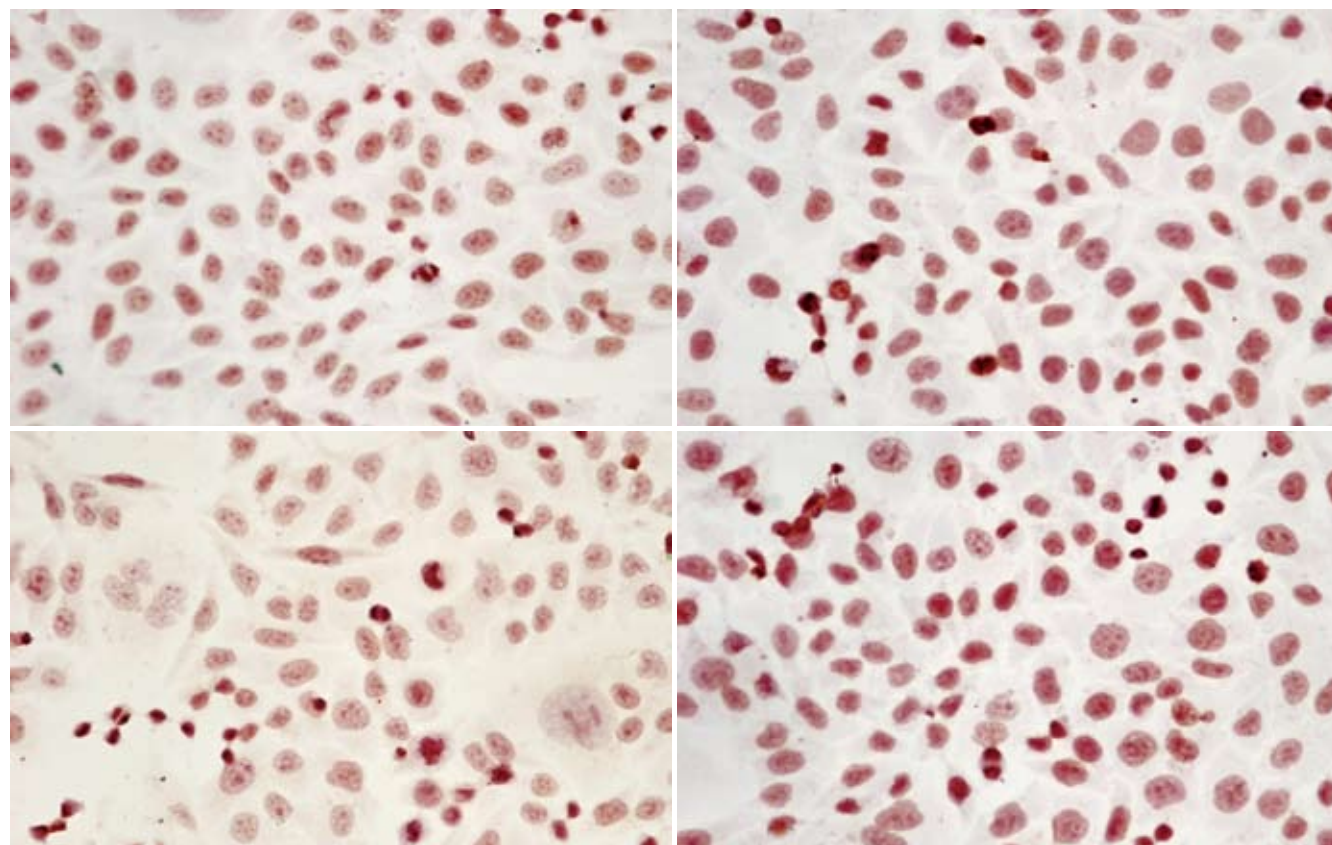


世界华人消化杂志®

WORLD CHINESE
JOURNAL OF DIGESTOLOGY

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

2010年3月28日 第18卷 第9期 (Volume 18 Number 9)



9 / 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
杨思风教授
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
聂新明教授
陈洪副教授

陈其奎教授
陈卫昌教授
陈贻胜教授
程斌副教授
迟宝荣教授
崔立红副教授
邓长生教授
丁士刚主任医师
董蕾教授
杜雅菊主任医师
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
郭晓钟教授
郝建宇教授
何松教授
洪天配教授
胡伏莲教授
胡和平主任医师
黄晓东副主任医师
黄颖秋教授
黄缘教授
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
李祖国副教授
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
刘占举教授
陆伦根教授

马红主任医师
马欣主任医师
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
王承党副教授
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
周国雄主任医师
周晓东副教授
朱春兰主任医师
邹晓平主任医师
消化外科学
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
陈立波副教授
陈凇教授
陈强谱教授
陈汝福教授
陈亚军主任医师
陈钟教授
程爱国教授
程爱群主任医师
程树群副教授
仇毓东副教授
崔云甫教授
戴朝六教授
戴冬秋教授
单云峰副主任医师
丁义涛教授
董明教授
房林副教授
傅红副教授
傅华群教授
傅志仁主任医师
葛海燕教授
巩鹏副教授
谷俊朝主任医师
顾岩教授
韩天权教授
郝纯毅主任医师
何超教授
何裕隆教授
黄志勇教授
季加孚教授
莫卫东副主任医师
蒋龙元副教授
李国威教授
李华副教授
李华山主任医师
李奇林教授
李胜研究员
李涛副主任医师

李文岗副教授
李旭副教授
李永翔主任医师
梁力建教授
刘超副教授
刘建教授
卢实春教授
陆才德教授
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
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
裘正军教授
沈柏用副教授
沈世强教授
施诚仁教授
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
汤恢焕教授
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

世界华人消化杂志®

编辑委员会

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
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
严律南教授
杨柏霖副主任医师
杨家和主任医师
杨秋蒙副主任医师
杨维良教授
伊力亚尔·夏合丁教授
殷正丰教授
于聪慧教授
于则利教授
郝宝铭教授
元云飞教授
张佳林教授
张进祥副教授
张俊副研究员
张群华教授
张水军教授
张宗明教授
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
龚国忠教授
管世鹤副教授
何生松教授
胡国信副主任医师
林菊生教授
刘正稳教授
貌盼勇研究员
宁琴教授
钱林学主任医师
孙殿兴主任医师
谭德明教授
汤华研究员
唐霓副研究员
唐晓鹏教授
王凯教授
王怡主任医师
魏来教授
吴建国教授
吴君主任医师
宣世英教授
杨江华副主任医师
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
周霞秋教授
朱传武主任医师
庄林主任医师

消化中医药学

蔡淦教授
陈治水主任医师
杜群副研究员
黄恒青主任医师
李军祥教授
李康副教授
李勇副教授
李振华教授
刘成海研究员
刘孟安教授
刘平教授
刘绍能主任医师

沈洪教授
唐志鹏研究员
王富春教授
王新月教授
谢鸣教授
徐列明教授
许玲副教授
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
李璠教授
刘宝瑞教授
刘彬彬副研究员
刘云鹏教授
沈克平主任医师
肖文华主任医师
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
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
张春虎副教授

消化基础研究

曹洁副教授
曹鹏副研究员
樊红副教授
高春芳研究员
高国全教授
高英堂研究员
管冬元副教授
胡旭初副教授
黄园教授
黄文林教授
李刚教授
李杰副教授
李永哲副研究员
李增山副教授
刘克辛教授
梅林教授
钱睿哲教授
任超世研究员
任浩副教授
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
吴军研究员
吴俊华副教授
徐宁志研究员
许文燮教授
姚登福教授
阴赅宏研究员
郁卫东副研究员
喻荣彬副教授
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

消化病理学

杜祥教授
李淳副教授
刘丽江教授
刘勇钢副主任医师
马大烈教授
潘兴华副主任医师
王鲁平主任医师
王娅兰教授
魏蕾教授
颜宏利副教授
于颖彦教授
余宏宇教授
张锦生教授
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3月28日 第18卷 第9期 (总第305期)

述 评

- 861 肝缺血再灌注损伤对肿瘤增殖、转移的影响
周伟平, 孙汉勇

基础研究

- 865 无血清培养胆囊癌GBC-SD细胞形成肿瘤细胞球的鉴定
石程剑, 秦仁义, 王敏, 田锐, 张志发, 宫伟强
- 871 异丙肾上腺素预处理对大鼠胰腺移植后缺血再灌注损伤的抑制作用
裴广辉, 梁健, 宋文利, 王智平, 莫春柏
- 877 携带Pyk2基因的shRNA质粒构建及其在Lovo结肠癌细胞系中的表达
胡刚, 汪欣, 郑启军, 万远廉, 刘玉村, 朱静
- 883 抗生素性腹泻肠道杆菌产超广谱 β -内酰胺酶基因型的调查
冯美菊, 张燕, 罗予, 郑鹏远

临床研究

- 889 RUNX3、RASSF1A启动子高甲基化与胃癌进展转移的关系
林海, 曹俊, 张斌, 吴育美, 邹晓平

文献综述

- 897 戊型肝炎病毒感染免疫研究进展
耿彦生, 王佑春
- 902 慢性HBV感染YMDD自然变异的研究进展
屈军校, 曾庆磊, 徐光华
- 906 瞬时弹性扫描仪在肝纤维化诊断中的应用价值
朱霞, 唐红
- 913 结直肠癌干细胞研究进展
杨治力, 王志刚, 郑起

研究快报

- 920 长期慢性束缚水浸应激对大鼠胃窦Cajal间质细胞数量的影响
张丹, 夏志伟, 韩亚京
- 926 胃癌与慢性胃炎唾液蛋白质组鉴别诊断模型
张晓丽, 王济国, 曹美群, 吴正治
- 932 鸡尾酒疗法对大鼠肝星状细胞的增殖及I型胶原、TIMP-1 mRNA表达的影响
廖明, 李彦, 舒伟, 卓朗
- 937 青黛颗粒对溃疡性结肠炎大鼠结肠黏膜MUC2和iNOS基因表达的影响
杜立阳, 刘清芳, 程晓磊, 陈铭诗, 李鲜明, 仇靖
- 942 TNF- α 体外对Caco-2细胞通透性的影响及其机制
王国丽, 尹菁华, 毛定安, 何芳, 尹飞

临床经验

- 947 食管测压指导Nissen胃底折叠术31例
蒋菁梅, 于磊, 刘晶, 白伟, 杜彦丽
- 950 内镜治疗肝外胆管良性狭窄29例
宫爱霞, 马静, 葛林梅, 冷敬, 郭世斌, 孙康, 孙颖
- 954 直肠血管肉瘤1例
冯向东, 张红凯

病例报告	958 Cronkhite-Canada综合征1例 华开罗, 陈可, 李莉, 朱文成, 夏冰 961 结肠、肝脏及膀胱三原发癌1例 宁雅婵, 王悦华, 腾梁红, 刘家峰, 李非, 许建军, 欧彤文
附录	964 《世界华人消化杂志》投稿须知 969 2010年国内国际会议预告
志 谢	970 志谢世界华人消化杂志编委
消 息	870 汤姆森-路透公布2008年WJG影响因子2.081 876 《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》 882 《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》 888 《世界华人消化杂志》修回稿须知 896 2008年内科学类期刊总被引频次和影响因子排序 901 WJG成功通过评审被PMC收录 905 《中国期刊引证报告(扩刊版)》发布《世界华人消化杂志》影响因子0.729 919 《世界华人消化杂志》计量单位标准 925 《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0.547 931 《世界华人消化杂志》数字用法标准 936 《世界华人消化杂志》出版流程 941 《世界华人消化杂志》被收录情况 946 《世界华人消化杂志》按时完成2009年度出版任务 953 《世界华人消化杂志》名词术语标准 957 《世界华人消化杂志》栏目设置 963 《世界华人消化杂志》性质、刊登内容及目标
封面故事	Fan LL, Sun GP, Wei W, Wang ZG, Ge L, Fu WZ, Wang H. Melatonin and Doxorubicin synergistically induce cell apoptosis in human hepatoma cell lines. <i>World J Gastroenterol</i> 2010; 16(12): 1473-1481 http://www.wjgnet.com/1007-9327/full/v16/i12/1473.htm
本期责任人	编务 刘晓芳; 送审编辑 李瑞敏; 组版编辑 吴鹏朕; 英文编辑 王天奇; 责任编辑 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 2010-03-28 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
--	---	---

中国标准连续出版物号 **ISSN 1009-3079**
CN 14-1260/R

邮发代号
82-262

国外代号
M 4481

国内定价
每期56.00元 全年2016.00元

广告经营许可证
1401004000050

World Chinese Journal of Digestology

March 2010 Contents in Brief Volume 18 Number 9

EDITORIAL	861 Effects of hepatic ischemia/reperfusion injury on tumor proliferation and metastasis <i>Zhou WP, Sun HY</i>
BASIC RESEARCH	865 Identification of tumor spheres from human gallbladder carcinoma GBC-SD cells cultured in serum-free medium <i>Shi CJ, Qin RY, Wang M, Tian R, Zhang ZF, Gong WQ</i> 871 Preconditioning of pancreatic graft with isoproterenol reduces posttransplant ischemia/reperfusion injury in rats <i>Pei GH, Liang J, Song WL, Wang ZP, Mo CB</i> 877 Construction of shRNA expression plasmids targeting the Pyk2 gene and their expression in Lovo cells <i>Hu G, Wang X, Zheng QJ, Wan YL, Liu YC, Zhu J</i> 883 Genotyping of extended-spectrum β-lactamase-producing enterobacteriaceae isolated from patients with antibiotic-associated diarrhea <i>Feng XJ, Zhang Y, Luo Y, Zheng PY</i>
CLINICAL RESEARCH	889 Correlations of RUNX3 and RASSF1A promoter hypermethylation with the progression and metastasis of gastric carcinoma <i>Lin H, Cao J, Zhang B, Wu YM, Zou XP</i>
REVIEW	897 Advances in immunology of hepatitis E virus infection <i>Geng YS, Wang YC</i> 902 Advances in research on natural YMDD mutations in the hepatitis B virus DNA polymerase in patients with chronic hepatitis B <i>Qu JX, Zeng QL, Xu GH</i> 906 Application value of Fibroscan in the diagnosis of hepatic fibrosis <i>Zhu X, Tang H</i> 913 Advances in research on colorectal cancer stem cells <i>Yang ZL, Wang ZG, Zheng Q</i>
RAPID COMMUNICATION	920 Long-term chronic water immersion-restraint stress alters the number of interstitial cells of Cajal in the gastric antrum of rats <i>Zhang D, Xia ZW, Han YJ</i> 926 Differential salivary proteome profile-based predictive model for discrimination between gastric cancer and chronic gastritis <i>Zhang XL, Wang JG, Cao MQ, Wu ZZ</i> 932 Effects of cocktail therapy on cell proliferation and Collagen I and TIMP-1 mRNA expression in rat hepatic stellate cells <i>Liao M, Li Y, Shu W, Zhuo L</i> 937 Qingdai Granules up-regulate MUC2 mRNA expression but down-regulate iNOS mRNA expression in the colonic mucosa of rats with ulcerative colitis <i>Du LY, Liu QF, Cheng XL, Chen MS, Li XM, Qiu J</i> 942 Tumor necrosis factor-α increases the paracellular permeability of Caco-2 cell monolayers <i>in vitro</i> <i>Wang GL, Yin JH, Mao DA, He F, Yin F</i>
CLINICAL PRACTICE	947 Value of intra- and postoperative manometry for Nissen fundoplication: an analysis of 31 cases <i>Jiang JM, Yu L, Liu J, Bai W, Du YL</i>

	950 Duodenoscopic treatment of benign extrahepatic biliary stricture: an analysis of 29 cases <i>Gong AX, Ma J, Ge LM, Leng J, Guo SB, Sun K, Sun Y</i>
	954 Clinical and pathological features of angiosarcoma of the rectum: a report of one case <i>Feng XD, Zhang HK</i>
CASE REPORT	958 Cronkhite-Canada syndrome: a report of one case <i>Hua KL, Chen K, Li L, Zhu WC, Xia B</i>
	961 A case of triple primary cancers occurring in the colon, liver and urinary bladder <i>Ning YC, Wang YH, Teng LH, Liu JF, Li F, Xu JJ, Ou TW</i>
APPENDIX	964 Instructions to authors of World Chinese Journal of Digestology
	969 Meeting events calendar in 2010
ACKNOWLEDGMENT	970 Acknowledgments to reviewers of World Chinese Journal of Digestology
COVER	<i>Fan LL, Sun GP, Wei W, Wang ZG, Ge L, Fu WZ, Wang H.</i> Melatonin and Doxorubicin synergistically induce cell apoptosis in human hepatoma cell lines. <i>World J Gastroenterol</i> 2010; 16(12): 1473-1481 http://www.wjgnet.com/1007-9327/full/v16/i12/1473.htm
RESPONSIBLE EDITORS FOR THIS ISSUE	Assistant Editor: <i>Xiao-Fang Liu</i> Review Editor: <i>Rui-Min Li</i> Electronic Page Editor: <i>Peng-Zhen Wu</i> English Language Editor: <i>Tian-Qi Wang</i> Editor-in-Charge: <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 March 28, 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 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*

肝缺血再灌注损伤对肿瘤增殖、转移的影响

周伟平, 孙汉勇

周伟平, 孙汉勇, 中国人民解放军第二军医大学东方肝胆外科医院肝外三科 上海市 200438

周伟平, 教授, 博士生导师, 主要从事肝胆外科, 专于原发性肝癌临床与基础研究。

通讯作者: 周伟平, 教授, 200438, 上海市长海路225号, 中国人民解放军第二军医大学东方肝胆外科医院肝外三科。

weiping.zhou@hotmail.com

电话: 021-81875463 传真: 021-65562400

收稿日期: 2009-12-02 修回日期: 2010-01-18

接受日期: 2010-01-26 在线出版日期: 2010-03-28

Effects of hepatic ischemia/reperfusion injury on tumor proliferation and metastasis

Wei-Ping Zhou, Han-Yong Sun

Wei-Ping Zhou, Han-Yong Sun, the Third Department of Hepatic Surgery, Eastern Hepatobiliary Surgery Hospital, the Second Military Medical University of Chinese PLA, Shanghai 200438, China

Correspondence to: Professor Wei-Ping Zhou, the Third Department of Hepatic Surgery, Eastern Hepatobiliary Surgery Hospital, the Second Military Medical University of Chinese PLA, 225 Changhai Road, Shanghai 200438, China. weiping.zhou@hotmail.com

Received: 2009-12-02 Revised: 2010-01-18

Accepted: 2010-01-26 Published online: 2010-03-28

Abstract

Hepatic ischemia/reperfusion injury (HIRI) is a common pathophysiological process encountered in liver surgery. It has significant effects on the migration, adhesion, colonization and growth of circulating tumor cells by affecting the expression of some cytokines such as chemokines, adhesion molecules, matrix metalloproteinases, and vascular endothelial growth factor. Therefore, HIRI is highly correlated with the postoperative recurrence and metastasis of liver cancer.

Key Words: Hepatic ischemia/reperfusion injury; Cytokine; Tumor proliferation; Tumor metastasis

Zhou WP, Sun HY. Effects of hepatic ischemia/reperfusion injury on tumor proliferation and metastasis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(9): 861-864

摘要

肝缺血再灌注损伤(hepatic ischemia/

reperfusion injury, HIRI)是肝脏外科常见的病理生理过程。HIRI通过引起趋化因子、黏附分子、基质金属蛋白酶、血管内皮细胞生长因子等细胞因子表达改变,对血液中残留肿瘤细胞的迁移、黏附、定植、生长等步骤有着重要的影响。与肝癌术后的复发、转移关系密切。

关键词: 肝缺血再灌注损伤; 细胞因子; 肿瘤增殖; 肿瘤转移

周伟平, 孙汉勇. 肝缺血再灌注损伤对肿瘤增殖、转移的影响. 世界华人消化杂志 2010; 18(9): 861-864

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/861.asp>

0 引言

无论是在原发性肝癌还是继发性肝癌,手术切除仍是目前的首选治疗手段。但术后肝内肿瘤的复发是影响患者总体生存率的主要因素。手术中为控制出血,常需阻断肝脏血流,导致残肝的缺血再灌注损伤(hepatic ischemia/reperfusion injury, HIRI)。研究表明缺血再灌注损伤不仅可引起术后肝功能衰竭,还可以促进血液中肿瘤细胞在肝脏定植、生长,在肝癌术后归巢复发、转移过程中扮演重要角色^[1-2]。血液中游离肿瘤细胞在肝脏中定植、生长过程:首先肿瘤细胞在趋化因子的作用下定向迁移至肝脏,再在黏附分子的作用下与血管壁黏附并分泌降解细胞外基质酶,使其逸出血管侵入肝实质定植、生长。

1 HIRI后趋化因子的表达对肿瘤细胞增殖、转移的影响

趋化因子在缺血再灌注损伤的病理过程中起着重要的作用,尤其是CXC亚家族在HIRI中是调节中性粒细胞聚集的关键因子^[3-5]。趋化因子是能使细胞发生趋化运动的一类细胞因子,绝大多数趋化因子含有4个保守的半胱氨酸,根据前两个半胱氨酸的相对位置不同,趋化因子可分为CXC(α)、CC(β)、C(δ)和CX3C(γ)4个亚家族。

■背景资料

研究表明缺血再灌注损伤不仅可引起术后肝功能衰竭,还可以促进血液中肿瘤细胞在肝脏定植、生长,在肝癌术后归巢复发、转移过程中扮演重要角色,肝缺血再灌注损伤(HIRI)是肝脏外科常见的病理生理过程。HIRI通过引起趋化因子、黏附分子、基质金属蛋白酶、血管内皮细胞生长因子等细胞因子表达改变,对血液中残留肿瘤细胞的迁移、黏附、定植、生长等步骤有着重要的影响。

■同行评议者

邱宝安, 主任医师, 中国人民解放军海军总医院肝胆外科

■ 研发前沿

目前对HIRI促进肿瘤复发、转移的研究很受关注,但很多都仅限于动物水平的研究,尚未见有完整的临床RCT研究报道。

趋化因子及其受体不仅参与炎症的致炎过程,而且在肿瘤的发展、转归过程起重要作用,其介导肿瘤细胞在特定的器官定植、生长^[6]。

CXC家族中CXCR4受体及其特异配体CXCL12的结合,是目前研究较多的趋化因子途径,不仅与肿瘤归巢转移、复发而且与肿瘤的增殖、血管形成相关。在HIRI的病理过程中,缺氧诱导因子-1(hypoxia inducible factor 1, HIF-1)是调节细胞组织对缺氧反应的中介。HIF-1可诱导CXCL12表达,其主要机制是CXCL12基因启动子区有两个HIF-1结合区域HBS1和HBS2(内皮细胞中HBS1是HIF-1依赖的CXCL12合成表达的结合域),HIF-1 α 与HBS1结合后转录活化,使得CXCL12在缺血、缺氧组织中高表达^[7]。CXCL12高表达促使CXCR4阳性肿瘤细胞定向向缺血、缺氧组织归巢、黏附。肿瘤活检和细胞系中检测许多肿瘤细胞都有CXCR4表达,包括结肠癌细胞、肝癌细胞、乳腺癌细胞等^[8,9]。Müller等^[10]研究发现乳腺癌CXCR4高表达,其主要转移靶器官(肺、肝、骨)中CXCL12表达明显增高,CXCR4/CXCL12在乳腺癌细胞的定向转移中起着重要作用。CXCR4/CXCL12作用不仅包括肿瘤细胞的迁移归巢,还可以促进肿瘤血管的发生^[8,11]。当前的研究热点肿瘤干细胞,被认为与肿瘤的复发、转移关系密切;同样许多肿瘤干细胞也有CXCR4表达^[12],CXCR4/CXCL12轴也介导着肿瘤干细胞的归巢,促进肿瘤的转移、复发^[13,14]。

2 HIRI后黏附分子的表达对肿瘤细胞增殖、转移的影响

缺血再灌注后肝脏趋化因子表达增高,促使血液中的肿瘤细胞的归巢。但要进入肝实质,首先肿瘤细胞要与血管壁的黏附,在这一过程中黏附分子发挥着重要作用。黏附分子目前主要分为两大类:一类是细胞表面的与黏附有关的分子,主要分为4大家族,即钙粘连素、选择素、免疫球蛋白超家族和整合素家族,此外尚有透明质酸的受体CD44和连环蛋白。另一类是在细胞间隙中充满的多种蛋白质和多糖组成的细胞外基质(extracellular matrix, ECM)。

当前有关选择素的研究较多,选择素为跨膜糖蛋白,介导细胞与细胞之间的黏附,并具有高度选择性;主要包括:E-选择素、P-选择素、L-选择素。选择素体内的配体主要是sLe^x和sLe^a,在白细胞和肿瘤细胞的表面均有表达。正

常肝窦内皮细胞上不表达E-选择素,HIRI中血清一氧化氮水平下降、细胞内钙超载、氧自由基大量产生及细胞因子的释放(TNF- α 、IL-1、IL-6、IL-10、PAF等)通过对转录因子NF- κ B的调控,使得包括肝窦内皮细胞在内的相应肝组织细胞表面的黏附分子(E-选择素、P-选择素、细胞间黏附分子1和血管细胞间黏附分子1等)相继表达上调^[3]。大量研究表明E-选择素与肿瘤细胞黏附、转移关系密切^[15-17]。内皮细胞表面的E-选择素表达增高与肿瘤细胞上的相应配体sLe^x和sLe^a结合介导两者之间的相互识别和早期黏附。其机制可能与炎症反应中内皮细胞表面E-选择素和白细胞上相应配体sLe^x和sLe^a结合,导致白细胞在内皮细胞上滚动,并为以后白细胞贴壁及游出血管到达炎症部位相似。P-选择素由内皮细胞和血小板表达,主要储存于内皮细胞的Weibel-Palade小体和血小板的 α 颗粒内,HIRI过程中释放的大量炎症因子及趋化因子激活后快速表达于血管内皮细胞表面。大量研究表明研究报道P-选择素可与肿瘤细胞上相应的选择素共同配体单位sLe^x和sLe^a结合,介导活化的血小板、内皮细胞与肿瘤细胞的共同黏附,协同促进肿瘤转移^[18,19]。目前有关L-选择素在缺血再灌注损伤中表达改变的研究不多。

