对药敏试验敏感的*H.pylori*有抑菌作用。但如果按照上述剂量和方法给药, 莫西沙星和左氧氟沙星的C_{max}则不能达到MPCpr₉₀, 即使莫西沙星抗菌活性较强, 半衰期较长, 仍容易引起部分*H.pylori*菌株得以选择性富集并生长, 继而产生耐药; 口服环丙沙星250 mg, 血C_{max}与MPC接近, 给药期间的大部分时间内血药浓度位于MIC与MPC之间, 容易选择出对环丙沙星耐药的突变株, 因此在*H.pylori*根除治疗时, 如果选择环丙沙星应加大剂量, 但由于环丙沙星AUC(tot)较小, 半衰期又较短, 所以综合起来并不推荐用于*H.pylori*的治疗; 加替沙星不仅MPC较低, 选择指数较小, 而且1次口服加替沙星400 mg, 其C_{max}可达到3.42 mg/L±0.74 mg/L, 明显高于MPC, 且AUC(tot)较大, 半衰期近7 h, 这就意味着每日1次口服加替沙星400 mg, 给药期间血药浓度高于MPC, 因此不仅可以清除敏感菌株, 而且也能有效预防*H.pylori*耐药突变株的产生。

总之, 莫西沙星和加替沙星的抗*H.pylori*活性强于左氧氟沙星和环丙沙星, 而加替沙星和环丙沙星限制*H.pylori*耐药突变株选择的能力优于左氧氟沙星和莫西沙星。结合体内药代动力学参数, 加替沙星不仅可以清除敏感细菌, 而且也能有效防止*H.pylori*产生耐药。

4 参考文献

- 1 胡伏莲. 中国幽门螺杆菌耐药研究现状. 胃肠病学和肝病杂志 2008; 17: 517-518
- 2 Hung KH, Sheu BS, Chang WL, Wu HM, Liu CC, Wu JJ. Prevalence of primary fluoroquinolone resistance among clinical isolates of *Helicobacter pylori* at a University Hospital in Southern Taiwan. *Helicobacter* 2009; 14: 61-65
- 3 Glocker E, Stueger HP, Kist M. Quinolone resistance in *Helicobacter pylori* isolates in Germany. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; 51: 346-349
- 4 Drlica K, Zhao X. Mutant selection window hypothesis updated. *Clin Infect Dis* 2007; 44: 681-688
- 5 Zhao X, Eisner W, Perl-Rosenthal N, Kreiswirth B, Drlica K. Mutant prevention concentration of garenoxacin (BMS-284756) for ciprofloxacin-susceptible or -resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47: 1023-1027
- 6 崔俊昌, 刘又宁, 王睿, 梁蓓蓓, 郑专杰. 氟喹诺酮类药物对临床分离金黄色葡萄球菌的防耐药变异浓度. 中华医院感染学杂志 2005; 15: 611-614
- 7 Kim JM, Kim JS, Kim N, Jung HC, Song IS. Distribution of fluoroquinolone MICs in *Helicobacter pylori* strains from Korean patients. *J Antimicrob*

- Chemother* 2005; 56: 965-967
- 8 Cattoir V, Nectoux J, Lascols C, Deforges L, Delchier JC, Megraud F, Soussy CJ, Cambau E. Update on fluoroquinolone resistance in *Helicobacter pylori*: new mutations leading to resistance and first description of a *gyrA* polymorphism associated with hypersusceptibility. *Int J Antimicrob Agents* 2007; 29: 389-396
- 9 Romano M, Iovene MR, Russo MI, Rocco A, Salerno R, Cozzolino D, Piloni AP, Tufano MA, Vaira D, Nardone G. Failure of first-line eradication treatment significantly increases prevalence of antimicrobial-resistant *Helicobacter pylori* clinical isolates. *J Clin Pathol* 2008; 61: 1112-1115
- 10 Allen GP, Deshpande LM. Determination of the mutant selection window for clindamycin, doxycycline, linezolid, moxifloxacin and trimethoprim/sulfamethoxazole against community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Int J Antimicrob Agents* 2010; 35: 45-49
- 11 Ferran AA, Kesteman AS, Toutain PL, Bousquet-Mélou A. Pharmacokinetic/pharmacodynamic analysis of the influence of inoculum size on the selection of resistance in *Escherichia coli* by a quinolone in a mouse thigh bacterial infection model. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; 53: 3384-3390
- 12 Hedlin P, Blondeau JM. Comparative minimal inhibitory and mutant prevention drug concentrations of four fluoroquinolones against ocular isolates of *Haemophilus influenzae*. *Eye Contact Lens* 2007; 33: 161-164
- 13 Homma T, Hori T, Sugimori G, Yamano Y. Pharmacodynamic assessment based on mutant prevention concentrations of fluoroquinolones to prevent the emergence of resistant mutants of *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; 51: 3810-3815
- 14 王艳, 周惠琴, 唐文. 苏州市胃肠病患者幽门螺旋杆菌耐药分析. *中国公共卫生杂志* 2010; 26: 122-123
- 15 Firsov AA, Lubenko IY, Smirnova MV, Strukova EN, Zinner SH. Enrichment of fluoroquinolone-resistant *Staphylococcus aureus*: oscillating ciprofloxacin concentrations simulated at the upper and lower portions of the mutant selection window. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; 52: 1924-1928
- 16 Kesteman AS, Ferran AA, Perrin-Guyomard A, Laurentie M, Sanders P, Toutain PL, Bousquet-Mélou A. Influence of inoculum size and marbofloxacin plasma exposure on the amplification of resistant subpopulations of *Klebsiella pneumoniae* in a rat lung infection model. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; 53: 4740-4748
- 17 Lubasch A, Keller I, Borner K, Koeppe P, Lode H. Comparative pharmacokinetics of ciprofloxacin, gatifloxacin, grepafloxacin, levofloxacin, trovafloxacin, and moxifloxacin after single oral administration in healthy volunteers. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44: 2600-2603
- 18 Cheng D, Xu WR, Liu CX. Relationship of quantitative structure and pharmacokinetics in fluoroquinolone antibacterials. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 2496-2503

■同行评价

本文学术性较好, 对临床工作有指导意义。

编辑 李薇 电编 李薇

ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) CN 14-1260/R 2010年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

汤姆森-路透公布 2009 年 *WJG* 影响因子 2.092

本刊讯 根据2010-06-18汤姆森-路透发布的2009年度期刊引证报告, *World Journal of Gastroenterology* (*WJG*) (中文刊名《世界胃肠病学杂志》) 影响因子为2.092, 论文总被引次数12 740次, 特征因子0.05832, 分别位于65种国际胃肠肝病学期刊的第33位, 8位和5位。

与2008年的影响因子(2.081), 总被引次数(10 822次), 特征因子(0.05006)相比, *WJG*在2009年国际胃肠肝病学期刊中的排名分别增加了7个百分点, 4个百分点和3个百分点. (*WJG*编辑部主任: 程剑侠 2010-06-18)

原发性胃恶性淋巴瘤的临床、内镜和病理特征24例

汪佩文, 姜海琼, 吴坚炯

■背景资料

原发性胃恶性淋巴瘤是少见病, 但近年来发病率有上升趋势, 其临床表现无特异性, 内镜表现与胃癌相似, 临床医师对其认识不足, 误诊率高。

汪佩文, 姜海琼, 吴坚炯, 上海交通大学附属第一人民医院消化科 上海市 200080

作者贡献分布: 此课题由汪佩文设计; 病例由汪佩文、姜海琼及吴坚炯收集; 本论文写作由汪佩文完成。

通讯作者: 汪佩文, 主任医师, 200080, 上海市, 上海交通大学附属第一人民医院消化科. tjw1135@126.com

收稿日期: 2010-07-19 修回日期: 2010-08-16

接受日期: 2010-08-24 在线出版日期: 2010-11-08

Clinicopathologic and endoscopic characteristics of primary gastric malignant lymphoma: an analysis of 24 cases

Pei-Wen Wang, Hai-Qiong Jiang, Jian-Jiong Wu

Pei-Wen Wang, Hai-Qiong Jiang, Jian-Jiong Wu, Department of Gastroenterology, Shanghai First People's Hospital, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200080, China

Correspondence to: Pei-Wen Wang, Department of Gastroenterology, Shanghai First People's Hospital, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200080, China. tjw1135@126.com

Received: 2010-07-19 Revised: 2010-08-16

Accepted: 2010-08-24 Published online: 2010-11-08

Abstract

AIM: To summarize the clinical, endoscopic and pathologic characteristics of primary gastric malignant lymphoma (PGML) to improve early diagnosis and facilitate prompt treatment of the disease.

METHODS: The clinicopathologic and endoscopic data for 24 PGML patients were reviewed and analyzed to summarize the clinicopathologic and endoscopic characteristics of the disease.

RESULTS: Upper abdominal pain, upper gastrointestinal bleeding, decreased appetite and emaciation were common but nonspecific clinical symptoms in PGML patients. Gastroscopic manifestations were diverse, including multiple large gastric ulcers, multiple erosions, multiple gastroduodenal ulcers, proliferative foci, and manifestations mimicking gastric cancer. The preferential sites of PGML were gastric body, antrum, and corpus-antral junction. Biopsy

yielded a diagnostic rate of 62.5%, while the rate of *Helicobacter pylori* (*H.pylori*) infection was 40%. Nineteen patients underwent surgery with subsequent chemotherapy, whereas three patients underwent chemotherapy alone. All 24 cases belonged to B-cell non-Hodgkin's lymphoma.

CONCLUSION: Preoperative diagnosis of PGML is difficult. Multiple gastroscopic examinations, multiple biopsy sites and large samples are necessary for clear diagnosis. Radical surgery with subsequent chemotherapy is preferred. *H.pylori* infection should be eradicated in patients with PGML.

Key Words: Primary gastric malignant lymphoma; Gastroscopy; Biopsy; Operation; Chemotherapy

Wang PW, Jiang HQ, Wu JJ. Clinicopathologic and endoscopic characteristics of primary gastric malignant lymphoma: an analysis of 24 cases. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(31): 3352-3355

摘要

目的: 总结原发性胃恶性淋巴瘤(PGML)的临床、内镜和病理特征以提高临床医师对PGML的诊治水平。

方法: 分析2003-01/2008-12交通大学附属第一人民医院收集的24例PGML患者的临床资料、内镜特点、辅助检查、病理结果和治疗方法。

结果: 本组病例临床表现无特异性, 有上腹痛, 上消化道出血, 纳差、消瘦等。24例胃镜检查的表现多样化, 可有巨大、多发溃疡、多发糜烂、胃增殖灶、胃、十二指肠多发溃疡和疑似胃癌。PGML肿瘤好发部位以胃体为主, 其次为胃窦、窦交界。内镜活检确诊率62.5%, 幽门螺杆菌(*H.pylori*)阳性率40%, 19例行手术联合化疗, 3例仅做化疗, 本组24例均为B细胞非霍奇金淋巴瘤。

结论: PGML术前确诊不易, 易漏诊, 需多次、多部位、深部大块活检, 结合超声胃镜可提高确诊率, 治疗应行根治术, 术后辅以化疗, *H.pylori*阳性者予抗*H.pylori*治疗。

■同行评议者

郑鹏远, 教授, 郑州大学第二附属医院消化科

关键词: 原发性胃恶性淋巴瘤; 胃镜; 活检病理; 手术; 化疗

汪佩文, 姜海琼, 吴坚炯. 原发性胃恶性淋巴瘤的临床、内镜和病理特征24例. 世界华人消化杂志 2010; 18(31): 3352-3355
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/3352.asp>

0 引言

原发性胃恶性淋巴瘤(primary gastric malignant lymphoma, PGML)占胃肠道恶性肿瘤的1%-7%。本病少见, 但近年来发病率有上升趋势, 其临床表现无特异性, 内镜表现与胃癌相似, 但治疗效果、预后比胃癌好。术前误诊率高, 因此加强对本病的认识显得尤为重要。本文分析交通大学附属第一人民医院2003-2008年收治的24例PGML患者的临床特点、内镜表现、病理特征和治疗方法, 以提高临床医师对PGML的认识, 实施合理治疗方案以提高疗效。

1 材料和方法

1.1 材料 收集2003-01/2008-12上海交通大学附属第一人民医院住院经组织病理学确诊的PGML患者24例, 其中男11例, 女13例, 年龄30-86(平均 57.50 ± 16.53)岁, 发病至确诊的时间最长的为8年, 最短的1 mo, 平均 $10.02 \text{ mo} \pm 20.94 \text{ mo}$, 临床诊断均符合Danson标准。

1.2 方法 总结分析24例PGML患者的临床表现、胃镜特点以及病理特征、部分病例还作了超声内镜、上腹部CT、骨髓穿刺以及*H.pylori*检测并探讨了其临床分期、诊断、治疗结果及预后, 对手术患者的手术前后病理进行对照。

2 结果

2.1 临床表现 患者临床表现无特异性, 内中上消化道出血7例(29.2%), 上腹痛9例(37.5%), 纳差、消瘦5例(20.8%), 上腹部不适3例(12.5%)。

2.2 实验室检查 有轻中度贫血16例, 肝、肾功能基本正常, 肿瘤指标癌胚抗原(carcino embryonic antigen, CEA)、甲胎蛋白(alpha fetoprotein, AFP)、癌抗原(cancer antigen 19-9, CA19-9)均正常。

2.3 辅助检查 24例患者胃镜多表现为病变广、多种形态的改变。肿瘤好发部位: 胃体9例(37.5%), 胃窦8例(33.3%), 窦体交界处4例(16.7%), 全胃3例(12.5%), 底部2例(8.3%); 形态学改变类似胃癌10例(41.6%), 巨大溃疡6例(25%), 胃多发溃疡2例(8.3%), 胃多发糜烂1例(4.2%), 增殖灶2例(8.3%), 多发胃十二指肠溃疡

3例(12.5%)。2例行超声胃镜提示胃黏膜层次不清, 回声不均匀; 6例骨髓穿刺中2例正常, 2例粒系增生, 1例类白血病反应, 1例有淋巴细胞浸润; 4例钡餐造影, 拟诊胃癌2例, 胃体黏膜改变1例, 胃窦、球部多发占位1例; 18例患者行上腹部增强CT, 内13例提示胃癌, 胃溃疡, 胃黏膜增厚, 间质瘤, 淋巴瘤及正常各1例, 淋巴结累及11例; 6例*H.pylori*检查, 阳性率42.9%(6/14)。

2.4 诊断和误诊情况 本组除有局部淋巴结肿大外, 均无全身淋巴结肿大, 肝脾未触及, 白细胞计数正常。24例术前胃镜确诊者15例(62.5%)。其中1例经4次胃镜, 1例3次胃镜, 2例2次胃镜才确诊, 4例经院内外病理切片会诊明确诊断, 有5例误诊为炎症, 胃溃疡4例, 胃癌1例, 疑似淋巴瘤4例。19例患者行手术治疗, 手术前后病理吻合10例(52.6%), 2例联合超声胃镜检查确诊。

2.5 免疫组织化学染色 肿瘤细胞表达白细胞共同抗原LCA21/22(95.5%); B淋巴细胞分化抗原第79分化群 α 亚群CD79 α 21/22(95.5%); UCHL-1 10/18(55.6%), BCL-2 (54.5%); λ 6/8(75%); K^+ 7/15(71.5%); I 26 14/17(82.3%)。

2.6 临床分期 按Ann-Arbor分类改良标准, 本组 I E期7例, II E期6例, IIIE期8例, IVE期3例。

2.7 病理类型 24例均为非霍奇金型淋巴瘤, 占同期恶性肿瘤的1.42%, 其中边缘区黏膜相关组织B细胞淋巴瘤(mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma, MALT)9例(37.5%), 大B细胞型淋巴瘤12例(50%), 大B细胞+MALT 3例(12.5%)。

2.8 肿瘤浸润深度 侵犯黏膜下层3例(15.8%), 浅肌层4例(21.5%), 中肌层2例(10.5%)深肌层4例(21.1%), 全层5例(26.3%), 浆膜外(31.6%), 淋巴结受累11例(57.9%)。

2.9 治疗 19/24例手术治疗, 分别采用扩大次全胃切除+胃十二指肠吻合术8例, 全胃切除5例, 胃大部切除6例, 肿瘤最大 $14 \text{ cm} \times 9.5 \text{ cm} \times 5 \text{ cm}$, 最小 $2 \text{ cm} \times 2 \text{ cm} \times 1.5 \text{ cm}$, 术后予化疗, 5例未手术, 其中3例予化疗, 化疗采用CHOP方案, 1 mo 1疗程, 共4-6个疗程。

3 讨论

PGML属于结外淋巴瘤, 发病率低, 占胃恶性肿瘤的1%-7%, 男女比例1:8, 平均年龄60岁^[1], 本组其发病率占胃恶性肿瘤1.42%, 与文献报道一致, 男女发病比例1:1.2, 平均年龄57.2岁, 与文献的相似, 发病年龄略提前。PGML常见症状有

■相关报道
任小军等报道CT误诊率达59.1%, 其误诊原因主要是对胃淋巴瘤的病理特点及CT表现认识不足。

■创新盘点
本文提出胃镜病理是诊断的金标准, 但一次活检阴性不能排除本病, 需多次、多部位、深取活检, 以提高确诊率。

■应用要点

本文总结了PGML的临床、胃镜、病理特征和治疗方法,提供较好的诊断思路,具有一定的临床应用价值。

上腹痛不适,上消化道出血,纳差、消瘦。好发部位主要以胃窦、胃体为主,也有累及全胃,与文献报道相似。中青年有长期上腹痛,多发性胃溃疡,经久不愈,一般情况相对较好者要考虑PGML可能。

PGML的诊断主要依据胃镜,可见胃内病变广泛,多部位、多形态改变,但诊断率并不高,国内文献报道胃镜活检确诊率为20%-25%,X线钡餐为32.4%-42.8%^[2,3],本组胃镜活检诊断率为62.5%,明显高于国内文献的报道,可能与多次胃镜检查结合超声胃镜,并多次、多部位活检有关。本组有5例误诊为胃癌、炎症、溃疡,4例疑诊淋巴瘤,但未找到确切证据,其中1例术前确诊为低分化腺癌,4例经院内外病理科会诊才确诊,对该病认识不足,活检取材太少,缺乏综合分析是可能的原因。4例胃肠钡餐也未提及淋巴瘤的诊断,CT也只有1例提及淋巴瘤,占5.5%,任小军等^[4]报道CT误诊率达59.1%,其误诊原因主要是对胃淋巴瘤的病理特点及CT表现认识不足,没有重视胃腔无明显狭窄、胃壁黏膜完整连续呈分层强化对胃淋巴瘤的诊断价值,没有重视广泛、多灶性病变是胃淋巴瘤的特点-广泛的胃壁浸润、多处胃壁增厚、多发结节和溃疡。有助于胃淋巴瘤与胃癌的鉴别。骨髓穿刺阳性率不高,只占16.7%,提示PGML只有晚期患者可能累及骨髓。

PGML病理组织类型主要为非霍奇金淋巴瘤,B淋巴细胞来源的霍奇金淋巴瘤少见,弥漫性大B淋巴细胞淋巴瘤占5%-6%,MALT占30%-35%,其他类型占5%^[5]。本组病例均为非霍奇金B型淋巴瘤,与文献报道相似,MALT淋巴瘤属于一种特殊类型的低度恶性肿瘤,其定义为在黏膜和腺体组织发生的具有边缘区B淋巴细胞分化和表型的结外B细胞淋巴瘤,近年来该病发病率有增加趋势^[6]。免疫组织化学显示LCA、CD79、UCHL-1、BCL-2、 λ 、 k^+ 、 $t(26)$ 阳性率较高(54.5%-95.5%)。

国内外报道手术是PGML的主要治疗手段,特别是在I E/II E期^[2,6,7],Hockey等^[1]认为根治性手术联合化疗可能是治愈PGML的最佳方案,但也有学者认为I E/II E期行辅助化疗后手术疗效好,而对III E/IV E期患者应选择先手术后化疗^[8]。本文79.2%的患者采用手术联合化疗,疗效高于单纯化疗,文献报道特殊类型的MALT淋巴瘤与*H.pylori*感染有密切关联,根除*H.pylori*可作为早期低度恶性MALT淋巴瘤的一线治疗,抗*H.pylori*

治疗可以使淋巴瘤消退^[9,10],甚至有报道^[11]还引起胃外的黏膜相关组织淋巴瘤消退。也有学者^[12-14]认为*H.pylori*治疗容易再次感染*H.pylori*而复发,治疗后需要观望和等待的阶段,有的学者^[15]提出内镜超声在长期的治疗后随访中应起重要作用。但国内大部分学者^[16]认为应尽量切除原发灶,放疗或化疗等非手术治疗方法也可以达到很好的治疗效果,本文有1例MALT淋巴瘤患者经抗*H.pylori*治疗后淋巴瘤消失,随访3年未复发。

总之,PGML的诊断主要依据胃镜和病理这一金标准,但一次活检阴性不能排除本病,需多次、多部位、深取活检,以提高诊断率。

志谢 本文得到巫协宁教授的悉心指导与帮助,在此表示衷心感谢。

4 参考文献

- 1 Hockey MS, Powell J, Crocker J, Fielding JW. Primary gastric lymphoma. *Br J Surg* 1987; 74: 483-487
- 2 袁兴华, 余宏超, 邵永平, 渠洁岩, 周卫平. 外科手术在胃淋巴瘤联合治疗中的作用(附52例报道). *中国实用外科杂志* 1995; 15: 461-464
- 3 黄开红, 林萍, 王连源, 陈为宪, 李海刚. 原发性胃恶性淋巴瘤临床、内镜与病理特点. *癌症* 2001; 20: 519-522
- 4 任小军, 章士正, 董旦君, 王丽华, 金重午. 原发性胃淋巴瘤的CT表现及误诊原因. *世界华人消化杂志* 2008; 16: 1807-1811
- 5 罗志国, 冯奉仪, 张频, 王兴元, 王奇璐. 68例原发性胃恶性淋巴瘤的临床分析. *癌症* 2004; 23: 1692-1695
- 6 樊丽琳, 陈东风. 胃黏膜相关淋巴组织淋巴瘤21例. *世界华人消化杂志* 2003; 11: 1267-1268
- 7 Roukos DH, Hottenrott C, Encke A, Baltogiannis G, Csioumis D. Primary gastric lymphomas: a clinicopathologic study with literature review. *Surg Oncol* 1994; 3: 115-125
- 8 Bellini M, Salvatore G, Di Palma R, Cataneo M, Pede A, De Martino C. [Gastric non-Hodgkin lymphoma: guidelines for the therapeutic approach] *Chir Ital* 2003; 55: 391-397
- 9 贺降福, 刘荣, 胡仕林, 王银, 陈新皓. 胃黏膜相关淋巴组织淋巴瘤临床与内镜诊断分析. *国际消化病杂志* 2007; 27: 306-308
- 10 陈清波, 常青, 王洪波, 叶春兰. 原发性胃恶性淋巴瘤的临床分析. *实用癌症杂志* 2008; 23: 500-502, 506
- 11 纪小龙. 胃淋巴瘤——一种可治愈的与Hp有关的恶性肿瘤. *世界华人消化杂志* 1997; 5: 681-683
- 12 Caletti G, Togliani T, Fusaroli P, Sabattini E, Khodadadian E, Gamberi B, Gobbi M, Pileri S. Consecutive regression of concurrent laryngeal and gastric MALT lymphoma after anti-Helicobacter pylori therapy. *Gastroenterology* 2003; 124: 537-543
- 13 Arima N, Tsudo M. Extragastric mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma showing the regression by Helicobacter pylori eradication therapy. *Br J Haematol* 2003; 120: 790-792
- 14 Valencak J, Trautinger F, Fiebigler WC, Raderer M. Complete remission of chronic plaque psoriasis and gastric marginal zone B-cell lymphoma of MALT type after treatment with 2-chlorodeoxyadenosine. *Ann Hematol* 2002; 81: 662-665
- 15 Fischbach W, Goebeler-Kolve M, Starostik P, Grein-

er A, Müller-Hermelink HK. Minimal residual low-grade gastric MALT-type lymphoma after eradication of *Helicobacter pylori*. *Lancet* 2002; 360: 547-548

16 Yeh HZ, Chen GH, Chang WD, Poon SK, Yang SS,

Lien HC, Chang CS, Chou G. Long-term follow up of gastric low-grade mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma by endosonography emphasizing the application of a miniature ultrasound probe. *J Gastroenterol Hepatol* 2003; 18: 162-167

■同行评价

本文可读性较好, 具有一定的临床意义。

编辑 曹丽鸥 电编 李薇

ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) CN 14-1260/R 2010年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

《世界华人消化杂志》出版流程

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

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

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

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

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

第五步 排版制作: 电子编辑对稿件基本情况进行审核, 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, 包括原创文章、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》保证每篇文章从投稿到刊出4 mo内完成。(编辑部主任: 李军亮 2010-01-18)

高原地区反流性食管炎胃镜检查858例

王晨, 文军宝, 原爱中, 白冬梅, 姚小军, 刘宏生

■背景资料

反流性食管炎(RE)是指胃、十二指肠内容物反流入食管引起临床症状及食管黏膜损伤的一种疾病, 胃镜下表现为食管远段黏膜破损。

王晨, 文军宝, 原爱中, 白冬梅, 姚小军, 刘宏生, 中国人民解放军第22医院消化内科 青海省格尔木市 816000

作者贡献分布: 此课题由王晨、文军宝及原爱中设计; 研究过程、数据分析由王晨、文军宝、姚小军、刘宏生及白冬梅完成; 本论文写作由王晨完成。

通讯作者: 王晨, 主治医师, 816000, 青海省格尔木市, 中国人民解放军第22医院消化内科. wangc_xhmk@163.com

收稿日期: 2010-08-14 修回日期: 2010-09-17

接受日期: 2010-09-25 在线出版日期: 2010-11-08

Prevalence of endoscopically detected reflux esophagitis in a high-altitude area of China: an analysis of 858 cases

Chen Wang, Jun-Bao Wen, Ai-Zhong Yuan, Dong-Mei Bai, Xiao-Jun Yao, Hong-Sheng Liu

Chen Wang, Jun-Bao Wen, Ai-Zhong Yuan, Dong-Mei Bai, Xiao-Jun Yao, Hong-Sheng Liu, Department of Gastroenterology, the 22nd Hospital of Chinese PLA, Golmud 816000, Qinghai Province, China

Correspondence to: Chen Wang, Department of Gastroenterology, the 22nd Hospital of Chinese PLA, Golmud 816000, Qinghai Province, China. wangc_xhmk@163.com

Received: 2010-08-14 Revised: 2010-09-17

Accepted: 2010-09-25 Published online: 2010-11-08

Abstract

AIM: To analyze the characteristics of clinical epidemiology of reflux esophagitis (RE) in a high-altitude area of China.