3 HIRI后基质金属蛋白酶的表达对肿瘤细胞增殖、转移的影响

肝缺血再灌注通过上调趋化因子和黏附分子促进肿瘤细胞的归巢和血管内细胞的黏附,但要在肝实质定植生长,必须突破血管基底膜。因此对基底膜及ECM的蛋白酶解作用被视为肿瘤侵袭转移的关键步骤。ECM由蛋白质和蛋白聚糖组成的网架,基底膜是ECM的一个重要部分。ECM的改变和重塑是肿瘤侵袭和血管生成的基本条件。与蛋白水解相关酶类中基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMP)与肿瘤侵袭转移关系最为密切也研究最多。MMP及其抑制因子(tissue inhibitor of metalloproteinases, TIMPs)是ECM成分的主要调节因素。缺血再灌注过程中炎症反应、呼吸爆发、诱生型一氧化氮的表达等病理过程均可导致MMP表达上调,尤其是MMP-9,其与肝脏Disse间隙IV胶原蛋白和纤维连接蛋白的降解关系密切^[20-22];同时金属蛋白酶抑制剂TIMP-1表达降低^[23]。因此缺血再灌注通过MMPs表达上调降解ECM、破坏局部组织结构、促进ECM重塑的作用,从而促进肿瘤侵

出、转移。MMP-9是胶原酶类亚家族, Moore等研究表明在HIRI中中性粒细胞、单核细胞、巨噬细胞、T淋巴细胞等大量产生MMP-9, 使其在损伤组织中高表达, 与CD44形成复合体, 并经后者介导与ECM结合, 从而发挥促进肿瘤细胞的侵犯与血管形成的重要作用^[24-27]。Nicoud等^[28]研究发现MMP-9基因敲除小鼠的结肠癌肝转移瘤的数量、体积均不如野生小鼠, 证实了MMP-9在缺血再灌注过程中介导肿瘤细胞侵袭转移。

4 HIRI对肿瘤血管生成的影响

肿瘤细胞浸出肝脏血管进入肝实质, 新生血管的形成对肿瘤的生长和转移起着重要的作用。肿瘤血管形成是一个复杂的多步骤过程, 他受多种因子调节。血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)是目前发现的作用最强、特异性最高的血管生成因子, 参与了血管新生的每个环节^[30]。Tsurui等^[31]认为VEGF介导的血管生成参与癌栓形成和肿瘤肝内转移机制, 可作为反映肿瘤进展和潜在血管侵犯的分子标志物。国内外许多学者研究表明VEGF与缺血再灌注损伤密切相关^[32,33]。在HIRI过程中许多的因素可对VEGF的表达产生重要的影响。缺氧情况下, 细胞产生HIF-1, 研究证实^[34,35]: HIF-1不仅可促进VEGF的转录, 而且可增加VEGF mRNA的稳定。VEGF基因5'端启动子中有一28 kb的增强子片段, 内含HIF-1结合位点, 该片段与缺氧时VEGF基因转录率增加有关。HIF-1与相应的DNA结合, 进而激活了HIF-1 α 羧基端转录活性区。这些变化增加了HIF-1 α 羧基端与P300/CBP-CH1的结合力, 后者为核磷酸蛋白, 是HIF-1调控DNA的重要信号传导蛋白。激活的HIF-1 α 通过该核磷酸蛋白将转录信号传给VEGF, 开始发挥其转录活性。另外在HIRI过程中TNF- α 、TGF- β 、IL-1、IL-6等表达增高, 他们也在转录水平促进了VEGF的表达^[35]。

5 结论

由此可见, HIRI可引起许多细胞因子表达改变, 影响着肿瘤细胞从归巢、黏附、血管基底膜降解和肿瘤血管形成的每一步。上述仅对每一步中某一、两个因素进行了论述, 其他还有很多的细胞因子在起作用。而且每一步之间的细胞因子作用是交叉的、复杂的网络。目前对HIRI促进肿瘤复发、转移的研究很受关注, 但很多都仅限于动物水平的研究, 尚未见有完整的临

床RCT研究报道, 我们在肝肿瘤手术中采用不同的肝血流阻断方法如单纯门静脉阻断、半肝血流阻断等以减轻患者缺血再灌注损伤, 初步研究资料表明对患者的术后肿瘤复发、转移有着重要的影响。

6 参考文献

- 1 Ku Y, Kusunoki N, Shiotani M, Maeda I, Iwasaki T, Tomimaga M, Kitagawa T, Fukumoto T, Suzuki Y, Kuroda Y. Stimulation of haematogenous liver metastases by ischaemia-reperfusion in rats. *Eur J Surg* 1999; 165: 801-807
- 2 Doi K, Horiuchi T, Uchinami M, Tabo T, Kimura N, Yokomachi J, Yoshida M, Tanaka K. Hepatic ischemia-reperfusion promotes liver metastasis of colon cancer. *J Surg Res* 2002; 105: 243-247
- 3 Lentsch AB, Kato A, Yoshidome H, McMasters KM, Edwards MJ. Inflammatory mechanisms and therapeutic strategies for warm hepatic ischemia/reperfusion injury. *Hepatology* 2000; 32: 169-173
- 4 Colletti LM, Kunkel SL, Walz A, Burdick MD, Kunkel RG, Wilke CA, Strieter RM. The role of cytokine networks in the local liver injury following hepatic ischemia/reperfusion in the rat. *Hepatology* 1996; 23: 506-514
- 5 Lentsch AB, Yoshidome H, Cheadle WG, Miller FN, Edwards MJ. Chemokine involvement in hepatic ischemia/reperfusion injury in mice: roles for macrophage inflammatory protein-2 and KC. *Hepatology* 1998; 27: 1172-1177
- 6 Vandercappellen J, Van Damme J, Struyf S. The role of CX chemokines and their receptors in cancer. *Cancer Lett* 2008; 267: 226-244
- 7 Ceradini DJ, Kulkarni AR, Callaghan MJ, Tepper OM, Bastidas N, Kleinman ME, Capla JM, Galiano RD, Levine JP, Gurtner GC. Progenitor cell trafficking is regulated by hypoxic gradients through HIF-1 induction of SDF-1. *Nat Med* 2004; 10: 858-864
- 8 Balkwill F. The significance of cancer cell expression of the chemokine receptor CXCR4. *Semin Cancer Biol* 2004; 14: 171-179
- 9 Zlotnik A. Chemokines in neoplastic progression. *Semin Cancer Biol* 2004; 14: 181-185
- 10 Müller A, Homey B, Soto H, Ge N, Catron D, Buchanan ME, McClanahan T, Murphy E, Yuan W, Wagner SN, Barrera JL, Mohar A, Verástegui E, Zlotnik A. Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. *Nature* 2001; 410: 50-56
- 11 Kryczek I, Lange A, Mottram P, Alvarez X, Cheng P, Hogan M, Moons L, Wei S, Zou L, Machelon V, Emilie D, Terrasa M, Lackner A, Curiel TJ, Carmeliet P, Zou W. CXCL12 and vascular endothelial growth factor synergistically induce neoangiogenesis in human ovarian cancers. *Cancer Res* 2005; 65: 465-472
- 12 Kucia M, Reza R, Miekus K, Wanzeck J, Wojakowski W, Janowska-Wieczorek A, Ratajczak J, Ratajczak MZ. Trafficking of normal stem cells and metastasis of cancer stem cells involve similar mechanisms: pivotal role of the SDF-1-CXCR4 axis. *Stem Cells* 2005; 23: 879-894
- 13 Kryczek I, Wei S, Keller E, Liu R, Zou W. Stromaderived factor (SDF-1/CXCL12) and human tumor pathogenesis. *Am J Physiol Cell Physiol* 2007; 292:

■ 相关报道

Nicoud等研究发现MMP-9基因敲除小鼠的结肠癌肝转移瘤的数量、体积均不如野生小鼠, 证实了MMP-9在缺血再灌注过程中介导肿瘤细胞侵袭转移。

■同行评价

本文选题较好, 内容全面, 文献引用合理, 有较好的可读性。

- C987-C995
- 14 Gelmini S, Mangoni M, Serio M, Romagnani P, Lazzeri E. The critical role of SDF-1/CXCR4 axis in cancer and cancer stem cells metastasis. *J Endocrinol Invest* 2008; 31: 809-819
- 15 Zhao Q, Guo X, Nash GB, Stone PC, Hilkens J, Rhodes JM, Yu LG. Circulating galectin-3 promotes metastasis by modifying MUC1 localization on cancer cell surface. *Cancer Res* 2009; 69: 6799-6806
- 16 Tremblay PL, Huot J, Auger FA. Mechanisms by which E-selectin regulates diapedesis of colon cancer cells under flow conditions. *Cancer Res* 2008; 68: 5167-5176
- 17 Kurata M, Okajima K, Kawamoto T, Uchiba M, Ohkohchi N. Antithrombin reduces reperfusion-induced hepatic metastasis of colon cancer cells. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 60-65
- 18 Peeters CF, Ruers TJ, Westphal JR, de Waal RM. Progressive loss of endothelial P-selectin expression with increasing malignancy in colorectal cancer. *Lab Invest* 2005; 85: 248-256
- 19 Borsig L, Wong R, Hynes RO, Varki NM, Varki A. Synergistic effects of L- and P-selectin in facilitating tumor metastasis can involve non-mucin ligands and implicate leukocytes as enhancers of metastasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99: 2193-2198
- 20 Chen CF, Leu FJ, Chen HI, Wang D. Oxygen radicals and matrix metalloproteinases mediate reperfusion liver injury. *Transplant Proc* 2005; 37: 4547-4549
- 21 Cursio R, Mari B, Louis K, Rostagno P, Saint-Paul MC, Giudicelli J, Bottero V, Anglard P, Yiotakis A, Dive V, Gugenheim J, Auberger P. Rat liver injury after normothermic ischemia is prevented by a phosphinic matrix metalloproteinase inhibitor. *FASEB J* 2002; 16: 93-95
- 22 Khandoga A, Kessler JS, Hanschen M, Khandoga AG, Burggraf D, Reichel C, Hamann GF, Enders G, Krombach F. Matrix metalloproteinase-9 promotes neutrophil and T cell recruitment and migration in the postischemic liver. *J Leukoc Biol* 2006; 79: 1295-1305
- 23 Kuyvenhoven JP, Molenaar IQ, Verspaget HW, Veldman MG, Palareti G, Legnani C, Moolenburgh SE, Terpstra OT, Lamers CB, van Hoek B, Porte RJ. Plasma MMP-2 and MMP-9 and their inhibitors TIMP-1 and TIMP-2 during human orthotopic liver transplantation. The effect of aprotinin and the relation to ischemia/reperfusion injury. *Thromb Haemost* 2004; 91: 506-513
- 24 Moore C, Shen XD, Gao F, Busuttill RW, Coito AJ. Fibronectin-alpha4beta1 integrin interactions regulate metalloproteinase-9 expression in steatotic liver ischemia and reperfusion injury. *Am J Pathol* 2007; 170: 567-577
- 25 Rudd PM, Mattu TS, Masure S, Bratt T, Van den Steen PE, Wormald MR, Küster B, Harvey DJ, Borregaard N, Van Damme J, Dwek RA, Opdenakker G. Glycosylation of natural human neutrophil gelatinase B and neutrophil gelatinase B-associated lipocalin. *Biochemistry* 1999; 38: 13937-13950
- 26 Matache C, Stefanescu M, Dragomir C, Tanaseanu S, Onu A, Ofiteru A, Szegli G. Matrix metalloproteinase-9 and its natural inhibitor TIMP-1 expressed or secreted by peripheral blood mononuclear cells from patients with systemic lupus erythematosus. *J Autoimmun* 2003; 20: 323-331
- 27 Yu Q, Stamenkovic I. Localization of matrix metalloproteinase 9 to the cell surface provides a mechanism for CD44-mediated tumor invasion. *Genes Dev* 1999; 13: 35-48
- 28 Nicoud IB, Jones CM, Pierce JM, Earl TM, Matrisian LM, Chari RS, Gorden DL. Warm hepatic ischemia-reperfusion promotes growth of colorectal carcinoma micrometastases in mouse liver via matrix metalloproteinase-9 induction. *Cancer Res* 2007; 67: 2720-2728
- 29 Sun HC, Tang ZY. Angiogenesis in hepatocellular carcinoma: the retrospectives and perspectives. *J Cancer Res Clin Oncol* 2004; 130: 307-319
- 30 Kamel L, Nessim I, Abd-el-Hady A, Ghali A, Ismail A. Assessment of the clinical significance of serum vascular endothelial growth factor and matrix metalloproteinase-9 in patients with hepatocellular carcinoma. *J Egypt Soc Parasitol* 2005; 35: 875-890
- 31 Tsurui Y, Sho M, Kuzumoto Y, Hamada K, Akashi S, Kashizuka H, Ikeda N, Nomi T, Mizuno T, Kanehiro H, Nakajima Y. Dual role of vascular endothelial growth factor in hepatic ischemia-reperfusion injury. *Transplantation* 2005; 79: 1110-1115
- 32 Tsuchihashi S, Ke B, Kaldas F, Flynn E, Busuttill RW, Briscoe DM, Kupiec-Weglinski JW. Vascular endothelial growth factor antagonist modulates leukocyte trafficking and protects mouse livers against ischemia/reperfusion injury. *Am J Pathol* 2006; 168: 695-705
- 33 Semenza GL. HIF-1 and tumor progression: pathophysiology and therapeutics. *Trends Mol Med* 2002; 8: S62-S67
- 34 Gray MJ, Zhang J, Ellis LM, Semenza GL, Evans DB, Watowich SS, Gallick GE. HIF-1alpha, STAT3, CBP/p300 and Ref-1/APE are components of a transcriptional complex that regulates Src-dependent hypoxia-induced expression of VEGF in pancreatic and prostate carcinomas. *Oncogene* 2005; 24: 3110-3120
- 35 Tamagawa K, Horiuchi T, Uchinami M, Doi K, Yoshida M, Nakamura T, Sasaki H, Taniguchi M, Tanaka K. Hepatic ischemia-reperfusion increases vascular endothelial growth factor and cancer growth in rats. *J Surg Res* 2008; 148: 158-163

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

无血清培养胆囊癌GBC-SD细胞形成肿瘤细胞球的鉴定

石程剑, 秦仁义, 王敏, 田锐, 张志发, 宫伟强

石程剑, 秦仁义, 王敏, 田锐, 张志发, 宫伟强, 华中科技大学同济医学院附属同济医院胆胰外科 湖北省武汉市 430030
石程剑, 华中科技大学同济医学院附属同济医院博士, 主要从事胆道胰腺肿瘤的基础和临床研究。

国家自然科学基金资助项目, No. 30600592, No. 30772127
作者贡献分布: 石程剑与秦仁义对此文所作贡献均等; 此课题由石程剑、王敏及秦仁义设计; 研究过程由所有作者完成; 研究所用试剂由石程剑、王敏、张志发及宫伟强提供; 数据分析由石程剑与田锐完成; 本文文写作由石程剑完成。

通讯作者: 秦仁义, 主任医师, 教授, 博士生导师, 430030, 湖北省武汉市, 华中科技大学同济医学院附属同济医院胆胰外科。
ryqin@tjh.tjmu.edu.cn

电话: 027-83663814

收稿日期: 2010-01-05 修回日期: 2010-01-29

接受日期: 2010-02-23 在线出版日期: 2010-03-28

Identification of tumor spheres from human gallbladder carcinoma GBC-SD cells cultured in serum-free medium

Cheng-Jian Shi, Ren-Yi Qin, Min Wang, Rui Tian, Zhi-Fa Zhang, Wei-Qiang Gong

Cheng-Jian Shi, Ren-Yi Qin, Min Wang, Rui Tian, Zhi-Fa Zhang, Wei-Qiang Gong, Department of Biliary and Pancreatic Surgery, Tongji Hospital, Tongji Medical College of Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, Hubei Province, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, Nos. 30600592 and 30772127

Correspondence to: Professor Ren-Yi Qin, Department of Biliary and Pancreatic Surgery, Tongji Hospital, Tongji Medical College of Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, Hubei Province, China. ryqin@tjh.tjmu.edu.cn

Received: 2010-01-05 Revised: 2010-01-29

Accepted: 2010-02-23 Published online: 2010-03-28

Abstract

AIM: To isolate and expand cancer stem cells in human gallbladder carcinoma cell line GBC-SD and to identify their biological properties.

METHODS: GBC-SD cells were cultured in serum-free conditions to derive tumor spheres. Tumor spheres were then expanded and cultured in serum-containing medium to permit their differentiation. The proliferative capacity of tumor sphere-forming cells was tested by methyl thiazoly tetrazolium (MTT) assay. The tumorigenicity of tumor sphere-forming cells was evaluated using animal experiments. The

expression of CD15s and CD24 on the surface of tumor sphere-forming cells was detected by flow cytometry.

RESULTS: Small number of floating tumor spheres were isolated and expanded in serum-free conditions. These tumor spheres attached to the bottom of culture plates and began to differentiate in serum-containing medium. The proliferation and xenograft tumorigenicity of tumor sphere-forming cells (80.00% vs 10.00%, $P < 0.05$) significantly increased compared with those cultured in serum-containing conditions. The percentage of CD15s-bearing cell population was significantly higher in tumor spheres than in the common GBC-SD cells ($2.56\% \pm 0.38\%$ vs $10.77\% \pm 0.93\%$, $t = 18.25$, $P < 0.05$).

CONCLUSION: The cancer stem cells in GBC-SD cell line can be isolated and expanded in serum-free conditions. CD15s may be a cell surface marker for these cancer stem cells.

Key Words: Gallbladder carcinoma; GBC-SD cell line; Serum-free medium; Cancer stem cell; Cell surface marker

Shi CJ, Qin RY, Wang M, Tian R, Zhang ZF, Gong WQ. Identification of tumor spheres from human gallbladder carcinoma GBC-SD cells cultured in serum-free medium. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(9): 865-870

摘要

目的: 分离扩增肿瘤干细胞, 并鉴定其生物学性质。

方法: 用无血清培养基培养人胆囊癌GBC-SD细胞得到肿瘤细胞球。将肿瘤细胞球传代扩增, 并用含血清培养基培养促使其分化; 将肿瘤球和普通GBC-SD细胞分别种入96孔板, MTT检测增殖能力, 并将肿瘤球和普通GBC-SD细胞分别植入裸鼠皮下, 观察移植瘤的形成; 流式细胞术检测CD15s和CD24在肿瘤球细胞和普通GBC-SD细胞中的表达, 筛选细胞表面标志物。

结果: 在无血清培养基中, 胆囊癌细胞可以形

■背景资料

原发性胆囊癌是胆道系统最常见的恶性肿瘤, 恶性程度高, 目前的手术治疗方法几乎达到了极限, 术后易复发, 而对目前的各种化疗药物也都不敏感, 预后差。近来的研究表明, 肿瘤的发生、发展和转移与肿瘤中的一小亚群细胞-肿瘤干细胞相关, 这小群细胞具有自我更新和分化潜能、耐受放化疗、高致瘤性等特性, 是治疗后肿瘤复发的原因。因此, 通过对胆囊癌干细胞的研究, 阐明其生物学特性并研究其维持机制, 是攻克胆囊癌的关键所在之一。

■同行评议者

吴泰璜, 教授, 山东省立医院肝胆外科

■相关报道

自1997年Bonnet等从白血病细胞中分离出肿瘤干细胞后,目前人们已经相继在多种实体肿瘤中分离出肿瘤干细胞,并进一步研究其生物学特性的维持机制。目前已经证实细胞信号通路、microRNA等在肿瘤干细胞生物学特性的维持中其重要作用,有望成为治疗的靶点。

成少量的肿瘤细胞球,并显示很强的自我更新和增殖能力,含血清环境能够诱导其分化而贴壁生长;在动物实验中,肿瘤球细胞较普通GBC-SD细胞显示更强的致瘤能力(80.00% vs 10.00%, $P < 0.05$);标志物CD15s在肿瘤球的表达较普通GBC-SD细胞明显增高(2.56% ± 0.38% vs 10.77% ± 0.93%, $t = 18.25$, $P < 0.05$)。

结论:人胆囊癌细胞GBC-SD的肿瘤干细胞可以通过无血清培养环境来分离和扩增,CD15s可能为其细胞表面标志物。

关键词: 胆囊癌; GBC-SD细胞系; 无血清培养基; 肿瘤干细胞; 细胞表面标志物

石程剑, 秦仁义, 王敏, 田锐, 张志发, 宫伟强. 无血清培养胆囊癌GBC-SD细胞形成肿瘤细胞球的鉴定. 世界华人消化杂志 2010; 18(9): 865-870

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/865.asp>

0 引言

肿瘤干细胞理论认为,肿瘤中存在肿瘤干细胞,他们具有自我更新和无限增殖能力,是肿瘤发生、发展、治疗后复发和转移的根源^[1-3]. 到目前,已经在白血病、脑肿瘤、乳腺癌、胰腺癌、前列腺癌、卵巢癌、尤文肉瘤等^[4-10]多种恶性肿瘤中分离出肿瘤干细胞. 我们用无血清培养基成功从人胆囊癌GBC-SD细胞中分离扩增出肿瘤干细胞并进行生物学研究,现报道如下.

1 材料和方法

1.1 材料 DMEM/F12(1:1)培养基(Gibco); B27添加剂(Gibco); 人表皮生长因子(EGF, Pe-proTech); 人碱性成纤维生长因子(bFGF, Pepro-Tech); L-谷氨酰胺(Sigma); 特级胎牛血清(Hy-clone); 抗CD15s-FITC(Santa Cruz); 抗CD24-PE(BD); 人胆囊癌细胞系GBC-SD购自上海中国科学院研究所; 实验用裸鼠由华中科技大学同济医学院实验动物中心提供.

1.2 方法

1.2.1 细胞培养:人胆囊癌细胞系GBC-SD,用含100 mL/L胎牛血清、100 kU/L青霉素和100 kU/L链霉素的DMEM/F12培养基,在37 °C、50 mL/L CO₂饱和湿度条件下培养,0.2 g/L胰蛋白酶的消化、传代,实验选用对数生长期的细胞.

1.2.2 肿瘤球的培养和扩增:取对数生长期的细胞消化后,PBS洗2次,用无血清培养基悬浮培养,无血清培养基由DMEM/F12(1:1)、

B27(1:50)、EGF(20 μg/L)、bFGF(10 mg/L)、LIF(10 mg/L)和L-谷氨酰胺(2 mmol/L)组成. 每天加入0.25 mL无血清培养基,观察细胞球形成的过程,拍照并记录. 10 d后收集细胞球吹散后按1:2传代,以后每天加入0.25 mL的培养基,7 d传代续培养扩增.

1.2.3 肿瘤球的分化:将生长良好的肿瘤球置入含100 mL/L血清的DMEM/F12中培养,观察细胞的生长情况,待细胞完全贴壁后,应用免疫细胞化学法检测胆囊癌的分化标志物CD44s.

1.2.4 细胞体外增殖能力检测:将肿瘤球和普通GBC-SD细胞制成细胞密度为1 000个活细胞/100 μL的单细胞悬液,接种于96孔板,每孔加液100 μL,并每孔补加100 μL继续培养,分别在培养的0、1、3、5、7 d进行MTT比色试验. 每孔加入MTT溶液(5 g/L)20 μL,37 °C孵育4 h后,每孔加入DMSO 150 μL震荡,选择490 nm波长,在酶联免疫检测仪测定各孔的吸光度(A)值,以时间为横轴,A值为纵轴,绘制细胞生长曲线.

1.2.5 动物体内成瘤实验:将肿瘤球和普通GBC-SD细胞消化吹散制成单细胞悬液,用不含血清的PBS洗2次后,PBS重悬,按 1×10^4 数量级分别注入裸鼠右腹部皮下,观察移植瘤形成时间及生长速度的情况. 自肉眼可观察到移植瘤形成持续观察6 wk,测量移植瘤的大小,并处死、解剖裸鼠取出肿瘤.

1.2.6 免疫组织化学:将裸鼠皮下移植瘤甲醛固定,制成切片行HE染色,部分行脱蜡、水化及抗原修复后,按照说明书应用免疫组织化学SP法检测胆囊癌敏感标志物CA19-9的表达.

1.2.7 流式细胞术检测肿瘤干细胞标志物的表达:将肿瘤球和普通GBC-SD细胞制成单细胞悬液,细胞PBS洗2次后,用含20 mL/L胎牛血清的PBS重悬,调整细胞密度为 1×10^6 /mL,分别标上肿瘤干细胞标志物的抗体:抗CD15s-FITC和抗CD24-PE,冰上避光孵育40 min后,PBS洗2次,上流式检测其表达.

统计学处理 应用SPSS11.0软件处理数据,标志物表达差异采用两样本 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义.

2 结果

2.1 胆囊癌细胞在无血清培养基中生成肿瘤球 胆囊癌细胞在无血清培养基中培养48 h后,少部分细胞贴壁,大部分细胞不贴壁,可见少量细胞球形成,细胞数目4-8个不等,悬浮生长,细胞



图 1 GBC-SD细胞在无血清培养基中形成的肿瘤球($\times 200$).

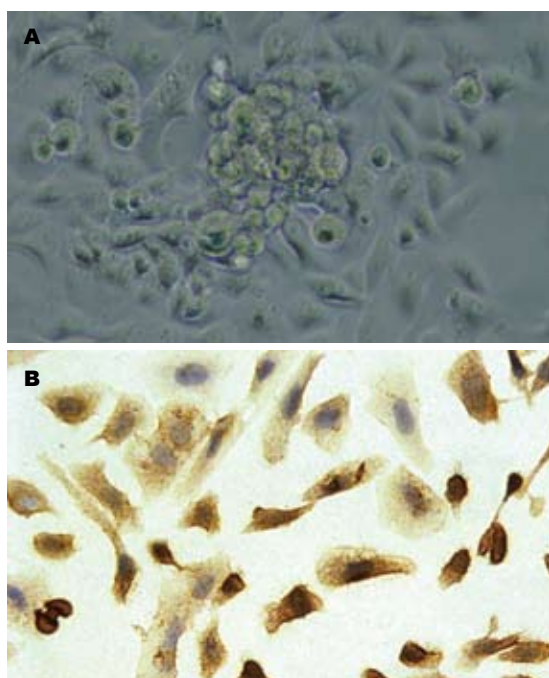


图 2 肿瘤球细胞在含血清的环境中渐贴壁生长以及CD44s在其中的表达. A: 肿瘤球细胞贴壁生长($\times 200$); B: CD44s的表达(SP $\times 200$).

间连接较紧密. 随着时间的延长, 细胞球渐增大, 细胞数目增多, 培养5-7 d后, 可观察到数十个细胞组成的细胞球, 细胞呈椭圆形或者类圆形, 随着时间的延长生长速度渐减慢(图1). 经吹散后继续在无血清培养基中培养, 部分细胞仍可继续形成新的肿瘤球, 且在相同细胞密度培养的条件下, 肿瘤球细胞形成的肿瘤球较普通GBC-SD细胞形成的肿瘤球数目明显增多, 但仍有相当一部分的肿瘤球细胞未能形成新的肿瘤球.