METHODS: A total of 11 032 patients undergoing endoscopy from January 2000 to December 2009 were included in this study. The data for RE patients were analyzed in terms of disease prevalence, age and gender.

RESULTS: The prevalence of RE was 7.78% (858/11 032). The prevalence of grade I, II and III RE was 5.65, 1.57 and 0.56%, respectively. Of all the RE patients, 92.77% had mild disease and 7.23% had severe disease. Although the severity of disease showed no correlation with age in males, a positive correlation was noted in females ($P < 0.05$). The ratio of male to female RE patients was 3.42 : 1. RE was predominantly found in patients aged 30 to 49 years. Of RE patients diagnosed with hiatal hernia (4.43%), 0.17% had Barrett's esophagus.

CONCLUSION: The prevalence of RE is 7.78% in the high-altitude area studied. RE is milder and more common in middle-aged male patients. Although the severity of RE shows no correlation with age in males, there is a positive correlation in females.

Key Words: High altitude; Reflux esophagitis; Gastroscopy

Wang C, Wen JB, Yuan AZ, Bai DM, Yao XJ, Liu HS. Prevalence of endoscopically detected reflux esophagitis in a high-altitude area of China: an analysis of 858 cases. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(31): 3356-3358

摘要

目的: 探讨高原地区反流性食管炎(reflux esophagitis, RE)的患者情况。

方法: 回顾分析中国人民解放军第22医院2000-01/2009-12经胃镜检查检查的所有病例11 032例, 根据1999年烟台全国反流性食管病/炎研讨会制定的标准分级; 对符合RE诊断病例的胃镜资料及相关信息进行分析。

结果: 10年间共检出RE患者858例, 占总胃镜检查人数的7.78%, RE I、II、III级的检出率分别为5.65%(623/11 032)、1.57%(173/11 032)、0.56%(62/11 032), 其中轻中度者92.77%, 重度者仅7.23%; 高原地区RE男性组病变程度与年龄无相关性, 女性组病变程度与年龄呈正相关($P < 0.05$)。男性病例明显多于女性比例, 男女比例为3.42 : 1; 发病年龄以30-49岁为主。食管裂孔疝见于4.43%(38/858)的病例, Barrett's食管发生率不高, 仅为0.17%。

结论: 高原地区RE以轻中度为主, 并多见于男性中青年患者。男性组病变程度与年龄无相关性, 女性组病变程度与年龄呈正相关。

关键词: 高原地区; 反流性食管炎; 胃镜检查

王晨, 文军宝, 原爱中, 白冬梅, 姚小军, 刘宏生. 高原地区反流性食管炎胃镜检查858例. *世界华人消化杂志* 2010; 18(31): 3356-3358

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/3356.asp>

■同行评议者

冯志杰, 主任医师, 河北医科大学第二医院消化内科

0 引言

反流性食管炎(reflux esophagitis, RE)是指胃、十二指肠内容物反流入食管引起临床症状及食管黏膜损伤的一种疾病;胃镜下表现为食管远段黏膜破损。本研究的目的在于了解青藏高原地区RE的胃镜检出率并分析其临床特点。

1 材料和方法

1.1 材料 回顾性分析中国人民解放军第22医院近10年间来自海拔2 800-5 300 m接受胃镜检查的所有病例。

1.2 方法 入选标准:中国人民解放军第22医院2000-01/2009-12对11 032例具有消化系统症状无胃镜检查禁忌证的门诊及住院患者行胃镜检查,诊断为RE的患者。并根据1999年烟台全国反流性食管病/炎研讨会制定的标准分级。0级:食管黏膜正常(可有组织学改变); I级:点状或条状发红,糜烂,无融合现象; II级:条状发红,糜烂,并有融合,但非全周性; III级:病变广泛,发红,糜烂,融合成全周性,或溃疡。食管裂孔疝的胃镜诊断标准为胃食管鳞状上皮交界线上移,其下方可见裂孔压迹环,两者间距超过2 cm,可见疝囊。Barrett's食管胃镜诊断标准为胃食管连接部以上的食管复层鳞状上皮被化生上皮所代替,活检见有肠腺化生者^[1]。剔除标准:胃癌、食管癌、食管胃底静脉曲张、幽门梗阻、胃潴留、食管或经胃切除术的患者等。

统计学处理 将符合以上标准的RE病例收集后再由两位以上的胃镜医师按诊断标准进行复核并汇总统计,以消除部分病例RE分级的偏差并剔除部分不合格病例。用SPSS11.0统计软件包进行统计学处理,所得计数资料行 χ^2 检验, $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 RE胃镜检出率 11 032例接受胃镜检查的病例中,共检出RE病例858例,年龄14-78(平均年龄 39.44 ± 11.81)岁,总检出率为7.78%。其中I级623例,检出率为5.65%, II级172例,检出率为1.57%, III级63例,检出率为0.56%。病变以轻中度为主, I级与II级共占92.67%(796/858)。从I级到III级,随着胃镜分级的增加,患者平均年龄无明显增加(表1)。

2.2 RE与性别关系 858例RE中,男664例,年龄14-75(平均 38.56 ± 11.52)岁,占77.39%,女194例,16-78(平均 42.40 ± 12.42)岁,占22.61%,男女之比为3.42:1;但同一病变分级中男女性平均

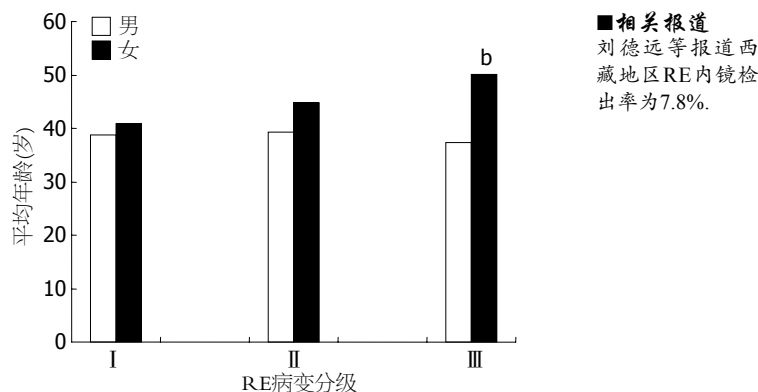


图1 不同分级患者的年龄分布。^b $P<0.01$ vs 同级男性。

表1 RE患者分级与年龄的关系

RE分级	n	所占比例(%)	年龄(岁)
I级	623	72.62	38.77 ± 11.34
II级	172	20.05	40.78 ± 13.34
III级	63	7.34	40.81 ± 12.89
合计	858	100.00	39.44 ± 11.81

年龄间差异 I、II级无统计学意义($P>0.05$), III级男女性平均年龄间差异有显著统计学意义($P<0.01$);男女两组病例中RE严重程度的比例相似,均以I级为最多,其次为II级、III级。男性组病变程度与年龄无相关性,女性组病变程度与年龄呈正相关($P<0.05$,图1)。

2.3 RE的年龄分布 其中<20岁14例(1.63%), 20-30岁158例(18.41%), 30-39岁294例(34.27%), 40-49岁238例(27.74%), 50-59岁89例(10.37%), ≥60岁65例(7.58%);高原地区原发性RE以30-49岁为多见。各年龄段中均以病变较轻的I、II级为主(表2)。

2.4 RE与消化性溃疡 15.62%(134/858)的RE患者并存消化性溃疡,以十二指肠溃疡为主,占76.87%(103/134),其次为胃溃疡与复合性溃疡,分别占15.67%(21/134)与7.46%(10/134)。

2.5 RE与食管裂孔疝 胃镜发现食管裂孔疝36例,检出率为0.32%;19.44%(7/36)的食管裂孔疝患者伴有反流性食管炎,占同期反流性食管炎的4.2%。

2.6 RE与并发症 RE并发症的发生率不高,胃镜检出Barrett's食管19例,检出率为0.17%。胃镜诊断的Barrett's食管患者均无食管炎表现。

3 讨论

胃和(或)十二指肠内容物反流入食管产生症状或并发症即为胃食管反流病,其中内镜检查阳

■同行评价

本文选题较好,有一定的新颖性,对了解反流性食管炎在高原地区的发病状况有一定的参考价值。

表 2 RE的年龄及严重程度分布情况 (%)

RE分级	<20岁	20-30岁	30-40岁	40-50岁	50-60岁	≥60岁	合计
I级	10	116	222	176	63	36	623
II级	2	30	54	47	17	22	172
III级	2	12	18	15	9	7	63
合计	14	158	294	238	89	65	858

性即内镜下可见黏膜破损者称为糜烂性胃食管反流病,也称为RE,而内镜检查未见黏膜破损者称为非糜烂性胃食管反流病,后者包括食管黏膜有细微改变的食管炎(如黏膜发红、肿胀等)和内镜检查没有异常者^[2]。

国内对胃食管反流病的基础和临床研究的日益重视,但是目前对高海拔地区人群的胃食管反流病的发病情况及相关临床资料仍缺乏比较详细的研究,为此,我们将中国人民解放军第22医院近10年间来自海拔2 800-5 300 m接受胃镜检查的所有病例资料进行回顾分析。国内文献报道,RE内镜检出率为1.5%-5.39%^[3-7],本组中高原地区RE检出率为7.78%,高于内地文献报道,与刘德远等^[8]报道西藏地区RE内镜检出率7.8%相近;由于各研究采用的RE诊断标准有所不同,且由于地区经济、文化等的差异,接受内镜检查的群体可能有所不同,因而对RE内镜检出率难于作出准确的比较,但仍能为临床提供一些有价值的信息。

国内外相关报道均提示RE一般以轻中度为主,病变多见于男性及年长者,病变严重程度随年龄而增加等基本特征^[3,7,9,10]。本研究结果显示高原地区RE的胃镜检出率为7.78%,轻中度的I级与II级共占92.67%,男性多于女性,男女病例之比为3.42:1,男女两组病例中RE严重程度的比例相似($P>0.05$),均以I级为最多,其次为II级、III级,与国内报道相似;但从I级到III级,随着胃镜分级的增加,患者平均年龄无明显增加;这与内地平原报道资料随内镜分级增加,患者平均年龄逐渐增加有所不同^[2]。RE多见于男性中青年患者,男性组病变程度与年龄无相关性,可能与高原地区男性大量饮酒有关;女性组病变程度与年龄呈正相关,且病变的严重程度与女性患者年龄的增加呈正相关。

本研究显示高原地区15.62%的RE患者并存消化性溃疡,尽管这些患者不存在幽门梗阻及明显的胃潴留。RE与消化性溃疡同属酸性相

关性疾病,两者的发病均与胃酸对黏膜的损害有关。可能与消化性溃疡引起的胃排空障碍或十二指肠胃反流等因素有关。

本组中食管裂孔疝检出率为0.32%,占同期检出的RE患者的4.2%,内地资料显示食管裂孔疝是RE的常见病因^[11],但本组资料检出率及占同期RE的百分率偏低,可能与我们医师对食管裂孔疝的内镜下诊断认识不够有关。

本组中Barrett's食管检出率为0.17%,明显低于文献^[12]报道,可能与目前我们对Barrett's食管的认识有所局限,与以前Barrett's食管尚无统一内镜标准有关。

4 参考文献

- 1 许国铭,李兆申. 上消化道内镜学. 上海: 上海科学技术出版社, 2003: 256
- 2 Labenz J, Jaspersen D, Kulig M, Leodolter A, Lind T, Meyer-Sabellek W, Stolte M, Vieth M, Willich S, Malfertheiner P. Risk factors for erosive esophagitis: a multivariate analysis based on the ProGERD study initiative. *Am J Gastroenterol* 2004; 99: 1652-1656
- 3 李兆申,王雯,许国铭,于凤海,邹多武,孙振兴. 反流性食管炎1827例临床分析. *中华内科杂志* 2001; 40: 9-12
- 4 王士杰,丛庆文,王其彰,戴继红,吴明利,张立玮,王顺平. 内镜对反流性食管炎诊断价值探讨. *中华消化内镜杂志* 1997; 14: 306-308
- 5 陈中和,张梅,莫略,温永通,汤宗示. 反流性食管炎的患病情况分析. *中华消化内镜杂志* 1999; 16: 354-355
- 6 王进海,罗金燕,龚均,陶明. 反流性食管炎的流行病学及临床研究. *中华消化内镜杂志* 2000; 17: 345-348
- 7 潘国宗,许国铭,郭慧平,柯美云,韩少梅,李兆申,方秀才,邹多武,鲁素彩,刘婧. 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
- 8 刘德远,刘素华. 高原地区反流性食管炎153例临床分析. *中华消化内镜杂志* 2006; 23: 63
- 9 Rosaida MS, Goh KL. Gastro-oesophageal reflux disease, reflux oesophagitis and non-erosive reflux disease in a multiracial Asian population: a prospective, endoscopy based study. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2004; 16: 495-501
- 10 El-Serag HB, Petersen NJ, Carter J, Graham DY, Richardson P, Genta RM, Rabeneck L. Gastroesophageal reflux among different racial groups in the United States. *Gastroenterology* 2004; 126: 1692-1699
- 11 赵子仪,何伟,陈星,徐富星. 反流性食管炎内镜检出率及临床分析. *中华消化杂志* 2005; 25: 507
- 12 侯晓华,郑丽端,王道蓉. Barrett's食管的病因与流行病学. *中华消化杂志* 2006; 26: 114-115

HPV16E6、TAP2与新疆哈萨克族食管癌交互作用的1:2病例对照

蔡金凤, 马彦清, 徐莉, 曾同霞, 李锋, 廖佩花, 秦江梅

蔡金凤, 曾同霞, 李锋, 秦江梅, 新疆地方病与民族高发病省部共建重点实验室 石河子大学医学院预防医学系 新疆维吾尔自治区石河子市 832002
马彦清, 徐莉, 伊犁哈萨克自治州友谊医院胸心外科 新疆维吾尔自治区伊犁哈萨克自治州伊宁市 835000
廖佩花, 新疆生产建设兵团医院科教科 新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市 830002
国家自然科学基金资助项目, No. 30660161
国家重点基础研究发展规划基金资助项目(973计划), No. 2005CCA03700
2006年教育部科学技术研究重点基金资助项目, No. 206167
国家973计划前期研究专项基金资助项目, No. 2007CB516804
作者贡献分布: 此课题由秦江梅与李锋设计并组织实施; 蔡金凤、马彦清及徐莉负责问卷调查与标本的收集工作; 蔡金凤、曾同霞及廖佩花参与HPV16E6、Tap2基因多态实验与数据分析; 本论文写作由蔡金凤与秦江梅完成。
通讯作者: 秦江梅, 教授, 832002, 新疆维吾尔自治区石河子市, 新疆地方病与民族高发病省部共建重点实验室, 石河子大学医学院预防医学系. qinjiangmei@yahoo.com.cn
收稿日期: 2010-08-12 修回日期: 2010-09-21
接受日期: 2010-09-27 在线出版日期: 2010-11-08

Association of HPV16 E6 infection and TAP2 gene polymorphisms with esophageal cancer risk in a Kazakh population: a 1:2 matched case-control study

Jin-Feng Cai, Yan-Qing Ma, Li Xu, Tong-Xia Zeng, Feng Li, Pei-Hua Liao, Jiang-Mei Qin

Jin-Feng Cai, Tong-Xia Zeng, Feng Li, Jiang-Mei Qin, Key Laboratory of Xinjiang Endemic and Ethnic Diseases, Department of Preventive Medicine, Shihezi University, Shihezi 832002, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China

Yan-Qing Ma, Li Xu, Department of Gastroenterology, Youyi Hospital of Yili Canton, Yining 835000, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China

Pei-Hua Liao, Department of Scientific Education, Hospital of Xinjiang Production and Construction Corps, Urumqi 830002, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China

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

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

Received: 2010-08-12 Revised: 2010-09-21

Accepted: 2010-09-27 Published online: 2010-04-08

Abstract

AIM: To evaluate the association of human papillomavirus 16 E6 (HPV16 E6) infection and transporter associated with antigen processing 2 (TAP2) 2379/2665/2687 genetic polymorphisms with the risk of esophageal cancer (EC) in a high incidence area for EC in Xinjiang, China.

METHODS: A case-control study was conducted. Ninety EC patients and 180 controls were included in the study. Each patient was matched to two controls. HPV16 E6 infection was identified by PCR-SSP, and TAP2 2379/2665/2687 genotypes were detected by PCR-RFLP.

RESULTS: The rate of HPV16 E6 infection and the genotype frequencies of TAP2 2379/2665 polymorphisms differed significantly between EC patients and controls ($\chi^2 = 11.617, 11.604, 4.451; P = 0.001, 0.001, 0.035$). The genotype frequency of TAP2 2687 polymorphism showed no significant difference between the two groups of subjects ($\chi^2 = 0.586, P = 0.444$). No interaction was found among HPV16 E6 infection and TAP2 2379/2665 genetic polymorphisms, while interaction between TAP2 2379/2665 genetic polymorphisms was noted.

CONCLUSION: HPV16 E6 infection and TAP2 2379/T2665 genetic polymorphisms are important risk factors for EC in the Kazakh population.

Key Words: Kazakh; Esophageal cancer; Human papillomavirus 16 E6; Transporter associated with antigen processing 2; Genetic polymorphism

Cai JF, Ma YQ, Xu L, Zeng TX, Li F, Liao PH, Qin JM. Association of HPV16 E6 infection and TAP2 gene polymorphisms with esophageal cancer risk in a Kazakh population: a 1:2 matched case-control study. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(31): 3359-3365

摘要

目的: 探讨HPV16E6感染、Tap2379、Tap2665、Tap2687基因多态性对新疆哈萨克族(简称哈族)食管癌产生的影响及相互关系。

■背景资料

人乳头瘤病毒(HPV)的E6、E7原癌蛋白可引起食管细胞永生,这可能是食管癌发生的危险因素之一;人类白细胞抗原(HLA)-II类基因区的LMP7/Tap2基因多态性与安阳地区HPV相关食管癌有关,并推测宿主的某些免疫相关基因将影响宿主对HPV病毒的清除,而导致细胞恶性转化。

■同行评议者

王健生, 教授, 西安交通大学医学院第一附属医院肿瘤外科

■研究前沿

食管癌病因及发病机制至今尚未完全阐明,目前认为这是环境因素和遗传因素共同作用的结果。食管癌的病因可归结为致癌物活化或解毒作用、DNA修复能力、HPV感染和其他已知或未知因素产生的联合作用。国内外研究结果表明高危型HPV感染与高发区食管癌发生关系密切。因此,食管癌与HPV感染及其与免疫相关基因之间的相互关系是一个值得研究的问题。

方法: 采用1:2配比的病例对照研究,收集哈族食管癌90例,对照180例,运用序列特异性聚合酶链反应(PCR-SSP)检测HPV16E6的感染率,运用序列特异性引物聚合酶链反应-限制片段长度多态技术(PCR-RFLP)检测Tap2379、Tap2665、Tap2687基因多态性,统计分析采用 χ^2 检验,交互作用采用分层分析。

结果: 食管癌组与对照组间比较: HPV16E6、Tap2379、Tap2665基因型差异均有统计学意义($\chi^2 = 11.617, P = 0.001$; $\chi^2 = 11.604, P = 0.001$; $\chi^2 = 4.451, P = 0.035$), Tap2687基因型差异无统计学意义($\chi^2 = 0.586, P = 0.444$)。HPV16E6感染与Tap2379、Tap2665基因多态性间不存在交互作用; Tap2379与Tap2665基因多态性存在交互作用。

结论: HPV16E6感染, Tap2379、Tap2665多态性是哈族食管癌的危险因素, Tap2379位多态性与Tap2665位多态性对哈族食管癌的发生存在效应修饰作用。

关键词: 哈萨克族; 食管癌; 人乳头瘤病毒16E6; 抗原加工相关转运体; 遗传多态性

蔡金凤, 马彦清, 徐莉, 曾同霞, 李锋, 廖佩花, 秦江梅. HPV16E6、TAP2与新疆哈萨克族食管癌交互作用的1:2病例对照. 世界华人消化杂志 2010; 18(31): 3359-3365
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/3359.asp>