2.2 肿瘤球在含血清环境中发生分化 含血清培养基培养6 h时候后, 肿瘤球周边可见细胞贴壁, 贴壁细胞呈梭形, 随着时间的延长, 贴壁细胞增多, 肿瘤渐缩小(图2A), 培养48 h后, 组成肿瘤球的细胞基本上全部贴壁, 肿瘤球消失. 经免疫细胞化学检测, 贴壁细胞明显表达胆囊癌分化相

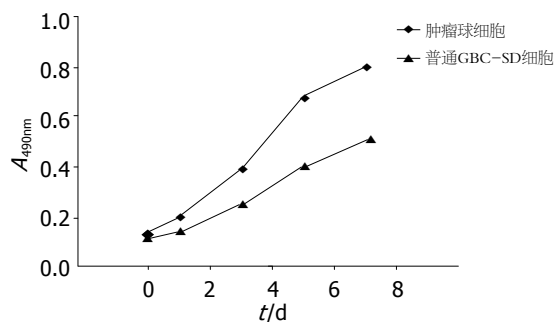


图 3 GBC-SD细胞生长曲线.

■创新盘点

本研究利用在干细胞环境中扩增胆囊癌干细胞, 并根据细胞表面标志物表达的变化来发现可能的肿瘤干细胞标志物, 可有效地避开对非特异标志物的验证, 并首次以CD15s为肿瘤干细胞标志物来研究.

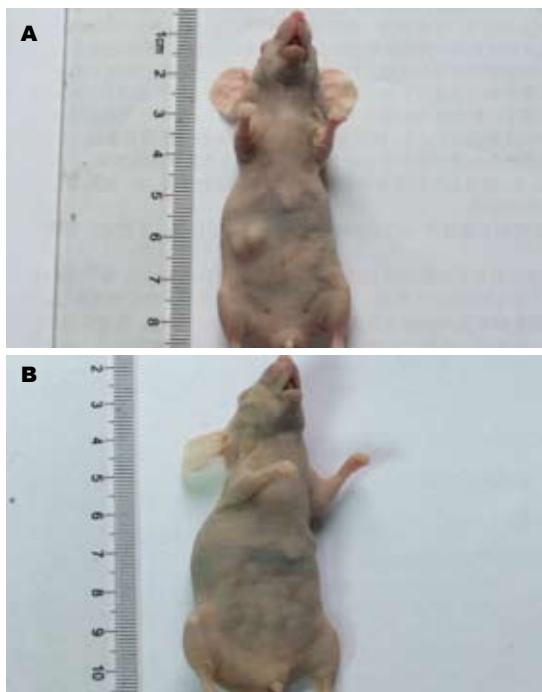


图 4 裸鼠皮下移植瘤形成比较. A: 植入肿瘤球细胞; B: 植入普通GBC-SD细胞.

关标志物CD44s(图2B).

2.3 肿瘤球细胞体外具有强增殖能力 MTT检测结果显示, 在相同的时间内, 肿瘤球细胞的A值较普通细胞明显增高, 显示更强的增殖能力(图3).

2.4 肿瘤球细胞具有强致癌的能力 接种肿瘤球细胞裸鼠在5 wk后可观察到形成明显的移植瘤, 成瘤率80.00%(8/10), 而接种普通GBC-SD细胞的裸鼠移植瘤形成不明显, 成瘤率仅10.00%(1/10)(图4), 差异有统计学意义(8/10 vs 1/10, $P < 0.05$). 移植瘤经HE染色, 可见细胞核大, 深染, 细胞排列紊乱, 经免疫组织化学检测, 肿瘤球细胞形成的移植瘤明显表达胆囊癌敏感标志物CA19-9(图5).

2.5 CD15s+细胞在肿瘤球细胞中比例增高 CD15s在普通GBC-SD细胞和肿瘤球细胞中阳性率的差异有统计学意义($2.56\% \pm 0.38\%$ vs

应用要点

标志物CD15s在肿瘤球细胞中表达上调,提示可能为特异标志物,可尝试用来分离细胞亚群并进行生物学鉴定。

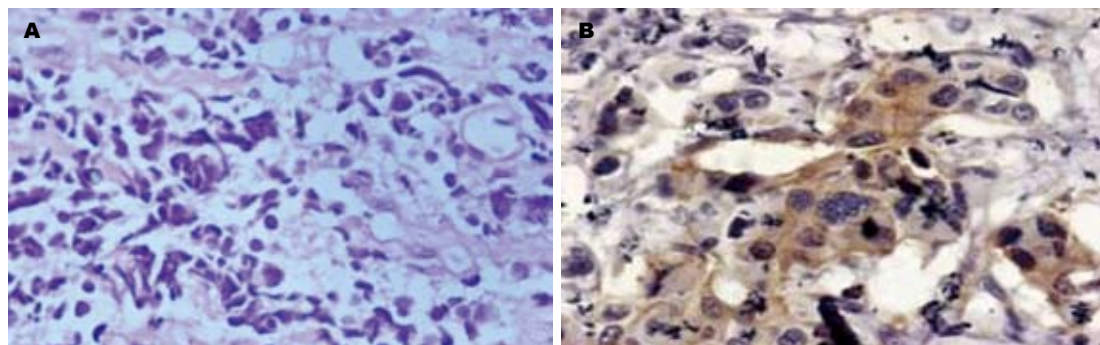


图5 裸鼠皮下移植瘤HE染色以及CA199在其中的表达. A: HE染色($\times 200$); B: CA199的表达(SP, $\times 200$).

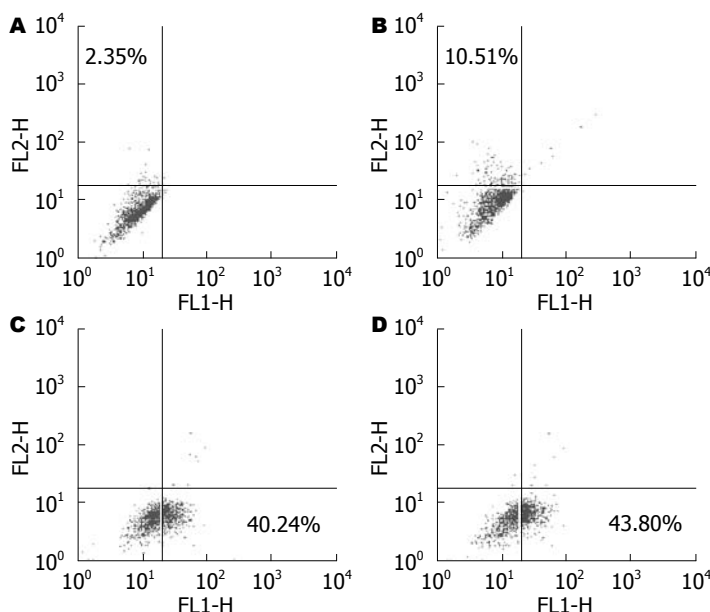


图6 流式细胞术检测CD15s和CD24在GBC-SD细胞中的表达. A, C: 普通细胞; B, D: 肿瘤球细胞; A, B: CD15s-FITC; C, D: CD24-PE.

$10.77\% \pm 0.93\%$, $t = 18.25$, $P < 0.05$), CD24阳性细胞率差异无统计学意义($t = 1.641$, $P > 0.05$, 图6)。

3 讨论

胆囊癌是胆道系统最常见的恶性肿瘤,其难以早期发现并极易发生侵袭转移,确诊时多数患者因处于晚期而丧失了最佳手术时机,虽然近年来胆囊癌手术切除范围不断扩大,其总体5年生存率仍在5%左右^[11,12]。临床实践表明,目前的手术治疗方法几乎达到了极限,放疗、化疗等综合治疗仍是有望提高患者生存率的重要手段。但是遗憾的是,胆囊癌对目前的各种化疗药物都不敏感。近来的研究表明,肿瘤的发生、发展和转移与肿瘤干细胞相关,这小群细胞具有自我更新、耐受放化疗、高致瘤性等特性,是治疗后肿瘤复发的原因^[13,14]。因此,研究胆囊癌干细胞,阐明其特殊的生物学特性是有效治疗胆囊癌的关键之一。

由于肿瘤干细胞在肿瘤组织中含量很少且

分离困难,因而对其生物学特性的研究具有很大难度。在长期的研究中,人们观察到含EGF、bFGF、LIF的无血清培养基可以促进正常干细胞的体外扩增而不发生分化^[15], bFGF可以促进神经干细胞进行不对称分裂,从而实现自我更新并产生具有对EGF反应性的干细胞,而EGF反应性的干细胞在EGF作用下,通过有丝分裂进行自我扩增,并通过不对称分裂来生成具有对bFGF反应性的神经干细胞。LIF有助于保持干细胞的未分化状态,并延长干细胞体外扩增时间。Singh等^[5]用无血清培养基从神经上皮肿瘤中培养出细胞球,并证实其具有肿瘤干细胞的特性,在对结肠癌、骨肉瘤、肺癌、黑色素瘤、皮肤癌等肿瘤干细胞的研究中^[16-20],人们也观察到通过无血清培养可以分离扩增出肿瘤干细胞。据以上研究,可以通过选择合适的培养基培养肿瘤细胞球来扩增肿瘤干细胞,并通过免疫学或者利用细胞功能,将肿瘤干细胞进一步分离纯化。在此研究中,我们用含有bFGF、EGF、B27

和LIF的培养基来培养胆囊癌细胞, 观察到大部分胆囊癌细胞不能耐受无血清培养基的环境而停止增殖并出现相继凋亡, 少部分细胞在培养48 h后渐出现分裂增殖, 随着培养时间的延长渐形成细胞球并不断增大, 经吹散传10代以上仍可以形成相同的肿瘤球, 且在相同初始细胞密度的条件下, 肿瘤球细胞形成的肿瘤球较由非肿瘤球GBC-SD细胞形成的肿瘤球数目明显增多, 但仍有相当一部分的肿瘤球细胞未能形成新的肿瘤球。经过在含血清的环境中培养, 肿瘤球细胞出现贴壁生长并基本上均表达胆囊癌分化标志物CD44s^[21], 说明肿瘤球中未分化的细胞发生分化。此外, 高致瘤性是肿瘤干细胞的另一主要特征, 而高致瘤性主要从两个方面来评价^[22], 一是肿瘤干细胞的体外克隆形成能力, 另外是肿瘤干细胞在免疫缺陷动物体内形成肿瘤的能力。在此研究中我们观察到, 来自肿瘤球的细胞体外增殖能力明显高于普通GBC-SD细胞, 此外, 动物实验结果也显示肿瘤球细胞具有更强的形成移植瘤能力, 这些均支持肿瘤球中富含肿瘤干细胞的设想。

在肿瘤干细胞的研究中, 难点首先在于对肿瘤干细胞的识别, 由于在同一肿瘤中, 肿瘤干细胞和其他普通的肿瘤细胞的形态和大小没有明显区别, 无法从形态学上辨别。目前很多研究主要通过细胞表面标志物来识别和分离肿瘤干细胞, 如前列腺癌干细胞表达CD44^[23]、肝癌干细胞表达CD90^[24]、胰腺癌^[25]和甲状腺癌^[26]干细胞表达CD133等。为了检测胆囊癌GBC-SD中高致瘤细胞的细胞表型, 我们选择CD15s和CD24蛋白来研究, 近来研究表明CD15s和肿瘤的发展、预后相关^[27-30], CD24被证实为多种肿瘤干细胞^[6,7]的特异性表面标志。本实验通过流式分析显示, CD15s+在肿瘤球细胞中的比例明显高于普通细胞, 因而认为CD15s可能为胆囊癌肿瘤干细胞的细胞表面标记。

据以上研究, 我们认为胆囊癌细胞系GBC-SD中存在肿瘤干细胞, 可以通过无血清培养基培养形成肿瘤细胞球的方法得以一定程度的扩增, 为进一步的分离和鉴定提供条件, CD15s可能为其特异性表面标记。本研究为胆囊癌肿瘤干细胞的进步一研究奠定了基础。

4 参考文献

- 1 Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* 2001; 414: 105-111
- 2 Scadden DT. Cancer stem cells refined. *Nat Immunol*

- 2004; 5: 701-703
- 3 O'Brien CA, Kreso A, Dick JE. Cancer stem cells in solid tumors: an overview. *Semin Radiat Oncol* 2009; 19: 71-77
- 4 Bonnet D, Dick JE. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med* 1997; 3: 730-737
- 5 Singh SK, Clarke ID, Terasaki M, Bonn VE, Hawkins C, Squire J, Dirks PB. Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer Res* 2003; 63: 5821-5828
- 6 Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ, Clarke MF. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100: 3983-3988
- 7 Li C, Heidt DG, Dalerba P, Burant CF, Zhang L, Adsay V, Wicha M, Clarke MF, Simeone DM. Identification of pancreatic cancer stem cells. *Cancer Res* 2007; 67: 1030-1037
- 8 Collins AT, Berry PA, Hyde C, Stower MJ, Maitland NJ. Prospective identification of tumorigenic prostate cancer stem cells. *Cancer Res* 2005; 65: 10946-10951
- 9 Zhang S, Balch C, Chan MW, Lai HC, Matei D, Schilder JM, Yan PS, Huang TH, Nephew KP. Identification and characterization of ovarian cancer-initiating cells from primary human tumors. *Cancer Res* 2008; 68: 4311-4320
- 10 Suvà ML, Riggi N, Stehle JC, Baumer K, Tercier S, Joseph JM, Suvà D, Clément V, Provero P, Cironi L, Osterheld MC, Guillou L, Stamenkovic I. Identification of cancer stem cells in Ewing's sarcoma. *Cancer Res* 2009; 69: 1776-1781
- 11 Levy AD, Murakata LA, Rohrmann CA Jr. Gallbladder carcinoma: radiologic-pathologic correlation. *Radiographics* 2001; 21: 295-314; questionnaire, 549-555
- 12 Jemal A, Siegel R, Ward E, Murray T, Xu J, Thun MJ. Cancer statistics, 2007. *CA Cancer J Clin* 2007; 57: 43-66
- 13 Wicha MS, Liu S, Dontu G. Cancer stem cells: an old idea--a paradigm shift. *Cancer Res* 2006; 66: 1883-1890; discussion 1895-1896
- 14 Milas L, Hittelman WN. Cancer stem cells and tumor response to therapy: current problems and future prospects. *Semin Radiat Oncol* 2009; 19: 96-105
- 15 Martens DJ, Tropepe V, van Der Kooy D. Separate proliferation kinetics of fibroblast growth factor-responsive and epidermal growth factor-responsive neural stem cells within the embryonic forebrain germinal zone. *J Neurosci* 2000; 20: 1085-1095
- 16 Ricci-Vitiani L, Lombardi DG, Pilozzi E, Biffoni M, Todaro M, Peschle C, De Maria R. Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells. *Nature* 2007; 445: 111-115
- 17 Wilson H, Huelsmeyer M, Chun R, Young KM, Friedrichs K, Argyle DJ. Isolation and characterisation of cancer stem cells from canine osteosarcoma. *Vet J* 2008; 175: 69-75
- 18 Eramo A, Lotti F, Sette G, Pilozzi E, Biffoni M, Di Virgilio A, Conticello C, Ruco L, Peschle C, De Maria R. Identification and expansion of the tumorigenic lung cancer stem cell population. *Cell Death Differ* 2008; 15: 504-514
- 19 Fang D, Nguyen TK, Leishear K, Finko R, Kulp AN, Hotz S, Van Belle PA, Xu X, Elder DE, Herlyn M. A tumorigenic subpopulation with stem cell

■名词解释

肿瘤干细胞: 肿瘤中具有无限自我更新能力, 能产生异质性肿瘤细胞并具有极强致瘤能力的细胞。

■同行评价

本文条理清晰, 分析得当, 有自己的见解, 研究有一定意义。

- 20 Toma JG, McKenzie IA, Bagli D, Miller FD. Isolation and characterization of multipotent skin-derived precursors from human skin. *Stem Cells* 2005; 23: 727-737
- 21 Yanagisawa N, Mikami T, Mitomi H, Saegusa M, Koike M, Okayasu I. CD44 variant overexpression in gallbladder carcinoma associated with tumor dedifferentiation. *Cancer* 2001; 91: 408-416
- 22 李锦军, 顾健人. 癌干细胞研究进展. *生命科学杂志* 2006; 18: 333-339
- 23 Simon RA, di Sant'Agnese PA, Huang LS, Xu H, Yao JL, Yang Q, Liang S, Liu J, Yu R, Cheng L, Oh WK, Palapattu GS, Wei J, Huang J. CD44 expression is a feature of prostatic small cell carcinoma and distinguishes it from its mimickers. *Hum Pathol* 2009; 40: 252-258
- 24 Yang ZF, Ho DW, Ng MN, Lau CK, Yu WC, Ngai P, Chu PW, Lam CT, Poon RT, Fan ST. Significance of CD90+ cancer stem cells in human liver cancer. *Cancer Cell* 2008; 13: 153-166
- 25 Hermann PC, Huber SL, Herrler T, Aicher A, Ellwart JW, Guba M, Bruns CJ, Heeschen C. Distinct populations of cancer stem cells determine tumor growth and metastatic activity in human pancreatic cancer. *Cell Stem Cell* 2007; 1: 313-323
- 26 Zito G, Richiusa P, Bommarito A, Carissimi E, Russo L, Coppola A, Zerilli M, Rodolico V, Criscimanna A, Amato M, Pizzolanti G, Galluzzo A, Giordano C. In vitro identification and characterization of CD133(pos) cancer stem-like cells in anaplastic thyroid carcinoma cell lines. *PLoS One* 2008; 3: e3544
- 27 Günther K, Dworak O, Remke S, Pflüger R, Merkel S, Hohenberger W, Reymond MA. Prediction of distant metastases after curative surgery for rectal cancer. *J Surg Res* 2002; 103: 68-78
- 28 Paganuzzi M, Bobbio B, Marroni P, Filiberti R, Secco GB, Grossi CE. Prognostic role of serum sialyl Lewisx (CD15s) in colorectal cancer. *Oncology* 2003; 65: 52-59
- 29 Ellmark P, Belov L, Huang P, Lee CS, Solomon MJ, Morgan DK, Christopherson RI. Multiplex detection of surface molecules on colorectal cancers. *Proteomics* 2006; 6: 1791-1802
- 30 Ratei R, Karawajew L, Schabath R, Ehrfeldt A, Grunert F, Ludwig WD. Differential expression of the carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecules panCD66, CD66a, CD66c and of sialyl-Lewis x (CD15s) on blast cells of acute leukemias. *Int J Hematol* 2008; 87: 137-143

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

ISSN 1009-3079 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 2008 年 WJG 影响因子 2.081

本刊讯 据汤姆森-路透科技信息集团2009-06-19发布《期刊引证报告》(*Journal Citation Reports*)的统计结果: *World Journal of Gastroenterology(WJG)*的总被引次数(TC): 10 822; 影响因子(IF): 2.081; 即年指数: 0.274; 论文数量: 1 112; 半衰期: 3.1; 特征因子(EF): 0.05006. 特征因子这个指标是今年期刊引证报告里新加的一个指标. 与影响因子不同的是, 这个指标不仅考察了引文的数量, 而且考虑了施引期刊的影响力, 即: 某期刊如果越多地被高影响力的期刊引用, 则该期刊的影响力也越高. 正如Google考虑超链接的来源, 特征因子也充分考虑引文的来源, 并在计算中赋予不同施引期刊的引文以不同的权重. 特征因子分值的计算基于过去5年中期刊发表的论文在期刊引证报告统计当年的被引用情况. 与影响因子比较, 期刊特征因子分值的优点主要有: (1)特征因子考虑了期刊论文发表后5年的引用时段, 而影响因子只统计了2年的引文时段, 后者不能客观地反映期刊论文的引用高峰年份; (2)特征因子对期刊引证的统计包括自然科学和社会科学, 更为全面、完整; (3)特征因子的计算扣除了期刊的自引; (4)特征因子的计算基于随机的引文链接, 通过特征因子分值可以较为合理地测度科研人员用于阅读不同期刊的时间. 在55种国际胃肠病学和肝病学期刊中, *WJG*的EF, TC和IF分别名列第6, 9, 32位. (*WJG*编辑部主任: 程剑侠 2009-06-19)

异丙肾上腺素预处理对大鼠胰腺移植后缺血再灌注损伤的抑制作用

裴广辉, 梁健, 宋文利, 王智平, 莫春柏

裴广辉, 宋文利, 王智平, 莫春柏, 天津市第一中心医院移植外科 天津市 300192

梁健, 中国医科大学附属第四医院肝胆胰外科 辽宁省沈阳市 110032

裴广辉, 在读博士, 主治医师, 主要从事器官移植临床工作。

辽宁省教育厅高校科研基金资助项目, No. 202012014

作者贡献分布: 裴广辉与梁健对此文所作贡献均等; 此课题由裴广辉与梁健设计; 研究过程由裴广辉、梁健、宋文利、王智平及莫春柏操作完成; 本文写作由裴广辉与梁健完成。

通讯作者: 梁健, 教授, 110032, 辽宁省沈阳市, 中国医科大学附属第四医院肝胆胰外科. liangj63110@sina.com

电话: 024-62043517

收稿日期: 2010-01-13 修回日期: 2010-03-08

接受日期: 2010-03-15 在线出版日期: 2010-03-28

Preconditioning of pancreatic graft with isoproterenol reduces posttransplant ischemia/reperfusion injury in rats

Guang-Hui Pei, Jian Liang, Wen-Li Song, Zhi-Ping Wang, Chun-Bai Mo

Guang-Hui Pei, Wen-Li Song, Zhi-Ping Wang, Chun-Bai Mo, Department of Organ Transplantation, Tianjin First Center Hospital, Tianjin 300192, China

Jian Liang, Department of General Surgery, the Fourth Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang 110032, Liaoning Province, China

Supported by: the Scientific Research Foundation of Liaoning Provincial Education Department, No. 202012014

Correspondence to: Professor Jian Liang, Department of General Surgery, the Fourth Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang 110032, Liaoning Province, China. liangj63110@sina.com

Received: 2010-01-13 Revised: 2010-03-08

Accepted: 2010-03-15 Published online: 2010-03-28

Abstract

AIM: To determine the protective effects of isoproterenol preconditioning (IPC) against ischemia/reperfusion injury in rats after pancreas transplantation and to explore mechanisms involved.

METHODS: The expression of heat shock protein 70 (HSP70) in the pancreas of rats undergoing IPC was detected at different time points after IPC. A rat model of posttransplant pancreatic ischemia/reperfusion injury was established.

The donor rats that showed high expression of HSP70 in the pancreas were used as experiment group, while donor rats that did not undergo IPC were used as control group. The blood and pancreatic samples were taken 6 h after pancreas transplantation. The expression of HSP70 in the pancreas was detected by Western blot and immunohistochemistry. The expression of TNF- α in the pancreas was detected by immunohistochemistry. Serum amylase was determined by iodine colorimetry. The apoptosis rate of pancreatic cells was determined by flow cytometry.

RESULTS: The expression level of HSP70 in the pancreas of donor rats reached the peak at 24 h after IPC, which was significantly higher than those at other time points (0.92 ± 0.25 vs 0.24 ± 0.04 , 0.34 ± 0.06 , 0.58 ± 0.07 , 0.62 ± 0.11 and 0.25 ± 0.09 , respectively; all $P < 0.05$). The expression levels of HSP70 in the experimental group at 6, 12, 24 and 36 h after IPC were significantly higher than those in the control group at corresponding time points (0.34 ± 0.06 vs 0.28 ± 0.07 , 0.58 ± 0.07 vs 0.25 ± 0.04 , 0.92 ± 0.25 vs 0.27 ± 0.05 and 0.62 ± 0.11 vs 0.25 ± 0.06 , respectively; all $P < 0.05$) but returned to normal level at 48 h. No significant differences were noted in the expression levels of HSP70 among each time point in the control group. HSP70 was mainly expressed in pancreatic acinar cells and the vessel wall. The expression level of TNF- α , apoptosis rate, neutrophil count and serum amylase significantly increased in the control group when compared with those in sham-operated group (all $P < 0.01$). However, the levels of these parameters significantly decreased in the experiment group when compared with those in the control group ($11\ 929 \pm 1\ 220$ vs $46\ 111 \pm 3\ 127$, $26.7\% \pm 4.5\%$ vs $37.4\% \pm 4.7\%$, $3\ 308 \pm 531$ vs $6\ 668 \pm 1\ 506$ and $1\ 057$ IU/L ± 148 IU/L vs $1\ 408$ IU/L ± 195 IU/L, respectively; all $P < 0.05$).

CONCLUSION: Isoproterenol preconditioning reduces ischemia/reperfusion injury in rats after pancreas transplantation perhaps by inducing the production of HSP70.

■背景资料

胰腺移植缺血再灌注损伤是胰腺移植失败的主要原因之一。胰腺持续性缺血可导致组织损伤和细胞死亡,早期再灌注尽管对组织非常重要,但再灌注后循环白细胞附壁、聚积,渗出血管、侵及脏器,导致组织细胞坏死,另外补体激活以及活性氧的产生致使缺血的脏器损伤更为严重。在此过程中多种炎症细胞因子参与,导致组织细胞凋亡及坏死。通过预处理的方法启动机体内源性保护机制,提高胰腺对缺血再灌注损伤的耐受性是减轻胰腺缺血再灌注损伤理想的方法。

■同行评议者

巩鹏, 教授, 大连医科大学附属第一医院普外科

■ 研究前沿

热休克蛋白是一组高度保守的蛋白质,当器官暴露于各种应激条件下,细胞表达热休克蛋白增强。不仅通过修复受损伤的蛋白质,使细胞在应激阶段存活,而且还帮助合成、降解、折叠、跨膜转运蛋白质,具有抗细胞凋亡,抑制炎性细胞因子的表达,起到增强细胞对损害的耐受,维持细胞的正常功能代谢,提高细胞的生存能力,在器官移植领域日益受到关注。

Key Words: Isoproterenol preconditioning; Pancreatic transplantation; Ischemic reperfusion injury; Heat shock protein 70

Pei GH, Liang J, Song WL, Wang ZP, Mo CB. Preconditioning of pancreatic graft with isoproterenol reduces posttransplant ischemia/reperfusion injury in rats. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(9): 871-876

摘要

目的: 探讨减轻大鼠胰腺移植后缺血再灌注损伤的保护作用机制。

方法: IPC后动态检测大鼠胰腺组织热休克蛋白表达。建立大鼠胰腺移植缺血再灌注模型,选择表达热休克蛋白高峰时段供体大鼠胰腺移植作为实验组,未预处理供体大鼠胰腺移植作为对照组。移植后6 h,采集静脉血及移植胰腺。热休克蛋白70(HSP70)分别用Western blot法及免疫组织化学法检测。免疫组织化学法测定肿瘤坏死因子- α (TNF- α)表达。流式细胞仪检测胰腺细胞凋亡率。碘淀粉比色法检测血淀粉酶水平。

结果: IPC后供体大鼠胰腺中HSP70的表达在24 h达到高峰,与其他各时段比较具有显著差异(0.92 ± 0.25 vs 0.24 ± 0.04 , 0.34 ± 0.06 , 0.58 ± 0.07 , 0.62 ± 0.11 , 0.25 ± 0.09 , 均 $P < 0.05$)。IPC后6 h, 12 h, 24 h, 36 h大鼠胰腺中HSP70的表达与未预处理组相应时段比较差异也显著(0.34 ± 0.06 vs 0.28 ± 0.07 , 0.58 ± 0.07 vs 0.25 ± 0.04 , 0.92 ± 0.25 vs 0.27 ± 0.05 , 0.62 ± 0.11 vs 0.25 ± 0.06 , 均 $P < 0.05$)。48 h恢复到原来水平。而未预处理组各时段间比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。HSP70主要表达于胰腺腺泡细胞及血管壁。对照组胰腺组织中TNF- α 、细胞凋亡率、中性粒细胞、血淀粉酶的水平明显升高,与假手术组相比差异显著(均 $P < 0.01$)。实验组降低了胰腺组织中TNF- α 、细胞凋亡率、白细胞数、血淀粉酶的水平,与对照组比较差异具有统计学意义($11\ 929 \pm 1220$ vs $46\ 111 \pm 3127$, $26.7\% \pm 4.5\%$ vs $37.4\% \pm 4.7\%$, $3\ 308 \pm 531$ vs $6\ 668 \pm 1\ 506$, $1\ 057\ \text{IU/L} \pm 148\ \text{IU/L}$ vs $1\ 408\ \text{IU/L} \pm 195\ \text{IU/L}$, 均 $P < 0.05$)。

结论: IPC减轻了大鼠胰腺移植后缺血再灌注损伤,IPC保护作用与HSP70的诱导生成有关。

关键词: 异丙肾上腺素预处理; 胰腺移植; 缺血再灌注损伤; 热休克蛋白70

裴广辉, 梁健, 宋文利, 王智平, 莫春柏. 异丙肾上腺素预处理对大鼠胰腺移植后缺血再灌注损伤的抑制作用. *世界华人消化杂志*

2010; 18(9): 871-876

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/871.asp>

0 引言

胰腺移植缺血再灌注(ischemia/reperfusion, I/R)损伤是胰腺移植失败的主要原因之一^[1-3]。胰腺持续性缺血可导致组织损伤和细胞死亡,早期再灌注尽管对组织非常重要,但再灌注后循环白细胞附壁、聚积,渗出血管、侵及脏器,导致组织细胞坏死,另外补体激活以及活性氧的产生致使缺血的脏器损伤更为严重,即再灌注损伤^[4,5]。在此过程中多种炎性细胞因子参与,导致组织细胞凋亡及坏死^[6,7]。通过预处理的方法启动机体内源性保护机制,提高器官对缺血再灌注损伤的耐受性是减轻缺血再灌注损伤理想的方法。国外报道通过异丙肾上腺素预处理可以减轻由蛙皮素引起的胰腺炎损伤^[8]。本实验采用大鼠胰腺移植模型,通过腹腔注射异丙肾上腺素预处理,探讨减轻大鼠胰腺缺血再灌注损伤的保护作用机制。为临床通过异丙肾上腺素预处理减轻缺血再灌注损伤提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 材料 清洁级Wistar大鼠,♂,体质量200-250 g,由中国医科大学动物部提供。一抗兔抗大鼠热休克蛋白70(heat shock protein 70, HSP70)抗体、二抗碱磷酶标记山羊抗兔IgG(北京中山生物技术有限公司)。HSP70及TNF- α 免疫组织化学染色试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司)。 β -actin(Santa Cruz biotechnology公司)。碘化丙啶(Sigma公司)。硝酸纤维素膜(Bio-Rad公司)、异丙肾上腺素(上海禾丰药业有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 诱导热休克蛋白大鼠分组: (1)异丙肾上腺素预处理(IPC)组: IPC组腹腔注射异丙肾上腺素0.05 mg/kg。 (2)未预处理(C)组: C组腹腔注射与IPC组相应等量0.9%氯化钠注射液。按照预处理后0、6、12、24、36、48 h分6小组。分别于预处理后各时段将IPC组($n = 36$)及C组($n = 36$)大鼠处死取胰腺组织,各时段大鼠胰腺组织置-70℃冰箱保存,待Western blot法及免疫组织化学检测胰腺组织HSP70。

1.2.2 Western blot法检测胰腺组织HSP70的表达: 将胰腺组织用匀浆机与缓冲液制成匀浆,离心收集上清液,蛋白定量后,SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳,转印至硝酸纤维素膜上。各与一抗兔抗

表 1 胰腺组织中HSP70(IDV)/ β -actin(IDV)比值在各时间段比较 ($n = 36$, mean $\pm$ SD)

分组	0 h	6 h	12 h	24 h	36 h	48 h
IPC组	0.24 $\pm$ 0.04	0.34 $\pm$ 0.06 ^a	0.58 $\pm$ 0.07 ^a	0.92 $\pm$ 0.25 ^{ac}	0.62 $\pm$ 0.11 ^a	0.25 $\pm$ 0.09
C组	0.26 $\pm$ 0.03	0.28 $\pm$ 0.07	0.25 $\pm$ 0.04	0.27 $\pm$ 0.05	0.25 $\pm$ 0.06	0.27 $\pm$ 0.06

^a $P < 0.05$ vs C组, ^c $P < 0.05$ vs IPC组中0, 6, 12, 36, 48 h.

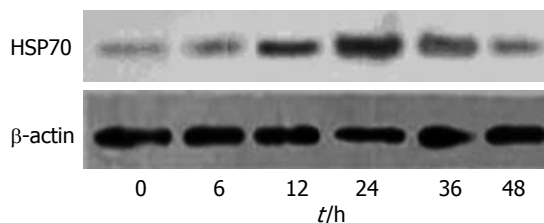


图 1 IPC组不同时段胰腺组织中HSP70的表达.

大鼠HSP70抗体及一抗兔抗大鼠 β -actin抗体孵育过夜, TBS液洗去未结合的抗体, 二抗碱磷酶标记山羊抗兔IgG孵育2 h. TBS洗去未结合的二抗. 膜浸入AKP显色液染色20 min, 将膜转至蒸馏水中, 终止显色反应. 运用凝胶图像分析系统(GDS8000型, 美国UVP公司)测定电泳条带积分吸光度值(IA). 以 β -actin作为内对照, 将目的条带IA与 β -actin IA的比值作为目的蛋白相对表达量.

1.2.3 大鼠胰腺移植模型建立及分组: 术前大鼠全身肝素化, 开腹将大鼠横结肠系膜、十二指肠悬韧带剪断, 分别结扎切断胆总管、肝固有动脉、胃左及胃短动静脉、胃幽门、肾左右动脉, 在腹腔干动脉上结扎腹主动脉, 在肠系膜上动脉下切断腹主动脉, 插管UW液灌注, 高度60 cm, 灌注5-8 mL, 直到胰腺变白为止, 游离切断腹主动脉、门静脉, 取出胰腺及脾, 放在4 °C UW液中, 腹主动脉远端封闭, 将腹主动脉近端及门静脉断端分别与另外一只大鼠腹主动脉、下腔静脉端侧吻合, 用7-0丝线将供体十二指肠断端与受体空肠作端侧吻合, 逐层关腹, 制成大鼠胰腺移植模型. 将表达热休克蛋白高峰时段大鼠及未预处理组大鼠分别作为供体鼠制作此模型, 分别作为实验组及对照组. 实验组10只预处理后的大鼠作为供体与10只未处理大鼠受体分别行胰腺移植, 对照组10只未预处理大鼠作为供体与10只未处理大鼠受体分别行胰腺移植. 10只大鼠仅行麻醉后开腹, 不制成模型, 作为假手术组. 通血再灌注6 h后视为胰腺移植成功, 分别处死实验组及对照组大鼠, 取其胰腺及血样检测.

1.2.4 免疫组织化学法检测预处理后胰腺组织

HSP70及移植后胰腺组织TNF- α 的表达: 胰腺标本固定于中性甲醛液24 h, 经脱水、浸蜡及包埋, 切片. 按照HSP70及TNF- α 免疫组织化学染色试剂盒说明书操作进行. 应用显微图像分析系统(Metamorph/Dpio/Bx41, UIC/Olympus, US/JP)测免疫组织化学TNF- α IA进行量化比较.

1.2.5 流式细胞仪检测移植后胰腺细胞凋亡率: 收集各组胰腺组织, 放在400目筛网上, 筛网覆盖于小烧杯上, 剪碎胰腺组织, 用PBS液冲洗组织碎块, 将浑浊液体移入流式细胞仪专用管中, 在离心机上1 000 r/min, 离心5 min, 弃上清, 留试管底液体加含RnaseA酶的碘化丙啶0.8 mL染色液混匀, 4 °C避光30 min. 然后上流式细胞仪检测.

1.2.6 碘淀粉比色法行血清淀粉酶测定: 1个淀粉酶单位为100 mL血清中的淀粉酶在37 °C条件下, 15 min水解5 mg淀粉. 血清正常值为80-180淀粉酶单位.

1.2.7 胰腺组织白细胞计数: 在200倍HE染色片随机选4个视野, 显微图像分析系统(Metamorph/Dpio/Bx41, UIC/Olympus, US/JP)计数白细胞, 取平均值为此片白细胞数.

统计学处理 数据用mean $\pm$ SD表示, 采用SPSS10.0软件, 诱导热休克蛋白组内各时段之间比较采用单因素方差分析. 两组之间比较采用 t 检验. $P < 0.05$ 为有统计学意义.

2 结果

2.1 HSP70在胰腺组织的表达 异丙肾上腺素预处理组大鼠胰腺组织中HSP70的表达在异丙肾上腺素预处理6 h后增加, 在24 h达到高峰(0.92 $\pm$ 0.25), 48 h恢复到原来水平, 预处理24 h的IDV与其他各时段IDV比较有显著性差异($P < 0.05$, 表1, 图1). IPC后6, 12, 24, 36 h大鼠胰腺中HSP70的表达与未预处理组相应时段比较差异也显著($P < 0.05$, 表1). 而未预处理组各时段间比较差异无统计学意义($P > 0.05$, 表1, 图2).

2.2 IPC后胰腺组织HSP70的表达 HSP70免疫组织化学染色显示, IPC后HSP70主要表达于胰腺腺泡细胞及血管壁, 而未预处理组免疫组织化

■ 相关报道

Frossard等报道通过大鼠热处理产生热休克蛋白可以减轻大鼠急性胰腺炎的发生程度.

■创新盘点

本研究首次提出应用异丙肾上腺素诱导热休克蛋白减轻胰腺移植缺血性再灌注损伤,为临床通过异丙肾上腺素预处理减轻缺血再灌注损伤提供实验依据。

表 2 胰腺移植后再灌注6 h各组TNF- α 、凋亡率、白细胞数、血淀粉酶的比较 ($n = 10$, mean $\pm$ SD)

分组	TNF- α (IU/L)	凋亡率(%)	白细胞数(cm^2)	血淀粉酶(IU/L)
实验组	11 929 $\pm$ 1 220 ^a	26.7 $\pm$ 4.5 ^a	3 308 $\pm$ 531 ^a	1 057 $\pm$ 148 ^a
对照组	46 111 $\pm$ 3 127 ^d	37.4 $\pm$ 4.7 ^d	6 668 $\pm$ 1 506 ^d	1 408 $\pm$ 195 ^d
假手术组	2 294 $\pm$ 247	6.0 $\pm$ 1.0	1 397 $\pm$ 191	112 $\pm$ 13

^a $P < 0.05$ vs 对照组; ^d $P < 0.01$ vs 假手术组。

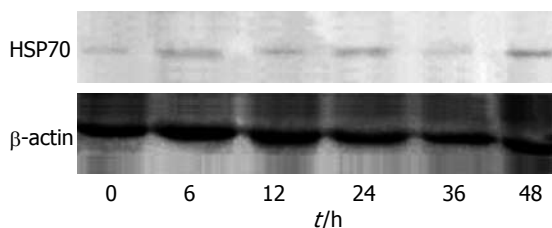


图 2 未预处理组不同时段胰腺组织中HSP70的表达。

学HSP70的表达为弱阳性(图3)。

2.3 IPC后对胰腺移植后缺血再灌注损伤的影响
胰腺移植后再灌注6 h 100%成功, TNF- α 在胰腺腺泡细胞中表达, 对照组TNF- α 、细胞凋亡率, 白细胞浸润数, 血淀粉酶的水平显著增高, 与假手术组比较有显著性差异($P < 0.01$)。而实验组明显降低了胰腺细胞TNF- α 、凋亡率、白细胞浸润数, 血淀粉酶水平, 与对照组比较差异有统计学意义($P < 0.05$, 表2)。

3 讨论

热休克蛋白是一组高度保守的蛋白质, 当器官暴露于各种应激条件下, 细胞表达热休克蛋白增强^[9]。不仅通过修复受损伤的蛋白质, 使细胞在应激阶段存活, 而且还帮助合成、降解、折叠、跨膜转运蛋白质^[10]。其中主要是HSP70家族, HSP70家族是多基因家族, 广泛分布在细胞的亚细胞结构中, 其N端结构域高度保守, 具有ATP酶活性, 可结合ATP, 其C端类似MHC结合肽结构区域, 同源性及功能差异较大, 具有结合多肽或特殊蛋白并调节其构象的功能^[11]。本实验结果证实, 异丙肾上腺素预处理后HSP70的表达强度有时间依从性, 在异丙肾上腺素预处理后24 h胰腺组织的HSP70表达至高峰, 随后HSP70缓慢恢复到原来水平。Frossard等^[8]报道通过大鼠热处理产生热休克蛋白可以减轻大鼠急性胰腺炎的发生程度。我们通过腹腔注射异丙肾上腺素应激诱导大鼠HSP70的产生, 因此将预处理后24 h表达HSP70高峰的大鼠作为供体进行胰腺移植, 观察异丙肾上腺素预处理对大鼠胰腺移植

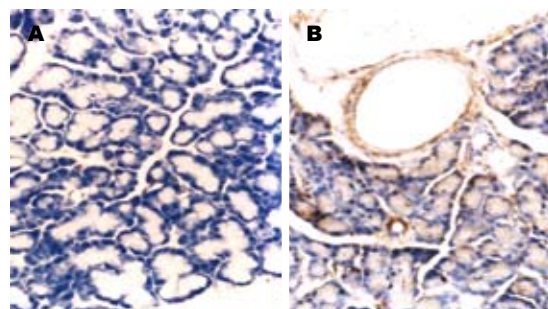


图 3 胰腺组织HSP70的表达($\times 400$)。A: 未预处理组; B: IPC组。

后缺血再灌注损伤的保护作用。

组织器官缺血再灌注时大量激活的白细胞及细胞因子进入缺血组织。其中由再灌注黏附于血管壁的白细胞产生的毒性物质, 破坏胰腺血管内皮细胞^[12-15]。TNF- α 引起细胞因子级联反应, 加重炎症反应^[16-18]。急性胰腺炎通常被认为是胰腺腺泡细胞合成及分泌的消化酶引起的自身消化疾病。同样胰腺移植缺血再灌注损伤时, 胰腺腺泡细胞内胰蛋白酶原及NF- κ B被激活, 引起腺泡细胞损伤和胰腺炎, 导致血淀粉酶升高^[19,20]。与其他研究结果一样^[21], 我们在研究中也证实, HSP70主要表达于胰腺腺泡细胞及血管壁。这样可以抑制胰腺胰蛋白酶原激活, 从而抑制胰蛋白酶的自身消化, 可以降低胰腺炎时血淀粉酶水平, 而HSP70在血管壁抑制白细胞在血管壁的黏附聚集, 抑制白细胞渗出血管壁, 减轻了胰腺缺血再灌注损伤^[22]。NF- κ B与HSP70结合将阻止NF- κ B的核易位, 并抑制TNF- α 的转录^[23], 从而HSP70抑制缺血再灌注损伤时表达TNF- α , 减轻了TNF- α 对胰腺组织的损害。本实验组降低了TNF- α 的表达及血淀粉酶水平, 减少了白细胞浸润, 提示热休克蛋白在大鼠胰腺移植缺血/再灌注损伤过程中起到增强细胞对损害的耐受, 维持细胞的正常功能代谢, 提高了细胞的生存能力。

脏器缺血性再灌注损伤可以引起细胞凋亡^[24-26]。目前研究已明确, 细胞表面的Fas/Apo-1

受体和他们的配体相结合是诱导凋亡的重要原因, 热休克蛋白的表达可能提供一种能够包裹自身和外来抗原新的免疫物质, 通过抑制c-Jun激酶的活性来抑制凋亡受体, 从而使细胞避免凋亡^[27,28]。Matsumoto等^[29]研究发现大鼠短暂高温预处理后, 体内积聚热休克蛋白, 并减少细胞凋亡, 而热休克蛋白合成的抑制物能阻碍这种现象。我们在实验中证实, 实验组的移植胰腺细胞凋亡率明显低于对照组, 间接提示经异丙肾上腺素预处理, 胰腺高表达的热休克蛋白降低了胰腺细胞的凋亡率, 从而减轻了大鼠胰腺移植缺血再灌注损伤。

总之, 经过异丙肾上腺素预处理后减轻了大鼠胰腺缺血性再灌注损伤, 表明异丙肾上腺素预处理减轻大鼠胰腺缺血性再灌注损伤的机制可能与上调胰腺组织HSP70的表达有关, 且异丙肾上腺素应用剂量小, 使用方便, 具有临床应用价值。

4 参考文献

- Mohan P, Safi K, Little DM, Donohoe J, Conlon P, Walshe JJ, O'Kelly P, Thompson CJ, Hickey DP. Improved patient survival in recipients of simultaneous pancreas-kidney transplant compared with kidney transplant alone in patients with type 1 diabetes mellitus and end-stage renal disease. *Br J Surg* 2003; 90: 1137-1141
- Hopt UT, Droginitz O. Pancreas organ transplantation. Short and long-term results in terms of diabetes control. *Langenbecks Arch Surg* 2000; 385: 379-389
- Orsenigo E, Fiorina P, Cristallo M, Socci C, La Rocca E, Maffi P, Invernizzi L, Zuber V, Secchi A, Di Carlo V. Long-term survival after kidney and kidney-pancreas transplantation in diabetic patients. *Transplant Proc* 2004; 36: 1072-1075
- Obermaier R, Droginitz O, Benz S, Hopt UT, Pisarski P. Pancreatic ischemia/reperfusion injury: impact of different preservation temperatures. *Pancreas* 2008; 37: 328-332
- Oehmann C, Benz S, Droginitz O, Pisarski P, Hopt UT, Obermaier R. Remote preconditioning reduces microcirculatory disorders in pancreatic ischemia/reperfusion injury. *Pancreas* 2007; 35: e45-e50
- Obermaier R, Benz S, Von Dobschuetz E, Droginitz O, Schareck W, Jonas L, Messmer K, Hopt UT. Characterization of microcirculatory disturbance in a novel model of pancreatic ischemia-reperfusion using intravital fluorescence-microscopy. *Pancreas* 2002; 25: 142-148
- Woeste G, Wullstein C, Meyer S, Usadel KH, Hopt UT, Bechstein WO, von Dobschuetz E. Octreotide attenuates impaired microcirculation in postischemic pancreatitis when administered before induction of ischemia. *Transplantation* 2008; 86: 961-967
- Frossard JL, Bhagat L, Lee HS, Hietaranta AJ, Singh VP, Song AM, Steer ML, Saluja AK. Both thermal and non-thermal stress protect against caerulein induced pancreatitis and prevent trypsinogen activation in the pancreas. *Gut* 2002; 50: 78-83
- Saluja A, Dudeja V. Heat shock proteins in pancreatic diseases. *J Gastroenterol Hepatol* 2008; 23 Suppl 1: S42-S45
- Weitzmann A, Baldes C, Dudek J, Zimmermann R. The heat shock protein 70 molecular chaperone network in the pancreatic endoplasmic reticulum - a quantitative approach. *FEBS J* 2007; 274: 5175-5187
- Mayer MP, Bukau B. Hsp70 chaperones: cellular functions and molecular mechanism. *Cell Mol Life Sci* 2005; 62: 670-684
- Zheng Z, Kim JY, Ma H, Lee JE, Yenari MA. Anti-inflammatory effects of the 70 kDa heat shock protein in experimental stroke. *J Cereb Blood Flow Metab* 2008; 28: 53-63
- Weiss YG, Bromberg Z, Raj N, Raphael J, Goloubinoff P, Ben-Neriah Y, Deutschman CS. Enhanced heat shock protein 70 expression alters proteasomal degradation of IkappaB kinase in experimental acute respiratory distress syndrome. *Crit Care Med* 2007; 35: 2128-2138
- Uchida Y, Freitas MC, Zhao D, Busuttill RW, Kupiec-Weglinski JW. The inhibition of neutrophil elastase ameliorates mouse liver damage due to ischemia and reperfusion. *Liver Transpl* 2009; 15: 939-947
- Warzecha Z, Dembinski A, Ceranowicz P, Konturek SJ, Dembinski M, Pawlik WW, Tomaszewska R, Stachura J, Kusnierz-Cabala B, Naskalski JW, Konturek PC. Ischemic preconditioning inhibits development of edematous cerulein-induced pancreatitis: involvement of cyclooxygenases and heat shock protein 70. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 5958-5965
- von Dobschuetz E, Meyer S, Thorn D, Marme D, Hopt UT, Thomusch O. Targeting vascular endothelial growth factor pathway offers new possibilities to counteract microvascular disturbances during ischemia/reperfusion of the pancreas. *Transplantation* 2006; 82: 543-549
- von Dobschuetz E, Pahernik S, Hoffmann T, Kiefmann R, Heckel K, Messmer K, Mueller-Hoecker J, Dellian M. Dynamic intravital fluorescence microscopy--a novel method for the assessment of microvascular permeability in acute pancreatitis. *Microvasc Res* 2004; 67: 55-63
- Tukiainen E, Kylänpää ML, Puolakkainen P, Kemppainen E, Halonen K, Orpana A, Methuen T, Salaspuro M, Haapiainen R, Repo H. Polymorphisms of the TNF, CD14, and HSPA1B genes in patients with acute alcohol-induced pancreatitis. *Pancreas* 2008; 37: 56-61
- von Dobschuetz E, Schmidt R, Scholtes M, Thomusch O, Schwer CI, Geiger KK, Hopt UT, Pannen BH. Protective role of heme oxygenase-1 in pancreatic microcirculatory dysfunction after ischemia/reperfusion in rats. *Pancreas* 2008; 36: 377-384
- Jaworek J, Nawrot-Porabka K, Leja-Szpak A, Bonior J, Szklarczyk J, Kot M, Konturek SJ, Pawlik WW. Melatonin as modulator of pancreatic enzyme secretion and pancreatoprotector. *J Physiol Pharmacol* 2007; 58 Suppl 6: 65-80
- Tashiro M, Schäfer C, Yao H, Ernst SA, Williams JA. Arginine induced acute pancreatitis alters the actin cytoskeleton and increases heat shock protein

■应用要点

异丙肾上腺素化学结构、药代动力学、药效学及药理作用机制明确, 不良反应很小。应用异丙肾上腺素诱导热休克蛋白, 使用方便, 剂量小, 具有临床应用价值。

■同行评价

本文书写思路清晰,规范,意义明确,具有重要的临床意义。

- expression in rat pancreatic acinar cells. *Gut* 2001; 49: 241-250
- 22 Dembiński A, Warzecha Z, Ceranowicz P, Dembiński M, Cieszkowski J, Pawlik WW, Tomaszewska R, Konturek SJ, Konturek PC. Effect of ischemic preconditioning on pancreatic regeneration and pancreatic expression of vascular endothelial growth factor and platelet-derived growth factor-A in ischemia/reperfusion-induced pancreatitis. *J Physiol Pharmacol* 2006; 57: 39-58
- 23 Bhagat L, Singh VP, Dawra RK, Saluja AK. Sodium arsenite induces heat shock protein 70 expression and protects against secretagogue-induced trypsinogen and NF-kappaB activation. *J Cell Physiol* 2008; 215: 37-46
- 24 Jang HJ, Kwak JH, Cho EY, We YM, Lee YH, Kim SC, Han DJ. Glutamine induces heat-shock protein-70 and glutathione expression and attenuates ischemic damage in rat islets. *Transplant Proc* 2008; 40: 2581-2584
- 25 Garrido C, Brunet M, Didelot C, Zermati Y, Schmitt E, Kroemer G. Heat shock proteins 27 and 70: anti-apoptotic proteins with tumorigenic properties. *Cell Cycle* 2006; 5: 2592-2601
- 26 Muñoz-Casares FC, Padillo FJ, Briceño J, Collado JA, Muñoz-Castañeda JR, Ortega R, Cruz A, Túniz I, Montilla P, Pera C, Muntané J. Melatonin reduces apoptosis and necrosis induced by ischemia/reperfusion injury of the pancreas. *J Pineal Res* 2006; 40: 195-203
- 27 Mokhtari D, Kerblom B, Mehmeti I, Wang X, Funa NS, Olerud J, Lenzen S, Welsh N, Welsh M. Increased Hsp70 expression attenuates cytokine-induced cell death in islets of Langerhans from Shb knockout mice. *Biochem Biophys Res Commun* 2009; 387: 553-557
- 28 Yenari MA, Liu J, Zheng Z, Vexler ZS, Lee JE, Giffard RG. Antiapoptotic and anti-inflammatory mechanisms of heat-shock protein protection. *Ann N Y Acad Sci* 2005; 1053: 74-83
- 29 Matsumoto K, Honda K, Kobayashi N. Protective effect of heat preconditioning of rat liver graft resulting in improved transplant survival. *Transplantation* 2001; 71: 862-868

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

ISSN 1009-3079 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32400余万篇次(2003-2005年),涉及期刊12400余种。本版还加大了专家评审力度,5500多位学科专家参加了核心期刊评审工作。经过定量评价和定性评审,从我国正在出版的中文期刊中评选出1980余种核心期刊,分属七大编73个学科类目。《世界华人消化杂志》入选本版核心期刊库(见R5内科学类核心期刊表,第66页)。(编辑部主任:李军亮 2010-01-08)

携带Pyk2基因的shRNA质粒构建及其在Lovo结肠癌细胞系中的表达

胡刚, 汪欣, 郑启军, 万远廉, 刘玉村, 朱静

胡刚, 汪欣, 郑启军, 万远廉, 刘玉村, 北京大学第一医院普外科 北京市 100034

朱静, 北京大学第一医院外科实验室 北京市 100034
胡刚, 北京大学第一医院硕士在读, 主要从事胃肠道肿瘤的表观遗传学发病机制研究。

国家自然科学基金资助项目, No. 30572105

作者贡献分布: 本课题由胡刚与郑启军共同完成; 研究过程由胡刚、郑启军及朱静操作完成; 数据分析由胡刚与郑启军完成; 本论文写作由胡刚与郑启军完成; 汪欣指导课题设计指导。

通讯作者: 汪欣, 主任医师, 副教授, 100034, 北京市西城区西什库大街38号, 北京大学第一医院普通外科。

wangxin_guo@hotmail.com

电话: 010-83572430

收稿日期: 2009-12-17 修回日期: 2010-01-28

接受日期: 2010-02-01 在线出版日期: 2010-03-28

Construction of shRNA expression plasmids targeting the Pyk2 gene and their expression in Lovo cells

Gang Hu, Xin Wang, Qi-Jun Zheng, Yuan-Lian Wan, Yu-Cun Liu, Jing Zhu

Gang Hu, Xin Wang, Qi-Jun Zheng, Yuan-Lian Wan, Yu-Cun Liu, Department of General Surgery, Peking University First Hospital, Beijing 100034, China

Jing Zhu, Surgical Laboratory of Peking University First Hospital, Beijing 100034, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30572105

Correspondence to: Associate Professor Xin Wang, Department of General Surgery, Peking University First Hospital, 38 Xishiku Avenue, Beijing 100038, China. wangxin_guo@hotmail.com

Received: 2009-12-17 Revised: 2010-01-28

Accepted: 2010-02-01 Published online: 2010-03-28

Abstract

AIM: To construct the recombinant small hairpin RNA (shRNA) plasmids targeting the proline-rich tyrosine kinase 2 (Pyk2) gene (pGCsi-Pyk2 shRNA) and detect their expression in Lovo cells.