0 引言

人乳头瘤病毒(human papillomavirus, HPV)在感染细胞中以两种形式存在,一种是病毒DNA与宿主细胞染色体相整合,另一种是病毒DNA游离于宿主细胞染色体外。HPV感染宿主细胞后的致癌作用与HPV DNA整合入宿主细胞有关^[1]。研究显示: HPV的E6、E7原癌蛋白可引起食管细胞永生,这可能是食管癌发生的危险因素之一^[2,3]。凡致癌的生物因素(如病毒)均不会引起急性传染性疾病的发生,而是一个长期的慢性过程,同时需要机体的遗传易感因素的存在。细胞的癌变是一个多因素、多阶段、多基因的复杂过程,HPV感染后要经过很长时间才能导致食管癌,而多种基因的多态性可能在HPV相关的食管癌中发挥着遗传易感作用或保护作用。抗原加工相关转运体(transporter of antigen processing, Tap)是抗原呈递机制中重要的一员,在人类组织相容性复合体(major histocompatibility complex, MHC)-I类分子的成熟及膜表面表达中起着十分重要的作用, Tap基因的缺失或突变可能是导

致Tap表达下降或功能障碍的一个主要原因,当Tap功能障碍或表达下降都将导致肿瘤抗原不能被有效地转运,可能导致肿瘤逃逸免疫监视^[4]。Cao等^[5]研究显示: 人类白细胞抗原(human leukocyte antigen, HLA)-II类基因区的LMP7/Tap2基因多态性与安阳地区HPV相关食管癌有关,并推测宿主的某些免疫相关基因将影响宿主对HPV病毒的清除,而导致细胞恶性转化。因此,食管癌与HPV感染及其与免疫相关基因之间的相互关系是一个值得研究的问题。本研究利用1:2病例对照研究,采用分子生物学方法,对哈萨克族(简称哈族)食管癌病例和对照组人群进行HPV感染的检测,并从分子水平探讨与HPV感染有关的免疫相关基因Tap2的基因型和等位基因频率,比较其在食管癌病例和对照中的分布,分析HPV感染及与免疫相关基因遗传多态性的关系及相互间的交互作用,探讨哈族食管癌高发的原因。

1 材料和方法

1.1 材料 2006-11/2010-03新疆北部哈族聚集地区的6所医院共收集哈族新发食管癌病例90例,其中男58例,女32例;对照180例,其中男116例,女64例。对照组部分来源于同一所医院门诊胃镜非食管疾病患者,部分来源于食管癌高发区正常人群,所有标本均经组织病理学确诊或排除。对照的匹配条件: 同民族、同性别、年龄相差不超过5岁、居住同一地区。患者和对照组均已签署知情同意书。主要仪器与试剂: PCR仪(德国Biometra公司); 离心机(德国Thermo公司); 紫外分光光度仪(北京普析通用仪器公司); 琼脂糖(上海杰瑞公司); PCR扩增试剂: 三磷酸碱基脱氧核苷酸(dNTP), Taq酶, 10×PCR Buffer及内切酶*Msp* I (大连宝生物公司), *Bst*u I (Fermentas), *Bfa* I (大连宝生物公司)。

1.2 方法

1.2.1 DNA抽提、PCR扩增及酶切: 食管癌病例及对照均取新鲜全血; 食管癌病例取石蜡包埋组织,对照取正常食管新鲜黏膜组织, -80℃低温保存备用。基因组DNA提取采用酚-氯仿-异戊醇法; 所有抽提的DNA均经1%琼脂糖凝胶电泳验证。PCR扩增所使用的引物参考文献[6-8](表1)。

HPV16E6 PCR反应总体积25 μ L, 基因组DNA 2 μ L, 引物(20 μ mol/L)各0.8 μ L, dNTP 2.0 μ L, Taq酶(5 U/ μ L)0.2 μ L, 10×PCR Buffer(含 Mg^{2+})2.5 μ L。PCR扩增条件为: 94℃预变性5 min,

表 1 PCR扩增所使用的引物序列

引物名称	引物序列	扩增长度(bp)
HPV16E6	For: 5'-GACCCAGAAAGTTACCACAG-3' Rev: 5'-CACAACGGTTTGTGTATTG-3'	268
Tap2379	For: 5'-GCCCGTGCCTTGACCTGCGC-3' Rev: 5'-ACCCCCAAGTGGAGCAC-3'	213
Tap2665	For: 5'-GGTGATTGCTCACAGGCTGCCG-3' Rev: 5'-CACAGCTCTAGGGAAACTC-3'	227
Tap2687	For: 5'-ACAGTGCTGGTGATTGCTC-3' Rev: 5'-CACAGCTCTAGGGAAACTC-3'	233

■ 相关报道

Furumoto等研究发
现HPV感染宿主
细胞后的致癌作
用与HPV DNA整
合入宿主细胞有
关. 许春雷等采用
免疫组织化学法
对食管癌的研究
表明, HPV16E6、
E7蛋白在食管癌
组织中的表达要
高于正常食管黏
膜组织.

94℃ 45 s、58℃ 45 s、72℃ 45 s, 共35个循环, 最后72℃延伸10 min. Tap2379和Tap2665反应总体积25 μL, 基因组DNA 2 μL, 引物(25 μmol/L)各0.8 μL, dNTP 2.0 μL, Taq酶(2.5 U/μL)0.4 μL, 10×PCR Buffer(含Mg²⁺)2.5 μL. PCR扩增条件为: 94℃预变性5 min, 94℃ 45 s、56℃ 45 s、72℃ 45 s, 共35个循环, 最后72℃延伸10 min. Tap2687反应总体积25 μL, 基因组DNA 2 μL, 引物(25 μmol/L)各0.4 μL, dNTP 2.0 μL, Taq酶(2.5 U/μL)0.4 μL, 10×PCR Buffer(含Mg²⁺)2.5 μL. PCR扩增条件为: 94℃预变性5 min, 94℃ 40 s、53℃ 45 s、72℃ 50 s, 共35个循环, 最后72℃延伸5 min. Tap2379 PCR产物用*Bst*I 内切酶酶切, Tap2665 PCR产物用*Msp*I 内切酶酶切, Tap2687 PCR产物用*Bfa*I 内切酶酶切, 37℃水浴12 h.

1.2.2 PCR产物及酶切产物鉴定: 2%和3%琼脂糖凝胶电泳分别用于鉴定HPV16E6阳性率和Tap2379、Tap2665、Tap2687基因型, 用DNA Marker I (100-600 bp)作为参照. HPV16E6阳性者出现268 bp的目的片段, 阴性者不出现; Tap2379基因型分3种: Val(G)/Val(G)、Val(G)/Ile(A)、Ile(A)/Ile(A), 片段长度分别为193 bp+20 bp、213 bp+193 bp+20 bp、213 bp; Tap2665基因型分3种: Thr(A)/Thr(A)、Thr(A)/Ala(G)、Ala(G)/Ala(G), 片段长度分别为227 bp、227 bp+207 bp+20 bp、207 bp+20 bp; Tap2687基因型分3种: Gln(Q)/Gln(Q)、Gln(Q)/Stop(S)、Stop(S)/Stop(S), 片段长度分别为223 bp+10 bp、223 bp+127 bp+96 bp+10 bp、127 bp+96 bp+10 bp.

统计学处理 使用Epidata建立数据库, 采用SPSS13.0统计软件进行分析, 以1:2配对资料 χ^2 检验、*P*值、*OR*值及95%CI确定HPV16E6阳性率及Tap2379、Tap2665、Tap2687基因多态性在食管癌组和对照组中的分布差异, 1:2配对资料 χ^2 检验涉及到的公式^[3]有: n_2 的期望值:

$E(n_2) = (n_2+n_4)/3$, n_2 的方差: $\text{Var}(n_2) = 2(n_2+n_4)/9$, n_1 的期望值: $E(n_1) = 2(n_1+n_3)/3$, n_1 的方差: $\text{Var}(n_1) = 2(n_1+n_3)/9$, $\chi^2 = [n_2-E(n_2)+n_1-E(n_1)]^2 / [\text{Var}(n_2)+\text{Var}(n_1)]$, $OR = (n_1+2n_2)/(2n_3+n_4)$.

2 结果

2.1 一般情况 食管癌组与对照组性别差异无统计学意义($\chi^2 = 0.000$, $P = 1.000$); 年龄差异无统计学意义($t = 1.355$, $P = 0.177$). Hardy Weinberg遗传平衡检验人群Tap2379、Tap2665、Tap2687基因型频率, 差异均无统计学意义($\chi^2 = 0.976$, $P > 0.05$; $\chi^2 = 0.770$, $P > 0.05$; $\chi^2 = 1.116$, $P > 0.05$), 说明这三者基因型频率已达到遗传平衡, 具有人群代表性. 对所有HPV16E6及Tap2379、Tap2665基因型频率的PCR扩增产物用2.0%的琼脂糖凝胶电泳鉴定, 扩增产物的目的片段分别为268 bp、213 bp和227 bp(图1-3). 对Tap2 PCR扩增产物进行特异性内切酶酶切, 3%琼脂糖凝胶电泳用于鉴定Tap2基因型, 用DNA Marker I (100-600 bp)作为参照. Tap2379 PCR产物用*Bst*I 内切酶酶切, 其基因型分3种: Val(G)/Val(G)、Val(G)/Ile(A)、Ile(A)/Ile(A), 片段长度分别为193 bp+20 bp、213 bp+193 bp+20 bp、213 bp; Tap2665 PCR产物用*Msp*I 内切酶酶切, 其基因型分3种: Thr(A)/Thr(A)、Thr(A)/Ala(G)、Ala(G)/Ala(G), 片段长度分别为227 bp、227 bp+207 bp+20 bp、207 bp+20 bp(图4, 5).

2.2 HPV16E6、Tap2基因多态性与哈族食管癌的关系 单因素条件Logistic回归显示: 食管癌组和对照组, HPV16E6、Tap2379、Tap2665基因型差异均有统计学意义($\chi^2 = 11.617$, $P = 0.001$; $\chi^2 = 11.604$, $P = 0.001$; $\chi^2 = 4.451$, $P = 0.035$), Tap2687基因型差异无统计学意义($\chi^2 = 0.586$, $P = 0.444$, 表2).

2.3 HPV16E6与Tap2基因多态性的交互作用

■创新盘点

本研究在前期HPV16E6、HLADR9、Tap2基因多态性与新疆哈萨克族人群食管癌关系的研究基础之上,进一步探讨了HPV16E6、Tap2与新疆哈萨克族食管癌交互作用,对于了解HPV在食管癌的发生中的可能致癌机制具有一定的意义。

表 2 HPV16E6、Tap2基因多态性与哈萨克族食管癌的关系

	病例n(%)	对照n(%)	P值	OR(95%CI)
HPV16E6				
-	63(70.00)	158(87.78)		1.000
+	27(30.00)	22(12.22)	0.001	3.159(1.630-6.122)
Tap2379				
G/G	57(63.33)	150(83.33)		1.000
G/A	27(30.00)	26(14.44)	0.003	2.525(1.366-4.670)
A/A	6(6.67)	4(2.22)	0.063	3.822(0.932-15.684)
G/G	57(63.33)	150(83.33)		1.000
G/A+A/A	33(36.67)	30(16.67)	0.001	2.694(1.523-4.764)
Tap2665				
A/A	43(47.78)	111(61.67)		1.000
A/G	38(42.22)	57(31.67)	0.056	1.686(0.986-2.883)
G/G	9(10.00)	12(6.67)	0.180	1.907(0.742-4.903)
A/A	43(47.78)	111(61.67)		1.000
A/G+G/G	47(52.22)	69(38.33)	0.035	1.724(1.039-2.860)
Tap2687				
T/T	32(35.56)	73(40.56)		1.000
T/C	30(33.33)	62(34.44)	0.770	1.090(0.612-1.941)
C/C	28(31.11)	45(25.00)	0.273	1.421(0.758-2.664)
T/T	32(35.56)	73(40.56)		1.000
T/C+C/C	58(64.44)	107(59.44)	0.444	1.218(0.735-2.016)

表 3 HPV16E6与Tap2379、Tap2665基因多态性的交互作用

	HPV16E6	病例n	对照n	χ^2 值	P值	OR(95%CI)
Tap2379-	-	38	133			1.000
Tap2379-	+	19	17	13.915	0.000	3.912(1.853-8.257)
Tap2379+	-	25	25	14.647	0.000	3.500(1.807-6.780)
Tap2379+	+	8	5	7.974	0.005	5.600(1.731-18.117)
Tap2665-	-	26	97			1.000
Tap2665-	+	17	14	13.972	0.000	4.530(1.977-10.382)
Tap2665+	-	37	61	7.390	0.007	2.263(1.248-4.103)
Tap2665+	+	10	8	8.056	0.005	4.663(1.672-13.004)

以Tap2379突变杂合型(G/A)和突变纯合型(A/A)为暴露,用“+”表示; Tap2379野生纯合型(G/G)为非暴露,以“-”表示;以Tap2665突变杂合型(A/G)和突变纯合型(G/G)为暴露,用“+”表示; Tap2665野生纯合型(A/A)为非暴露,以“-”表示。

2.3.1 HPV16E6阳性和Tap2379基因多态性的交互作用: 以两因素均为阴性为对照, HPV16E6阴性、Tap2379阳性的个体发生食管癌的风险为3.500(95%CI: 1.807-6.780); HPV16E6阳性、Tap2379阴性的个体发生食管癌的风险为3.912(95%CI: 1.853-8.257); HPV16E6、Tap2379两者均为阳性的个体发生食管癌的风险为5.600(95%CI: 1.731-18.117), 其仅稍大于两者单独作用之和, 提示HPV16E6阳性与Tap2379基因

多态性无交互作用(表3)。

2.3.2 HPV16E6阳性和Tap2665基因多态性的交互作用: 以两因素均为阴性为对照, HPV16E6阴性、Tap2665阳性的个体发生食管癌的风险为2.263(95%CI: 1.248-4.103); HPV16E6阳性、Tap2665阴性的个体发生食管癌的风险为4.530(95%CI: 1.977-10.382); HPV16E6、Tap2665两者均为阳性的个体发生食管癌的风险为4.663(95%CI: 1.672-13.004),

表 4 Tap2379与Tap2665基因多态性的交互作用

Tap2665	Tap2379	病例(n)	对照(n)	χ^2 值	P值	OR(95%CI)
-	-	27	89			1.000
-	+	30	61	2.400	0.121	2.397(1.105-5.202)
+	-	16	22	5.042	0.025	1.621(0.878-2.994)
+	+	17	8	19.164	0.000	7.005(2.725-18.008)

以Tap2379突变杂合型(G/A)和突变纯合型(A/A)为暴露, 用“+”表示; Tap2379野生纯合型(G/G)为非暴露, 以“-”表示; 以Tap2665突变杂合型(A/G)和突变纯合型(G/G)为暴露, 用“+”表示; Tap2665野生纯合型(A/A)为非暴露, 以“-”表示。

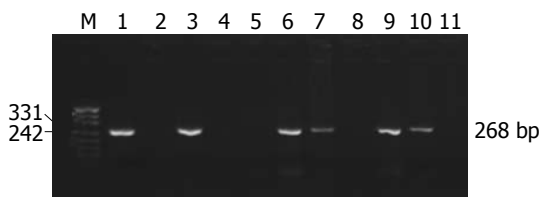


图 1 HPV16E6 PCR扩增电泳图. M: DNA Marker; 1: 阳性对照, 2: 阴性对照, 3、6、7、9、10: 阳性, 4、5、8、11: 阴性。

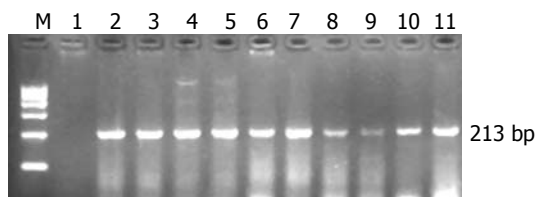


图 2 Tap2379 PCR电泳图. M: DNA Marker; 1: 阴性对照; 2-11: 阳性。

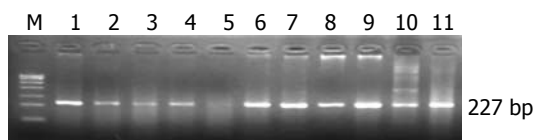


图 3 Tap2665 PCR扩增电泳图. M: DNA Marker; 1-4, 6-11: 阳性; 5: 阴性对照。

其危险性稍高于两者单独作用之和, 提示HPV16E6阳性与Tap2665基因多态性不存在交互作用(表3)。

2.3.3 Tap2379、Tap2665基因多态性的交互作用: 以两因素均为阴性为对照, Tap2379阴性、Tap2665阳性的个体发生食管癌的风险为1.621(95%CI: 0.878-2.994); Tap2379阳性、Tap2665阴性的个体发生食管癌的风险为2.397(95%CI: 1.105-5.202); Tap2379与Tap2665基因多态性两者均为阳性的个体发生食管癌的风险为7.005(95%CI: 2.725-18.008), 其远大于两者单独作用之和, 提示Tap2379与Tap2665基因多

应用要点

本研究从分子水平分析HPV感染与Tap2基因遗传多态性的关系及其相互间的交互作用, 为食管癌的防治提供有价值的参考依据。

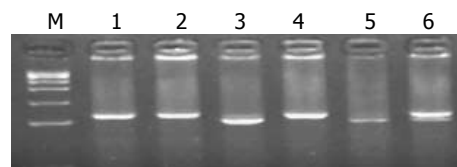


图 4 Tap2379酶切图. M: DNA Marker; 1、2、4: A/A型; 3、5: G/G型; 6: G/A型。

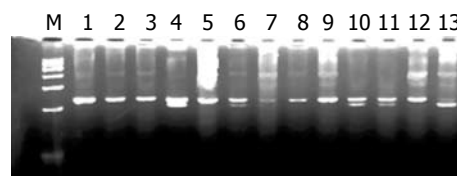


图 5 Tap2665酶切图. M: DNA Marker; 1-3、5、7-9、12: A/A型; 4、6、10、11: A/G型; 13: G/G型。

态性存在交互作用(表4)。

3 讨论

分子生物学和流行病学已证实HPV16在宫颈癌的发生中具有重要作用, 但与食管癌的关系不明确。高危型HPV E6和E7基因主要涉及细胞转化, 当HPV的DNA整合到宿主细胞核内基因组中, 激活调节病毒生长的E6和E7基因片段, 使其无限转录, 从而导致癌变的发生^[9]。许春雷等^[3]采用免疫组织化学法对食管癌的研究表明, HPV16E6、E7蛋白在食管癌组织中的表达要高于正常食管黏膜组织($P<0.05$), 推测二者可能是食管癌发生、发展的重要因素之一。邹赛英等^[10]采用PCR及免疫组织化学技术对104例食管鳞癌进行HPV E6蛋白的检测, 发现HPV16E6在食管鳞癌的发生发展中有重要的作用。刘文康等^[11]采用PCR技术检测40例食管鳞癌和20例正常食管黏膜中HPV16E6、E7基因, 发现与二者与食管鳞癌的发生和发展有关。本研究通过PCR-SSP技术检测食管癌组及对照组中HPV16E6

■同行评价

本文可读性和科学性较好, 对于了解HPV在食管癌发生中的可能致癌机制具有一定的意义。

的感染率, 结果发现90例食管癌中HPV16E6感染者有27例, 高于对照组(30.00% vs 12.22%, $P = 0.000$), HPV16E6感染的个体发生食管癌的风险是HPV16E6阴性个体的3.159倍(95%CI: 1.630-6.122), 与上述研究结果一致, 也与本课题组前期研究结果一致^[12,13]。

Tap是一种属于ATP结合匣超家族的转运蛋白, 由Tap1和Tap2两个亚单位组成, 并以异二聚体的形式发挥作用, Tap2基因多态性与多种恶性肿瘤的发生相关, 且其与汉族食管癌存在相关性^[5]。本研究采用PCR-RFLP技术对食管癌组与对照中的Tap2基因多态性进行检测, 结果显示: Tap2379为哈族食管癌的危险因素($\chi^2 = 11.604$, $P = 0.001$), 与本课题组前期研究结果一致^[14]; Tap2665是哈族食管癌的危险因素($\chi^2 = 4.451$, $P = 0.035$), 与本课题组前期研究结果有所不同, 其可能的原因是: HPV检测需要用到食管黏膜组织, 考虑到伦理道德, 对照不可能都是正常人群, 本课题的对照有一部分是门诊胃镜检查患有胃炎等消化系炎症的患者, 可能因此导致食管癌组及对照组之间的基因多态性的差异变小; Tap2687未发现有此作用($\chi^2 = 0.586$, $P = 0.444$), 其原因可能是: 肿瘤细胞在与宿主的相互作用中, 为求生存可建立一系列免疫逃避机制以抵抗机体免疫系统的攻击。

研究发现, 免疫相关基因与HPV感染机体后的病毒清除过程有关, Cao等^[5]研究显示HLA-II类基因区的LMP7/Tap2基因多态性与安阳地区HPV相关食管癌有关, 并推测宿主的某些免疫相关基因将影响宿主对HPV病毒的清除, 而导致细胞恶性转化。本研究交互作用显示: HPV16E6阳性与Tap2379、Tap2665基因多态性不存在交互作用, 可能是由于本课题的对照有一部分是门诊胃镜检查患有胃炎等消化系炎症的患者, 从而导致食管癌组及对照组之间的差异变小, 掩盖了他们之间的真实关系; Tap2379与Tap2665基因多态性存在交互作用, Tap2379、Tap2665两者均为阳性的个体发生食管癌的危险性为两因素均为阴性者的7.005倍(95%CI: 2.725-18.008), 其共同作用远大于两因素单独作用之和[单独Tap2379基因多态阳性的个体发生食管癌的风险为2.397(95%CI: 1.105-5.202), 单独Tap2665基因多态阳性的个体发生食管癌的风险为1.621(95%CI: 0.878-2.994)], 其原因可能是: Tap2379及Tap2665是Tap2基因座上相邻的两个多态位点, 在抗原呈递时, Tap2379及Tap2665

单独的多态改变均会使Tap表达下降或功能障碍, 使得抗原结合槽无法形成, 当Tap2379及Tap2665共同作用时, Tap表达下降或功能上的障碍发生叠加, 此时, Tap上的ATP酶就在大程度上无法被激活, Tap二聚体结构也不会发生改变, 跨膜通道不开放的个数增加, 胞质侧的抗原肽被转位于内质网腔内的个数减少^[15], 与内质网中新合成组装完整的MHC-I α/β 2m分子上的肽结合沟槽结合个数也减少, 形成稳定的MHC-I抗原肽复合物的个数也必然减少, 使其无法经分泌途径表达于APC表面, 无法被CD8⁺ T淋巴细胞识别而引起免疫应答, 导致肿瘤抗原被有效转运的作用降低, 故使肿瘤逃逸免疫监视的效应增强。但HPV与免疫相关基因遗传多态性的共同致癌机制仍需进一步深入研究, 为食管癌的防治提供确切的生物学依据。