METHODS: Three pairs of Pyk2 shRNA sequences were designed and ligated to the pGCsi vector that contains U6 promoter and hygromycin B to obtain shRNA expression plasmids targeting the Pyk2. The recombinant pGCsi-Pyk2 shRNA plasmids were introduced into Lovo cells by liposome-mediated transfection

and selected with hygromycin B. The expression of Pyk2 mRNA and protein was detected by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and Western blot, respectively.

RESULTS: Restriction enzyme digestion and sequence analysis showed that recombinant pGCsi-Pyk2 shRNA plasmids were successfully constructed. The expression levels of Pyk2 mRNA and protein in Lovo cells transfected with pGCsi-Pyk2 shRNA plasmids were significantly lower than those in Lovo cells transfected with empty or negative plasmids.

CONCLUSION: Recombinant pGCsi-Pyk2 shRNA plasmids are successfully constructed. Their transfection can silence the expression of Pyk2 gene in Lovo cells. The pGCsi-Pyk2 shRNA plasmids obtained lay a foundation for further study of the role of the Pyk2 gene in the pathogenesis of colorectal cancer.

Key Words: Proline-rich tyrosine kinase 2; Colon cancer; RNA Interference; Small hairpin RNA; pGCsi vector

Hu G, Wang X, Zheng QJ, Wan YL, Liu YC, Zhu J. Construction of shRNA expression plasmids targeting the Pyk2 gene and their expression in Lovo cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(9): 877-882

摘要

目的: 构建重组质粒PGCsi-Pyk2 shRNA, 并检测所引起的Pyk2 mRNA和蛋白在Lovo结肠癌细胞系中的表达。

方法: 设计合成3对Pyk2基因shRNA序列, 形成双链后将其依次连入带有U6启动子并含有潮霉素B的pGCsi空载体, 构建成能产生Pyk2短发卡RNA的质粒; 采用双酶切和测序分析鉴定插入基因的序列; 脂质体介导重组质粒pGCsi-Pyk2 shRNA稳定转染Lovo细胞系并通过潮霉素B筛选, 获得比较单一的转染细胞; 分别采用RT-PCR、Western blot等检测转染前后Pyk2的水平表达。

■背景资料

大量的研究证据表明, Pyk2在调节细胞的增生与分化、细胞骨架重组、黏附和迁移以及一些转录因子的活性中发挥作用, 与人类肿瘤的发生密切相关。

■同行评议者

葛海燕, 教授, 同济大学附属第十人民医院普通外科; 王石林, 主任医师, 中国人民解放军空军总医院普通外科

■研究前沿

研究表明Pyk2通过对下游的Hic-5/ARA55, Paxillion等基因的调控,与降低人类结直肠癌的发病相关,在结直肠癌中作为一种潜在的抑癌基因发挥作用。

结果: 酶切鉴定和测序分析表明重组表达质粒pGCsi-Pyk2 shRNA构建无误;绿色荧光照相及PCR表明质粒转染成功;RT-PCR和Western blot均表明,与转染空质粒PGCsi组和转染仅含免疫荧光基因组细胞相比,转染重组表达质粒pGCsi-Pyk2 shRNA细胞中Pyk2 mRNA及蛋白表达水平均明显降低。

结论: 成功构建重组质粒pGCsi-Pyk2 shRNA,并证明他能降低Pyk2在Lovo细胞株系中的表达,为进一步研究Pyk2如何调控Hic-5/ARA55, Paxillion等下游靶基因的表达和参与结肠癌表观遗传学发生机制奠定了基础。

关键词: Pyk2; 结肠癌; RNA干扰; 小发夹RNA; pGCsi载体

胡刚, 汪欣, 郑启军, 万远廉, 刘玉村, 朱静. 携带Pyk2基因的shRNA质粒构建及其在Lovo结肠癌细胞系中的表达. 世界华人消化杂志 2010; 18(9): 877-882

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/877.asp>

0 引言

富含脯氨酸的非受体酪氨酸蛋白激酶2(proline-rich tyrosine kinase-2, Pyk2)是黏着斑激酶FAKs家族成员,可能在调节细胞的增生与分化,调节细胞的黏附和迁移能力,调节转录因子的活性方面发挥作用. 大量的流行病学和实验研究也表明, Pyk2在结直肠癌的发生发展中有重要意义. Guo等^[1]研究表明, Pyk2在正常的胃黏膜组织和胃癌组织中表达差异有显著性,可能在胃癌的发生中起作用. Zhang等^[2]研究表明, Pyk2与其他的因素是结直肠癌的预后因素. 在胃肠道肿瘤中, Pyk2作为一种潜在的抑癌基因存在. 而靳西凤等^[3]报道认为RNA干扰技术对研究结肠癌的发生机制能提供强有力的支持, RNA干扰技术(siRNA)在结肠癌基础研究中也已被广泛应用^[4-10]. 本研究拟通过基因重组技术构建Pyk2 shRNA的真核表达载体,并转染到Lovo结直肠癌细胞系,研究已经表明, Lovo结直肠癌细胞系是未分化细胞株,但其Pyk2蛋白呈高表达^[11,12],对结直肠癌的发生发展起抑制作用,我们通过构建Pyk2 shRNA,人为地降低Lovo细胞系中Pyk2的表达量,为探讨Pyk2是否通过Hic-5/ARA55及Paxillion等下游通路的激活抑制肠道肿瘤的发生提供研究基础。

1 材料和方法

1.1 材料 空质粒pGCsi(带有潮霉素B抗体基

因片段)购于北京毅新兴业公司, DMEM、胎牛血清、LB培养基均为Gibco公司产品,感受态细菌购于DH-5 α (全式金公司),限制性内切酶和T4 DNA连接酶为NEB公司产品,脂质体Lipofectamine 2000购于Invitrogen公司, Protein Ladder (10748010)购自Invitrogen公司,鼠抗人Pyk2Ab购自Santa Cruz公司(sc-100379), RT-PCR试剂盒及DNA Ladder购自Promega公司,结肠癌细胞株Lovo由本实验室保存。

1.2 方法

1.2.1 合成Pyk2基因干扰寡核苷酸序列: 针对Pyk2 mRNA全序列设计合成4对Pyk2基因干扰寡核苷酸序列,即Pyk2-1, Pyk2-2, Pyk2-3, Pyk2-4经过BLAST数据库分析未发现同源序列. 其序列如下: Pyk2-1: 5'-GCTTCTATAGCAACAGCTTCA-tcaagag-TGAAGCTGTTGCTATAGAAGC-3'; 3'-GCTTCTATAGCAACAGCTTCA-aatgcag-TGAAGCTGTTGCTATAGAAGC-5', 针对131-151 bp位置; Pyk2-2: 5'-GCTACTTG CCAGAAGACTTCAT-caaga-GTGAAGTCTTCTGGCAAGTAGC-3'; 3'-GGCTACTTGCCAGAAGACTTCAT-aggtc-GTGAAGTCTTCTGGCAAGTAGC-5', 针对401-422 bp位置; Pyk2-3: 5'-GCTGTACTCACTGCAGATATG-tcaagag-CATATCTGCAGTGAGTACAGC-3'; 3'-GCTGTACTCACTGCAGATATG-agttctc-CATATCTGCAGTGAGTACAGC-5', 针对1581-1602 bp位置; Pyk2-4: 5'-GGACATTGCCATGGAGCAAGA-tcaagag-TCTTGCTCCATGGCAATGTCC-3'; 3'-GGACATTGCCATGGAGCAAGA-agttatc-TCTTGCTCCATGGCAATGTCC-5', 针对2061-2081 bp位置。

1.2.2 Pyk2的扩增及纯化及重组质粒pGCsi-Pyk2 shRNA的体外构建: 根据GenBank中人Pyk2基因cDNA设计PCR引物,从人结肠癌手术患者正常切缘组织中提取总RNA,并用上述引物通过RT-PCR法扩增得到目的基因cDNA片段,酶切4 h后过柱回收PCR产物. pGCsi载体经HindIII酶切5 h, BamHI酶切4 h后加入1 μ L去磷酸酶,反应0.5 h后电泳检测,切胶回收. 将pGCsi酶切回收后产物和PCR回收后产物用T4连接酶22 $^{\circ}$ C连接4 h后,取3 μ L产物热休克法转入感受态细胞DH-5 α (全式金公司), 37 $^{\circ}$ C倒置培养过夜,次日挑取单克隆,接入LB培养基, 37 $^{\circ}$ C振荡培养过夜. 提取菌液行PCR和电泳后将PCR鉴定正确的COMF-shRNA载体提取质粒(百泰克公司),使用pGCsi载体上的序列为引

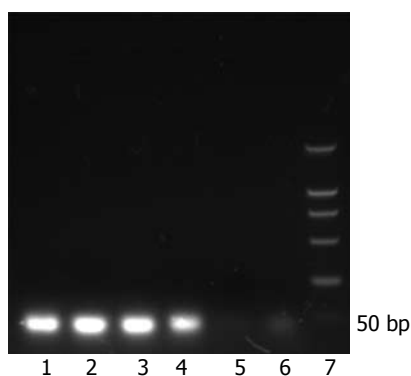


图1 Pyk2扩增后电泳图. 1-4: 4个样本的PCR产物; 5, 6: 两个阴性对照; 7: DNA Marker.

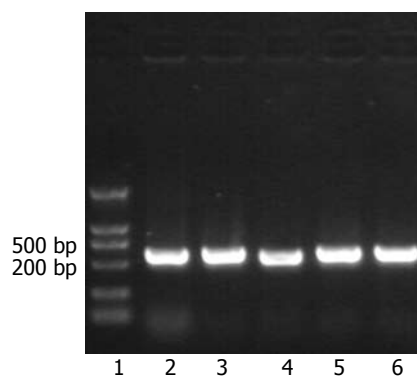


图2 转染4个位点质粒菌液及空载体PCR结果. 1: DNA Marker; 2-6分别为位点1、位点2、空载体、位点3、位点4的PCR产物.

■ 相关报道

Zhang等研究指出Pyk2表达水平, 肿瘤组织学分级以及TNM分期是影响大肠癌患者预后的独立因素, 可能通过提高大肠癌细胞的凋亡水平、降低其增殖水平来发挥抑癌作用.

物送测序(华大基因).

1.2.3 脂质体介导的pGCsi-Pyk2 shRNA稳定转染及分选: 脂质体介导的pGCsi-Pyk2 shRNA稳定转染及流式分选: 结肠癌细胞株Lovo体外常规培养并传代维持, 然后取状态良好的细胞以 $2 \times 10^8/L$ 接种于6孔板. 待细胞80%汇合时, 采用Lipofectamine 2000介导分别转染pGCsi-Pyk2 shRNA1、pGCsi-Pyk2 shRNA2、pGCsi-Pyk2 shRNA3及带有无义片段的pGCsi载体到Lovo细胞中. 转染空质粒组(pGCsi组), 同时设空白对照组, 只加入等量脂质体, 其余步骤同上, 每组设3复孔. 转染24及72 h后, 荧光显微镜下观察细胞内绿色荧光蛋白表达情况, 评价转染效率. 72 h后收集各组细胞用潮霉素B分选转染和未转染的Lovo细胞.

1.2.4 RT-PCR检测目的基因Pyk2 mRNA在Lovo细胞系中的表达: 针对筛选出来的4组细胞, 选择其中的3组包括Pyk2 shRNA1, Pyk2 shRNA2, Pyk2 shRNA3, 以及转染空载体的Lovo细胞以及转染无义基因的Lovo细胞, 并以未转染载体的Lovo细胞作为对照组. 每组提取 1×10^5 个细胞, TRIzol一步法提取细胞总RNA, 先行逆转录 48°C 45 min, 并用先前设计的上下游引物, PCR检测Pyk2 mRNA的表达. PCR扩增的条件为: 94°C 变性2 min, 按下述参数循环40次: 94°C 变性30 s, 60°C 退火1 min, 68°C 延伸2 min; 最后 68°C 延伸7 min, 4°C 保存. 12%琼脂糖凝胶电泳分析各组PCR产物并拍照保存.

1.2.5 Western blot检测目的蛋白Pyk2在Lovo细胞系中的表达: 选择Pyk2 shRNA1, Pyk2 shRNA2, Pyk2 shRNA3, 并以未转染载体的Lovo细胞, 转染空载体的Lovo细胞以及转染无义基因的Lovo细胞作为对照组. 每组取 5×10^6 个细胞, 加100 μL 细胞裂解液和2 μL 蛋白酶

抑制剂, 提取细胞总蛋白. 取50 μg 细胞总蛋白, 10% SDS-PAGE电泳, 转硝酸纤维素膜, 1:500稀释的鼠抗人Pyk2单抗, 碱性磷酸酶标记的兔抗鼠二抗, DAB显色, Western blot检测细胞内Pyk2的蛋白表达水平.

2 结果

2.1 重组质粒pGCsi-Pyk2 shRNA酶切鉴定及测序分析 选择Pyk2基因上4个位点, 设计引物行PCR后行12%琼脂糖凝胶电泳分析(图1). 结果显示4个样本的Pyk2均能有效扩增, 片段大小为50 bp左右. 将pGCsi酶切回收后产物和PCR回收后产物分别采用限制性内切酶Hind III和BamH I 双酶切, 并转入感受态细胞, 提取菌液行PCR并行PCR产物的12%琼脂糖凝胶电泳分析(图2). 结果显示仅转染了空载体的质粒扩增片段为260 bp左右的片段, 而转染了含4种Pyk2片段的质粒的扩增片段均为310 bp左右. 说明空质粒pGCsi中已插入Pyk2 shRNA片段, 且插入方向无误. 选取经酶切鉴定正确的重组质粒进行核苷酸序列测定, 结果表明, 测序序列与GenBank中人Pyk2基因原始序列完全相同, 重组质粒pGCsi-Pyk2 shRNA构建成功(图3).

2.2 RT-PCR检测转染Pyk2 shRNA的Lovo细胞系中Pyk2 mRNA表达明显降低 转染24 h后在荧光显微镜下观察可见, 除空白对照组未有明显的绿色荧光外, pGCsi-Pyk2 shRNA1, 2, 3组, 仅转染无义基因片段的载体组和pGCsi空载体组细胞都能发出特异性的绿色荧光(图4), 经潮霉素B分选转染的细胞. 提取RNA后行RT-PCR, 12%琼脂糖凝胶电泳分析(图5). 结果显示未转染载体的Lovo细胞, 转染空载体的Lovo细胞以及转

■创新盘点

本文采用RNA干扰技术体外构建Pyk2 shRNA的真核表达质粒,并在脂质体的介导下转染进入Lovo结肠癌细胞株,降低其在Lovo细胞系中的表达,为研究Pyk2的抑癌作用提供条件。

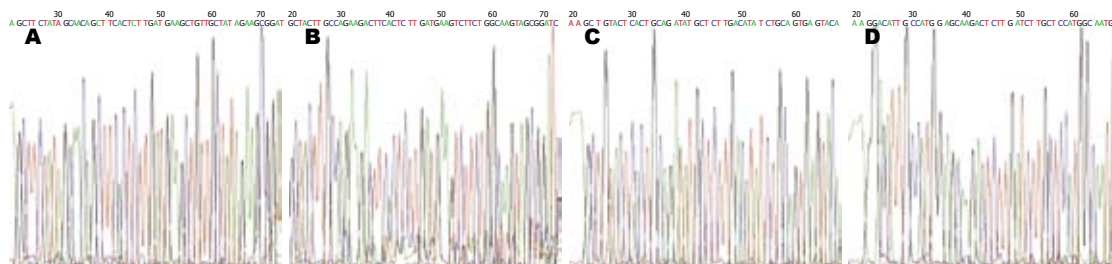


图3 含四个位点Pyk2 shRNA片段的质粒1, 2, 3, 4测序结果. A-D分别为选择的4个位点, 经测序显示其核苷酸序列与其数据库中的原始序列一致。

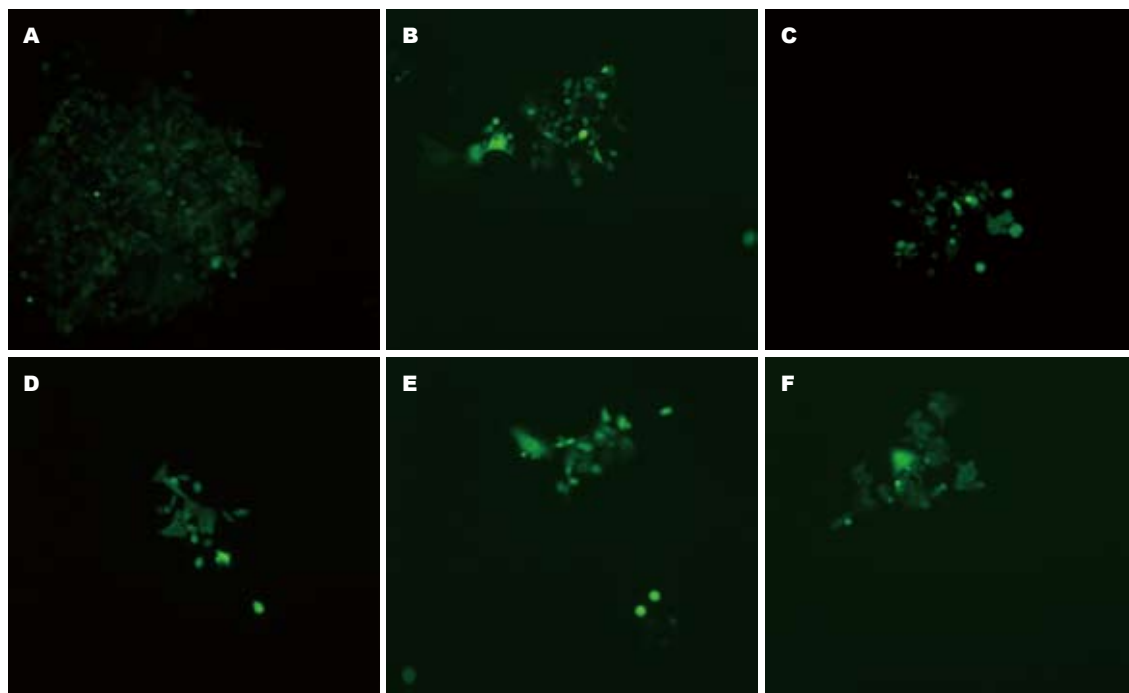


图4 转染了3种siRNA质粒、无义基因、空载体及空白对照的绿色荧光照. A: Lovo细胞; B: 转染空载体的Lovo细胞; C: 仅转染无义基因的Lovo细胞; D: Pyk2 shRNA1; E: Pyk2 shRNA2; F: Pyk2 shRNA3。

染无义基因的Lovo细胞中Pyk2的表达量明显高于转染Pyk2 shRNA1, 2, 3质粒的Lovo细胞. 说明Pyk2 shRNA能有效地抑制Lovo细胞中Pyk2 mRNA的表达。

2.3 Western blot检测转染Pyk2 shRNA的Lovo细胞系中Pyk2蛋白表达明显降低 选择转染Pyk2 shRNA1, 2, 3的Lovo细胞系, 以未转染载体的Lovo细胞, 转染空载体的Lovo细胞以及转染无义基因的Lovo细胞为对照. 提取细胞总蛋白, 以每个样本100 μ g蛋白进行SDS-PAGE, 用Pyk2单抗进行Western blot检测, 以 β -actin为内参(图6). 结果显示转染了Pyk2 shRNA1, 2, 3的Lovo细胞中Pyk2蛋白的表达均明显低于对照组中Pyk2蛋白的表达量. 而内参表达量基本一致, 说明转染的Pyk2 shRNA质粒能有效降低Lovo细胞中Pyk2蛋白的表达。

3 讨论

Pyk2是非受体酪氨酸蛋白激酶FAKs家族的成员, 在多种组织中都有Pyk2的表达如在神经组织、造血组织以及小肠、肾、脾、附睾、胃肠、前列腺等^[13-17]. Pyk2主要依赖 Ca^{2+} 浓度^[18,19]或PKC参与细胞内的MAPK、PI3K^[20,21]或JNK等信号通路转导, 将胞外信息与胞内效应分子联系起来, 催化多种含SH2结构域的底物蛋白磷酸化, 在调节细胞的增生与分化、细胞骨架重组、黏附和迁移以及一些转录因子的活性中发挥作用, 目前的研究发现, 在胃癌、结直肠癌、胰腺癌、乳腺癌、前列腺癌、肺癌等常见肿瘤的发生发展过程的不同阶段发挥着重要的作用^[23-33]. 然而, 目前的研究表明, Pyk2在不同部位的肿瘤发生的作用不完全一样. Iizumi等^[25]发现在前列腺癌中, RhoC

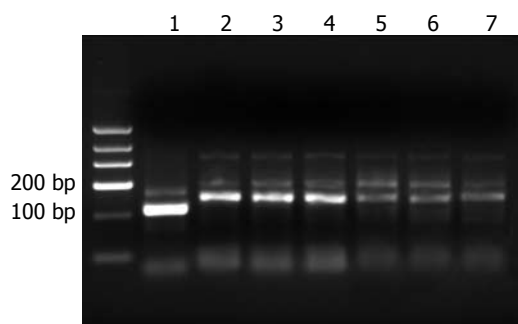


图 5 经质粒转染后Lovo细胞系中Pyk2 mRNA的表达. 1: 阳性对照; 2: Lovo细胞; 3: 转染空载体的Lovo细胞; 4: 仅转染无义基因的Lovo细胞; 5: Pyk2 shRNA1; 6: Pyk2 shRNA2; 7: Pyk2 shRNA3.

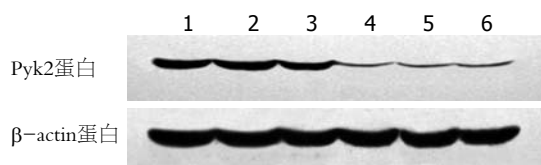


图 6 Western blot检测Pyk2表达. 1: Lovo细胞; 2: 转染空载体的Lovo细胞; 3: 仅转染无义基因的Lovo细胞; 4: Pyk2 shRNA1; 5: Pyk2 shRNA2; 6: Pyk2 shRNA3.

通过激活Pyk2促进前列腺癌的转移; Vitale等^[26]发现Pyk2在cAMP信号通路介导的前列腺癌浸润及核分化中发挥作用; Wang等^[30]对Pyk2在前列腺癌细胞中的作用机制进行了研究, 发现Pyk2通过与下游的信号分子ARA55(Hic-5)相互作用并使其磷酸化, 间接改变了雄激素受体的活性, 从而控制前列腺癌细胞的生长; Sun等报道Pyk2通过激活c-Src/ERK通路促进肝细胞癌的增殖和浸润^[31,32]。然而在胃肠道肿瘤中, Pyk2却作为一种抑癌基因而存在, Zhang等^[2]报道Pyk2在结直肠癌中低表达, 是结直肠癌的预后指标; Guo等^[1]报道Pyk2在胃癌组织中表达明显降低, 其降低程度与胃癌的分期及恶性程度正相关; Cui等^[34]报道Pyk2的下游基因Hic-55/ARA55能减少结直肠癌细胞的生长及促进癌细胞的凋亡。

我们构建的Pyk2 shRNA的真核表达载体pGCsi-Pyk2 shRNA经限制性核酸内切酶酶切鉴定、DNA测序证实目的基因Pyk2序列与数据库中相应序列一致, 质粒构建成功; 我们进一步将脂质体介导pGCsi-Pyk2 shRNA质粒稳定转染到Lovo结肠癌细胞中, 通过绿色荧光等实验方法筛选稳定转染的细胞, 然后通过RT-PCR及Western blot方法检测各组细胞中Pyk2的mRNA和蛋白的表达水平差异, 结果表明, 在高表达Pyk2的Lovo结肠癌细胞中转染Pyk2 shRNA后,

Pyk2 mRNA和蛋白的表达均明显下降。

目前还没有文献明确报道Pyk2通过何种信号通路介导影响结肠癌的发生发展, 可能与其下游的Hic-5/ARA55及Paxillion等相关, 其在人体的各种肿瘤中的作用也未有定论, 我们构建Pyk2 shRNA质粒, 希望为以后研究Pyk2在结肠癌及其他肿瘤的抗肿瘤治疗中的角色奠定基础。

4 参考文献

- Guo HJ, Wang X, Liu YC, Wan YL, Yin HF, Li T, Zhu J. [Expression of proline-rich tyrosine kinase-2 (Pyk2) in gastric carcinoma and its significance] *Beijing Daxue Xuebao* 2005; 37: 261-264
- Zhang ZN, Wang X, Li T, Yin HF, Wan YL, Liu YC, Zhu J. [Expression of proline-rich tyrosine kinase-2 in human primary colorectal carcinoma and its prognostic implication] *Zhonghua Waike Zazhi* 2008; 46: 440-442
- 靳西凤, 冉志华. RNA干扰技术与结肠癌. *世界华人消化杂志* 2006; 14: 2003-2008
- 金海林, 施瑞华, 朱宏, 凌亭生, 郝波. RNA干扰HIF-1 α 对食管癌细胞株TE13的生物学特性的影响. *世界华人消化杂志* 2009; 17: 2762-2766
- 欧树安, 张克君, 严明总, 王齐全. Slug-siRNA干扰Slug基因表达对胰腺癌的抑制作用. *世界华人消化杂志* 2009; 17: 1713-1719
- 王鲁平, 杨善明, 徐学明, 陈健, 杨光之, 张鲁榕. RNAi抑制结肠癌细胞系DcR3的表达及对癌细胞生长的影响. *世界华人消化杂志* 2008; 16: 2285-2288
- 丁健, 李丹, 王承党, 吴婷, 王小众, 于皆平. RNA干扰阻断cyclinD1表达抑制结肠癌细胞增殖. *世界华人消化杂志* 2007; 15: 3572-3576
- 曹锴, 狄建彬, 魏文祥, 庞智. miRNA在结肠癌早期诊断和筛选中的作用. *世界华人消化杂志* 2009; 17: 3615-3619
- 华杰, 施瑞华, 张红杰, 于莲珍, 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
- 葛金华, 朱月永, 刘豫瑞, 江家骥, 董菁. siRNA降低COX-2基因表达对肝癌细胞系HepG2增殖的影响. *世界华人消化杂志* 2009; 17: 2244-2250
- 倪志, 刘南植, 李林芳, 张庆, 李秀梅, 洪玮. 5-Aza-CdR对人结肠癌Lovo细胞增殖凋亡及抑癌基因RUNX3表达的影响. *世界华人消化杂志* 2006; 14: 184-188
- 倪志, 鲍曼夕, 刘南植, 赵秋, 覃华, 杨彦, 邱艺坚, 王婷婷. 结肠癌Lovo细胞RUNX3基因的表达与其增殖及凋亡的关系. *世界华人消化杂志* 2008; 16: 711-715
- Avraham H, Park SY, Schinkmann K, Avraham S. RAFTK/Pyk2-mediated cellular signalling. *Cell Signal* 2000; 12: 123-133
- Lipinski CA, Tran NL, Menashi E, Rohl C, Kloss J, Bay RC, Berens ME, Loftus JC. The tyrosine kinase pyk2 promotes migration and invasion of glioma cells. *Neoplasia* 2005; 7: 435-445
- Gutenberg A, Brück W, Buchfelder M, Ludwig HC. Expression of tyrosine kinases FAK and Pyk2 in 331 human astrocytomas. *Acta Neuropathol* 2004; 108: 224-230
- Eguchi S, Iwasaki H, Inagami T, Numaguchi K, Yamakawa T, Motley ED, Owada KM, Marumo F, Hirata Y. Involvement of PYK2 in angiotensin II signaling of vascular smooth muscle cells.

■同行评价

本文选题合理, 设计得当, 结论可靠, 且具有一定参考价值。

- Hypertension 1999; 33: 201-206
- 17 Schaller MD. Calcium-dependent Pyk2 activation: a role for calmodulin? *Biochem J* 2008; 410: e3-e4
 - 18 Lev S, Moreno H, Martinez R, Canoll P, Peles E, Musacchio JM, Plowman GD, Rudy B, Schlessinger J. Protein tyrosine kinase PYK2 involved in Ca(2+)-induced regulation of ion channel and MAP kinase functions. *Nature* 1995; 376: 737-745
 - 19 Kohno T, Matsuda E, Sasaki H, Sasaki T. Protein-tyrosine kinase CAKbeta/PYK2 is activated by binding Ca2+/calmodulin to FERM F2 alpha2 helix and thus forming its dimer. *Biochem J* 2008; 410: 513-523
 - 20 Schlaepfer DD, Hunter T. Focal adhesion kinase overexpression enhances ras-dependent integrin signaling to ERK2/mitogen-activated protein kinase through interactions with and activation of c-Src. *J Biol Chem* 1997; 272: 13189-13195
 - 21 Tokiwa G, Dikic I, Lev S, Schlessinger J. Activation of Pyk2 by stress signals and coupling with JNK signaling pathway. *Science* 1996; 273: 792-794
 - 22 Watson JM, Harding TW, Golubovskaya V, Morris JS, Hunter D, Li X, Haskill JS, Earp HS. Inhibition of the calcium-dependent tyrosine kinase (CADTK) blocks monocyte spreading and motility. *J Biol Chem* 2001; 276: 3536-3542
 - 23 Salgia R, Avraham S, Pisick E, Li JL, Raja S, Greenfield EA, Sattler M, Avraham H, Griffin JD. The related adhesion focal tyrosine kinase forms a complex with paxillin in hematopoietic cells. *J Biol Chem* 1996; 271: 31222-31226
 - 24 Bagi CM, Roberts GW, Andresen CJ. Dual focal adhesion kinase/Pyk2 inhibitor has positive effects on bone tumors: implications for bone metastases. *Cancer* 2008; 112: 2313-2321
 - 25 Iiizumi M, Bandyopadhyay S, Pai SK, Watabe M, Hirota S, Hosobe S, Tsukada T, Miura K, Saito K, Furuta E, Liu W, Xing F, Okuda H, Kobayashi A, Watabe K. RhoC promotes metastasis via activation of the Pyk2 pathway in prostate cancer. *Cancer Res* 2008; 68: 7613-7620
 - 26 Vitale G, Gentilini D, Abbruzzese A, Caraglia M. Pyk2 and Cyr61 at the cross-road of cAMP-dependent signalling in invasiveness and neuroendocrine differentiation of prostate cancer. *Cancer Biol Ther* 2009 Mar 11. [Epub ahead of print]
 - 27 Behmoaram E, Bijian K, Jie S, Xu Y, Darnel A, Bismar TA, Alaoui-Jamali MA. Focal adhesion kinase-related proline-rich tyrosine kinase 2 and focal adhesion kinase are co-overexpressed in early-stage and invasive ErbB-2-positive breast cancer and cooperate for breast cancer cell tumorigenesis and invasiveness. *Am J Pathol* 2008; 173: 1540-1550
 - 28 Roelle S, Grosse R, Buech T, Chubanov V, Gudermann T. Essential role of Pyk2 and Src kinase activation in neuropeptide-induced proliferation of small cell lung cancer cells. *Oncogene* 2008; 27: 1737-1748
 - 29 Zhang S, Qiu X, Gu Y, Wang E. Up-regulation of proline-rich tyrosine kinase 2 in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 2008; 62: 295-301
 - 30 Wang X, Yang Y, Guo X, Sampson ER, Hsu CL, Tsai MY, Yeh S, Wu G, Guo Y, Chang C. Suppression of androgen receptor transactivation by Pyk2 via interaction and phosphorylation of the ARA55 coregulator. *J Biol Chem* 2002; 277: 15426-15431
 - 31 Sahu SN, Nunez S, Bai G, Gupta A. Interaction of Pyk2 and PTP-PEST with leupaxin in prostate cancer cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 2007; 292: C2288-C2296
 - 32 Sun CK, Ng KT, Sun BS, Ho JW, Lee TK, Ng I, Poon RT, Lo CM, Liu CL, Man K, Fan ST. The significance of proline-rich tyrosine kinase2 (Pyk2) on hepatocellular carcinoma progression and recurrence. *Br J Cancer* 2007; 97: 50-57
 - 33 Sun CK, Man K, Ng KT, Ho JW, Lim ZX, Cheng Q, Lo CM, Poon RT, Fan ST. Proline-rich tyrosine kinase 2 (Pyk2) promotes proliferation and invasiveness of hepatocellular carcinoma cells through c-Src/ERK activation. *Carcinogenesis* 2008; 29: 2096-2105
 - 34 Cui W, Wang X, Liu YC, Wan YL, Guo HJ, Zhu J. [Expression of HIC-5/ARA55 in colonrectal cancer and its mechanisms of action] *Beijing Daxue Xuebao* 2006; 38: 280-283
 - 35 Zhang S, Guo D, Jiang L, Zhang Q, Qiu X, Wang E. SOCS3 inhibiting migration of A549 cells correlates with PYK2 signaling in vitro. *BMC Cancer* 2008; 8: 150
 - 36 Lipinski CA, Tran NL, Viso C, Kloss J, Yang Z, Berens ME, Loftus JC. Extended survival of Pyk2 or FAK deficient orthotopic glioma xenografts. *J Neurooncol* 2008; 90: 181-189

编辑 李军亮 电编 何基才

ISSN 1009-3079 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)

抗生素性腹泻肠道杆菌产超广谱β-内酰胺酶基因型的调查

冯羨菊, 张燕, 罗予, 郑鹏远

冯羨菊, 郑州大学第一附属医院检验科 河南省郑州市 450052
张燕, 罗予, 河南省(郑州大学)医药科学研究院免疫室 河南省郑州市 450052
郑鹏远, 郑州大学第二附属医院消化内科 河南省郑州市 450014
冯羨菊, 副主任医师, 主要从事临床微生物检验及细菌耐药机制的研究。
河南省医学科技攻关基金资助项目, No. 200703033
作者贡献分布: 冯羨菊、张燕、罗予及郑鹏远对此文献均有贡献; 此课题由冯羨菊、罗予及郑鹏远设计; 研究过程由冯羨菊与张燕完成; 研究所用试剂由冯羨菊与罗予提供; 数据分析由张燕完成; 本论文写作由冯羨菊、张燕、罗予及郑鹏远共同完成。
通讯作者: 罗予, 研究员, 450052, 河南省郑州市大学路40号, 河南省医药科学研究院免疫室. hnwst_2006@yahoo.com.cn
电话: 0371-66913131
收稿日期: 2010-01-22 修回日期: 2010-03-01
接受日期: 2010-03-02 在线出版日期: 2010-03-28

Genotyping of extended-spectrum β-lactamase-producing enterobacteriaceae isolated from patients with antibiotic-associated diarrhea

Xian-Ju Feng, Yan Zhang, Yu Luo, Peng-Yuan Zheng

Xian-Ju Feng, Department of Clinical Laboratory, the First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, Henan Province, China
Yan Zhang, Yu Luo, Henan Academy of Medical and Pharmaceutical Sciences, Zhengzhou 450052, Henan Province, China
Peng-Yuan Zheng, Department of Gastroenterology, the Second Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450014, Henan Province, China
Supported by: the Medical Scientific and Technological Project of Henan Province, No. 200703033
Correspondence to: Yu Luo, Henan Academy of Medical and Pharmaceutical Sciences, 40 Daxue Road, Zhengzhou 450052, Henan Province, China. hnwst_2006@yahoo.com.cn
Received: 2010-01-22 Revised: 2010-03-01
Accepted: 2010-03-02 Published online: 2010-03-28

Abstract

AIM: To genotype extended-spectrum β-lactamase (ESBL)-producing enterobacteriaceae isolated from patients with antibiotic-associated diarrhea.

METHODS: The feces samples were collected

from patients with antibiotic-associated diarrhea and cultured to isolate ESBL-producing enterobacteriaceae. *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase production was evaluated by the modified Hodge test. Metallo-β-lactamase production was determined by the imipenem-EDTA double-disk synergy test. Antibiotic resistance genes were amplified by polymerase chain reaction (PCR). The sequences of PCR products were determined and compared with those deposited in GenBank.

RESULTS: Fifty *Klebsiella pneumoniae* strains, 21 *Escherichia coli* strains and 18 *Proteus* strains were isolated. Of all isolated strains, 64 carry ESBLs of the CTX-type, 68 carry ESBLs of the TEM-type, and 21 carry ESBLs of the SHV-type. CTX-, TEM- and SHV-type ESBLs were present in 84% (42/50), 76% (38/50) and 15% (7/50) of *Klebsiella pneumoniae* isolates, respectively. TEM- and CTX-type ESBLs were present in 100% (18/18) and 40% (7/18) of *Proteus* isolates, respectively. No SHV-type ESBLs were detected in *Proteus* isolates. CTX-, TEM- and SHV-type ESBLs were present in 100% (21/21), 83% (17/21) and 83% (17/21) of *Escherichia coli* isolates, respectively.

CONCLUSION: The enterobacteriaceae isolated from patients with antibiotic-associated diarrhea in our study mainly carry TEM- and CTX-type ESBLs.

Key Words: Antibiotic-associated diarrhea; Enteric bacilli; β-lactamase; Polymerase chain reaction; Sequence analysis

Feng XJ, Zhang Y, Luo Y, Zheng PY. Genotyping of extended-spectrum β-lactamase-producing enterobacteriaceae isolated from patients with antibiotic-associated diarrhea. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(9): 883-888

摘要

目的: 研究抗菌药物使用后, 引起腹泻患者肠道杆菌产超广谱β-内酰胺酶(ESBLs)细菌的耐药基因型并进行序列分析。

■背景资料

近年来, 由于头孢菌素类抗菌药物的使用甚至滥用, 导致肠道杆菌产超广谱β-内酰胺酶(ESBL)的分离率越来越高, 抗生素相关性腹泻(AAD)在临床发生率亦越来越高。研究该类患者肠道杆菌产超广谱β-内酰胺酶基因型对于临床抗感染治疗, 预防抗生素相关性腹泻, 控制院内感染的暴发流行有着重要意义。

■同行评议者

李瑜元, 教授, 广州市第一人民医院内科

■创新盘点

本文通过对该类腹泻患者肠道杆菌产超广谱 β -内酰胺酶进行基因分型的调查与研究,不仅发现常见流行的基因型(CTX、SHV、TEM等),亦发现了新的少见耐药基因(KPC-2、IMP),这种耐碳青霉烯类耐药基因的出现会给临床抗感染治疗带来更大困惑。

方法:收集临床住院应用抗菌药物后出现腹泻患者的大便或肛拭子进行培养,分离产ESBLs的肺炎克雷伯菌50株、大肠埃希菌21株和变形杆菌18株,通过改良Hodge实验、EDTA双纸片增效试验、分别测定KPC、金属酶;聚合酶链反应(PCR)检测其耐药基因、分析PCR产物序列并在GenBank中比对分析,总结产ESBLs细菌同源性的和变异情况。

结果:89株产ESBL的菌株中,有64株携带CTX型耐药基因,68株携带TEM型耐药基因,21株携带SHV型耐药基因。肺炎克雷伯菌中CTX型占到84%(42/50),TEM型占到76%(38/50),SHV型占到15%(7/50);变形杆菌中没有SHV型,而TEM型占到100%(18/18),CTX型占到40%(7/18);大肠埃希菌中CTX占到100%(21/21),SHV型和TEM型均为83%(17/21);同时检出3株产KPC和22株产金属酶的细菌。

结论:本院抗生素腹泻患者肠道杆菌产ESBLs耐药基因主要以CTX和TEM为主,同时携带两个或两个以上耐药基因的细菌占49%(44/89)。

关键词:抗生素性腹泻;肠道杆菌; β -内酰胺酶;聚合酶链反应;序列分析

冯美菊, 张燕, 罗予, 郑鹏远. 抗生素性腹泻肠道杆菌产超广谱 β -内酰胺酶基因型的调查. 世界华人消化杂志 2010; 18(9): 883-888

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/883.asp>

0 引言

由于抗生素大量、甚至盲目使用,临床在治疗感染性疾病的同时,使肠道中有益菌被抑制,肠道的微生态平衡被打破,导致菌群失调,此时肠上皮细胞的代谢调节水平和生理功能发生紊乱,使腹泻进一步加重,即产生抗生素相关性腹泻^[1]。抗生素性腹泻、肠道菌群失调症、细菌的耐药等问题给患者带来了经济、肉体上的痛苦。自1983年德国学者首先在肺炎克雷伯菌中发现了超广谱 β -内酰胺酶(ESBLs)^[2],由于这种酶能够水解广谱头孢菌素,近年来人们对于他的基因分型、耐药机制及传播方式的研究越来越多。一般认为,ESBLs大多源于TEM、SHV位的基因突变。有关抗生素相关性腹泻患者的肠道杆菌产ESBLs分型情况报道的很少。本文对住院患者因各种感染使用抗菌药物后导致腹泻的大便进行培养,分离出产ESBLs的肺炎克雷伯菌、大肠

埃希菌和变形杆菌做耐药基因型和流行趋势及序列分析,结果如下。

1 材料和方法

1.1 材料 收集2009年郑州大学第一附属医院临床科室随机病例,因非肠道感染使用抗菌药物后出现轻微或严重腹泻,取其不重复患者大便126份进行培养,他们均曾使用过头孢菌素类、喹诺酮类、碳青霉烯类等两种或两种以上抗菌药物。质控菌株为大肠埃希菌ATCC25922(产酶)、ATCC35218(不产酶)、肺炎克雷伯菌ATCC700603; ATB细菌鉴定仪,法国BioMerieux公司;药敏纸片、头孢噻肟、头孢噻肟/克拉维酸、头孢他啶、头孢他啶/克拉维酸,厄他培南、美罗培南,英国Oxoid公司产品;PCR扩增仪(Biometra TGRADIENT);PCR MIX、标记物,天根生化科技有限公司;电泳及凝胶成像系统(BIO-RAD);凝胶纯化及测序,大连宝生物有限公司;API 20E板条,法国BioMerieux公司产品。

1.2 方法

1.2.1 耐药表型检测:(1)ESBLs检测:常规K-B纸片扩散法,选择头孢噻肟(30 μ g)、头孢噻肟/克拉维酸(30 μ g/10 μ g);头孢他啶(30 μ g)、头孢他啶/克拉维酸(30 μ g/10 μ g)两组进行ESBL表型确证试验。以CLSI2009版判定标准^[3],任何一组复合剂纸片抑菌环直径大于或等于单独抗生素纸片抑菌环直径5 mm,即判定为产ESBL菌株,并将其进行基因分型;(2)改良Hodge实验:将0.5个麦氏单位ATCC25922做10倍稀释,涂于MH平板上。在平板中心贴厄他培南纸片,将待检菌和阳性对照菌分别按2009版CLSI方法接种至平板。35 $^{\circ}$ C培养过夜,取出观察;(3)金属碳青霉烯酶检测0.5麦氏单位的待测菌涂布MH平板,分别贴美罗培南的纸片和含8 μ L 0.5 mol/L EDTA- Na_2 的美罗培南纸片,纸片间距离大于15 mm。35 $^{\circ}$ C过夜培养,观察美罗培南和含EDTA- Na_2 美罗培南纸片对细菌的抑制情况,后者与前者抑菌环直径相差>7 mm的为金属酶阳性。

1.2.2 耐药基因检测:CTX型、SHV型和TEM型 β -内酰胺酶基因;KPC-2型碳青霉烯酶基因及金属酶等基因表型及引物见相关文献(表1),进行PCR扩增,所用引物均由大连宝生物有限公司合成。PCR反应后经产物纯化、测序,序列在GenBank上检索比对,确认表型。分别与参考序列EU938349.1、GQ343054.1、GU064388.1比对。反应体系:缓冲液5 μ L, dNTP 1 μ L, 引物

表 1 引物和目标基因

目标基因	引物序列(5'-3')	大小(bp)
CTX ^[4]	F: ATG TGC AGY ACC AGT AAR GT R: TGG GTR AAR TAR GTS ACC AGA	593
TEM ^[5]	F: TCA ACA TTT CCG TGT CG R: CTG ACA GTT ACC AAT GCT TA	860
SHV ^[6]	F: ATG CGT TAT ATT CGC CTG TG R: AGA TAA ATC ACC ACA ATG CGC	780
KPC-2 ^[6]	F: GCT ACA CCT AGC TCC ACC TTC R: ACA GTG GTT GGT AAT CCA TGC	989
VIM ^[7]	F: ATG GTG TTT GGT CGC ATA TC R: TGG GCC ATT CAG CCA GAT C	500
IMP ^[8]	F: CAT GGT TTG GTG GTT CTT GT R: ATA ATT TGG CFF ACT TTG GC	270

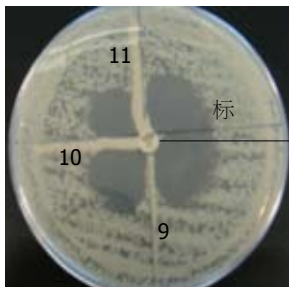


图 1 肺炎克雷伯菌Hodge试验阳性结果. 9, 10, 11: Hodge阳性的菌株编号; 标: Hodge阴性的标准菌株; ETP: 厄他培南.

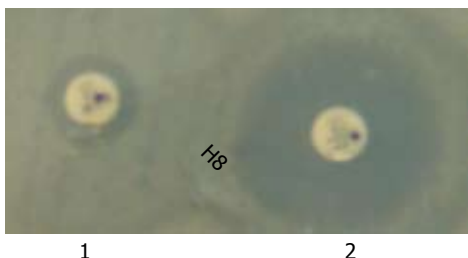


图 2 EDTA增效实验. 1: 美罗培南; 2: 滴加了EDTA的美罗培南纸片, H8: 菌株标号.

各0.5 μL, 聚合酶0.25 μL, 模板2 μL. 反应条件: 94 °C, 5 min, 94 °C, 1 min, 55 °C, 1 min, 72 °C, 1 min, 72 °C, 7 min, 4 °C 保存. 100 V电泳20 min.

2 结果

2.1 ESBLs检测 126株细菌经表型确认有89株为ESBLs阳性, 总阳性检出率71%(89/126). 分别为大肠埃希菌21株、肺炎克雷伯菌50株、变形杆菌18株; 37株其他细菌, 其中ESBLs阴性大肠埃希菌8株、肺炎克雷伯菌2株和变形杆菌1株; 非发酵菌中铜绿假单胞菌7株, 粪肠球菌9株, 白色念珠菌10株.

2.2 改良Hodge实验和EDTA双纸片增效实验 改良Hodge实验中, 3株肺炎克雷伯菌呈现阳性结

表 2 ESBLs菌株CTX、TEM、SHV等亚型基因总检出率

亚型种类	n	检出率(%)
TEM-1b	68	76.4
CTX-M1	31	34.8
CTX-M9	33	37.1
SHV-11	14	15.7
SHV-36	7	7.9
KPC-2	3	3.4
VIM	19	21.3
IMP	3	3.4
新类型	1	1.1

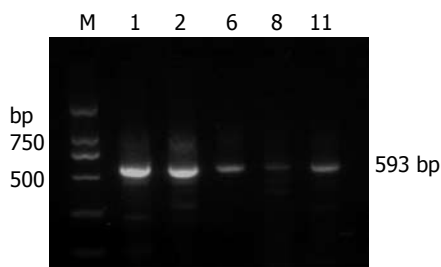


图 3 肺炎克雷伯菌属CTX型PCR结果. M: Marker; 1, 2, 6, 8, 11: 菌株标号.

果(图1), 经PCR扩增、测序, 在GenBank中比对后, 均为KPC-2型耐药基因; 金属酶表型检测结果, 有22株细菌可以被EDTA抑制(图2), 经PCR扩增、测序后证实其为19株VIM型和3株IMP型产金属酶细菌.

2.3 基因型检测

2.3.1 CTX-M型耐药基因: 肺炎克雷伯菌中含CTX耐药基因的菌株占84%(42/50); 大肠埃希菌中为100%(21/21); 而变形杆菌中只有40%(7/18)(表2). 测序结果经GenBank中比对后的分型情况详见表2. PCR结果见图3.

2.3.2 TEM型耐药基因: 肺炎克雷伯菌中含TEM耐药基因的菌株占76%(38/50); 大肠埃希菌为82%(17/21); 而变形杆菌中所有的菌株均含有此耐药基因. 经测序为TEM-1b型耐药基因(表2).

2.3.3 SHV型耐药基因: 肺炎克雷伯菌中只含SHV耐药基因的菌株占14%(7/50); 大肠埃希菌中为83%(17/21); 而变形杆菌中无此耐药基因. 测序为SHV-11型、SHV-36型(表2).

2.4 测序结果 以SHV型引物为例, 测定结果为SHV-11型, 除此之外, 还有SHV-36型耐药基因检出(图4).

TEM型耐药基因全部为TEM-1b型; CTX耐药基因为CTX-M1、CTX-M9型. 测序结果显示

■ 相关报道

Beaugerie等对抗生素性腹泻的主要原因进行全面分析, 证实他们多是由梭状芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌等引起; 钱英等曾对健康人群肠道大肠埃希菌对氟喹诺酮药物的耐药性及耐药机制进行研究, 证实了我国健康人群肠道大肠埃希菌对氟喹诺酮类抗菌药物的耐药率为很高, 耐药基因主要由gyrA基因和parC基因位点突变造成, 以gyrA基因为主.

■名词解释

超广谱 β -内酰胺酶(ESBLs): 属质粒介导, 是当前细菌出现的新的耐药趋势之一, 多发生在肠杆菌科等革兰阴性杆菌中; 细菌一旦产生该类酶, 则对第三代头孢菌素(如头孢噻肟、头孢他啶、头孢哌酮、头孢曲松等)以及单环酰胺类抗生素产生耐药。

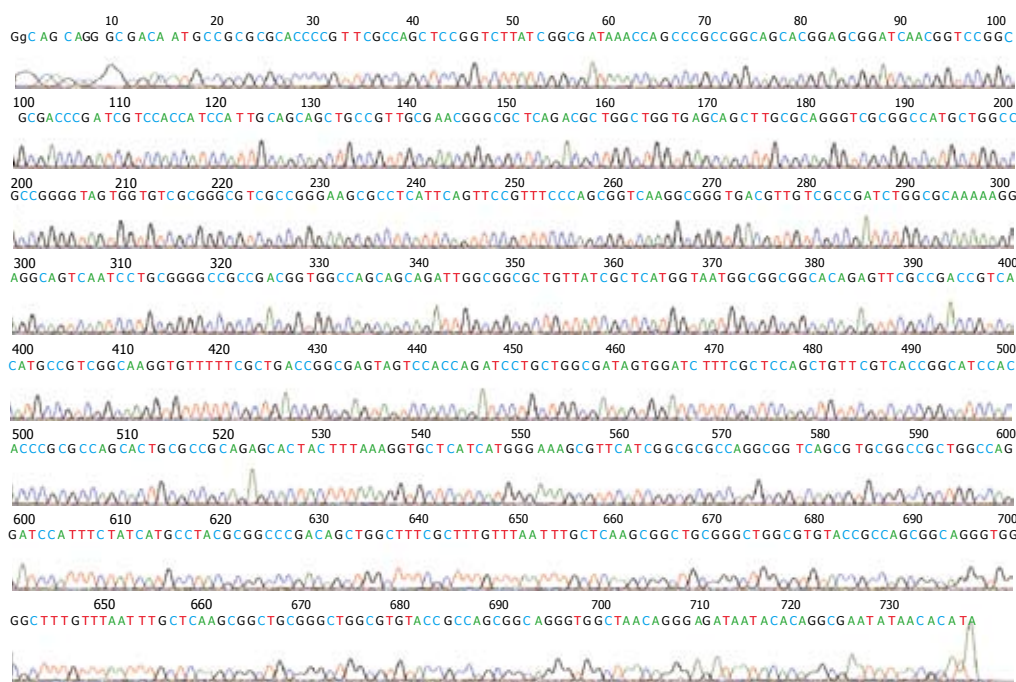


图4 SHV型基因图谱.