4 参考文献

- 1 Furumoto H, Irahara M. Human papilloma virus (HPV) and cervical cancer. *J Med Invest* 2002; 49: 124-133
- 2 Sashiyama H, Shino Y, Sakao S, Shimada H, Kobayashi S, Ochiai T, Shirasawa H. Alteration of integrin expression relates to malignant progression of human papillomavirus-immortalized esophageal keratinocytes. *Cancer Lett* 2002; 177: 21-28
- 3 许春雷, 千新来, 周小山, 赵清正, 李艳春. HPV16E6型-E6、E7在食管鳞癌组织与非癌组织中的表达. *癌症* 2004; 23: 165-168
- 4 叶先仁. 抗原加工转运蛋白与免疫逃避. *福建医药杂志* 2003; 25: 133-135
- 5 Cao B, Tian X, Li Y, Jiang P, Ning T, Xing H, Zhao Y, Zhang C, Shi X, Chen D, Shen Y, Ke Y. LMP7/TAP2 gene polymorphisms and HPV infection in esophageal carcinoma patients from a high incidence area in China. *Carcinogenesis* 2005; 26: 1280-1284
- 6 Wu Y, Chen Y, Li L, Yu G, He Y, Zhang Y. Analysis of mutations in the E6/E7 oncogenes and L1 gene of human papillomavirus 16 cervical cancer isolates from China. *J Gen Virol* 2006; 87: 1181-1188
- 7 翟金霞, 沈冲, 叶冬青. 抗原肽处理相关运载蛋白体基因多态性与1型糖尿病. *中国慢性病预防与控制* 2007; 15: 28-31
- 8 夏天, 郝妍, 王小华, 刘洋, 陈兆鹏, 沈锡中, 朱乃硕. 抗原肽运载体TAP2基因与乙型肝炎病毒感染预后的相关性研究. *中华微生物学和免疫学杂志* 2005; 25: 331-337
- 9 张伟, 李艳红, 王兴国, 刘节, 赵建业, 苏勤. HPV16E6、18E6、c-erbB-2及p21ras基因蛋白的表达与宫颈癌的关系. *诊断病理学杂志* 2000; 7: 196
- 10 邹赛英, 刘旭明, 唐新萍, 司静懿. 食管鳞癌HPV感染与病毒致癌基因E6的关系. *临床与实验病理学杂志* 1998; 14: 50-52
- 11 刘文康, 张美萍, 张镇西, 楚雍烈. 食管鳞癌中人乳头瘤病毒16型E6、E7和细胞特异性增强子片段的检测. *现代肿瘤医学* 2009; 17: 878-881
- 12 陈云昭, 姚恩生, 杨兰, 刘春霞, 李洪安, 蒋金芳, 秦江梅, 杨磊, 李锋. 人乳头状瘤病毒感染与新疆哈萨克族食管癌发生关系的探讨. *现代预防医学* 2008; 35:

- 2407-2409
- 13 廖佩花, 秦江梅, 曾同霞, 李锋, 蔡金凤, 何玲. HPV16E6、HLA-DR9与新疆哈萨克族人群食管癌交互作用的1:2病例对照研究. 中华流行病学杂志 2009; 30: 951-954
- 14 曾同霞, 张海峰, 雷丽娟, 蔡金凤, 李锋, 廖佩花, 秦江梅. TAP2基因多态性及遗传因素与新疆哈萨克族食管癌的相关性. 世界华人消化杂志 2009; 17: 3255-3258
- 15 Reits EA, Griekspoor AC, Neefjes J. How does TAP pump peptides? insights from DNA repair and traffic ATPases. *Immunol Today* 2000; 21: 598-600

编辑 李薇 电编 何基才

ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) CN 14-1260/R 2010年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

2008 年内科学类期刊总被引频次和影响因子排序

代码	期刊名称	总被引频次			影响因子		
		数值	学科排名	离均差率	数值	学科排名	离均差率
1170	JOURNAL OF GERIATRIC CARDIOLOGY	7	41	-0.99	0.043	41	-0.92
G275	WORLD JOURNAL OF GASTROENTEROLOGY	5432	1	3.71	0.792	6	0.52
G803	肝脏	586	25	-0.49	0.594	11	0.14
G938	国际呼吸杂志	645	22	-0.44	0.294	34	-0.43
G415	国际内分泌代谢杂志	663	20	-0.43	0.379	28	-0.27
G501	临床肝胆病杂志	582	27	-0.50	0.441	22	-0.15
G658	临床荟萃	1709	8	0.48	0.356	32	-0.32
G257	临床内科杂志	875	16	-0.24	0.412	24	-0.21
G855	临床消化病杂志	314	32	-0.73	0.294	34	-0.43
G261	临床心血管病杂志	836	17	-0.28	0.371	29	-0.29
G293	临床血液学杂志	408	31	-0.65	0.329	33	-0.37
G491	岭南心血管病杂志	161	39	-0.86	0.158	40	-0.70
G662	内科急危重症杂志	308	34	-0.73	0.279	36	-0.46
G523	内科理论与实践	34	40	-0.97	0.171	39	-0.67
G746	实用肝脏病杂志	312	33	-0.73	0.562	14	0.08
G190	世界华人消化杂志	2480	6	1.15	0.547	17	0.05
G800	胃肠病学	619	23	-0.46	0.621	10	0.19
G326	胃肠病学和肝病杂志	580	28	-0.50	0.415	23	-0.20
G083	心肺血管病杂志	246	37	-0.79	0.361	31	-0.31
G419	心血管病学进展	585	26	-0.49	0.410	25	-0.21
G260	心脏杂志	553	29	-0.52	0.406	26	-0.22
G610	胰腺病学	268	35	-0.77	0.366	30	-0.30
G234	中国动脉硬化杂志	934	15	-0.19	0.557	16	0.07
G267	中国实用内科杂志	2309	7	1.00	0.487	20	-0.06
G211	中国糖尿病杂志	1567	11	0.36	0.570	13	0.10
G380	中国心血管杂志	256	36	-0.78	0.225	37	-0.57
G203	中国心脏起搏与心电生理杂志	657	21	-0.43	0.562	14	0.08
G633	中国血液净化	680	19	-0.41	0.546	18	0.05
G119	中国循环杂志	694	18	-0.40	0.406	26	-0.22
G231	中华肝脏病杂志	3283	4	1.84	1.119	2	1.15
G235	中华高血压杂志	1168	14	0.01	0.730	8	0.40
G639	中华老年多器官疾病杂志	166	38	-0.86	0.207	38	-0.60
G876	中华老年心脑血管病杂志	588	24	-0.49	0.442	21	-0.15
G155	中华内分泌代谢杂志	1612	10	0.40	0.897	5	0.73
G156	中华内科杂志	3484	3	2.02	0.788	7	0.52
G161	中华肾脏病杂志	1643	9	0.42	1.068	3	1.05
G285	中华消化内镜杂志	1314	13	0.14	0.578	12	0.11
G168	中华消化杂志	2571	5	1.23	1.025	4	0.97
G892	中华心率失常学杂志	494	30	-0.57	0.657	9	0.26
G170	中华心血管病杂志	4186	2	2.63	1.375	1	1.64
G172	中华血液学杂志	1501	12	0.30	0.489	19	-0.06
	平均值	1154			0.520		

以上数据摘自2009年版《中国科技期刊引证报告》(核心版). 科学技术文献出版社, 177-178.

VEGF在胃癌中的表达及其临床意义

刘伟, 余英豪, 欧阳学农, 王烈, 武一曼, 陈娟, 熊喜生

■背景资料

胃癌是最常见的恶性肿瘤之一, 居消化系统肿瘤之首。大部分胃癌患者在诊断时已属晚期, 治疗效果不理想, 需寻求新的治疗方法以提高疗效是临床的迫切需要。

刘伟, 余英豪, 陈娟, 熊喜生, 中国人民解放军南京军区福州总医院病理科 福建省福州市 350025
欧阳学农, 中国人民解放军南京军区福州总医院肿瘤科 福建省福州市 350025
王烈, 中国人民解放军南京军区福州总医院普外科 福建省福州市 350025
武一曼, 福建中医药大学病理学教研室 福建省福州市 350003
作者贡献分布: 此课题由刘伟与余英豪设计; 技术操作由欧阳学农、王烈、武一曼、陈娟及熊喜生完成; 数据分析由刘伟完成; 本论文写作由刘伟与余英豪完成。
通讯作者: 余英豪, 主任医师, 教授, 350025, 福建省福州市西二环北路156号, 中国人民解放军南京军区福州总医院病理科。
yuyinghao0808@126.com
电话: 0591-83717703 传真: 0591-83717703
收稿日期: 2010-07-21 修回日期: 2010-08-17
接受日期: 2010-08-24 在线出版日期: 2010-11-08

Clinical significance of VEGF expression in gastric cancer

Wei Liu, Ying-Hao Yu, Xue-Nong Ouyang, Lie Wang, Yi-Man Wu, Juan Chen, Xi-Sheng Xiong

Wei Liu, Ying-Hao Yu, Juan Chen, Xi-Sheng Xiong, Department of Pathology, Fuzhou General Hospital of Nanjing Military Command of Chinese PLA, Fuzhou 350025, Fujian Province, China
Xue-Nong Ouyang, Department of Oncology, Fuzhou General Hospital of Nanjing Military Command of Chinese PLA, Fuzhou 350025, Fujian Province, China
Lie Wang, Department of General Surgery, Fuzhou General Hospital of Nanjing Military Command of Chinese PLA, Fuzhou 350025, Fujian Province, China
Yi-Man Wu, Department of Pathology, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350025, Fujian Province, China
Correspondence to: Professor Ying-Hao Yu, Department of Pathology, Fuzhou General Hospital of Nanjing Military Command of Chinese PLA, 156 North Xierhuan Road, Fuzhou 350025, Fujian Province, China.
China. yuyinghao0808@126.com
Received: 2010-07-21 Revised: 2010-08-17
Accepted: 2010-08-24 Published online: 2010-11-08

Abstract

AIM: To investigate the correlation between the expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) protein and clinicopathological characteristics of gastric cancer.

METHODS: The surgical specimens from 775 patients with gastric cancer who were treated at Fuzhou General Hospital of Nanjing Military Command of Chinese PLA were used in this study. VEGF protein expression in these speci-

mens was examined by immunohistochemistry.

RESULTS: The rate of VEGF protein overexpression was 25.42% (197/775). VEGF protein overexpression was associated with depth of invasion, lymph node metastasis and distant metastasis (all $P < 0.05$), but not with sex, age, tumor site, TNM stage, histopathologic type and differentiation (all $P > 0.05$). Multivariate analysis demonstrated that depth of invasion, lymph node metastasis and distant metastasis were significant predictors of VEGF protein overexpression in gastric cancer (all $P < 0.05$).

CONCLUSION: Detection of VEGF protein expression may be used to assess the malignant biological behavior and prognosis of gastric cancer.

Key Words: Gastric cancer; Vascular endothelial growth factor; Epidermal growth factor receptor; Immunohistochemistry; Clinicopathological characteristic

Liu W, Yu YH, Ouyang XN, Wang L, Wu YM, Chen J, Xiong XS. Clinical significance of VEGF expression in gastric cancer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(31): 3366-3371

摘要

目的: 探讨VEGF过表达与中国胃癌患者临床病理特征间的关系及其临床意义。

方法: 收集2006-01/2009-08在中国人民解放军南京军区福州总医院手术切除的胃癌组织标本1 107例, 选择资料完整的胃腺癌病例775例进行研究, 采用EliVision™ plus免疫组织化学染色方法检测775例胃癌标本VEGF蛋白的表达。

结果: 775例胃癌组织中VEGF阳性表达197例, 表达率为25.42%(197/775); VEGF蛋白表达与患者性别、年龄、肿瘤部位、TNM分期及组织类型、分化程度无相关性(均 $P > 0.05$); 而与浸润深度、淋巴结转移、远处转移相关($P < 0.05$); 经多因素分析, 浸润深度、淋巴结转移、远处转移均会影响VEGF的表达($P < 0.05$)。

■同行评议者

王鲁平, 主任医师, 中国人民解放军北京军区总医院病理科

结论: VEGF检测可以作为评估胃癌生物学行为及预后的指标, 并为靶向治疗提供理论依据。

关键词: 胃癌; 血管内皮生长因子; 表皮生长因子受体; 免疫组织化学; 临床病理参数

刘伟, 余英豪, 欧阳学农, 王烈, 武一曼, 陈娟, 熊喜生. VEGF在胃癌中的表达及其临床意义. 世界华人消化杂志 2010; 18(31): 3366-3371

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/3366.asp>

0 引言

胃癌是最常见的恶性肿瘤之一, 居消化系肿瘤之首^[1]。大部分胃癌患者在诊断时已属晚期, 手术后辅以化疗, 治疗效果不明显。影响胃癌预后最重要的因素就是肿瘤的侵袭及转移, 而血管生成在肿瘤的侵袭转移中发挥着重要作用。血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)是迄今发现的最重要的促血管生成因子, 其通过促进血管内皮细胞增殖、增加血管通透性, 在诱导肿瘤血管生成, 促进肿瘤细胞转移中起关键作用^[2]。目前, 国内尚未见大宗胃癌病例VEGF表达的报道, 本研究采用免疫组织化学方法检测775例胃癌病例组织中VEGF的表达, 探讨VEGF过表达与胃癌发生发展、浸润转移等临床病理特征及预后的关系, 以期针对VEGF过表达胃癌的靶向治疗提供理论参考依据。

1 材料和方法

1.1 材料 收集2006-01/2009-08在中国人民解放军南京军区福州总医院手术切除的胃癌组织标本1 107例, 选择资料完整的胃腺癌病例775例进行研究, 手术标本经10%中性甲醛固定, 石蜡包埋, 3 μ m厚连续切片, 分别进行HE和免疫组织化学染色; 所有病例术前均未行放化疗。患者中男576例, 女199例, 年龄27-85(平均58.2)岁。胃癌TNM分期采用AJCC标准(2002)。组织分型采用Lauren分型标准, 分为肠型、弥漫型、混合型。另外, 在775例胃腺癌病例中随机抽取100例癌旁(距癌灶距离>5 cm)非肿瘤性胃黏膜作为对照。试剂均购自福州迈新生物技术开发公司, 一抗为鼠抗人单克隆抗体VEGF。试剂盒选用EliVision™ plus试剂盒。石蜡切片机(LEICA RM2245)、显微镜(OLYMPUS BX51)、电热恒温干燥箱(上海-恒科技有限公司)。所有标记均设阳性对照并用PBS缓冲液代替一抗做阴性对照。

1.2 方法

1.2.1 EliVision™ plus免疫组织化学染色: 石蜡切

片脱蜡、水化, PBS冲洗3 $\times$ 3 min; 高温高压抗原修复; 加3%过氧化氢溶液, 室温下孵育10 min, 以阻断内源性过氧化物酶; PBS冲洗3 $\times$ 3 min; 加第一抗体, 室温下孵育60 min; PBS冲洗3 $\times$ 5 min; 加聚合物增强剂, 室温下孵育20 min; PBS冲洗3 $\times$ 3 min; 再加酶标抗鼠聚合物, 室温下孵育30 min; PBS冲洗3 $\times$ 3 min; 加新配制的DAB显色液, 显微镜下观察3-10 min, 阳性显色为棕黄色; 自来水冲洗, 苏木素复染, 0.1%盐酸分化; 自来水冲洗, PBS冲洗返蓝; 梯度酒精脱水干燥, 中性树脂封片。

1.2.2 VEGF过表达分析: 阳性染色呈棕黄色颗粒, 定位于细胞质。肿瘤细胞不着色/<10%的肿瘤细胞着色为阴性(-), $\geq$ 10%的肿瘤细胞着色为阳性^[3,4], 并根据肿瘤阳性细胞数所占比例分为: 10%-25%(+), 26%-50%(++), 50%-75%(+++), >75%(++++).

统计学处理 采用SPSS16.0软件进行 χ^2 检验分析。通过多因素分析, 对各个因素之间的关系进行分析。

2 结果

2.1 VEGF蛋白在胃癌中的表达 胃癌组织中VEGF阳性反应, 定位于细胞质, 其表达呈明显的异质性, 不同分化程度的癌组织均有表达(图1, 2A)。癌旁非肿瘤性胃黏膜未见VEGF的过表达(图2B)。

2.2 VEGF蛋白表达与胃癌临床病理参数间的关系 775例胃癌组织中VEGF阳性表达197例, 表达率为25.42%。VEGF蛋白表达与患者性别、年龄、肿瘤部位、TNM分期、组织类型及分化程度无相关性($P>0.05$), 而与浸润深度、淋巴结转移及远处转移相关($P<0.05$)。经多因素分析, 浸润深度、淋巴结转移及远处转移均会影响VEGF的表达($P<0.05$, 表1)。

2.3 胃癌中VEGF蛋白表达与Her-2及EGFR蛋白表达的关系 本课题组前期对同组胃癌病例进行了Her-2和表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)蛋白检测, 发现胃癌组织中存在Her-2和EGFR蛋白过表达^[5,6], 将本研究中胃癌VEGF蛋白表达与前期同组胃癌病例Her-2、EGFR蛋白表达进行关联性检验分析发现, VEGF与Her-2、EGFR蛋白的过表达均无相关性($P>0.05$, 表2, 3)。

3 讨论

VEGF家族包括VEGF-A、VEGF-B、VEGF-C、

■研究前沿

关于VEGF与肿瘤的关系, 多数研究集中在转移性结肠直肠癌上, 目前国内未见有关VEGF与胃癌关系的大宗病例研究。

■相关报道

Fondevila等研究显示, VEGF的阳性表达与TNM分期、组织类型、浸润深度、淋巴结转移、远处转移等预后参数相关, VEGF的阳性表达患者的复发率明显高于阴性患者(40% vs 20%).

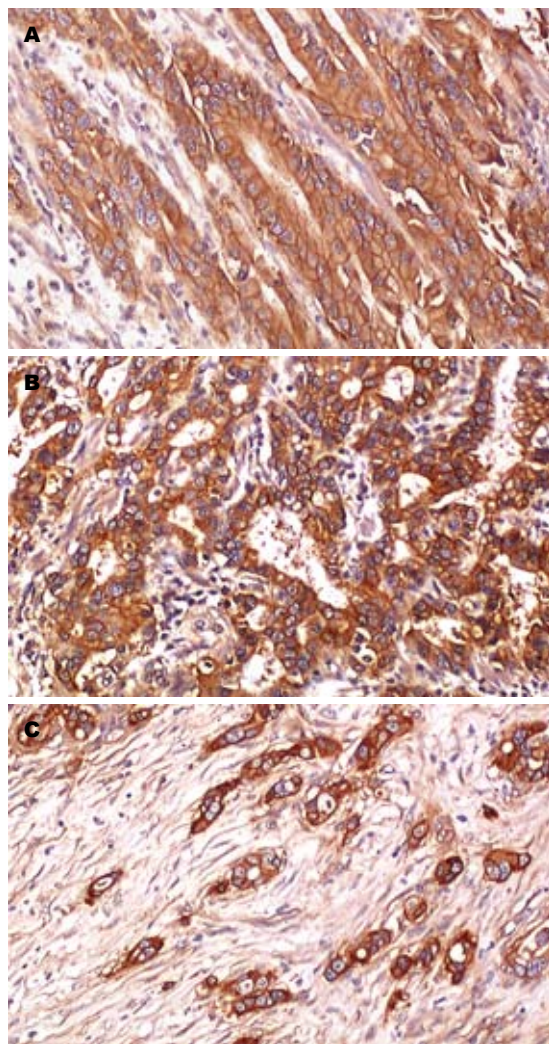


图1 VEGF在不同分化程度胃癌组织中的表达($\times 200$, 癌细胞质着色). A: 高分化; B: 中分化; C: 低分化.

VEGF-D、VEGF-E和胎盘生长因子(placenta growth factor, PLGF), 其中VEGF-A是最主要的血管生成因子, 能增加血管通透性, 促进血管内皮细胞分裂增殖, 抑制凋亡, 诱导蛋白酶降解细胞外基质和细胞间连接, 促进肿瘤细胞转移^[7,8]. VEGF-C和VEGF-D可与VEGFR-3结合, 诱导VEGFR-3酪氨酸酶磷酸化, 导致新生淋巴管生成, 促进肿瘤细胞通过淋巴道转移^[9]. 研究发现胃癌中存在VEGF-A、VEGF-C和VEGF-D的过表达, 并与癌组织血管密度增高、血管侵犯、淋巴结转移、及远处转移有关^[10-13].

本研究显示胃癌组织VEGF阳性表达率为25.42%, VEGF蛋白表达与患者性别、年龄、肿瘤部位、TNM分期、组织类型及分化程度无相关性, 这与相关报道基本一致^[14,15]. 国内外研究显示, VEGF过表达和胃癌血管生成、淋巴结转移以及胃癌发展密切相关, 并且VEGF表达阳性

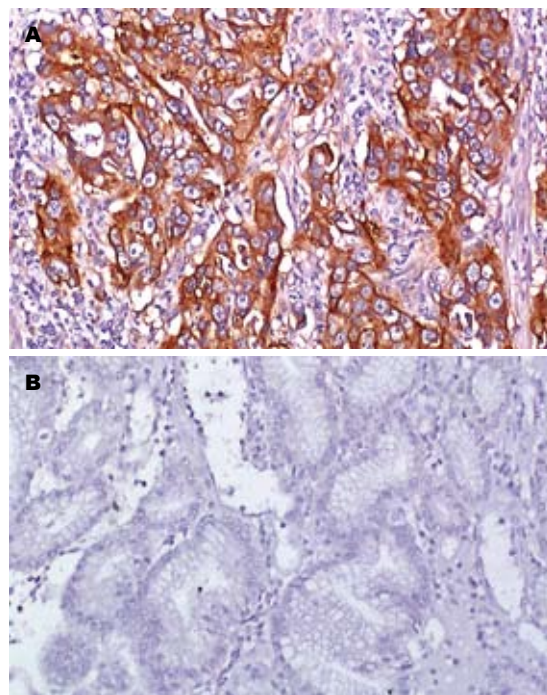


图2 VEGF在胃组织中的表达($\times 200$). A: 中低分化胃癌组织; B: 癌旁非肿瘤性胃黏膜组织.

患者较阴性患者的预后差^[14,16]; Fondevila等^[14]研究显示, VEGF的阳性表达与TNM分期、组织类型、浸润深度、淋巴结转移、远处转移等预后参数相关, VEGF的阳性表达患者的复发率明显高于阴性患者(40% vs 20%), 并且VEGF的阳性表达与微血管密度(microvessel density, MVD)密切相关. 赵向阳等^[16]报道VEGF的表达不但与肿瘤的分化程度、TNM分期、淋巴结的转移、浸润程度有关, 而且与MVD和基质金属蛋白酶-10(matrix metalloproteinase 10, MMP-10)的过表达呈正相关. Lieto等^[3]研究发现, VEGF的表达与浸润深度、TNM分期、淋巴结转移及远处转移密切相关, 并且VEGF阳性表达患者5年生存率较阴性表达患者低(30% vs 79%); 同组病例EGFR阳性表达患者5年生存率较阴性表达患者低(40% vs 73%); VEGF与EGFR表达均阳性的患者较VEGF或EGFR之一阳性或均阴性的患者预后差. 我们的研究证实胃癌组织VEGF、EGFR及Her-2过表达与浸润深度、淋巴结转移等密切相关, 那么VEGF与EGFR、Her-2蛋白的表达是否具有相关性? 关联性检验分析显示VEGF与EGFR、Her-2蛋白的表达并无相关性, 这可能是由于三者通过不同的作用机制在胃癌的发生发展、浸润转移中发挥作用, 从而使两者在胃癌中的过表达无相关性, 具体机制尚需进一步研究. 以上临床资料显示VEGF、EGFR及Her-2在

表 1 VEGF表达与胃癌患者临床病理参数的关系

临床病理参数	<i>n</i>	-	+	++	+++	++++	VEGF阳性率 <i>n</i> (%)	<i>P</i> 值
性别								
男	576	432	46	41	30	27	144(25.0)	>0.50
女	199	146	13	15	14	11	53(26.6)	
年龄(岁)								
<60	363	271	37	21	19	15	92(25.3)	>0.50
≥60	412	307	37	26	19	23	105(25.5)	
肿瘤部位								
胃食管连接部胃癌	324	237	25	26	17	19	87(26.9)	>0.10
胃部胃癌	451	341	32	30	28	20	110(24.4)	
浸润深度								
Tis	2	2	0	0	0	0	0(0.0)	<0.05
T1	51	46	1	3	1	0	5(9.8)	
T2	314	234	25	20	21	14	80(25.5)	
T3	385	283	29	31	19	23	102(26.5)	
T4	23	13	2	2	4	2	10(43.5)	
Lauren分型								
肠型	285	209	24	16	20	16	76(26.7)	>0.50
弥漫型	313	238	23	23	17	12	75(24.0)	
混合型	177	131	14	13	9	10	46(26.0)	
分化程度								
高、中分化	461	344	38	25	28	26	117(25.4)	>0.50
低、未分化	314	234	25	24	17	14	80(25.5)	
TNM分期								
0、Ⅰ、Ⅱ	351	264	27	20	23	17	87(24.8)	>0.50
Ⅲ、Ⅳ	424	314	31	36	21	22	110(25.9)	
淋巴结转移								<0.005
N0	251	193	19	11	19	9	58(23.1)	<0.005
N1	322	238	22	26	16	20	84(26.1)	
N2	168	130	12	15	5	6	38(22.6)	
N3	70	53	3	6	6	2	17(24.3)	
远处转移								<0.005
有	89	55	11	13	6	4	34(38.2)	<0.005
无	686	523	38	51	40	34	163(23.8)	

表 2 VEGF与Her-2表达的相关性 (*n*)

Her-2	VGFR		合计
	+	-	
+	23	65	88
-	174	513	687
合计	197	578	775

表 3 VGFR与EGFR表达的相关性 (*n*)

EGFR	VGFR		合计
	+	-	
+	40	92	132
-	157	486	643
合计	197	578	775

胃癌中均存在过表达且与淋巴结转移等临床预后相关参数密切相关, 初步表明VEGF、EGFR及Her-2促进了胃癌的浸润转移, 是胃癌患者预后的独立参考指标.

VEGF可诱导血管内皮细胞增殖, 促进新生血管形成, 增加血管通透性, 为肿瘤的侵袭、转

移提供了条件^[17], 同时针对VEGF为靶点的靶向药物也为胃癌治疗提供了新的思路. 以VEGF为靶点的靶向治疗药物主要包括: 人源化抗VEGF单克隆抗体, 如贝伐单抗(bevacizumab); 嵌合性抗VEGF受体(vascular endothelial growth factor receptor, VEGFR)胞外区的单克隆抗体, 如 IMC-

■创新盘点
本文采用大宗病例研究, 综合分析了VEGF与胃癌生物学行为及预后的关系, 以期为胃癌靶向治疗提供理论依据.

■应用要点

本研究采用免疫组织化学的方法检测VEGF蛋白在胃癌组织的表达情况, 拟为临床治疗胃癌选取针对EGFR的靶向药物和预后判断提供参考依据。

1C11; 以及针对VEGFR的酪氨酸激酶抑制剂, 如SU5416, SU6668和ZD6474。

贝伐单抗为重组人源化抗VEGF单克隆抗体, 2004年获美国食品药品监督管理局批准上市, 对VEGF的识别和结合有高度特异性, 与VEGF结合可阻止或减弱VEGF与血管内皮细胞受体(Fit-1和KDR)的结合, 从而抑制内皮细胞增生和新生血管形成, 起到抗肿瘤作用。目前, 贝伐单抗在转移性结肠、直肠癌中配合化学治疗已作为一线治疗药物^[18], 而贝伐单抗在胃癌方面的研究尚处II期临床试验阶段。Shah等^[19]进行了贝伐单抗联合伊立替康、顺铂治疗晚期胃癌及贲门癌患者的II期临床试验, 在34例可评疗效的患者中治疗的总缓解率为65%, 中位生存期为12.3 mo, 而且与顺铂、伊立替康联合用药并未增加化学治疗相关的不良反应。Su5416是一种新合成的VEGFR FLK-1/KDR酪氨酸激酶抑制物, 可明显抑制酪氨酸激酶活化, 阻止肿瘤新生血管形成, 在Su5416联合伊立替康治疗晚期结直肠癌的I期临床试验中获得一定的临床疗效^[20], 但关于Su5416在胃癌中的治疗尚未见临床报道。另外, SU6668与ZD6474在临床前期的研究中也显示出一定的效果^[21,22]。

胃癌患者靶向药物如贝伐单抗的应用可能成为趋势, 而靶向药物的应用有赖于可靠的筛选方法。免疫组织化学法是最常用于检测VEGF蛋白表达的方法, 但免疫组织化学法往往受到抗体浓度、抗原修复方式、显色方式等方面的影响; 目前, 荧光原位杂交(fluorescence *in situ* hybridization, FISH)方法已成为病理学新的诊断工具, 使得病理学家能够在形态学背景上清晰地观察到基因扩增, 从而获得与组织形态学相融合的基因表达谱^[23]。与免疫组织化学法相比, FISH具有高稳定性、高准确性和高灵敏性的特点, 能避免假阳性和假阴性结果的出现, 因而应用FISH检测基因扩增被公认为检测基因表达的金标准。目前, FISH已应用于检测乳腺癌、肝细胞肝癌等肿瘤组织Her-2、VEGF基因扩增情况^[24,25]。在本课题组后续研究中, 我们拟将经免疫组织化学法证实VEGF蛋白表达阳性的病例, 应用FISH检测VEGF基因扩增情况, 并分析与免疫组织化学法检测的相关性, 进一步探索胃癌VEGF过表达的机制, 并为临床选取针对VEGF抗体的靶向药物提供更直接的理论依据。

4 参考文献

- Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Thun MJ. Cancer statistics, 2009. *CA Cancer J Clin* 2009; 59: 225-249
- Yancopoulos GD, Davis S, Gale NW, Rudge JS, Wiegand SJ, Holash J. Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. *Nature* 2000; 407: 242-248
- Lieto E, Ferraraccio F, Orditura M, Castellano P, Mura AL, Pinto M, Zamboli A, De Vita F, Galizia G. Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and epidermal growth factor receptor (EGFR) is an independent prognostic indicator of worse outcome in gastric cancer patients. *Ann Surg Oncol* 2008; 15: 69-79
- 段伦喜, 钟德午, 胡辅珍, 赵华, 杨竹林, 易文君, 舒国顺, 华颂文. 胃癌组织VEGF, Flt1, bFGF, p53表达与胃癌预后的关系. *世界华人消化杂志* 2004; 12: 546-549
- 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
- 刘伟, 余英豪, 陈娟, 熊喜生, 欧阳学农, 王烈, 武一曼. EGFR在中国胃癌患者中的表达及其临床意义. *世界华人消化杂志* 2010; 18: 2648-2653
- Pan Q, Chanthery Y, Liang WC, Stawicki S, Mak J, Rathore N, Tong RK, Kowalski J, Yee SF, Pacheco G, Ross S, Cheng Z, Le Couter J, Plowman G, Peale F, Koch AW, Wu Y, Bagri A, Tessier-Lavigne M, Watts RJ. Blocking neuropilin-1 function has an additive effect with anti-VEGF to inhibit tumor growth. *Cancer Cell* 2007; 11: 53-67
- Roskoski R Jr. Vascular endothelial growth factor (VEGF) signaling in tumor progression. *Crit Rev Oncol Hematol* 2007; 62: 179-213
- Su JL, Yen CJ, Chen PS, Chuang SE, Hong CC, Kuo IH, Chen HY, Hung MC, Kuo ML. The role of the VEGF-C/VEGFR-3 axis in cancer progression. *Br J Cancer* 2007; 96: 541-545
- Gretschel S, Astrosini Ch, Vieth M, Jöns T, Tomov T, Höcker M, Schlag PM, Kemmner W. Markers of tumour angiogenesis and tumour cells in bone marrow in gastric cancer patients. *Eur J Surg Oncol* 2008; 34: 642-647
- Miyamoto N, Yamamoto H, Taniguchi H, Miyamoto C, Oki M, Adachi Y, Imai K, Shinomura Y. Differential expression of angiogenesis-related genes in human gastric cancers with and those without high-frequency microsatellite instability. *Cancer Lett* 2007; 254: 42-53
- Yonemura Y, Endo Y, Tabata K, Kawamura T, Yun HY, Bandou E, Sasaki T, Miura M. Role of VEGF-C and VEGF-D in lymphangiogenesis in gastric cancer. *Int J Clin Oncol* 2005; 10: 318-327
- Onogawa S, Kitadai Y, Amioka T, Kodama M, Cho S, Kuroda T, Ochiuni T, Kimura S, Kuwai T, Tanaka S, Chayama K. Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF)-C and VEGF-D in early gastric carcinoma: correlation with clinicopathological parameters. *Cancer Lett* 2005; 226: 85-90
- Fondevila C, Metges JP, Fuster J, Grau JJ, Palacín A, Castells A, Volant A, Pera M. p53 and VEGF expression are independent predictors of tumour recurrence and survival following curative resection of gastric cancer. *Br J Cancer* 2004; 90: 206-215
- 周祥荣, 李忠音, 杨小东, 杜志强. PCNA和VEGF在胃癌组织中表达的关系及意义. *华西医学* 2009; 24: 2585-2587
- 赵向阳, 施瑞华. 胃癌组织MMP-10和VEGF表达与血管生成的关系. *世界华人消化杂志* 2007; 15:

- 3495-3499
- 17 Harlozinska A. Progress in molecular mechanisms of tumor metastasis and angiogenesis. *Anticancer Res* 2005; 25: 3327-3333
- 18 Koyama M, Murata A, Kimura Y, Sakamoto Y, Morohashi H, Kimura N, Gasa F, Sato J, Terui K, Awatsu A, Hakamada K. [Bevacizumab in combination with mFOLFOX6 or FOLFIRI for previously treated metastatic colorectal cancer] *Gan To Kagaku Ryoho* 2010; 37: 1069-1073
- 19 Shah MA, Ramanathan RK, Ilson DH, Levrnor A, D'Adamo D, O'Reilly E, Tse A, Trocola R, Schwartz L, Capanu M, Schwartz GK, Kelsen DP. Multicenter phase II study of irinotecan, cisplatin, and bevacizumab in patients with metastatic gastric or gastroesophageal junction adenocarcinoma. *J Clin Oncol* 2006; 24: 5201-5206
- 20 Hoff PM, Wolff RA, Bogaard K, Waldrum S, Abbruzzese JL. A Phase I study of escalating doses of the tyrosine kinase inhibitor semaxanib (SU5416) in combination with irinotecan in patients with advanced colorectal carcinoma. *Jpn J Clin Oncol* 2006; 36: 100-103
- 21 Tokuyama J, Kubota T, Saikawa Y, Yoshida M, Furukawa T, Otani Y, Kumai K, Kitajima M. Tyrosine kinase inhibitor SU6668 inhibits peritoneal dissemination of gastric cancer via suppression of tumor angiogenesis. *Anticancer Res* 2005; 25: 17-22
- 22 McCarty MF, Wey J, Stoeltzing O, Liu W, Fan F, Bucana C, Mansfield PF, Ryan AJ, Ellis LM. ZD6474, a vascular endothelial growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor with additional activity against epidermal growth factor receptor tyrosine kinase, inhibits orthotopic growth and angiogenesis of gastric cancer. *Mol Cancer Ther* 2004; 3: 1041-1048
- 23 官兵, 周晓军. 个体化医疗时代诊断病理学面临的机遇和挑战. *临床与实验病理学杂志* 2010; 26: 255-257
- 24 Schoppmann SF, Tamandl D, Roberts L, Jomrich G, Schoppmann A, Zwrtek R, Dubsy P, Gnant M, Jakesz R, Birner P. HER2/neu expression correlates with vascular endothelial growth factor-C and lymphangiogenesis in lymph node-positive breast cancer. *Ann Oncol* 2010; 21: 955-960
- 25 Chiang DY, Villanueva A, Hoshida Y, Peix J, Newell P, Minguez B, LeBlanc AC, Donovan DJ, Thung SN, Solé M, Tovar V, Alsinet C, Ramos AH, Barretina J, Roayaie S, Schwartz M, Waxman S, Bruix J, Mazzaferro V, Ligon AH, Najfeld V, Friedman SL, Sellers WR, Meyerson M, Llovet JM. Focal gains of VEGFA and molecular classification of hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* 2008; 68: 6779-6788

■同行评价

本文新颖性一般, 材料丰富, 对治疗胃癌有一定的临床指导意义。

编辑 曹丽鸥 电编 何基才

ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) CN 14-1260/R 2010年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

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

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

贵州黔西威宁彝族人群HBV感染与IL10-819及CCR5-59029多态性的相关性

单可人, 王婵娟, 谭奎, 何燕, 张婷, 李毅, 赵艳, 吴昌学, 齐晓岚, 官志忠

■背景资料

我国7个民族HBV感染调查, 结果显示HBsAg具有较高的阳性率: 汉族为15.3%, 藏族26.2%, 瑶族24.0%, 黎族7.0%, 维族5.3%, 且HBV感染在这些民族中存在着差异性。

单可人, 王婵娟, 谭奎, 何燕, 张婷, 李毅, 赵艳, 吴昌学, 齐晓岚, 官志忠, 贵阳医学院分子生物学重点实验室 贵州省贵阳市550004

贵州省科技厅科技计划课题基金资助项目, No. 黔科合SY字[2008]3053; No. 黔科合SY字[2010]3001

贵州省卫生厅基金资助项目, No. 黔卫发[2009]122

作者贡献分布: 单可人与官志忠对此文所作贡献均等; 此课题由单可人与官志忠设计; 研究过程操作由王婵娟与谭奎操作完成; 样本采集、人基因组DNA提取等由单可人、官志忠、何燕、张婷、李毅、齐晓岚、赵艳及吴昌学共同完成; 研究所用新试剂及分析工具由单可人与官志忠提供; 数据分析由王婵娟与谭奎完成; 本论文写作由单可人完成。

通讯作者: 官志忠, 教授, 550004, 贵州省贵阳市北京路9号, 贵阳医学院分子生物学重点实验室, zhizhongguan@yahoo.com

电话: 0851-6909566 传真: 0851-6752814

收稿日期: 2010-07-13 修回日期: 2010-08-24

接受日期: 2010-09-07 在线出版日期: 2010-11-08

Association of CCR5-59029 and IL10-819 polymorphisms with HBV infection in two Yi minority populations in Guizhou Province, China

Ke-Ren Shan, Chan-Juan Wang, Kui Tan, Yan He, Ting Zhang, Yi Li, Yan Zhao, Chang-Xue Wu, Xiao-Lan Qi, Zhi-Zhong Guan

Ke-Ren Shan, Chan-Juan Wang, Kui Tan, Yan He, Ting Zhang, Yi Li, Yan Zhao, Chang-Xue Wu, Xiao-Lan Qi, Zhi-Zhong Guan, Key Molecular Biology Laboratory of Guiyang Medical College, Guiyang 550004, Guizhou Province, China

Supported by: the Science and Technology Program of Guizhou Provincial Science and Technology Department, Qian Ke He SY Zi Nos. [2008]3053; and [2010]3001; and the Program of Guizhou Provincial Health Department, Qian Wei Fa No. [2009]122

Correspondence to: Professor Zhi-Zhong Guan, Key Molecular Biology Laboratory of Guiyang Medical College, Guiyang 550004, Guizhou Province, China. zhizhongguan@yahoo.com

Received: 2010-07-13 Revised: 2010-08-24

Accepted: 2010-09-07 Published online: 2010-11-08

Abstract

AIM: To investigate the distribution of chemokine receptor 5 gene 59029A/G (CCR5-59029) and interleukin 10 819 T/C (IL10-819) polymorphisms in two Yi minority populations in Guizhou Province, China, and to analyze their association with HBV infection.

METHODS: Blood samples were taken from 105 and 108 Yi ethnic individuals in Qianxi and Weining, respectively. The CCR5-59029 polymorphism was genotyped by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP), while the IL10-819 polymorphism was genotyped by polymerase chain reaction-sequence-specific primer (PCR-SSP). DNA sequencing was performed to verify the above results.

RESULTS: The genotype frequency of IL10-819 polymorphism differed significantly between HBV-infected subjects and non-infected ones in the Qianxi Yi minority population ($P < 0.05$), but showed no statistical difference in the Weining Yi minority population ($P > 0.05$). In contrast, the genotype frequency of CCR5-59029 differed significantly between HBV-infected subjects and non-infected ones in the Weining Yi minority population ($P < 0.05$), but showed no statistical difference in the Qianxi Yi minority population ($P > 0.05$).

CONCLUSION: CCR5-59029 and IL10-819 polymorphisms are associated with susceptibility to HBV infection in the Yi minority population in Guizhou Province, China.

Key Words: Chemokine receptor 5; Interleukin 10; Polymorphism; Yi minority; Hepatitis B virus

Shan KR, Wang CJ, Tan K, He Y, Zhang T, Li Y, Zhao Y, Wu CX, Qi XL, Guan ZZ. Association of CCR5-59029 and IL10-819 polymorphisms with HBV infection in two Yi minority populations in Guizhou Province, China. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(31): 3372-3377

摘要

目的: 研究贵州世居少数民族-黔西、威宁彝族人群IL-10基因启动子区-819位点(IL10-819)和趋化因子受体5(chemokine receptor 5, CCR5)基因启动子区-59029位点(CCR5-59029)与HBV易感性的相关性。

方法: 对研究人群采用序列特异性引物-聚合

■同行评议者

李淑德, 主任医师, 中国人民解放军第二军医大学长海医院消化内科

酶链式反应(PCR-SSP)方法分析IL-10基因启动子区-819位点多态性和限制性片段长度多态性-聚合酶链式反应(PCR-RFLP)方法分析CCR5基因启动子区-59029位点。

结果: IL10-819基因型频率在贵州黔西彝族感染组与非感染组中的分布差异有统计学意义($P<0.05$), 在贵州威宁彝族感染组与非感染组中的分布差异无统计学意义; CCR5-59029基因威宁彝族感染组与非感染组中的分布差异有统计学意义($P<0.05$), 在贵州黔西彝族感染组与非感染组中的分布差异无统计学意义。

结论: IL10-819基因和CCR5-59029基因多态性与彝族乙肝感染情况可能存在相关性, IL10-819基因和CCR5-59029基因多态性可能是乙肝易感性的因素之一。

关键词: 趋化因子受体5; 白介素10; 多态性; 彝族; 乙型肝炎病毒

单可人, 王婵娟, 谭奎, 何燕, 张婷, 李毅, 赵艳, 吴昌学, 齐晓岚, 官志忠. 贵州黔西威宁彝族人群HBV感染与IL10-819及CCR5-59029多态性的相关性. 世界华人消化杂志 2010; 18(31): 3372-3377

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/3372.asp>

0 引言

乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)感染呈世界性流行, 估计全球有3.5亿慢性HBV感染者^[1]. 中国是乙型肝炎的高流行区, 2005年中国 ≥ 3 岁人群HBsAg阳性率为9.09%^[2], 其中25%以上的携带者将发展为慢性肝炎, 并可能进展为肝硬化和肝癌^[3]. 骆抗先等^[4]对我国7个民族HBV感染调查, 结果显示HBsAg具有较高的阳性率: 汉族为15.3%, 藏族26.2%, 瑶族24.0%, 黎族7.0%, 维族5.3%, 且HBV感染在这些民族中存在着差异性. 2007年北京市人群乙型肝炎血清流行病学研究中报道^[5], 北京人群HBsAg标化阳性率已降至3.02%. 2008年卫生部公布全国人群乙型肝炎血清流行病学调查结果为全国1-59岁人群乙型肝炎表面抗原携带率为7.18%. 西部地区人群乙型肝炎表面抗原携带率高于东部地区, 西部5-59岁人群乙型肝炎表面抗原携带率最高, 达8.57%^[6]. HBV感染, 其临床表现多样而复杂, 乙型肝炎患者的发病、发展、治疗及预后亦因人而异, 除了与病毒因素(病毒含量、基因型等)、环境因素(如暴露人群的整体卫生状况、疫苗接种状况等)有关, 还与宿主的遗传因素有关, 考虑

其疾病、宿主基因与环境因素三者间关系的复杂性, 并且涉及到遗传异质性、多基因相互作用等特征^[7,8]. 随着人类基因组计划的完成, 遗传因素^[9]逐渐成为慢性乙型肝炎致病机制研究的一个热点, 遗传因素在乙型肝炎发生、发展和致病作用中的研究受到更大重视. 贵州是一个多民族省份, 少数民族人口众多, 构成了极其珍贵的遗传资源. 贵州少数民族形成了遗传学上相对隔离的人群. 选用这样相对封闭的隔离自然人群为研究对象, 可以最大限度地排除基因流(gene flow)现象对该人群等位基因频率、基因型频率的影响, 对多基因疾病研究具有独特的优势. 本研究采用序列特异性引物-聚合酶链式反应(polymerase chain reaction-sequence-specific primer, PCR-SSP)方法和限制性片段长度多态性-聚合酶链式反应(polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism, PCR-RFLP)方法对贵州世居少数民族-威宁和黔西彝族人群进行与乙型肝炎病毒感染相关的CCR5基因启动子区-59029位点和IL-10基因启动子区-819位点的多态性分析研究。

1 材料和方法

1.1 材料 在知情同意的原则基础上, 选取贵州省少数民族中较封闭的隔离自然人群-黔西彝族105例、威宁彝族108例. 所选的研究对象3代内无族外通婚、彼此间无直接血缘关系、性别、年龄匹配、未有乙型肝炎疫苗接种史。

1.2 方法

1.2.1 乙型肝炎血液学的检测、DNA提取、定量以及分组: 采取血样后, 离心后取血浆, 采用酶联免疫试验(ELISA)检测乙型肝炎血清学标志, 即表面抗原(HBsAg)、表面抗体(抗-HBs)、e抗原(HBeAg)、e抗体(抗-HBe)以及核心抗体(抗-HBc). 按照上海实业科华生物技术有限公司生产的试剂盒(批号20011112)说明进行操作, 美国Bio-tec ELX 800酶标仪判断结果。

1.2.2 样本分组: 由于样本人群无乙型肝炎疫苗接种史, 乙型肝炎血液学指标判断标准为: HBsAg阳性: 标本A值/阴性对照标本平均A值 ≥ 2.1 ; 抗-HBs阳性: 标本A值/阴性对照标本平均A值 ≥ 2.1 ; 抗-HBe阳性: 标本A值 $< COV$ (原倍血浆阴性对照标本平均A值 $\times 0.3$), 并对其样本分组为阳性感染组和阴性非感染组。

1.2.3 选取样本: 根据乙型肝炎血液学检测结果, 选取样本并进行人基因组DNA的常规酚/氯仿抽提法提取。

■ 研究前沿

随着人类基因组计划的完成, 遗传因素逐渐成为慢性乙型肝炎致病机制研究的一个热点, 遗传因素在乙型肝炎发生、发展和致病作用中的研究受到更大重视。

■ 相关报道

Chang等对CCR5启动子基因多态性与HBV感染的相关性进行研究,发现CCR5-59029 G等位基因型与HBV感染的自发清除显著相关,CCR5基因59029位点基因多态性可能在HBV感染的清除中起重要作用。

表 1 贵州彝族乙型肝炎血清学标志检测结果 $n(\%)$

民族	n	HBsAg	抗-HBs	HBeAg	抗-HBe	抗-HBc	HBV流行率($\%$)
黔西彝族	105	10(9.52)	14(13.33)	3(2.86)	8(7.62)	37(35.24)	42.86
威宁彝族	108	22(20.37)	18(16.67)	2(1.85)	9(8.33)	34(31.48)	51.85

1.2.4 IL10-819位点的PCR-SSP分析: 采用PCR-SSP方法检测IL-10基因启动子区-819位点多态性。根据GenBank报道的人类IL-10 DNA序列,利用Primer Premier 5软件自行设计引物扩增IL10-819位点的两对引物序列以及内参照引物序列,引物均由上海生工合成,扩增产物片段的长度为402 bp。内参照为人 β -珠蛋白基因扩增片段,长度为268 bp。

1.2.5 CCR5-59029位点的PCR-RFLP分析: 采用PCR-RFLP方法检测CCR5基因启动子区-59029位点多态性。根据GenBank报道的人类CCR5 DNA序列,利用Primer Premier 5软件自行设计扩增CCR5-59029位点的引物序列,引物由上海生工合成,PCR扩增产物长度为559 bp。