碱基发生一些变异, 碱基的缺失有20株、插入的有36株、变异的有33株, 且不同的耐药基因表现出一定的规律性. TEM型耐药基因没有碱基插入现象, 碱基的缺失和变异常常表现在序列末端; CTX型耐药基因没有出现碱基缺失, 而碱基的插入和变异出现在序列前端; SHV型耐药基因中碱基的缺失表现在序列前端、碱基的插入出现在序列末端, 没有出现变异情况.

3 讨论

众所周知, 肠杆菌科及其相关细菌大肠埃希菌、肺炎克雷伯菌、变形杆菌、柠檬酸杆菌、摩根摩根菌、普罗维登斯菌和假单胞菌等, 对人类是极其有益并组成人类肠道的正常菌群^[9]. 但是近年来, 有关该类细菌引起的院内感染、尤其是产ESBLs的多重耐药的肠杆菌科细菌引起的内源性感染, 在世界各地陆续有报道, 分离率各不相同. 我国深圳、广东等经济发达地区ESBLs检出率24%-37%^[10,11], 姜森等报道的大肠埃希菌ESBLs检出率为40%^[12], 台湾地区也报道了有关ESBLs在阴沟肠杆菌中的流行^[13]. 本研究126株肠道杆菌ESBLs检出率为71%, 远远高于我国其他地区, 亦高于国外报道^[14,15]. 该类患者的共同特点是: 抗生素使用时间大多超过1 wk以上, 且均使用过头孢菌素类、喹诺酮类、碳青霉烯类等两种以上抗菌药物. 考虑与抗菌药物的使用有着密切关系; 而这类腹泻患者患者培

养结果大多显示菌群失调, 极易引起内源性感染甚至是院内感染的暴发流行.

ESBLs出现对临床感染治疗带来了极大的威胁, 成为目前亟待解决的问题. 本实验结果显示, 我院因应用抗菌药物导致的腹泻患者大便培养肠道杆菌的ESBLs基因型是以CTX、TEM为主, 大肠埃希菌中100%含有CTX耐药基因, 肺炎克雷伯菌CTX为84%, 变形杆菌100%含有TEM-1b型耐药基因. 与国内报道大致相同^[16-18], 与文献报道的亚洲地区流行亦较符合^[19,20]. 这类细菌以水解头孢噻肟、头孢曲松等三代头孢菌素为主, 因此对其显示高度耐药性. SHV耐药基因在变形杆菌中没有检出, 肺炎克雷伯菌中检出率为14%, 但在大肠埃希菌中83%的菌株均含有此耐药基因, 该基因是巯基变量(sulphydryl variable)的简称, 以能够水解头孢噻吩中的巯基而得名. SHV型ESBLs是由广谱酶SHV-1的编码基因的1-4个核苷酸突变引起氨基酸改变而形成的一系列酶蛋白, 其中第238位和第240位氨基酸是影响酶水解能力的主要位点. 第238位由丝氨酸替换甘氨酸, 引起对头孢他啶水解能力增强; 第240位由赖氨酸替换谷氨酰胺, 造成对头孢噻肟的水解能力增强^[21]. 临床表现对头孢他啶、头孢噻肟、头孢哌酮等抗菌药物表现高度耐药性; 但上述三种基因对含酶抑制剂复合制剂敏感性较好、目前且没有发现耐碳青霉烯类抗菌药物菌株. 本组资料显示, 89株产ESBLs

耐药菌株往往同时含有多个耐药基因型, 例如: CTX型、TEM型、SHV型可同时出现在同一菌株中, 因此造成了严重的多重耐药的产生, 这一点与王贺等^[22]、张晓梅等^[23]关于肠杆菌科细菌的研究一致. 从相同耐药基因的高度同源性来看, 他们来源于同一细菌. 又因个别碱基的差异, 可能是导致不同菌株的药敏实验结果不同的主要原因. 有关变异碱基是否导致蛋白表达的变异还有待于我们进一步研究.

本研究还检出产碳青霉烯酶KPC-2型和金属酶IMP和VIM型细菌. KPC-2型是1998年美国首次在肺炎克雷伯菌中检出^[24], 以后世界各地关于KPC型耐药菌的报道逐渐增多, 希腊的一家医院内爆发了KPC-2型耐药基因在肺炎克雷伯菌中的流行^[25]. 国内山东、江苏等陆续分离出KPC-2型的沙雷菌^[26]和大肠埃希菌^[27], 河南也曾报道分离出1株产KPC-2的肺炎克雷伯菌^[28], 金属酶早在20世纪90年代中国香港在亚胺培南耐药的不动杆菌中就发现IMP-4型耐药基因^[29]. 2001年广州报道在绿脓杆菌中发现了IMP-4型耐药基因^[30], 浙江大学附属第二医院发现1种IMP-4型产酸肺炎克雷伯菌^[31]. 本次我们从大便中检出1株产IMP-4型肺炎克雷伯菌, 河南尚属首例. 这些菌株能够水解碳青霉烯类抗生素导致耐药. 由于其耐药基因存在于质粒上, 且能横向传播, 极易造成医院内感染的暴发流行, 应该引起我们的高度重视. 同时提示, 临床医生在治疗抗生素相关性腹泻时, 应注意防止自身肠源性感染, 慎重使用广谱抗生素; 必要时, 可以加服一些肠道微生态制剂^[32].

4 参考文献

- 1 罗学娅, 伦永志, 高卫, 胡海北, 王强, 刘莹, 尹建石, 姜苏娟. 嗜酸性乳杆菌培养上清液对抗生素相关性腹泻小鼠肠道. 世界华人消化杂志 2006; 14: 1870-1873
- 2 Kliebe C, Nies BA, Meyer JF, Tolxdorff-Neutzling RM, Wiedemann B. Evolution of plasmid-coded resistance to broad-spectrum cephalosporins. *Antimicrob Agents Chemother* 1985; 28: 302-307
- 3 Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. Nineteenth Informational Supplement 2009; 29: M100-S19, Wayne, PA, United States
- 4 Pagani L, Dell'Amico E, Migliavacca R, D'Andrea MM, Giacobone E, Amicosante G, Romero E, Rossolini GM. Multiple CTX-M-type extended-spectrum beta-lactamases in nosocomial isolates of Enterobacteriaceae from a hospital in northern Italy. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 4264-4269
- 5 Schlesinger J, Navon-Venezia S, Chmelnitsky I, Hammer-Münz O, Leavitt A, Gold HS, Schwaber MJ, Carmeli Y. Extended-spectrum beta-lactamases among Enterobacter isolates obtained in Tel Aviv, Israel. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49: 1150-1156
- 6 冯雅君, 沈萍, 杜小幸, 俞云松, 李兰娟. 产碳青霉烯酶KPC-2肺炎克雷伯菌局部流行. 浙江医学 2008; 30: 923-930
- 7 杨青, 魏泽庆, 俞云松, 钟步云, 陈亚岗. 重症监护病房产VIM-2型金属酶绿脓假单胞菌的研究. 中华检验医学杂志 2004; 27: 678-682
- 8 朱冰泉, 沈萍, 俞云松, 张幸国. 对亚胺培南耐药的鲍曼不动杆菌同源性及其碳青霉烯酶基因型研究. 浙江医学 2008; 30: 459-462
- 9 Batchoun RG, Swedan SF, Shurman AM. Extended Spectrum beta-Lactamases among Gram-Negative Bacterial Isolates from Clinical Specimens in Three Major Hospitals in Northern Jordan. *Int J Microbiol* 2009; 2009: 513874
- 10 钟霞霞, 陆坚. 产超广谱 β -内酰胺酶临床分离株的耐药性及基因分型研究. 中国感染控制杂志 2006; 5: 198-201
- 11 何松彬, 凌云, 叶初阳. 产ESBL菌株的检测及临床研究. 淮海医药 2006; 24: 268-269
- 12 姜森, 张正, 杨朵, 王贺. 2062株大肠杆菌ESBL测定及耐药分析. 中国实验诊断学 2008; 12: 1134-1136
- 13 Yang JL, Wang JT, Lauderdale TL, Chang SC. Prevalence of extended-spectrum beta-lactamases in Enterobacter cloacae in Taiwan and comparison of 3 phenotypic confirmatory methods for detecting extended-spectrum beta-lactamase production. *J Microbiol Immunol Infect* 2009; 42: 310-316
- 14 Dzierzanowska D, Kamińska W, Semczuk K, Borowiec D, Matysiak M, Szumała-Kakol A, Gierczyński R, Patzer JA. Carriage of genes for various extended-spectrum beta-lactamases: a novel resistance strategy of Klebsiella pneumoniae in Poland. *Int J Antimicrob Agents* 2010; 35: 392-395
- 15 Mohanty S, Gaiind R, Ranjan R, Deb M. Use of the cefepime-clavulanate ESBL Etest for detection of extended-spectrum beta-lactamases in AmpC co-producing bacteria. *J Infect Dev Ctries* 2009; 4: 24-29
- 16 王辉, 吴伟元, 陈民钧. 肠杆菌科细菌中产超广谱 β -内酰胺酶(ESBL)的研究. 中华微生物和免疫学杂志 2001; 21: 676-679
- 17 吴佳丽, 顾洪琴, 俞云松, 周志慧, 陈亚岗, 李兰娟. 杭州市产超广谱 β -内酰胺酶菌株耐药性和基因型分布研究. 浙江医学 2006; 27: 401-403
- 18 徐灵彬, 刘原, 王香玲. 西安地区肠杆菌科细菌的产超广谱 β -内酰胺酶基因型的研究. 西安交通大学学报(医学版) 2008; 29: 443-445
- 19 Wu TL, Chia JH, Su LH, Chu C, Kuo AJ, Chiu CH. Dissemination of extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae in intensive care units of a medical center in Taiwan. *Microb Drug Resist* 2006; 12: 203-209
- 20 Ensor VM, Shahid M, Evans JT, Hawkey PM. Occurrence, prevalence and genetic environment of CTX-M beta-lactamases in Enterobacteriaceae from Indian hospitals. *J Antimicrob Chemother* 2006; 58: 1260-1263
- 21 程君, 王迎迎, 李慧, 李家斌. 合肥市产超广谱 β -内酰胺酶菌株的SHV型耐药基因分布和耐药性分析. 中国药理学通报 2007; 23: 812-815
- 22 王贺, 杨启文, 徐英春, 胡云建, 孙景勇, 孔海深, 吴伟元, 杨银梅, 郭世辉, 朱震宏, 张利侠, 朱旭慧, 梅亚宁, 张智洁, 李丹, 刘蓬蓬, 彭丽霞, 陈民钧. 产超广谱 β -内酰胺酶肠杆菌科对头孢美唑等抗菌药物的体外敏感性分析. 中华医院感染学杂志 2008; 18: 850-854
- 23 张晓梅, 潘坚伟, 吴建娟, 王家平, 王苏建. 产ESBLs大

同行评价

本研究创新性强, 方法较先进, 具有较好的学术价值.

- 肠埃希菌 β -内酰胺酶基因检测与耐药性分析. 中华医院感染学杂志 2009; 19: 724-726
- 24 Smith Moland E, Hanson ND, Herrera VL, Black JA, Lockhart TJ, Hossain A, Johnson JA, Goering RV, Thomson KS. Plasmid-mediated, carbapenem-hydrolysing beta-lactamase, KPC-2, in *Klebsiella pneumoniae* isolates. *J Antimicrob Chemother* 2003; 51: 711-714
- 25 Maltezou HC, Giakkoupi P, Maragos A, Bolikas M, Raftopoulos V, Papahatzaki H, Vrouhos G, Liakou V, Vatopoulos AC. Outbreak of infections due to KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* in a hospital in Crete (Greece). *J Infect* 2009; 58: 213-219
- 26 常霞, 常丽, 张士科. 对400株沙雷菌耐药性分析. 医学检验临床 2009; 19: 47-48
- 27 荆守刚, 邵海枫, 王卫萍, 史利宁, 张小卫, 范明. 大肠埃希菌质粒型碳青霉烯酶KPC-2检测和分析. 中华检验医学杂志 2009; 32: 1120-1123
- 28 李轶, 冯羨菊. 河南发现产KPC-2碳青霉烯酶的肺炎克雷伯菌. 中华检验医学杂志 2009; 32: 1045-1046
- 29 Chu YW, Afzal-Shah M, Houang ET, Palepou MI, Lyon DJ, Woodford N, Livermore DM. IMP-4, a novel metallo-beta-lactamase from nosocomial *Acinetobacter* spp. collected in Hong Kong between 1994 and 1998. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45: 710-714
- 30 Hawkey PM, Xiong J, Ye H, Li H, M'Zali FH. Occurrence of a new metallo-beta-lactamase IMP-4 carried on a conjugative plasmid in *Citrobacter youngae* from the People's Republic of China. *FEMS Microbiol Lett* 2001; 194: 53-57
- 31 Chen LR, Zhou HW, Cai JC, Zhang R, Chen GX. Combination of IMP-4 metallo-beta-lactamase production and porin deficiency causes carbapenem resistance in a *Klebsiella oxytoca* clinical isolate. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2009; 65: 163-167
- 32 严洁, 许红阳, 杨挺, 梁锋鸣, 周维桂, 严正. 肠道益生菌复合制剂预防重症监护病房抗生素相关性腹泻的临床应用. 中国微生态学杂志 2008; 20: 596-599

编辑 李瑞敏 电编 吴鹏朕

ISSN 1009-3079 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, 须经得《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.

RUNX3、RASSF1A启动子高甲基化与胃癌进展转移的关系

林海, 曹俊, 张斌, 吴育美, 邹晓平

林海, 邹晓平, 南京医科大学鼓楼临床医学院消化内科
江苏省南京市 210008

曹俊, 张斌, 吴育美, 邹晓平, 南京大学医学院附属鼓楼医院
消化科 江苏省南京市 210008

林海, 南京医科大学在读硕士, 主要从事消化系统肿瘤的表现遗传学研究。

江苏省卫生厅医学重点人才基金资助项目, No. RC2007003
作者贡献分布: 此课题由邹晓平、曹俊及林海设计; 研究过程由林海、张斌及吴育美操作完成; 研究所用试剂及分析工具由邹晓平提供; 数据分析由林海与曹俊完成; 本论文写作由林海与邹晓平完成。

通讯作者: 邹晓平, 教授, 210008, 江苏省南京市中山路321号, 南京医科大学鼓楼临床医学院消化内科。

zouxiaoping795@hotmail.com

电话: 025-83106666-20602

收稿日期: 2009-11-30 修回日期: 2010-03-07

接受日期: 2010-03-15 在线出版日期: 2010-03-28

Correlations of RUNX3 and RASSF1A promoter hypermethylation with the progression and metastasis of gastric carcinoma

Hai Lin, Jun Cao, Bin Zhang, Yu-Mei Wu,
Xiao-Ping Zou

Hai Lin, Xiao-Ping Zou, Department of Gastroenterology,
Drum Tower Clinical Medical College of Nanjing Medical
University, Nanjing 210008, Jiangsu Province, China

Jun Cao, Bin Zhang, Yu-Mei Wu, Xiao-Ping Zou, De-
partment of Gastroenterology, the Affiliated Drum Tower
Hospital of Nanjing University Medical School, Nanjing
210008, Jiangsu Province, China

Supported by: the Key Medical Talent Foundation of
Health Department of Jiangsu Province, No. RC2007003

Correspondence to: Professor Xiao-Ping Zou, Department
of Gastroenterology, Drum Tower Clinical Medical College
of Nanjing Medical University, Nanjing 210008, Jiangsu
Province, China. zouxiaoping795@hotmail.com

Received: 2009-11-30 Revised: 2010-03-07

Accepted: 2010-03-15 Published online: 2010-03-28

Abstract

AIM: To investigate the clinical significance of runt-related transcription factor 3 (RUNX3) and Ras association domain family 1A (RASSF1A) promoter methylation in human gastric cancer.

METHODS: The mRNA expression and methylation of RUNX3, and RASSF1A in 62 gastric cancer specimens and 56 adjacent normal tissue

specimens were detected by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and methylation-specific PCR (MSP), respectively. The expression of VEGF protein was measured by immunohistochemistry in methylation-positive and -negative cancer tissue specimens and 20 normal gastric tissue specimens.

RESULTS: The mRNA expression levels of RUNX3 and RASSF1A in gastric cancer were lower than those in normal gastric tissue (0.629 ± 0.461 vs 0.893 ± 0.543 and 0.653 ± 0.476 vs 0.858 ± 0.581 , respectively; both $P < 0.05$). The positive rates of RUNX3 and RASSF1A methylation were significantly higher in gastric cancer tissue specimens than in normal control ones (69.4% vs 26.8% and 66.1% vs 23.2%, respectively; both $P < 0.01$). The expression levels of RUNX3 and RASSF1A mRNAs were lower in methylation-positive cancer tissue specimens than in methylation-negative ones ($P < 0.05$). Neither RUNX3 nor RASSF1A promoter methylation were correlated with sex, age, tumor size, tumor differentiation degree, and Lauren classification. However, RASSF1A methylation was related with TNM stage and depth of infiltration, and RUNX3 methylation was associated with lymph node metastasis, vascular invasion and TNM stage. The positive rate of VEGF protein expression in RUNX3 methylation-positive gastric cancer specimens was significantly higher than that in RUNX3 methylation-negative ones (86.0% vs 57.9%, $P < 0.05$).

CONCLUSION: Aberrant RUNX3 and RASSF1A promoter methylation may lead to down-regulation of the two genes in GC and is therefore involved in the progression of the disease. RUNX3 promoter methylation may participate in the vascular/lymphatic metastasis of GC.

Key Words: Stomach neoplasm; Methylation; Runt-related transcription factor 3; Ras association domain family 1A; Vascular endothelial growth factor

Lin H, Cao J, Zhang B, Wu YM, Zou XP. Correlations of RUNX3 and RASSF1A promoter hypermethylation with

■背景资料

胃癌是我国病死率最高的消化系统肿瘤之一, 其中甲基化导致的抑癌基因表达失活是胃癌发生的重要原因。RUNX3基因位于染色体1p36.1位点, 是TGF- β 信号通路的重要调节因子, 具有调节胃黏膜上皮细胞增殖与凋亡平衡的作用, 其表达缺失与胃癌的发生、发展相关。RASSF1A是近年发现的抑癌基因, 位于染色体3p21.3处。其启动子区甲基化与胃肠道肿瘤发生、发展有密切的联系。

■同行评议者

于颖彦, 教授, 上海交通大学医学院附属瑞金医院器官移植中心病理室; 崔莲花, 副教授, 青岛大学医学院公共卫生系

■研究前沿

淋巴结及血道转移是胃癌的主要转移途径。近年来已有研究发现RUNX3、RASSF1A基因甲基化对胃癌的发生起重要作用, VEGF与胃癌的转移相关。但是有关抑癌基因甲基化在胃癌进展转移中的具体作用机制研究尚不完全清楚。

the progression and metastasis of gastric carcinoma. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2010; 18(9): 889-896

摘要

目的: 探讨胃癌RUNX3、RASSF1A基因启动子甲基化在胃癌进展转移中的作用及意义。

方法: RT-PCR和MSP检测62例胃癌标本及56例正常胃黏膜组织RUNX3、RASSF1A基因mRNA表达及甲基化状况, 免疫组织化学检测VEGF在RUNX3、RASSF1A甲基化与非甲基化胃癌组织及20例正常组织中的表达, 并分析RUNX3、RASSF1A甲基化与VEGF表达的关系。

结果: 胃癌组织RUNX3与RASSF1A表达较正常组织均明显降低(0.629 ± 0.461 vs 0.893 ± 0.543 , 0.653 ± 0.476 vs 0.858 ± 0.581 , 均 $P < 0.05$), 且RUNX3与RASSF1A甲基化率均高于正常组织(69.4% vs 26.8% , 66.1% vs 23.2% , 均 $P < 0.01$)。胃癌组织中RUNX3、RASSF1A甲基化组mRNA表达量较非甲基化组明显降低(0.545 ± 0.299 vs 0.736 ± 0.291 , 0.562 ± 0.208 vs 0.674 ± 0.185 , 均 $P < 0.05$)。RASSF1A甲基化与肿瘤TNM分期及浸润深度相关, RUNX3甲基化与肿瘤淋巴结转移、血管侵犯及TNM分期相关($P < 0.05$)。RUNX3甲基化组胃癌组织VEGF蛋白表达高于非甲基化组(86.0% vs 57.9%), RUNX3甲基化与VEGF表达相关($P < 0.05$)。

结论: RUNX3、RASSF1A启动子高甲基化可能是导致其表达降低的原因, 并与胃癌进展演变相关。RUNX3甲基化可能参与胃癌血管、淋巴管转移。

关键词: 胃肿瘤; 甲基化; RUNX3; RASSF1A; 血管内皮生长因子

林海, 曹俊, 张斌, 吴育美, 邹晓平. RUNX3、RASSF1A启动子高甲基化与胃癌进展转移的关系. 世界华人消化杂志 2010; 18(9): 889-896
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/889.asp>

0 引言

胃癌发病率居所有恶性肿瘤的第2位, 是否发生转移对患者治疗方式的选择及预后影响较大, 而目前尚缺乏可以实现早期检测胃癌侵犯转移的指标^[1-3]。VEGF的表达与肿瘤血管、淋巴管转移密切相关, 多数肿瘤中均存在VEGF高表达, 虽然已有报道抑癌基因表达失活与VEGF表达相关, 但是其具体调节机制仍不完全清楚^[4-6]。

既往我们已经研究发现RUNX3在胃癌癌前病变及早期胃癌中均存在高甲基化现象, 对胃癌的发生起重要作用, 但有关RUNX3甲基化是否参与胃癌进展转移尚不完全清楚^[7]。RASSF1A是目前发现的在不同类型肿瘤中最常发生甲基化的基因, 关于其启动子甲基化与国内胃癌关系的报道较少。我们通过检测进展期胃癌组织RUNX3、RASSF1A基因甲基化和mRNA表达, 以及VEGF蛋白表达, 以期进一步深入探讨抑癌基因高甲基化与胃癌发生、发展的关系。

1 材料和方法

1.1 材料 62例胃癌组织(6例为皮革胃)及相应的56例正常胃黏膜组织取自鼓楼医院普外科2008-04/2009-06行手术切除的胃癌患者, 其中男44例, 女18例, 年龄34-83岁(平均年龄61.5岁±10.1岁)。肿瘤组织取自肿块中心未发生坏死的组织, 正常组织取自距肿块5 cm以外区域, 病理检测未见癌细胞浸润, 所有患者术前均未行放、化疗。所有癌组织标本术后均经病理学专家确诊为胃癌。根据1997年国际抗癌联盟TNM分期标准将62例胃癌分为I/II期17例, III/IV期45例。肿瘤浸润深度: T1/T2期22例, T3/T4期40例(T1: 肿瘤浸润至黏膜或黏膜下层; T2: 肿瘤浸润至肌层或浆膜层; T3: 肿瘤已穿透浆膜层, 但未侵及邻近组织; T4: 肿瘤侵及邻近组织或器官)。按Lauren分型分为肠型30例, 弥漫型25例, 混合型7例。按术后病理分为高/中分化24例, 低分化38例。标本离体后立即存入-80℃冰箱备用。组织获取均征得患者及家属知情同意, 并经鼓楼医院伦理委员会同意。引物委托上海英骏生物技术有限公司合成。

1.2 方法

1.2.1 RNA提取及逆转录聚合酶链式反应(RT-PCR): 取100 mg组织匀浆后, 参照TRIzol (Invitrogen, USA)说明书提取癌及正常组织RNA, 琼脂糖凝胶电泳检测RNA完整性, 用紫外分光光度计检测RNA浓度及纯度。取2 μg RNA, 参照逆转录试剂盒(Invitrogen, USA)操作说明书逆转录合成cDNA。取2 μL cDNA扩增RUNX3基因(311 bp), 同时扩增β-actin1(434 bp)作为内参。其中RUNX3引物序列为: F: 5'-ATCCCCTGACAA AAAGTGACG-3'; R: 5'-GCAAAGCAGTTTCCA CCA-3', β-actin1引物序列: F: 5'-CGGGAAATC GTGCGTGAC-3'; R: 5'-TGGAAGGTGGACAG CGAGG-3'。反应体系包括: 10×PCR Buffer 2.0 μL, dNTP 1.6 μL, MgCl₂ 2.0 μL, 上下游引物各0.4 μL(10 pmol/L), cDNA 2.0 μL, Taq酶0.1 μL, 双蒸水

表 1 MSP引物序列

基因	引物序列	产物大小(bp)	退火温度(°C)	参考文献
RUNX3MF	ATAATAGCGGTCGTTAGGGCGTCG	115	60	[9]
RUNX3MR	GCTTCTACTTTCCCGCTTCTCGCG			
RUNX3UF	ATAATAGTGGTTGTTAGGGTGTG	115	55	[9]
RUNX3UR	ACTTCTACTTTCCCACTTCTCACA			
RASSF1AM F	GTGTTAACGCGTTGCGTATC	93	58	[10]
RASSF1AM R	AACCCCGCGAACTAAAAACGA			
RASSF1AU F	TTTGGTTGGAGTGTGTTAATGTG	105	58	[10]
RASSF1AU R	CAAACCCACAACTAAAAACAA			

MF: 甲基化上游引物; MR: 甲基化下游引物; UF: 非甲基化上游引物; UR: 非甲基化下游引物。

补齐至20 μ L。RASSF1A(331 bp)引物序列: F: 5'-C TTTTACCTGCCCAAGGATGC-3'; R: 5'-CACCT CCCCAGAGTCATTTTCC-3'。 β -actin(263 bp)引物序列: F: 5'-GAGACCTTCAACACCCCAGC-3', R: 5'-ATGTCACGCACGATTTCCC-3'。反应体系包括: 10 $\times$ PCR Buffer 2.5 μ L, dNTP 2.0 μ L, $MgCl_2$ 1.5 μ L, 上下游引物各0.5 μ L(10 pmol/L), cDNA 2.0 μ L, Taq酶(TaKaRa, 日本)0.125 μ L, 去离子水补齐至25 μ L。反应条件为: 95 $^{\circ}C$, 5 min, 95 $^{\circ}C$, 30 s, 退火温度(RUNX3 58 $^{\circ}C$, RASSF1A 60 $^{\circ}C$)45 s, 72 $^{\circ}C$, 1 min, 共38个循环, 最后72 $^{\circ}C$ 延伸10 min。取5 μ L PCR扩增产物在2%琼脂糖凝胶同一胶孔上行同步电泳, 凝胶成像仪拍照, 分别计算RUNX3、RASSF1A与内参的平均吸光度(A)值, 以两者吸光度比值作为目的基因相对表达量。