1.2.6 PCR反应体系、循环条件及检测: IL10-819位点: PCR反应体系总体积25 μ L, 包含100 mmol/L Tris-HCl(pH8.3), 500 mmol/L KCl, 25 mmol/L $MgCl_2$, 2.5 mol/L dNTPs, 10 μ mol/L上下游引物, 10 μ mol/L上下游内对照引物, 100 ng模板DNA, 1 U Taq DNA聚合酶(大连宝生物工程有限公司)。PCR循环条件: 预变性94 $^{\circ}C$ 5 min, 94 $^{\circ}C$ 变性40 s, 63 $^{\circ}C$ 退火45 s, 72 $^{\circ}C$ 延伸1 min, 共35次循环, 终末延伸72 $^{\circ}C$ 7 min。扩增产物用1.5%琼脂糖凝胶电泳检测。

1.2.7 CCR5-59029位点: PCR反应体系总体积25 μ L, 包含10 $\times$ PCR Buffer 2.5 μ L, 25 mmol/L $MgCl_2$ 2.0 μ L, 2.5 mol/L dNTPs 2.0 μ L, 10.0 μ mol/L上游和下游引物各0.5 μ L, TaqDNA聚合酶(天根)(2.5 U/ μ L)0.4 μ L, 模板DNA(100 μ g/L)1 μ L, 加水补足体积至25 μ L。PCR循环条件: 预变性95 $^{\circ}C$ 5 min, 变性95 $^{\circ}C$ 30 s, 退火63.3 $^{\circ}C$ 30 s, 延伸72 $^{\circ}C$ 30 s, 循环30次, 终末延伸72 $^{\circ}C$ 7 min。扩增产物用1.5%琼脂糖凝胶电泳检测。

1.2.8 CCR5-59029位点酶切分析: 用限制性内切酶Bsp1286 I 酶切PCR扩增产物的DNA片段, Bsp1286 I 酶切识别位点: 5'...GGGCA $\downarrow$ C...3'; 3'...C $\uparrow$ CCGTG...5', 59029位点发生G $\rightarrow$ A, 使原来的限制性酶切位点消失, 这样电泳条带的数量和大小就会发生改变, 从而区分不同的基因型。Bsp1286 I 酶切体系: 10 $\times$ PCR Buffer 1 μ L,

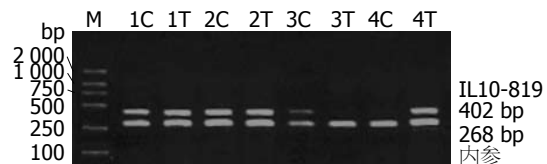


图 1 IL10基因-819位点的PCR-SSP结果。1, 2: 杂合子CT; 3: 野生型CC; 4: 纯合突变型TT。

2.5 mmol/L BSA 0.4 μ L, 模板DNA(100 μ g/L)2 μ L, Bsp1286 I (Promega)(10 U/ μ L)0.25 μ L, 加高压灭菌ddH₂O至10 μ L, 经2.0%琼脂糖凝胶电泳, 在UV凝胶成像仪上照相观察结果, 根据片段大小来区分不同的基因型。

统计学处理 使用SPSS14.0统计软件处理数据。根据IL10-819位点的PCR-SSP结果和CCR5-59029位点的PCR-RFLP结果确定样本的基因型, 基因型频率和等位基因频率, 用直接计数法计算。组间基因型频率和等位基因频率比较、基因型及等位基因频率与乙型肝炎易感性的关联性分析采用 χ^2 检验, 定义 $P \leq 0.05$ 时有统计学意义。

2 结果

2.1 乙型肝炎血清学标志检测结果 乙型肝炎血清学标志检测结果见表1, 贵州黔西彝族HBsAg阳性率为9.52%, HBV流行率42.86%, 威宁彝族HBsAg阳性率为20.37%, HBV流行率51.85%。

2.2 IL10-819位点的PCR-SSP结果 IL10-819位点扩增产物片段的长度为402 bp, 内参照扩增产物片段长度为268 bp。若样本基因型为野生型, -819位点为CC时, 引物1扩增, 在402 bp和268 bp处出现条带, 引物2不能扩增, 只在268 bp内对照处出现条带; 若样本基因型为纯合突变型, -819位点为TT时, 引物2扩增, 也在402 bp和268 bp处出现条带, 而引物1不能扩增, 只在268 bp处出现条带; 若样本基因型为杂合子CT时, 引物1与2均可扩增, 都在402 bp和268 bp处出现条带, 见图1。

2.3 CCR5-59029位点PCR扩增和酶切分析结果

2.3.1 CCR5-59029位点的PCR扩增结果: 经过PCR特异性扩增, 扩增产物长度559 bp(图2), 每例样本选择目的条带清晰的PCR产物进行酶切。

表 2 贵州威宁、黔西彝族IL10-819基因及基因型频率与HBV感染的相关分析

分组	n	基因型频率n(%)			基因频率n(%)	
		TT	CT	CC	T	C
威宁彝族	108	44(40.7)	44(40.7)	20(18.5)	132(61.1)	84(38.9)
HBV感染组	56	25(44.6)	23(41.1)	8(14.3)	73(65.2)	39(34.8)
HBV非感染组	52	19(36.5)	21(40.4)	12(23.1)	59(56.7)	45(43.3)
		Sig. = 0.458, $P>0.05$			Sig. = 0.203, $P>0.05$	
黔西彝族	105	47(44.8)	52(49.5)	6(5.7)	146(69.5)	64(30.5)
HBV感染组	45	13(28.9)	28(62.2)	4(8.9)	54(60.0)	36(40.0)
HBV非感染组	60	34(56.7)	24(40.0)	2(3.3)	92(76.7)	28(23.3)
		Sig. = 0.014, $P<0.05$			Sig. = 0.027, $P<0.05$	

■应用要点

IL10-819基因和CCR5-59029基因多态性与彝族乙肝感染情况可能存在相关性, IL10-819基因和CCR5-59029基因多态性可能是乙肝易感性的因素之一。

表 3 贵州威宁黔西彝族CCR5-59029基因及基因型频率与HBV感染的相关分析

分组	n	基因型频率n(%)			基因频率n(%)	
		GG	GA	AA	G	A
威宁彝族	105	25(23.81)	42(40.00)	38(36.19)	92(43.81)	118(56.19)
HBV感染组	45	11(24.44)	17(37.78)	17(37.78)	39(43.33)	51(56.67)
HBV非感染组	60	14(23.33)	25(41.67)	21(35.00)	53(44.17)	67(55.83)
		$\chi^2 = 0.165$, Sig. = 0.921, $P>0.05$			$\chi^2 = 0.015$, Sig. = 0.904, $P>0.05$	
黔西彝族	108	42(38.89)	46(42.59)	20(18.52)	130(60.19)	86(39.81)
HBV感染组	56	18(32.14)	24(42.86)	14(25.00)	60(53.57)	52(46.43)
HBV非感染组	52	24(46.15)	22(42.31)	6(11.54)	70(67.31)	34(32.69)
		Sig. = 0.258, $P>0.05$			Sig. = 0.039, $P<0.05$	

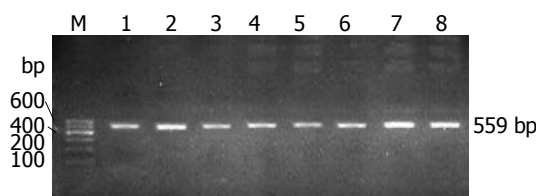


图 2 CCR5基因-59029位点的PCR扩增结果。

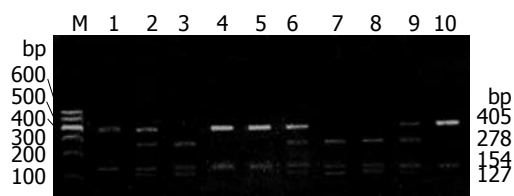


图 3 CCR5基因-59029位点的酶切结果电泳图。1, 4, 5, 10: 突变型AA; 2, 6, 9: 杂合子GA; 3, 7, 8: 野生型GG。

2.3.2 CCR5-59029的*Bsp*1286 I 酶切结果: CCR5-59029扩增产物559 bp, 其片段中带有2个*Bsp*1286 I 内切酶的酶切位点, 59029位点发生G→A, 片段中该酶切位点消失, 只有1个酶切位点发生酶切。当为野生型GG时, 559 bp被酶切成278, 154, 127 bp; 当为突变型AA时, 559 bp被酶切成405 bp和154 bp; 当为杂合子GA时, 559 bp被酶切成405, 278, 154, 127 bp(图3)。

2.4 乙型肝炎感染情况与贵州威宁、黔西彝族基因型频率、基因频率的分析 根据乙型肝炎血液学标志检测结果将样本分为HBV阳性感染组和阴性非感染组两组, 比较两组IL10基因-819基因型和CCR5基因-59029基因型分布的差别。IL10基因-819等位基因频率和基因型频率在贵州黔西彝族人群感染组与非感染组中的分布有

显著性差异($P<0.05$); 贵州威宁彝族人群等位基因频率和基因型频率在感染组与非感染组中的分布无显著性差异($P>0.05$, 表2)。CCR5-59029等位基因频率在贵州威宁彝族人群感染组与非感染组中的分布有显著性差异($P<0.05$); 黔西彝族等位基因频率和基因型频率在感染组与非感染组中的分布无显著性差异($P>0.05$, 表3)。

3 讨论

与HBV感染者有密切接触的高危人群感染HBV的机会不均一, 一部分人很容易被感染, 另一部分人虽长期与患者接触却未被感染。HBV感染者中有人很快发展到肝硬化、肝癌阶段, 而一些患者在感染后很多年未经治疗, 其仍维持在

■同行评价

本文选题较好, 对于揭示该地区少数民族乙型肝炎病毒感染的分子机制, 有重要的理论指导价值。

最初感染状态。这与个体基因易感性和基因多态性以及免疫状态有密切关系。

越来越多的实验结果表明, HBV感染的肝脏病理改变是针对这种病毒的肝内免疫反应的结果, 记忆和激活T淋巴细胞的浸润已成为HBV的炎症特征, 而趋化因子/趋化因子受体在T淋巴细胞游走中起重要作用。蒲春文等^[10]研究发现: 肝内CCR5阳性细胞在慢性肝炎中高度表达, 且其表达程度与炎症程度平行, 提示CCR5在HBV的病理损伤进展过程中起重要作用。Shieh等^[11]发现CCR5-59029 A/A基因型的个体中CD4⁺T淋巴细胞上表达更多的CCR5受体。因此认为CCR5-59029 G/G基因型的作用是降低CCR5受体的功能, 而CCR5-59029 A/A基因型的作用是增加CCR5受体的表达。而且研究发现CCR5 promoter 59029 G/G基因型个体可以通过降低CCR5的作用而减轻肝脏的炎症反应^[12]。由此我们可以推想CCR5-59029位点的基因多态性与细胞CCR5的表达有关, 而其表达程度又与肝炎的炎症程度平行, 这些证据提示我们CCR5-59029 G/G基因型可能是HBV感染的保护性基因型。

Chang等^[13]对CCR5启动子基因多态性与HBV感染的相关性进行研究, 发现CCR5-59029 G等位基因型与HBV感染的自发清除显著相关, CCR5基因59029位点基因多态性可能在HBV感染的清除中起重要作用。本研究显示, 威宁彝族CCR5基因-59029 G等位基因频率在非感染组中显著高于感染组, 这提示我们59029 G等位基因可能与HBV感染的清除有关, 这与Chang等的结果一致; 而黔西彝族等位基因频率和基因型频率在感染组与非感染组中的分布无显著性差异($P>0.05$), 与Cheong等^[14]的研究中显示CCR5-59029位点与HBV的感染没有相关性的结果一致。

IL-10是人体内重要的具有抗炎和免疫调节作用的细胞因子, IL-10基因的启动子区具有高度多态性, 有多个多态性位点, 与很多疾病相关。已有研究^[15,16]显示IL-10基因多态性能影响IL-10的转录、翻译和分泌过程, 与IL-10的分泌水平有关, 而IL-10在体内的分泌水平将直接影响机体对HBV的免疫反应, 进而影响其对乙型肝炎的易感性^[15,17,18], 所以说IL-10基因多态性与HBV感染密切相关, 在抗病毒免疫中发挥着重要的作用, 直接影响其易感性和严重程度。

Miyazoe等^[19]的研究发现, IL-10基因启动子区-819 T等位基因在慢性无症状乙型肝炎

携带者中的频率显著高于慢性进展性肝病患者, 研究提示携带IL10-819 T基因的人群乙型肝炎病情发展较其他慢。在本研究中, 结果显示IL10-819基因型频率在贵州黔西彝族感染组与非感染组之间分布差异有统计学意义, 黔西彝族非感染组IL10-819 TT基因型频率显著高于感染组, IL10-819 T等位基因频率在非感染组中显著高于感染组, 提示IL10-819 T突变基因可能在HBV感染中起到保护作用, 这与Miyazoe等的研究结果一致; 而贵州威宁彝族人群等位基因频率和基因型频率在感染组与非感染组中的分布无显著性差异($P>0.05$)。

特别有意义的是, 两个与HBV感染相关的基因在本研究中不同民族出现了不同的结果, 这可能与样本量、地域、种族及族群有一定关系。在不同地域、种族、族群其基因多态性表现并不完全相同, 而HBV感染与机体许多基因有关, 许多作用机制还有待于进一步的证实和探索。

4 参考文献

- 1 Alvarado Mora MV, Romano CM, Gomes-Gouvêa MS, Gutierrez MF, Carrilho FJ, Pinho JR. Molecular epidemiology and genetic diversity of hepatitis B virus genotype E in an isolated Afro-Colombian community. *J Gen Virol* 2010; 91: 501-508
- 2 梁晓峰, 陈园生, 王晓军, 贺雄, 陈丽娟, 王骏, 林长缨, 白呼群, 严俊, 崔钢, 于竞进. 中国3岁以上人群乙型肝炎血清流行病学研究. *中华流行病学杂志* 2005; 26: 655-658
- 3 张伟, 时德, 杜成友. 雌激素受体a基因多态性与原发性肝癌的相关性研究. *生物技术通报* 2008; 24: 84-86, 98
- 4 骆抗先, 何超, 何海棠. 汉藏傣瑶维蒙黎族人群乙型肝炎病毒感染调查. *中华流行病学杂志* 1993; 14: 266-270
- 5 陈园生, 王晓军, 梁晓峰. 中国东、中、西部地区乙型肝炎血清流行病学现状. *中国计划免疫* 2006; 12: 246-249
- 6 吴疆, 张卫, 韩莉莉, 林长缨, 林晖, 邢玉兰, 高培, 龚晓红, 刘立荣, 黄芳, 刘健英, 刘利英, 王化勇, 于海柱, 刘秀军, 唐雅清, 蒲永兰, 赵伟, 王晨, 张震, 马立宪. 北京市人群乙型肝炎血清流行病学研究. *中华流行病学杂志* 2007; 28: 555-557
- 7 洪卫国, 王福生, 徐安龙. 乙型肝炎病毒相关人体基因研究的策略. *世界华人消化杂志* 2001; 9: 1356-1359
- 8 雷瑞祥, 顾琳, 黄明星, 彭晓谋. MxA-88 G/T和IFN- γ +874 A/T位点多态性对地方流行区HBV感染自然转归的影响. *实用医学杂志* 2008; 24: 509-511
- 9 Chen DQ, Zeng Y, Zhou J, Yang L, Jiang S, Huang JD, Lu L, Zheng BJ. Association of candidate susceptible loci with chronic infection with hepatitis B virus in a Chinese population. *J Med Virol* 2010; 82: 371-378
- 10 蒲春文, 姜春萌, 丛树荣, 马大鹏. 细胞趋化因子受体CXCR3及CCR5在乙型肝炎患者肝组织中的表达. *中华肝脏病杂志* 2005; 13: 708-709
- 11 Shieh B, Liao YE, Hsieh PS, Yan YP, Wang ST, Li C. Influence of nucleotide polymorphisms in the CCR2

- gene and the CCR5 promoter on the expression of cell surface CCR5 and CXCR4. *Int Immunol* 2000; 12: 1311-1318
- 12 徐维国, 杨丽, 刘小菁, 强鸥. CC族趋化因子受体基因多态性在乙型肝炎肝硬化中的作用. *临床荟萃* 2009; 24: 187-190
- 13 Chang HY, Ahn SH, Kim DY, Shin JS, Kim YS, Hong SP, Chung HJ, Kim SO, Yoo WD, Han KH. [Association between CCR5 promoter polymorphisms and hepatitis B virus infection] *Korean J Hepatol* 2005; 11: 116-124
- 14 Cheong JY, Cho SW, Choi JY, Lee JA, Kim MH, Lee JE, Hahm KB, Kim JH. RANTES, MCP-1, CCR2, CCR5, CXCR1 and CXCR4 gene polymorphisms are not associated with the outcome of hepatitis B virus infection: results from a large scale single ethnic population. *J Korean Med Sci* 2007; 22: 529-535
- 15 Truelove AL, Oleksyk TK, Shrestha S, Thio CL, Goedert JJ, Donfield SM, Kirk GD, Thomas DL, O'Brien SJ, Smith MW. Evaluation of IL10, IL19 and IL20 gene polymorphisms and chronic hepatitis B infection outcome. *Int J Immunogenet* 2008; 35: 255-264
- 16 Xie HY, Wang WL, Yao MY, Yu SF, Feng XN, Jin J, Jiang ZJ, Wu LM, Zheng SS. Polymorphisms in cytokine genes and their association with acute rejection and recurrence of hepatitis B in Chinese liver transplant recipients. *Arch Med Res* 2008; 39: 420-428
- 17 Yan Z, Tan W, Zhao W, Dan Y, Wang X, Mao Q, Wang Y, Deng G. Regulatory polymorphisms in the IL-10 gene promoter and HBV-related acute liver failure in the Chinese population. *J Viral Hepat* 2009; 16: 775-783
- 18 Gao QJ, Liu DW, Zhang SY, Jia M, Wang LM, Wu LH, Wang SY, Tong LX. Polymorphisms of some cytokines and chronic hepatitis B and C virus infection. *World J Gastroenterol* 2009; 15: 5610-5619
- 19 Miyazoe S, Hamasaki K, Nakata K, Kajiya Y, Kitajima K, Nakao K, Daikoku M, Yatsushashi H, Koga M, Yano M, Eguchi K. Influence of interleukin-10 gene promoter polymorphisms on disease progression in patients chronically infected with hepatitis B virus. *Am J Gastroenterol* 2002; 97: 2086-2092

编辑 曹丽鸥 电编 何基才

ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) CN 14-1260/R 2010年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

《世界华人消化杂志》正文要求

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

抗体芯片技术的建立及其对肝癌血清标志物的筛选

吴彩霞, 刘琼明, 赵信利, 王斐, 许丹科, 何为

■背景资料

肝癌标志物是肝脏疾病蛋白质组研究的一个热点领域, 如何对已发现的潜在肝癌标志物进行全面、系统的血清学筛选研究, 并从中挖掘出具有临床诊断价值的肝癌血清蛋白标志具有重要意义。

吴彩霞, 甘肃省肿瘤医院 甘肃省兰州市 730050
刘琼明, 赵信利, 王斐, 何为, 军事医学科学院放射与辐射医学研究所 北京蛋白质组研究中心 北京市 102206
许丹科, 南京大学化学化工学院 教育部生命分析化学重点实验室 江苏省南京市 210093
国家863高技术研究发展计划基金资助项目, No. 2006AA02A311; No. 2009AA043702
国家973重点基础研究发展计划基金资助项目, No. 2006CB910803
作者贡献分布: 此课题由吴彩霞、许丹科及何为设计; 实验操作与数据分析由吴彩霞、刘琼明、赵信利及王斐完成; 本论文写作由吴彩霞与何为完成。
通讯作者: 何为, 副研究员, 102206, 北京市, 军事医学科学院放射与辐射医学研究所, 北京蛋白质组研究中心, 蛋白质组学国家重点实验室, hewei1012@263.net
电话: 010-80727777-1228 传真: 010-80705155
收稿日期: 2010-08-06 修回日期: 2010-09-07
接受日期: 2010-09-13 在线出版日期: 2010-11-08

An antibody microarray assay for screening serum biomarkers for liver cancer

Cai-Xia Wu, Qiong-Ming Liu, Xin-Li Zhao, Fei Wang, Dan-Ke Xu, Wei He

Cai-Xia Wu, Tumor Hospital of Gansu Province, Lanzhou 730050, Gansu Province, China
Qiong-Ming Liu, Xin-Li Zhao, Fei Wang, Wei He, State Key Laboratory of Proteomics, Beijing Proteome Research Center, Beijing Institute of Radiation Medicine, Beijing 102206, China
Dan-Ke Xu, Key Laboratory of Analytical Chemistry for Life Science, School of Chemistry and Chemical Engineering, Nanjing University, Nanjing 210093, Jiangsu Province, China

Supported by: the Foundation of National Hi-Tech Research and Development Program, Nos. 2006AA02A311; 2009AA043702; and the Foundation of National Basic Research Program, No. 2006CB910803

Correspondence to: Associate Professor Wei He, State Key Laboratory of Proteomics, Beijing Proteome Research Center, Beijing Institute of Radiation Medicine, Beijing 102206, China. hewei1012@263.net

Received: 2010-08-06 Revised: 2010-09-07

Accepted: 2010-09-13 Published online: 2010-11-08

Abstract

AIM: To develop an antibody microarray assay for screening serum biomarkers for liver cancer.

METHODS: Antibody microarrays targeting 14 potential liver cancer biomarkers were prepared on aldehyde-coated glass slides. The prepared antibody microarrays were incubated with NHS-

biotin-labeled serum samples and visualized with streptavidin-Cy3 fluorescent dye. The serum expression levels of 14 biomarkers were then compared between 44 liver cancer patients and 46 healthy individuals.

RESULTS: The accuracy and reproducibility of data from the developed antibody microarray assay were satisfactory. The serum expression levels of HSP70, CK19, GPC3, PTMA, AFU, GP73, HBxAg and CA125 differed significantly between liver cancer patients and healthy individuals (all $P < 0.01$).

CONCLUSION: An effective antibody microarray assay for screening serum biomarkers for liver cancer has been successfully developed.

Key Words: Antibody microarray; Serum biomarker; Liver cancer

Wu CX, Liu QM, Zhao XL, Wang F, Xu DK, He W. An antibody microarray assay for screening serum biomarkers for liver cancer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(31): 3378-3383

摘要

目的: 建立一种可以诊断肝癌的血清标志物通量筛选分析的抗体芯片技术。

方法: 以14种肝癌潜在标志物为研究对象并制备相应的抗体芯片, 采用对血清样本进行生物素标记的抗体芯片分析策略, 通过Wilcoxon非参数检验方法分析14种潜在蛋白标志物在44例肝癌患者和46名健康者的临床血清标本中的差异表达情况。

结果: 建立了针对生物素标记血清标本的抗体芯片分析技术, 抗体芯片检测分析结果具有较好的重复性和准确性。HSP70、CK19、GPC3、PTMA、AFU、GP73、HBxAg、CA125等8种潜在标志的蛋白表达水平在44例肝癌与46例健康者血清中存在统计学差异 ($P < 0.01$)。

结论: 本研究所建立的基于血清标本生物素

■同行评议者

倪润洲, 教授, 南通大学附属医院 消化内科

标记的抗体芯片分析技术可以初步筛选出具有临床诊断价值的肝癌血清标志。

关键词: 抗体芯片; 血清学标志; 肝癌

吴彩霞, 刘琼明, 赵信利, 王斐, 许丹科, 何为. 抗体芯片技术的建立及其对肝癌血清标志物的筛选. 世界华人消化杂志 2010; 18(31): 3378-3383
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/3378.asp>

0 引言

肝癌是最常见的恶性肿瘤之一, 肝癌标志的研究是肝脏疾病蛋白质组研究的一个热点领域, 随着研究的不断深入, 发现了许多与肝癌的发生发展存在密切联系的差异表达蛋白(称作潜在标志)^[1-8], 且已有部分标志如甲胎蛋白(alpha-fetoprotein, AFP)、异常凝血酶原(des-gamma-carboxy prothrombin, DCP)、癌抗原125(cancer antigen 125, CA125)、谷氨酰转氨酶(gamma glutamyl transferase, GGT)、 α -L-岩藻糖苷酶(α -L-fucosidase, AFU)、磷脂酰肌醇蛋白聚糖3(glypican 3, GPC3)等被开发成诊断试剂并用于肝癌的临床辅助诊断^[9-13], 但研究结果表明目前尚无一种生物标志物能够独立地确诊所有的肝癌. 因此在积极研究探索新的肝癌诊断标志物的同时, 也应该对已经发现的潜在的肝癌标志物进行全面、系统的血清学筛选研究, 从中挖掘出更多的具有临床诊断价值的血清蛋白标志. 传统的蛋白检测分析技术如ELISA和免疫组织化学技术等, 一次实验只能分析一种靶蛋白分子, 在分析通量上难以满足对众多的潜在肝癌标志物筛选分析的需求. 抗体芯片技术作为一种通量化的蛋白质分析技术, 已经用于疾病蛋白质组的研究, 并能够较全面和准确地反映出在疾病发生发展过程中的蛋白质表达水平的变化^[14-16]. 抗体芯片的制备是在我们前期有关蛋白质芯片研究工作的基础上进行的, 即在抗体的点样浓度为1 g/L、点样后芯片4 °C放置过夜条件下, 能够实现抗体的有效固定并获得理想的检测信号^[17]. 因此, 本研究拟以研究报道较多的14种潜在肝癌标志物为研究对象, 制备抗体芯片并开展相关实验条件的优化研究, 建立可用于临床血清标本检测分析的抗体芯片技术, 并初步开展用于肝癌诊断的血清标志筛选的研究.

1 材料和方法

1.1 材料 90例血清样本由北京大学北京肿瘤

医院检验科提供, 其中, 肝癌患者44例, 年龄38-64(平均年龄49±9)岁, 男24例, 女20例, 均经临床确诊; 健康对照者46名均来自同院的健康体检者, 年龄38-53(平均年龄44±4)岁, 男21名, 女25名; 标本的采集是采用BD一次性采血器和真空采血管, 在消毒无菌情况下, 采集静脉血液5 mL, 室温下静置30 min后, 在3 000 r/min下离心15 min, 取上清分装, 置-80 °C保存、待用. 实验中所用的单克隆抗体AFP、GGT、热休克蛋白27(heat shock protein 27, HSP27)、HSP70、细胞角质蛋白19(cytokeratin 19, CK19)、血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)购自美国Thermo Fisher Scientific公司, 人宫颈癌基因蛋白(human cervical cancer oncogene, HCCR)、AFU、高尔基体糖蛋白73(golgi protein 73, GP73)、CA125购自台湾Abnova公司, GPC3、丛生蛋白(clusterin, Clu)购自R&D Systems公司, 胸腺素 α 原(alpha-prothymosin, PTMA)、乙肝X抗原(hepatitis B x Antigen, HBxAg)购自英国Abcam公司, 生物素标记试剂(biotin amido hexanoic acid *N*-hydroxysuccinimide ester)和荧光染料(streptavidin-Cy3)购自美国Sigma公司. 芯片封闭剂TNB购自美国Perkin Elmer公司, 10 g/L BSA(溶于含0.01%吐温-20的TBS缓冲液中)、1 g/L甘氨酸(溶于10 mmol/L PBS、pH7.4的缓冲液中)、5%脱脂奶粉(溶于含0.05%吐温-20的TBS缓冲液中)、1% BSA和0.3% CHAPS(溶于含0.5%吐温-20的PBS缓冲液中)、硼氢化钠溶液(1 g硼氢化钠溶于300 mL 10 mmol/L PBS缓冲液和1 mL无水乙醇中)、12%脱脂奶粉(溶于含0.05%吐温-20的TBS缓冲液中)等芯片封闭剂为自行配制. 微型离心分离柱Bio-Spin6购自美国Bio-Rad公司, 醛基修饰芯片基片购自上海点亮基因科技有限公司, 芯片点样仪(晶芯® Smart Arrayer 48)和荧光芯片扫描仪(晶芯® LuxScan 10K-A)购自北京博奥生物有限公司, 其他试剂为国产的分析纯.

1.2 方法

1.2.1 血清样本的标记: 取10 μ L血清样品, 用10 mmol/L PBS(pH7.4)溶液稀释至100 μ L, 混匀后加入1 μ L浓度为20 g/L的生物素标记试剂(溶剂为无水 N,N -二甲基甲酰胺). 室温下反应1 h, 每隔15 min振荡混匀1次. 将标记后的反应物加入Bio-Spin6柱, 在2 700 r/min离心4 min, 除去游离的生物素标记试剂, 收集纯化的血清标志物, 备用.

■ 研究前沿

寻找特异、敏感的血清蛋白标志物是肝癌临床诊治的研究热点, 采取多种标志物联合检测已经成为提高肝癌早期检出率的发展趋势, 如何筛选出与肝癌发生、发展密切相关的血清蛋白标志, 是目前亟待研究的问题.

■创新盘点

样本标记策略的稳定性直接影响到芯片检测结果的准确性。目前最常用的是对待测样本和对照样本进行交叉混合的双标记策略,其不足是标记操作过程烦琐、复杂。本文所建立的对血清标本进行生物素单标记的分析策略具有良好的稳定性和操作的简便及可控性。

1.2.2 抗体芯片的制备与分析: 用自制贴膜将芯片基片分隔成10个亚阵列区域, 在每个亚阵列中用点样仪进行抗体阵列的制备, 每种抗体的点样浓度均为1 g/L, 每种抗体重复点制6个点; 点制0.1 g/L的biotin-BSA作为芯片的阳性对照点, 5%脱脂奶粉作为阴性对照点。点制好的抗体芯片放在湿盒中, 4℃固定过夜。实验中所有的孵育和洗涤过程都在室温下进行, (1)封闭: 将固定好的抗体芯片用5%的脱脂奶粉孵育1 h; (2)洗涤: 芯片用0.05% TBST溶液(含0.05%吐温-20的TBS缓冲液)洗涤3次, 每次5 min, 然后用蒸馏水清洗3次, 每次2 min; (3)加样: 处理好的血清样品分别加入到芯片的亚阵列中, 室温孵育2 h; (4)洗涤: 芯片用0.05% TBST溶液洗涤3次, 每次10 min, 然后用蒸馏水清洗3次, 每次2 min; (5)加荧光染料: 将2 mg/L的链亲和素-Cy3加入到芯片的亚阵列中, 室温避光孵育1 h; (6)避光洗涤: 操作同步骤(2); (7)芯片检测: 将芯片晾干, 用荧光芯片扫描仪进行检测, 仪器参数设置为激光强度95%, 光电倍增系数850。

1.2.3 AFP含量的测定: 采用Roche Modular E170全自动电化学发光仪检测肝癌患者血清中AFP的含量, 严格按照仪器操作程序进行, 检测由北京大学北京肿瘤医院检验科完成。

1.2.4 芯片数据提取与校正: 采用美国Axon公司的GenePix Pro 3.0生物芯片图像分析软件, 提取芯片上各阵列点的荧光信号强度的中值; 荧光信号有效性的判定原则: $F-B \geq 3d$, 其中F为阵列点的荧光信号强度中值, B为阵列点的背景信号中值, d为背景信号的标准差; 对每种抗体的6个重复数据中可能存在的异常值, 可通过Q检验来决定取舍, 保留的数据点取平均值作为该检测指标的荧光信号强度。芯片数据的校正: $X_{ij} = (S_{ij} - N_i) / P_{ij} \times PT$, 其中 X_{ij} 为校正后的信号强度值, S_{ij} 为第i张芯片上第j个亚阵列中某种抗体所产生的信号强度值, N_i 为第i张芯片上全部阴性对照点的信号强度均值, P_{ij} 为第i张芯片第j亚阵列中阳性对照点的信号强度均值, PT为所有芯片上阳性对照点的信号强度均值。

1.2.5 芯片结果的判定: 利用制备的针对14种潜在肝癌标志的抗体芯片, 对用生物素标记的44例肝癌患者和46名健康人的血清标本进行检测并对获得的芯片数据进行统计学分析^[18,19], 计算每种指标对肝癌诊断的敏感度和特异度。以46例健康者血清中14种指标的各自芯片检测信号强度的均值作为标本诊断结果判定的阈值,

高于该值即判定为阳性, 否则为阴性。

统计学处理 采用Wilcoxon非参数检验方法, 进行肝癌蛋白标志在肝癌患者与健康人血清标本中表达水平的差异比较分析, 通过SPSS17.0统计分析软件计算检验统计量U值, $P < 0.01$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 封闭剂的选择与封闭时间的优化 实验中对7种不同封闭剂的封闭效果进行了考察, 选取可获得较低芯片背景信号的封闭剂用于后续实验。可以看出TNB和5%脱脂奶粉封闭效果最好(366 ± 26 , 417 ± 40), 低于BSA、甘氨酸、CHAPS、硼氢化钠和12%脱脂奶粉(8150 ± 620 , 5516 ± 686 , 2517 ± 379 , 1271 ± 107 , 599 ± 62)。而脱脂奶粉价格低且易获取, 因此本研究选择5%脱脂奶粉作为芯片的封闭剂。实验中还考察了用5%脱脂奶粉在室温下封闭处理芯片1、2、3和4 h的封闭效果, 结果均获得了较低的芯片背景信号, 而且信号之间无显著差异, 因此把芯片的封闭时间定为1 h。

2.2 生物素标记试剂用量以及标记的血清样本分析所用浓度的优化 实验中, 血清样品的总蛋白质浓度按80 g/L计算, 生物素标记试剂的浓度为20 g/L, 分别考察了生物素试剂与血清蛋白的质量比(1:10、1:20、1:40)以及标记的血清样本分析所用的浓度(最终血清样本稀释比例为1:100、1:200、1:400)两个因素对芯片检测结果的影响。实验表明在生物素标记试剂与血清蛋白的质量比为1:40, 血清样本的最终稀释比例为1:200时, 可获得最强的血清样本中AFP指标的芯片检测信号(表1)。因此, 把这一条件作为优化的实验条件用于后续的研究。

2.3 抗体芯片检测结果重复性的评价 在实验中任选了1份血清标本, 将其分为相等的5份, 按前述血清标记方法分别进行标记以及纯化处理, 用抗体芯片对5份平行标记的血清样本分别进行检测, 获取每份样本中14种蛋白指标的荧光信号强度值, 然后计算每种蛋白指标5次检测结果间的变异系数(表2)。

2.4 抗体芯片检测结果准确性的评价 由于本研究所用的44例肝癌患者血清标本中的AFP指标的含量经过临床电化学发光法检测, 所以在试验中以AFP为指标, 考察抗体芯片检测结果与临床电化学发光法检测结果的一致性。临床上对肝癌患者的血清学诊断是以AFP的含量20 μg/L作为

表 1 标记试剂用量与血清样本浓度对AFP指标的芯片检测信号的影响 (mean ± SD)

生物素试剂与 血清蛋白的质量比	血清样本分析时所用的最终稀释比例		
	1 : 100	1 : 200	1 : 400
1 : 10	1 868 ± 389	2 535 ± 454	2 841 ± 139
1 : 20	2 576 ± 31	2 330 ± 50	2 698 ± 523
1 : 40	1 893 ± 80	3 520 ± 794	3 508 ± 523

表 2 同一份血清样本5次标记的14种指标的检测结果

	AFP	GGT	VEGF	CK19	AFU	GP73	HSP27	HSP70	CA125	GPC3	PTMA	CLU	HCCR	HBxAg
1	2 874.6	203.3	1 491.0	1 460.1	31.2	22.4	26.1	4 986.3	33.2	362.5	1 235.5	64.6	35.0	46.1
2	2 751.3	193.1	1 414.4	1 517.9	31.1	20.0	23.7	4 805.5	28.8	408.3	1 031.9	62.1	32.6	42.6
3	3 013.8	197.4	1 110.5	1 185.7	31.4	21.4	24.8	5 070.2	26.1	311.9	1 016.5	58.4	29.4	40.8
4	2 966.3	202.3	1 085.8	1 462.8	33.3	20.8	23.2	5 097.7	34.3	426.2	1 168.1	55.2	27.5	43.9
5	2 803.6	215.4	1 090.0	1 605.4	35.3	22.6	26.1	5 154.6	27.9	373.6	1 254.1	56.4	28.9	40.9
CV	3.8%	4.1%	15.9%	10.8%	5.6%	5.1%	5.4%	2.7%	11.7%	11.8%	9.8%	6.6%	10.0%	5.1%

表 3 两种方法对44例肝癌患者血清标本的判定结果(n)

	阳性	阴性
抗体芯片方法	20	24
电化学发光法	22	22
共同判定结果	18	18

判别阈值, 高于该阈值则判为阳性, 低于此阈值判为阴性. 在抗体芯片方法中, 46名健康体检者血清中AFP指标的平均荧光信号强度(2 191.4), 将其作为肝癌芯片诊断的判别阈值. 两种方法对44例肝癌血清标本进行判别, 对44例肝癌标本判别结果的一致率为 $(18+18)/44 \times 100\% = 81.8\%$ (表3), 因此可以初步认为通过抗体芯片方法能够获得较准确的检测结果.

2.5 肝癌血清标志的初步筛查 以每种指标在46例健康者血清中检测信号的均值作为阈值, 进行标本诊断结果的阳性/阴性判定. 在 $P = 0.01$ 水平, 检验统计量U的界值为2.576(表4).

3 讨论

抗体芯片是一种可对样本中蛋白质的表达水平进行通量化分析的技术, 其分析策略可分为直接法和间接法两种, 直接法虽需要对样本进行标记处理, 但容易实现分析指标的高通量; 间接法(类似ELISA的夹心分析模式)不需要对样本进行标记处理, 但需要高质量的针对靶标蛋白的匹配抗体对试剂, 抗体的交叉反应问题很难克服, 因此该方法难以实现分析指标的高通量.

■应用要点

本文采用抗体芯片技术筛选出了8种与肝癌密切相关的血清蛋白标志物, 可为肝癌临床诊断方法的建立提供参考依据, 也可为在更大规模上实现对肝癌或者其他疾病潜在标志物的血清学筛选研究奠定方法学基础.

近年来, 基于直接法的抗体芯片技术已在疾病蛋白质组研究中得到了广泛应用, 如通过研究乳腺癌^[18]、膀胱癌^[19]、肺癌^[20]、前列腺癌^[21]、胰腺癌^[22]等临床样本中蛋白质表达水平的变化, 从中发现与肿瘤相关的潜在标志物等. 在上述研究中采用的是对待测样本和对照样本进行交叉混合的双标记策略, 其不足是标记操作过程烦琐、复杂.

由于本实验采用的是对血清标本进行生物素单标记的分析策略, 因此标记方法的稳定性和检测结果的可重复性将直接影响到芯片检测结果的准确性. 血清是一个十分复杂的体系, 含有种类繁多的蛋白质, 而且这些蛋白质的丰度存在巨大的差异. 在对血清样品进行直接标记时, 如果生物素标记试剂用量过低, 会使得血清中蛋白质的标记不完全, 导致芯片的检测信号低; 如果生物素标记试剂用量过高, 会使得蛋白质的标记过度, 影响蛋白质与抗体的结合活性, 同时也会带来较高的芯片检测背景, 影响对某些低丰度含量蛋白质的检出, 因此选择合适的生物素标记试剂用量对于获得理想的芯片检测结果是至关重要的. 在本研究中, 通过试验条件的优化研究, 获得了理想的生物素标记试剂用量, 即当生物素标记试剂用量与血清标本中蛋白的质量比为1 : 40时, 可得到最佳的芯片检测效果, 而且整个标记反应过程时间短(仅需1 h)、分离纯化简便(离心4 min即可). 通过对5份同一血清样本平行进行的生物素标记和抗体芯片检测分析, 发现14种蛋白指标的芯片检测信号强

■同行评价

本文科学性尚可, 具有一定的临床借鉴意义。

表 4 14种肝癌指标的诊断效能

检测指标	敏感度%(n)	特异度%(n)	U值	P值
AFP	45.45(20/44)	50.00(23/46)	0.597	>0.01
GPC3	72.73(32/44)	56.52(26/46)	3.826	<0.01
HSP70	75.00(33/44)	45.65(21/46)	3.543	<0.01
CK19	63.64(28/44)	58.70(27/46)	2.704	<0.01
VEGF	45.45(20/44)	54.35(25/46)	0.646	>0.01
PTMA	77.27(34/44)	47.83(22/46)	3.915	<0.01
Clu	20.45(9/44)	56.52(26/46)	0.396	>0.01
HBxAg	79.55(35/44)	52.17(24/46)	3.180	<0.01
GGT	38.64(17/44)	56.52(26/46)	0.525	>0.01
AFU	79.55(35/44)	47.83(22/46)	4.359	<0.01
GP73	72.73(32/44)	54.35(25/46)	3.108	<0.01
HCCR	34.09(15/44)	60.87(28/46)	0.896	>0.01
HSP27	47.73(21/44)	60.87(28/46)	2.297	>0.01
CA125	72.73(32/44)	58.70(27/46)	3.317	<0.01

度的变异系数(CV)在2.7%-15.9%, 表明抗体芯片的检测结果显示具有较好的重复性, 也说明本研究所建立的血清标本生物素标记方法具有良好的稳定性和操作的简便及可控性。

在血清标本的抗体芯片检测中, 高背景信号是影响芯片检测结果准确性的一个重要因素, 在研究中, 通过对封闭剂的种类、封闭时间、标记反应以及血清样本稀释比例等工作条件进行的优化, 获得了均匀且信号值较低的芯片背景, 而且筛选出一种效果可与商品化封闭剂(TNB试剂)相媲美且价格低廉的芯片封闭剂(5%脱脂奶粉)。

AFP是惟一经FDA批准的肝癌临床诊断标志物, 也是肝癌血清学检测的必检指标, 为了评价抗体芯片检测结果的准确性, 本研究以AFP为考察指标, 来评价抗体芯片方法与临床电化学发光方法对44例肝癌样本判别结果的一致性, 结果达到81.8%的符合度, 表明抗体芯片方法能够获得较准确的检测结果。

通过对生物素标记血清标本的抗体芯片检测结果的重复性和准确性的考察, 表明所建立的抗体芯片技术是一种有效的血清蛋白质分析手段。利用本研究所建立的抗体芯片分析策略检测了44例肝癌患者和46例健康体检者血清标本, 其芯片结果的统计学分析显示, HSP70、CK19、GPC3、PTMA、AFU、GP73、HBx-Ag、CA125等8种潜在标志的蛋白表达水平在肝癌与健康者血清中存在统计学差异, 且在肝癌患者血清中的表达水平均明显升高, 表明这8种指标有可能成为肝癌诊断的血清标志。由试

验结果可以看出单种指标对肝癌的诊断敏感度在20.45%-79.55%, 特异度在45.65%-60.87%。而当HSP70、CK19、GPC3、PTMA、AFU、GP73、HBxAg、CA125等8种指标联合检测时的诊断敏感度可提高到97.73%(43/44), 但特异度降至23.91%(11/46), 提示建立基于多种标志联合检测的诊断模式, 将会弥补单项指标诊断的灵敏度较低的缺点, 降低漏诊率, 提高肝癌临床诊断的检出率。

本研究的初步结果表明, 利用建立的基于血清标本生物素标记的抗体芯片分析技术, 不仅可以实现对血清样本中多种指标蛋白的通量化检测分析, 而且也有可能筛选出一些具有临床肝癌诊断价值的血清学标志, 为在更大规模上实现对肝癌或者其他疾病潜在标志物的血清学筛选研究奠定方法学基础。

志谢: 北京大学北京肿瘤医院检验科提供本研究所所需的临床血清标本。

4 参考文献

- 1 王嘉倍, 刘连新. 肝细胞癌生物标志物的研究进展. 世界华人消化杂志 2005; 13: 2251-2256
- 2 吴诚, 施斌, 朱樑. 蛋白质组学在肝癌标志物研究中的应用. 中国癌症杂志 2006; 16: 1071-1074
- 3 Tannapfel A, Anhalt K, Häusermann P, Sommerer F, Benicke M, Uhlmann D, Witzigmann H, Hauss J, Wittekind C. Identification of novel proteins associated with hepatocellular carcinomas using protein microarrays. *J Pathol* 2003; 201: 238-249
- 4 Srivatanakul P, Sriplung H, Deerasamee S. Epidemiology of liver cancer: an overview. *Asian Pac J Cancer Prev* 2004; 5: 118-125
- 5 Yuen MF, Tanaka Y, Fong DY, Fung J, Wong DK, Yuen JC, But DY, Chan AO, Wong BC, Mizokami

- M, Lai CL. Independent risk factors and predictive score for the development of hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis B. *J Hepatol* 2009; 50: 80-88
- 6 Qin LX, Tang ZY. The prognostic significance of clinical and pathological features in hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2002; 8: 193-199
- 7 Yao DF, Dong ZZ, Yao M. Specific molecular markers in hepatocellular carcinoma. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2007; 6: 241-247
- 8 Beale G, Chattopadhyay D, Gray J, Stewart S, Hudson M, Day C, Trerotoli P, Giannelli G, Manas D, Reeves H. AFP, PIVKAL, GP3, SCCA-1 and follistatin as surveillance biomarkers for hepatocellular cancer in non-alcoholic and alcoholic fatty liver disease. *BMC Cancer* 2008; 8: 200
- 9 吴年良, 陈安彬, 周勇. 肝癌标志物多项联合检测的临床意义. 蚌埠医学院学报 2000; 25: 50-51
- 10 阮秀花, 张效本, 任丽君, 田葱, 张喜梅. 肝癌患者血清AFP, AFU和SHCSP的联合检测. 临床肝胆病杂志 2003; 19: 61-62
- 11 高海燕, 朱华, 丛占杰. 三种肝癌标志物对肝癌诊断特异性的评价. 实用肿瘤学杂志 2004; 18: 364-366
- 12 范公忍, 任永强, 邓涛, 陈天宝, 贾志玲, 胡大荣. 多项肿瘤标志物蛋白芯片在原发性肝癌诊断上的应用. 胃肠病学和肝病学杂志 2005; 14: 568-570
- 13 沈卫东, 黄介飞. 肝癌特异性GGT诊断肝癌的研究进展. 世界华人消化杂志 2005; 13: 1119-1122
- 14 Haab BB, Dunham MJ, Brown PO. Protein microarrays for highly parallel detection and quantitation of specific proteins and antibodies in complex solutions. *Genome Biol* 2001; 2: RESEARCH0004
- 15 Perlee L, Christiansen J, Dondero R, Grimwade B, Lejnine S, Mullenix M, Shao W, Sorette M, Tchernev V, Patel D, Kingsmore S. Development and standardization of multiplexed antibody microarrays for use in quantitative proteomics. *Proteome Sci* 2004; 2: 9
- 16 Sanchez-Carbayo M. Applying antibody arrays in cancer research. *Clin Lab Internat* 2006; 7: 31-34
- 17 何为, 许丹科, 刘志红, 刘泽源, 黄英, 李明, 宁云山, 王云丹, 孙启鸿. 蛋白质微阵列芯片技术及其在抗体筛选中的应用. 分析化学 2005; 33: 37-40
- 18 Carlsson A, Wingren C, Ingvarsson J, Ellmark P, Baldertorp B, Fernö M, Olsson H, Borrebaeck CA. Serum proteome profiling of metastatic breast cancer using recombinant antibody microarrays. *Eur J Cancer* 2008; 44: 472-480
- 19 Sanchez-Carbayo M, Socci ND, Lozano JJ, Haab BB, Cordon-Cardo C. Profiling bladder cancer using targeted antibody arrays. *Am J Pathol* 2006; 168: 93-103
- 20 Gao WM, Kuick R, Orzechowski RP, Misek DE, Qiu J, Greenberg AK, Rom WN, Brenner DE, Omenn GS, Haab BB, Hanash SM. Distinctive serum protein profiles involving abundant proteins in lung cancer patients based upon antibody microarray analysis. *BMC Cancer* 2005; 5: 110
- 21 Miller JC, Zhou H, Kwekel J, Cavallo R, Burke J, Butler EB, Teh BS, Haab BB. Antibody microarray profiling of human prostate cancer sera: antibody screening and identification of potential biomarkers. *Proteomics* 2003; 3: 56-63
- 22 Ingvarsson J, Wingren C, Carlsson A, Ellmark P, Wahren B, Engström G, Harmenberg U, Krogh M, Peterson C, Borrebaeck CA. Detection of pancreatic cancer using antibody microarray-based serum protein profiling. *Proteomics* 2008; 8: 2211-2219

编辑 李薇 电编 李薇

ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) CN 14-1260/R 2010年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

《世界华人消化杂志》栏目设置

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

《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(科技部列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-RCCS权威、核心期刊排行榜与指南》和中国知识资源总库收录。2008年度《世界华人消化杂志》总被引频次为2480, 位居内科学类41种期刊的第6位; 影响因子为0.547, 位居内科医学类41种期刊的第17位。《世界华人消化杂志》即年指标0.059, 他引率0.79, 地区分布数29, 基金论文比0.340, 国际论文比0.00, 学科影响指标0.59, 综合评价总分49.5, 位居内科学类41种期刊的第8位。

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

2 撰稿要求

2.1 总体标准 文稿撰写应遵照国家标准GB7713科学技术报告、学位论文和学术论文的编写格式, GB6447文摘编写规则, GB7714文后参考文献著录规则, GB/T 3179科学技术期刊编排格式等要求; 同时遵照国际医学期刊编辑委员会(International Committee of Medical Journal Editors)制定的《生物医学期刊投稿的统一要求(第5版)》(Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals)。见: *Ann Intern Med* 1997; 126: 36-47。

2.2 名词术语 应标准化, 前后统一, 如原词过长且多次出现者, 可于首次出现时写出全称加括号内注简称, 以后直接用简称。医学名词以全国自然科学名词审定委员会公布的《生理学名词》、《生物化学名词与生物物理学名词》、《化学名词》、《植物学名词》、《人体解剖学名词》、《细胞生物学名词》及《医学名词》系列为准, 药名以《中华人民共和国药典》和卫生部药典委员会编的《药名词汇》为准, 国家食品药品监督管理局批准的新药, 采用批准的药名; 创新性新药, 请参照我国药典委员会的“命名原则”, 新译名词应附外文。公认习用缩略语可直接应用(建议第一次也写出全称), 如ALT, AST, mAb, WBC, RBC, Hb, T, P, R, BP, PU, GU, DU, ACTH, DNA, LD50, HBsAg, HCV

RNA, AFP, CEA, ECG, IgG, IgA, IgM, TCM, RIA, ELISA, PCR, CT, MRI等. 为减少排印错误, 外文、阿拉伯数字、标点符号必须正确打印在A4纸上. 中医药名词英译要遵循以下原则: (1)有对等词者, 直接采用原有英语词, 如中风stroke, 发热fever; (2)有对应词者应根据上下文合理选用原英语词, 如八法eight principal methods; (3)英语中没有对等词或相应词者, 宜用汉语拼音, 如阴yin, 阳yang, 阴阳学说yinyangology, 人中renzhong, 气功qigong; 汉语拼音要以词为单位分写, 如weixibao nizhuanwan(胃细胞逆转丸), guizhitang(桂枝汤). 通常应小写.

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

2.4 计量单位 采用国际单位制并遵照有关国家

标准, GB3100-3102-93量和单位. 原来的“分子量”应改为物质的相对分子质量. 如30 kD改为M_r 30 000或30 kDa(M大写斜体, r小写正体, 下角标); “原子量”应改为相对原子质量, 即A_r(A大写斜体, r小写正体, 下角标); 也可采用原子质量, 其单位是u(小写正体). 计量单位在+、-及-后列出. 在±前后均要列出, 如37.6 °C ± 1.2 °C, 45.6岁 ± 24岁, 56.4 d ± 0.5 d. 3.56 ± 0.27 pg/ml应为3.56 ng/L ± 0.27 ng/L. BP用kPa(mmHg), RBC数用1 × 10¹²/L, WBC数用1 × 10⁹/L, WBC构成比用0.00表示, Hb用g/L. M_r明确的体内物质以nmol/L或mmol/L表示, 不明确者用g/L表示. 1 M硫酸, 改为1 mol/L硫酸, 1 N硫酸, 改为0.5 mol/L硫酸. 长10 cm, 宽6 cm, 高4 cm, 应写成10 cm × 6 cm × 4 cm. 生化指标一律采用法定计量单位表示, 例如, 血液中的总蛋白、清蛋白、球蛋白、脂蛋白、血红蛋白、总脂用g/L, 免疫球蛋白用mg/L; 葡萄糖、钾、尿素、尿素氮、CO₂结合力、乳酸、磷酸、胆固醇、胆固醇酯、三酰甘油、钠、钙、镁、非蛋白氮、氯化物; 胆红素、蛋白结合碘、肌酸、肌酐、铁、铅、抗坏血酸、尿胆元、氨、维生素A、维生素E、维生素B1、维生素B2、维生素B6、尿酸; 氢化可的松(皮质醇)、肾上腺素、汞、孕酮、甲状腺素、睾酮、叶酸用nmol/L; 胰岛素、雌二醇、促肾上腺皮质激素、维生素B12用pmol/L. 年龄的单位有日龄、周龄、月龄和岁. 例如, 1秒, 1 s; 2分钟, 2 min; 3小时, 3 h; 4天, 4 d; 5周, 5 wk; 6月, 6 mo; 雌性♀, 雄性♂, 酶活性国际单位IU = 16.67 nkat, 对数log, 紫外uv, 百分比%, 升L, 尽量把1 × 10⁻³ g与5 × 10⁻⁷ g之类改成1 mg与0.5 mg, hr改成h, 重量γ改成mg, 长度m改成mm. 国际代号不用于无数字的文句中, 例如每天不写每d, 但每天8 mg可写8 mg/d. 在一个组合单位符号内不得有1条以上的斜线, 例如不能写成mg/kg/d, 而应写成mg/(kg·d), 且在整篇文章内应统一. 单位符号没有单、复数的区分, 例如, 2 min不是2 mins, 3 h不是3 hs, 4 d不是4 ds, 8 mg不是8 mgs. 半个月, 15 d; 15克, 15 g; 10%福尔马林, 40 g/L甲醛; 95%酒精, 950 mL/L乙醇; 5% CO₂, 50 mL/L CO₂; 1 : 1 000肾上腺素, 1 g/L肾上腺素; 胃黏膜含促胃液素36.8 pg/mg, 改为胃黏膜蛋白含促胃液素36.8 ng/g; 10%葡萄糖改为560 mmol/L或100 g/L葡萄糖; 45 ppm = 45 × 10⁻⁶; 离心的旋转频率(原称转速)用r/min, 超速者用g; 药物剂量若按体质量计算, 一律以“/kg”表示.

《世界华人消化杂志》为中国科技论文统计源核心期刊(2009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: 010-85381901, 传真: 010-85381893, Email: wjcd@wjgnet.com; http://www.wjgnet.com

2.5 统计学符号 (1) t 检验用小写 t ; (2) F 检验用英文大写 F ; (3)卡方检验用希文小写 χ^2 ; (4)样本的相关系数用英文小写 r ; (5)自由度用希文小写 ν ; (6)样本数用英文小写 n ; (7)概率用英文斜体大写 P . 在统计学处理中在文字叙述时平均数 $\pm$ 标准差表示为 $\text{mean} \pm \text{SD}$, 平均数 $\pm$ 标准误为 $\text{mean} \pm \text{SE}$. 统计学显著性用 $^aP < 0.05$, $^bP < 0.01$ ($P > 0.05$ 不注). 如同一表中另有一套 P 值, 则 $^cP < 0.05$, $^dP < 0.01$; 第三套为 $^eP < 0.05$, $^fP < 0.01$ 等.

2.6 数字用法 遵照国家标准GB/T 15835-1995出版物上数字用法的规定, 作为汉语词素者采用汉字数字, 如二氧化碳、十二指肠、三倍体、四联球菌、五四运动、星期六等. 统计学数字采用阿拉伯数字, 如1000-1500 kg, 3.5 mmol/L $\pm$ 0.5 mmol/L等. 测量的数据不能超过其测量仪器的精密度, 例如6347意指6000分之一的精密度. 任何一个数字, 只允许最后一位有误差, 前面的位数不应有误差. 在一组数字中的 $\text{mean} \pm \text{SD}$ 应考虑到个体的变差, 一般以SD的1/3来定位数, 例如3614.5 g $\pm$ 420.8 g, SD的1/3达一百多g, 平均数波动在百位数, 故应写成3.6 kg $\pm$ 0.4 kg, 过多的位数并无意义. 又如8.4 cm $\pm$ 0.27 cm, 其SD/3 = 0.09 cm, 达小数点后第2位, 故平均数也应补到小数点后第2位. 有效位数以后的数字是无效的, 应该舍. 末尾数字, 小于5则舍, 大于5则进, 如恰等于5, 则前一位数逢奇则进, 逢偶(包括“0”)且5之后全为0则舍. 末尾时只可1次完成, 不得多次完成. 例如23.48, 若不要小数点, 则应成23, 而不应该23.48 $\rightarrow$ 23.5 $\rightarrow$ 24. 年月日采用全数字表达法, 请按国家标准GB/T 7408-94书写. 如1985年4月12日, 可写作1985-04-12; 1985年4月, 写作1985-04; 从1985年4月12日23时20分50秒起至1985年6月25日10时30分止, 写作1985-04-12 T23:20:50/1985-06-25 T10:30:00; 从1985年4月12日起至1985年6月15日止, 写作1985-04-12/06-16, 上午8时写作08:00, 下午4时半写作16:30. 百分数的有效位数根据分母来定: 分母 ≤ 100 , 百分数到个位; $101 \leq \text{分母} \leq 1000$, 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致谢中. 作者署名的次序按贡献大小排列, 多作者时姓名间用逗号, 如是单名, 则在姓与名之间空1格(正文和参考文献中不空格). 《世界华人消化杂志》要求所有署名人写清楚自己对文章的贡献. 世界华人消化杂志不设置共同第一作者和共同通信作者.

3.3 单位 作者后写单位的全称空1格后再写省市及邮政编码. 格式如: 张旭晨, 梅立新, 承德医学院病理教研室 河北省承德市 067000

3.4 第一作者简介 格式如: 张旭晨, 1994年北京中医药大学硕士, 讲师. 主要从事消化系统疾病的病理研究.

3.5 作者贡献分布 格式如: 陈湘川与庞丽娟对此文所作贡献两均等; 此课题由陈湘川、庞丽娟、陈玲、杨兰、张金芳、齐妍及李洪安设计; 研究过程由陈玲、杨兰、张金芳、蒋金芳、杨磊、李锋及曹秀峰操作完成; 研究所用新试剂及分析工具由曹秀峰提供; 数据分析由陈湘川、杨兰及庞丽娟完成; 本论文写作由陈湘川、庞丽娟及李洪安完成.

3.6 同行评议者 为了确保刊出文章的质量, 本刊即将开始实行接受稿件的同行评议公开策略, 将同行评议者姓名, 职称, 机构的名称与文章一同在脚注出版. 格式如: 房静远, 教授, 上海交通

大学医学院附属医院仁济医院, 上海市消化疾病研究所.

3.7 基金资助项目 格式如: 国家自然科学基金资助项目, No. 30224801

3.8 通讯作者 格式如: 通讯作者: 黄缘, 教授, 330006, 江西省南昌市民德路1号, 南昌大学第二附属医院消化内科, 江西省分子医学重点实验室. huang9815@yahoo.com

电话: 0351-4078656 传真: 0351-4086337

收稿日期: 修回日期:

3.9 英文摘要

题名 文章的题名应言简意赅, 方便检索, 英文题名以不超过10个实词为宜, 应与中文题名一致.

作者 作者姓名汉语拼音拼写法规定为: 先名, 后姓; 首字母大写, 双名之间用半字线“-”分开, 多作者时姓名间加逗号. 格式如: “潘伯荣”的汉语拼写法为“Bo-Rong Pan”.

单位 先写作者, 后写单位的全称及省市邮政编码. 例如: Xu-Chen Zhang, Li-Xin Mei, Department of Pathology, Chengde Medical College, Chengde 067000, Hebei Province, China

基金资助项目 格式如: Supported by National Natural Science Foundation of China, No.30224801

通讯作者 格式如: Correspondence to: Dr. Lian-Sheng Ma, Taiyuan Research and Treatment Center for Digestive Diseases, 77 Shuangta Xijie, Taiyuan 030001, Shanxi Province, China. wcjd@wjgnet.com

收稿及修回日期 格式如: Received: Revised:

摘要 包括目的、方法、结果、结论, 书写要求与中文摘要一致.

3.10 中文摘要 必须在300字左右, 内容应包括目的(应阐明研究的背景和设想、目的), 方法(必须包括材料或对象. 应描述课题的基本设计, 双盲、单盲还是开放性, 使用什么方法, 如何进行分组和对照, 数据的精确程度. 研究对象选择条件与标准是否遵循随机化、齐同化的原则, 对照组匹配的特征. 如研究对象是患者, 应阐明其临床表现, 诊断标准. 如何筛选分组, 有多少例进行过随访, 有多少例因出现不良反应而中途停止研究), 结果(应列出主要结果, 包括主要数据, 有什么新发现, 说明其价值和局限, 叙述要真实、准确、具体, 所列数据经用何种统计学方法处理; 应给出结果的置信区间和统计学显著性检验的确切值; 概率写 P , 后应写出相应显著性检验值), 结论(全文总结, 准确无误的观点及价值).

3.11 正文标题层次 0引言; 1 材料和方法, 1.1 材

料, 1.2 方法; 2 结果; 3 讨论; 4 参考文献. 序号一律左顶格写, 后空1格写标题; 2级标题后空1格接正文. 正文内序号连排用(1), (2), (3). 以下逐条陈述.

0 引言 应包括该研究的目的和该研究与其他相关研究的关系.

1 材料和方法 应尽量简短, 但应让其他有经验的研究者能够重复该实验. 对新的方法应该详细描述, 以前发表过的方法引用参考文献即可, 有关文献中或试剂手册中的方法的改进仅描述改进之处即可.

2 结果 实验结果应合理采用图表和文字表示, 在结果中应避免讨论.

3 讨论 要简明, 应集中对所得的结果做出解释而不是重复叙述, 也不应是大量文献的回顾.

图表的数量要精选. 表应有表序和表题, 并有足够具有自明性的信息, 使读者不查阅正文即可理解该表的内容. 表内每一栏均应有表头, 表内非公知通用缩写应在表注中说明, 表格一律使用三线表(不用竖线), 在正文中该出现的地方应注出. 图应有图序、图题和图注, 以使其容易被读者理解, 所有的图应在正文中该出现的地方注出. 同一个主题内容的彩色图、黑白图、线条图, 统一用一个注解分别叙述. 如图1 萎缩性胃炎治疗前后病理变化. A: ...; B: ...; C: ...; D: ...; E: ...; F: ...; G: ... 曲线图可按●、○、■、□、▲、△顺序使用标准的符号. 统计学显著性用: ^a $P<0.05$, ^b $P<0.01$ ($P>0.05$ 不注). 如同一表中另有一套 P 值, 则^c $P<0.05$, ^d $P<0.01$; 第3套为^e $P<0.05$, ^f $P<0.01$. P 值后注明何种检验及其具体数字, 如 $P<0.01$, $t = 4.56$ vs 对照组等, 注在表的左下方. 表内采用阿拉伯数字, 共同的计量单位符号应注在表的右上方, 表内个位数、小数点、±、-应上下对齐. “空白”表示无此项或未测, “-”代表阴性未发现, 不能用同左、同上等. 表图勿与正文内容重复. 表图的标目尽量用 t/min , $c/(\text{mol/L})$, p/kPa , V/mL , $t/^\circ\text{C}$ 表达. 黑白图请附黑白照片, 并考入磁盘内; 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.

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

《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。

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,则在论述的句末右上角注角码号。如马连生^[1]报告……,潘伯荣等^[2-5]认为……;PCR方法敏感性高^[6-7]。文献序号作正文叙述时,用与正文同号的数字并排,如本实验方法见文献[8]。所引参考文献必须以近2-3年SCIE, PubMed,《中国科技论文统计源期刊》和《中文核心期刊要目总览》收录的学术类期刊为准,通常应只引用与其观点或数据密切相关的国内外期刊中的最新文献。期刊:序号,作者(列出全体作者),文题,刊名,年,卷,起页-止页,PMID和DOI编号;书籍:序号,作者(列出全部),书名,卷次,版次,出版地,出版社,年,起页-止页。

5 网络版的发表前链接 本刊即将开始实行网络版的每篇文章上都有该文发表前纪录的链接,包括首次提交的稿件,同行评议人报告,作者给审稿人回信和作者修回稿,以PDF格式上传。读者可以针对论文、审稿意见和作者的修改情况发表意见,指出问题与不足;作者也可以随时修改完善自己发表的论文,使文章的发表成为一个编者、同行评议者、读者、作者互动的动态过程。

4 写作格式实例

4.1 述评写作格式实例

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

4.2 研究原著写作格式实例

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

4.3 焦点论坛写作格式实例

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

4.4 文献综述写作格式实例

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

4.5 研究快报写作格式实例

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

4.6 临床经验写作格式实例

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

4.7 病例报告写作格式实例

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

5 投稿方式

接受在线投稿,不接受其他方式的投稿,如E-mail、打印稿。在线投稿网址: <http://www.baishideng.com/wcjd/ch/index.aspx>。无法在线提交的通过submission@wjgnet.com, 电话: 010-8538-1892, 传真: 010-8538-1893寻求帮助。投

稿须知下载网址<http://www.wjgnet.com/1009-3079/tgxz.pdf>。审稿过程平均时间需要14-28 d。所有的来稿均经2-3位同行专家严格评审,2位或以上通过为录用,否则将退稿或修改后再审。接受后的稿件作者需缴纳稿件处理费及发表费,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: 010-8538-1892
传真: 010-8538-1893
E-mail: wcjd@wjgnet.com
<http://www.wjgnet.com>

2010-2011年国内国际会议预告

2010-11-08/11

肝胆管结石病的微创治疗学习班

会议地点: 南充市

联系方式: 0817-2262419

2010-11-08/13

肿瘤多学科综合诊治新概念学术研讨会

会议地点: 三亚市

联系方式: 010-67762118

2010-11-11/14

中国医师协会感染科医师分会第三届全国感染科医师大会

会议地点: 杭州市

联系方式: 0571-87567810

2010-11-12/14

第十四届全国超声内镜学术研讨会

会议地点: 上海市

联系方式: 021-81873242

2010-11-12/15

内镜黏膜下剥离术(ESD)及其并发症防治学习班

会议地点: 哈尔滨市

联系方式: liubingrong@medmail.com.cn

2010-11-12/16

无创性肝纤维化诊断及常见肝病新进展学习班

会议地点: 南京市

联系方式: 025-80864021

2010-11-17/20

中华医学会糖尿病学分会第十四次全国学术会议

会议地点: 苏州市

联系方式: fredfeng@cma.org.cn

2010-11-17/21

第二届国际中西医结合肝病学术会议(2nd ISLD)

会议地点: 上海市

联系方式: carl95@163.com

2010-11-17/21

消化及消化内镜前沿理论和技术学习班

会议地点: 南京市

联系方式: 025-80004616

2010-11-18/21

2010年中国国际肝胆外科论坛

会议地点: 上海市

联系方式: 021-68383773

2010-11-18/21

第十四届全国胆道外科学术会议暨2010中国国际肝胆外科论坛

会议地点: 上海市

联系方式: ncbs_cifhbs@126.com

2010-11-26/27

全军首届临床营养支持研讨会暨北京肠外内营养专业委员会消化疾病营养支持专题研讨会

会议地点: 北京市

联系方式: drqiaozhi@hotmail.com

2010-12-02/06

第九届广东省消化内镜学术年会

会议地点: 广州市

联系方式: 020-61641541

2010-12-10/12

2010江苏省腹腔镜临床应用进展研讨班

会议地点: 苏州市

联系方式: 0512-67784095/67784099

2010-12-26/30

肝胆疾病-肝功能衰竭治疗新理念

会议地点: 南京市

联系方式: 025-83106666-66866

2011-01-20/22

2011年胃肠道癌症研讨会-胃肠道肿瘤的科学和多学科管理

会议地点: 美国旧金山

联系方式: giregistration@jspargo.com

2011-03

中华医学会第四次全国感染性疾病中青年学术会议

会议地点: 长沙市

联系方式: medcon@126.com

2011-03-25/27

首届中国腹膜后肿瘤论坛

会议地点: 北京市

联系方式: sjtcolorectalsurgery@gmail.com

2011-04-15/17

第二届中国肿瘤介入与微创治疗大会

会议地点: 上海市

联系方式: 010-84288944

2011-06-16/20

第二十三次全国中西医结合消化学术会议

会议地点: 太原市

联系方式: 0351-4174328

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!

陈进宏 副主任医师
复旦大学附属华山医院外科

陈志辉 副教授
中国人民解放军第二军医大学附属长海医院感染科

程英升 教授
同济大学附属第十人民医院影像临床医学中心

迟宝荣 教授
吉林大学第一医院消化内科

杜祥 教授
复旦大学附属肿瘤医院病理科

房静远 教授
上海交通大学医学院附属仁济医院消化内科, 上海市消化疾病研究所

洪天配 教授
北京大学第三医院内分泌科

黄颖秋 教授
本溪钢铁(集团)有限责任公司总医院消化内科

刘海林 主任医师
上海交通大学医学院附属第九人民医院消化科

刘勇钢 副主任医师
天津市传染病医院病理科

龙学颖 副主任医师
中南大学湘雅医院放射科

禄韶英 副主任医师
西安交通大学医学院第一附属医院普外科

倪润洲 教授
南通大学附属医院消化内科

欧希龙 副教授
东南大学中大医院消化科

潘兴华 副主任医师
成都军区昆明总医院病理实验科

潘秀珍 教授
福建省立医院消化内科

朴云峰 教授
吉林大学第一临床医院消化科

沈薇 教授
重庆医科大学附属第二医院消化内科

石毓君 副研究员
四川大学华西医院外科

汤华 研究员
重庆医科大学感染性疾病分子生物学教育部重点实验室

唐文富 副教授
四川大学华西医院中西医结合科

田宇彬 教授
青岛大学医学院附属医院消化内科

王邦茂 教授
天津医科大学总医院消化内科

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

杨柏霖 副主任医师
南京中医药大学附属医院结直肠外科

张国梁 主任医师
天津市第一中心医院消化内科

张佳林 教授
中国医科大学附属第一医院肝胆外科暨器官移植科

郑培永 副研究员
上海中医药大学脾胃病研究所

周南进 研究员
江西省医学科学研究所