1.2.2 DNA提取及修饰: 取50-80 mg组织, 使用蛋白酶K消化、酚/氯仿变性、乙醇沉淀法提取组织DNA, 紫外分光光度计测定DNA浓度及纯度。取1 μ g DNA按试剂盒EZ DNA Methylation GoldTM(Zymo research, USA)说明书步骤行亚硫酸氢钠修饰, 修饰后DNA存于-80 $^{\circ}C$ 备用。

1.2.3 甲基化特异性聚合酶链式反应(MSP): 按照Herman等^[8]提出的MSP方法, 分别设计甲基化与非甲基化引物行MSP扩增检测癌与正常组织RUNX3、RASSF1A基因是否发生甲基化。具体引物序列、退火温度及扩增片段大小见表1。MSP反应体系为25 μ L: 包括去离子水16.875 μ L, 10 $\times$ PCR Buffer(含15 mmol/L $MgCl_2$)2.5 μ L, dNTP 2.5 μ L, 上下游引物各0.5 μ L(10 pmol/L), 修饰DNA 2.0 μ L, Taqhotstart酶(TaKaRa, 日本)0.125 μ L。反应条件: 95 $^{\circ}C$, 5 min, 95 $^{\circ}C$, 45 s, 退火温度复性45 s, 72 $^{\circ}C$, 1 min, 共40个循环, 最后72 $^{\circ}C$ 延伸10 min。同时分别选取经甲基化酶M.Sss I (New England BioLabs[®] Inc.)处理和未处理的正

常人外周血淋巴细胞DNA作为甲基化、非甲基化阳性对照, 去离子水代替DNA作空白对照。取5 μ L MSP产物在3%琼脂糖凝胶上电泳, 用GDS-8000(UVP, 美国)凝胶成像仪拍照分析。

1.2.4 免疫组织化学检测VEGF表达: 将组织标本用100 g/L甲醛固定, 石蜡包埋, 制备4 μ m厚连续切片。采用EnVision二步法行免疫组织化学染色。具体操作步骤如下: 将石蜡切片常规脱蜡至水, 采用高压锅加热法行抗原修复, 10%山羊血清封闭, 滴加兔抗人VEGF单克隆抗体(北京中杉金桥生物技术有限公司)并于4 $^{\circ}C$ 过夜, PBS漂洗3次, 滴加二抗(北京中杉公司试剂盒)并在室温下孵育30 min, DAB显色, 苏木精复染后将切片脱水、透明并封片。以已知的VEGF染色阳性切片做阳性对照, PBS代替一抗做阴性对照。高倍镜下随机取4个视野, 以细胞质出现棕黄色或棕褐色颗粒为VEGF阳性, 根据阳性细胞百分比及染色强度分别计分判定VEGF染色结果: 阳性细胞百分比计数如下: $\leq 10\%$ (0分), 11%-25%(1分), 26%-50%(2分), 51%-75%(3分), $\geq 76\%$ (4分)。染色强度评分如下: 无染色(0分), 淡染色(1分), 棕黄色(2分), 棕褐色(3分)。以两项积分乘积 < 3 分为阴性, 积分 ≥ 3 分判定为阳性(3-6分弱阳性; ≥ 6 分强阳性)^[11,12]。

统计学处理 采用SPSS16.0软件进行统计分析。 χ^2 检验、 t -检验分别用于比较癌与正常组织中RUNX3、RASSF1A两基因甲基化率及表达差异。 χ^2 检验或Fisher确切概率法对性别、年龄、TNM分期等临床病理参数进行单因素分析。RUNX3和RASSF1A两基因甲基化与其mRNA表达及VEGF蛋白表达之间的关系用 t -检验和 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为有统计学意义。

2 结果

2.1 RUNX3、RASSF1A基因mRNA表达 RUNX3

■ 相关报道

本课题组在前期研究发现RUNX3在胃黏膜异型增生及早期胃癌中甲基化率分别为48.1%、50%, 而RASSF1A基因无甲基化现象。Oshimo等报道进展胃癌RUNX3甲基化率达71%。Byun等研究发现RASSF1A甲基化与肿瘤分期、分期有关。

■创新盘点

本研究采用MSP及免疫组织化学技术检测胃癌及正常胃黏膜组织中RUNX3、RASSF1A甲基化及VEGF蛋白表达状况,并分析两基因甲基化与临床病理参数的关系。

表 2 RUNX3、RASSF1A甲基化联合分析

RUNX3	n	RASSF1A		χ^2 值	P值
		M	U		
M	39	29	10	0.587	0.564
U	23	15	8		
合计	62	44	18		

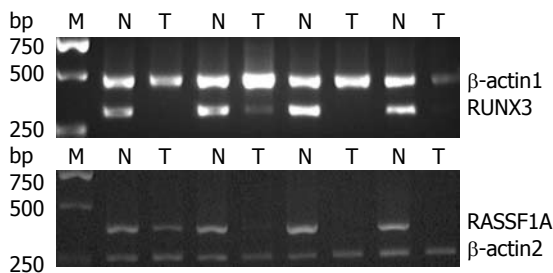


图 1 胃癌及正常组织RUNX3、RASSF1A基因mRNA表达。M: DL 2000 DNA Marker标准品; N: 正常组织; T: 肿瘤组织。

在胃癌与正常胃黏膜组织中的相对表达量分别为 0.629 ± 0.461 和 0.893 ± 0.543 , 癌组织RUNX3表达量低于正常组织, 差异具有统计学意义($t = 2.189, P = 0.033$)。RASSF1A在癌与正常组织中的相对表达量分别为 0.653 ± 0.476 , 0.858 ± 0.581 , 两组差异具有统计学意义($t = 2.017, P = 0.046$)。RUNX3甲基化组胃癌组织其RUNX3 mRNA表达低于非甲基化组(0.545 ± 0.299 vs 0.736 ± 0.291 , $t = 2.310, P = 0.025$)。RASSF1A甲基化组的胃癌RASSF1A mRNA表达量低于非甲基化组(0.562 ± 0.208 vs 0.674 ± 0.185 , $t = 2.572, P = 0.012$, 图1)。

2.2 癌与正常组织RUNX3、RASSF1A甲基化 胃癌组织RUNX3甲基化率为69.4%(43/62), 高于正常组织26.8%(15/56), 癌组织甲基化率是正常胃黏膜组织的2.60倍, 差异具有统计学意义($P < 0.01$)。RASSF1A在癌组织和正常组织中的甲基化率分别为66.1%(41/62)和23.2%(13/56), 癌组织甲基化率是正常组织的2.80倍, 具有统计学差异($P < 0.01$, 图2)。

2.3 同一组织标本RUNX3、RASSF1A甲基化 癌组织中RUNX3与RASSF1A两基因同时发生甲基化的有29例(46.8%), 正常组织有6例(10.7%), 两组差异显著($P < 0.01$)。癌组织中RUNX3、RASSF1A至少1个基因存在甲基化的有54例(87.1%), 正常组织为17例(30.4%), 两者差异显著($P < 0.01$)。癌组织中RUNX3与RASSF1A两基因甲基化不存在相关性(表2)。

2.4 RUNX3、RASSF1A甲基化与患者临床及病

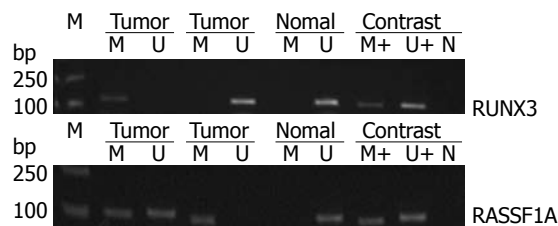


图 2 MSP检测RUNX3、RASSF1A甲基化电泳图。M: DL 2000 DNA Marker标准品; M: 甲基化; U: 非甲基化。

理参数的关系 两基因甲基化与患者性别、年龄、肿瘤大小、分化程度、Lauren分型之间无相关性($P > 0.05$), 但RUNX3甲基化与肿瘤淋巴结转移、血管侵犯、TNM分期相关, 而RASSF1A甲基化与TNM分期和浸润深度具有相关性($P < 0.05$, 表3)。

2.5 VEGF免疫组织化学 胃癌细胞胞质可见VEGF阳性染色, 阳性率为79.0%(49/62), 正常胃黏膜细胞阳性率为15.0%(3/20), 癌组织VEGF蛋白表达明显高于正常胃黏膜组织($P = 0.000, \chi^2 = 26.724$)。将胃癌组织按RUNX3甲基化与否分组发现, RUNX3甲基化组中VEGF表达阳性的有37例(86.0%), 非甲基化组中VEGF表达阳性的有11例(57.9%), 两组差异显著, RUNX3甲基化与VEGF表达相关($P = 0.022, \chi^2 = 5.974$, 表4)。VEGF在RASSF1A甲基化与非甲基化胃癌组织中表达率分别为81.0%(35/43)和73.7%(14/19), 无统计学差异($P = 0.513, \chi^2 = 0.473$, 图3)。

3 讨论

RUNX3基因编码TGF- β 信号通路下游转录调节因子, 其表达失活, 可以使胃黏膜细胞凋亡受抑, 并向恶性细胞转化^[13]。RASSF1A是位于染色体3p21.3位点的抑癌基因, 通过阻断CyclinD1累积及控制细胞G₁/S期进展而抑制肿瘤细胞生长^[14,15]。RUNX3、RASSF1A基因在肺癌、胃癌、乳腺癌等多种实体瘤中均存在甲基化导致的表达失活^[16-18]。本实验发现胃癌组织RUNX3与RASSF1A基因均存在低表达改变, 并伴有高甲基化现象。为了更好地阐明RUNX3、RASSF1A基因甲基化与表达之间的关系, 我们进一步对发生与未发生甲基化的胃癌组织中RUNX3、RASSF1A mRNA表达做统计分析, 发现两基因存在甲基化的癌组织其mRNA表达均较未发生甲基化的胃癌组织明显降低, 差异具有统计学意义。表明RUNX3、RASSF1A基因甲基化与其表达相关, 抑癌基因高甲基化可能是导致其表达降低的原因。本实验中个别组织不

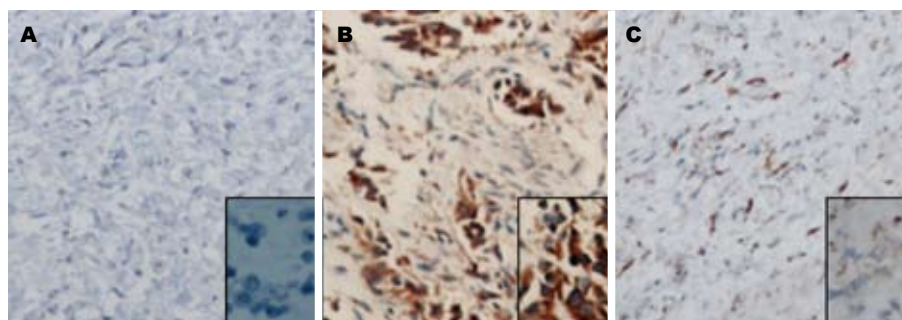


图3 VEGF在胃黏膜中的表达。A: 正常胃黏膜组织; B: RUNX3甲基化的胃癌组织; C: RUNX3非甲基化胃癌组织。

■应用要点
通过检测RUNX3、RASSF1A基因甲基化可以有助于准确评价胃癌的分期分级, 及判断肿瘤有无微转移。应用去甲基化药物逆转RUNX3基因甲基化或许可以通过降低胃癌组织VEGF表达, 减少胃癌血管淋巴管生成。

表3 RUNX3、RASSF1A甲基化与患者临床及病理参数的关系

临床病理参数	n	RUNX3		χ^2 值	P值	RASSF1A		χ^2 值	P值
		M	U			M	U		
性别									
男	44	31	13	0.086	0.770	29	15	0.003	1.000
女	18	12	6			12	6		
年龄(岁)									
≥60	38	27	11	0.781	0.133	24	14	0.387	0.591
<60	24	16	8			17	7		
肿瘤大小(cm)									
≥5	33	25	8	1.361	0.280	23	10	0.401	0.596
<5	29	18	11			18	11		
分化程度									
高/中	24	19	5	1.774	0.260	15	9	0.230	0.784
低	38	24	14			26	12		
淋巴结转移									
有	43	34	9	6.231	0.018 ^a	30	13	0.829	0.395
无	19	9	10			11	8		
血管侵犯									
有	42	33	9	5.204	0.038 ^a	29	13	0.495	0.570
无	20	10	10			12	8		
TNM分期									
I/II	17	8	9	5.478	0.030 ^a	7	10	6.511	0.016 ^a
III/IV	45	35	10			34	11		
Lauren 分型									
肠型	30	21	9	1.630	0.443	17	13	2.260	0.323
弥漫型	25	20	5			15	10		
混合型	7	4	3			2	5		
浸润深度									
T1/T2	22	12	10	3.519	0.085	10	12	6.507	0.023 ^a
T3/T4	40	31	9			31	9		

^aP<0.05.

存在RUNX3及RASSF1A甲基化却出现基因表达缺失或降低, 对于这种现象, 我们考虑除了甲基化外可能还有杂合性缺失、点突变等机制共同调节基因的表达。

与前期研究^[7]的RUNX3在异型增生、早期胃癌中甲基化率分别为48.1%、50%相比, 本研究发现RUNX3在进展期胃癌中甲基化率达到

69.4%, 这与Oshimo等^[19]报道的71%甲基化率基本一致, 稍高于Kim等^[20]等报道的64%的甲基化率。随着胃癌的发展RUNX3甲基化率逐步升高, 这提示RUNX3甲基化可能贯穿于胃癌进展演变的全过程, 与胃癌的发生发展均有关系。RASS1A在胃癌组织中的甲基化率为66.1%, 正常胃黏膜组织为23.2%。胃癌组织RASS1A甲基化率稍高

■名词解释

DNA甲基化:是指在DNA甲基化转移酶(DNMTs)的作用下,将一个甲基添加到DNA分子碱基上,其中最常添加于胞嘧啶,从而形成5-甲基胞嘧啶。DNA甲基化主要发生于CpG岛,其作用是导致基因失活,一般DNA甲基化程度越高,这段DNA被转录成RNA的可能性相对越小。

表 4 RUNX3甲基化与VEGF蛋白表达的关系

RUNX3	n	VEGF蛋白表达		χ^2 值	P值
		阴性	阳性		
甲基化	43	6	37	5.974	0.022
非甲基化	19	8	11		
合计	62	14	48		

于李学彦等^[21]报道的甲基化率。而同Ye等^[22]的研究结果相比, RASS1A在胃癌组织中的甲基化率基本一致, 而正常胃黏膜组织RASS1A甲基化率高于其报道的14.8%检出率。关于正常组织RASS1A甲基化率的差异, 我们考虑可能是由于病例年龄组成不同所致($61.5 \pm 10.1/57.6 \pm 13.7$)。由于我们所检测标本的患者其年龄相对较高, 而且已有研究表明随着年龄增长, 正常胃黏膜出现RASS1A等抑癌基因高甲基化的几率将会增加^[20,23]。当通过对RUNX3和RASS1A甲基化进行联合分析时我们发现, RUNX3与RASS1A甲基化不存在相关性, 这说明两基因甲基化可能是通过不同路径影响胃癌的发生发展。由于联合检测两个基因甲基化的敏感性和特异性均高于单基因甲基化检测, 而且目前已有报道通过检测血清中肿瘤细胞游离DNA甲基化作为肿瘤的分子标记^[24,25]。这提示或许在今后的临床研究中可以应用这种创伤较小的检查方法, 联合检测多个相关基因甲基化或建立肿瘤相关基因的甲基化模式图谱, 从而为肿瘤的诊断、分型、分期及个体化诊疗等提供帮助。

此外, 通过与患者临床病理指标比较我们发现, 两基因甲基化率在分期较晚及浸润较深的胃癌中较高, 表明随着肿瘤的进展演变, 甲基化现象变得更为普遍。RUNX3甲基化率在发生血管及淋巴管转移的胃癌组织中明显升高, 这提示RUNX3甲基化可能参与胃癌的进展及血管、淋巴管转移。由于VEGF是最主要的血管淋巴管生成调节因子, 其不仅参与肿瘤新生血管的形成, 而且可以通过与淋巴管内皮细胞Flt-4受体相结合而诱导瘤体内淋巴管的增生、扩张, 与肿瘤的血管淋巴管转移有密切的联系^[26,27]。VEGF高表达的肿瘤患者对治疗的反应及预后较差^[28,29]。虽然既往有报道甲基化等原因造成的抑癌基因表达失活及癌基因激活可能与肿瘤组织VEGF高表达相关, 但是有关抑癌基因甲基化与VEGF表达之间的关系仍不完全清楚^[5-6,30]。为了进一步阐明RUNX3甲基化与胃癌转移之间的关系, 我们用免疫组织化学检测了43例RUNX3发生甲基

化与19例未发生甲基化的胃癌组织, 分析发现RUNX3发生甲基化的胃癌组织其VEGF表达阳性率(86.0%)明显高于RUNX3非甲基化胃癌组织(57.9%), RUNX3甲基化与VEGF表达相关。伏洁等^[31]利用胃癌组织芯片验证了RUNX3失表达可以通过促进VEGF表达增加胃癌血管的生成和转移。而Peng等^[12]通过动物实验及对120例胃癌组织中RUNX3与VEGF表达的研究也发现, RUNX3低表达与VEGF高表达密切相关, 通过激活RUNX3基因表达可以有效抑制胃癌血管及淋巴管的形成。这说明RUNX3甲基化或许是通过调节VEGF高表达从而促进胃癌的血管及淋巴管转移。由于RUNX3基因表达失活与胃癌转移密切相关, 而甲基化所导致的基因表达异常属于可逆性遗传改变, 应用5-Aza-cdR等去甲基化药物可以逆转甲基化而使得抑癌基因恢复表达^[32,33]。这提示或许可以通过应用5-Aza-cdR等去甲基化药物逆转RUNX3基因甲基化以降低胃癌组织中VEGF的表达, 从而使得胃癌血管淋巴管生成减少, 降低肿瘤转移的可能性, 改善胃癌患者预后。但是由于并非所有抑癌基因甲基化均参与胃癌的进展转移, 而目前去甲基化药物尚不能做到针对特异性基因实现去甲基化, 故如何进一步研究RUNX3特异性去甲基化药物对于肿瘤的去甲基化治疗具有重要意义。

总之, 启动子高甲基化是导致抑癌基因表达失活或降低的重要机制, 其不仅与胃癌发生相关, 而且参与胃癌的进展转移。在今后的临床研究中检测胃癌组织RUNX3、RASS1A甲基化或许有助于评估胃癌的浸润及转移状况从而优化患者的临床治疗方案。并且通过检测患者的不同基因甲基化状况, 可以为患者的诊断及临床预后评估提供参考, 同时如能针对特异基因去甲基化, 或许可以将有助于降低肿瘤的浸润转移并改善预后^[34,35]。但有关甲基化与胃癌之间的具体分子机制及相关因素尚需进一步深入研究。

志谢: 感谢鼓楼医院病理科周纪乔、冯安宁在胃癌组织标本收集过程中所提供的帮助。

4 参考文献

- 1 Oue N, Aung PP, Mitani Y, Kuniyasu H, Nakayama H, Yasui W. Genes involved in invasion and metastasis of gastric cancer identified by array-based hybridization and serial analysis of gene expression. *Oncology* 2005; 69 Suppl 1: 17-22
- 2 Terry MB, Gaudet MM, Gammon MD. The epidemiology of gastric cancer. *Semin Radiat Oncol* 2002; 12: 111-127
- 3 Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer

- statistics, 2002. *CA Cancer J Clin* 2005; 55: 74-108
- 4 Xie K, Wei D, Shi Q, Huang S. Constitutive and inducible expression and regulation of vascular endothelial growth factor. *Cytokine Growth Factor Rev* 2004; 15: 297-324
- 5 Kim JY, Hwang JH, Zhou W, Shin J, Noh SM, Song IS, Kim JY, Lee SH, Kim J. The expression of VEGF receptor genes is concurrently influenced by epigenetic gene silencing of the genes and VEGF activation. *Epigenetics* 2009; 4: 313-321
- 6 Matsumura S, Oue N, Mitani Y, Kitadai Y, Yasui W. DNA demethylation of vascular endothelial growth factor-C is associated with gene expression and its possible involvement of lymphangiogenesis in gastric cancer. *Int J Cancer* 2007; 120: 1689-1695
- 7 Zou XP, Zhang B, Zhang XQ, Chen M, Cao J, Liu WJ. Promoter hypermethylation of multiple genes in early gastric adenocarcinoma and precancerous lesions. *Hum Pathol* 2009; 40: 1534-1542
- 8 Herman JG, Graff JR, Myöhänen S, Nelkin BD, Baylin SB. Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93: 9821-9826
- 9 Homma N, Tamura G, Honda T, Matsumoto Y, Nishizuka S, Kawata S, Motoyama T. Spreading of methylation within RUNX3 CpG island in gastric cancer. *Cancer Sci* 2006; 97: 51-56
- 10 Lo KW, Kwong J, Hui AB, Chan SY, To KF, Chan AS, Chow LS, Teo PM, Johnson PJ, Huang DP. High frequency of promoter hypermethylation of RASSF1A in nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Res* 2001; 61: 3877-3881
- 11 Wang L, Wei D, Huang S, Peng Z, Le X, Wu TT, Yao J, Ajani J, Xie K. Transcription factor Sp1 expression is a significant predictor of survival in human gastric cancer. *Clin Cancer Res* 2003; 9: 6371-6380
- 12 Peng Z, Wei D, Wang L, Tang H, Zhang J, Le X, Jia Z, Li Q, Xie K. RUNX3 inhibits the expression of vascular endothelial growth factor and reduces the angiogenesis, growth, and metastasis of human gastric cancer. *Clin Cancer Res* 2006; 12: 6386-6394
- 13 Li QL, Ito K, Sakakura C, Fukamachi H, Inoue K, Chi XZ, Lee KY, Nomura S, Lee CW, Han SB, Kim HM, Kim WJ, Yamamoto H, Yamashita N, Yano T, Ikeda T, Itohara S, Inazawa J, Abe T, Hagiwara A, Yamagishi H, Ooe A, Kaneda A, Sugimura T, Ushijima T, Bae SC, Ito Y. Causal relationship between the loss of RUNX3 expression and gastric cancer. *Cell* 2002; 109: 113-124
- 14 Shivakumar L, Minna J, Sakamaki T, Pestell R, White MA. The RASSF1A tumor suppressor blocks cell cycle progression and inhibits cyclin D1 accumulation. *Mol Cell Biol* 2002; 22: 4309-4318
- 15 Deng ZH, Wen JF, Li JH, Xiao DS, Zhou JH. Activator protein-1 involved in growth inhibition by RASSF1A gene in the human gastric carcinoma cell line SGC7901. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 1437-1443
- 16 Niklinska W, Naumnik W, Sulewska A, Kozłowski M, Pankiewicz W, Milewski R. Prognostic significance of DAPK and RASSF1A promoter hypermethylation in non-small cell lung cancer (NSCLC). *Folia Histochem Cytobiol* 2009; 47: 275-280
- 17 Guo W, Dong Z, Chen Z, Yang Z, Wen D, Kuang G, Guo Y, Shan B. Aberrant CpG island hypermethylation of RASSF1A in gastric cardia adenocarcinoma. *Cancer Invest* 2009; 27: 459-465
- 18 Li Y, Wei Q, Cao F, Cao X. Expression and promoter methylation of the RASSF1A gene in sporadic breast cancers in Chinese women. *Oncol Rep* 2008; 19: 1149-1153
- 19 Oshimo Y, Oue N, Mitani Y, Nakayama H, Kitadai Y, Yoshida K, Ito Y, Chayama K, Yasui W. Frequent loss of RUNX3 expression by promoter hypermethylation in gastric carcinoma. *Pathobiology* 2004; 71: 137-143
- 20 Kim TY, Lee HJ, Hwang KS, Lee M, Kim JW, Bang YJ, Kang GH. Methylation of RUNX3 in various types of human cancers and premalignant stages of gastric carcinoma. *Lab Invest* 2004; 84: 479-484
- 21 李学彦, 傅宝玉. 胃癌组织RASSF1基因启动子区甲基化的意义. *世界华人消化杂志* 2007; 15: 2354-2357
- 22 Ye M, Xia B, Guo Q, Zhou F, Zhang X. Association of diminished expression of RASSF1A with promoter methylation in primary gastric cancer from patients of central China. *BMC Cancer* 2007; 7: 120
- 23 Waki T, Tamura G, Sato M, Motoyama T. Age-related methylation of tumor suppressor and tumor-related genes: an analysis of autopsy samples. *Oncogene* 2003; 22: 4128-4133
- 24 Yanagawa N, Tamura G, Oizumi H, Kanauchi N, Endoh M, Sadahiro M, Motoyama T. Promoter hypermethylation of RASSF1A and RUNX3 genes as an independent prognostic prediction marker in surgically resected non-small cell lung cancers. *Lung Cancer* 2007; 58: 131-138
- 25 Wang YC, Yu ZH, Liu C, Xu LZ, Yu W, Lu J, Zhu RM, Li GL, Xia XY, Wei XW, Ji HZ, Lu H, Gao Y, Gao WM, Chen LB. Detection of RASSF1A promoter hypermethylation in serum from gastric and colorectal adenocarcinoma patients. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 3074-3080
- 26 Da MX, Wu Z, Tian HW. Tumor lymphangiogenesis and lymphangiogenic growth factors. *Arch Med Res* 2008; 39: 365-372
- 27 Shida A, Fujioka S, Kobayashi K, Ishibashi Y, Nimura H, Mitsumori N, Yanaga K. Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF)-C and -D in gastric carcinoma. *Int J Clin Oncol* 2006; 11: 38-43
- 28 Ustuner Z, Saip P, Yasasever V, Vural B, Yazar A, Bal C, Ozturk B, Ozbek U, Topuz E. Prognostic and predictive value of vascular endothelial growth factor and its soluble receptors, VEGFR-1 and VEGFR-2 levels in the sera of small cell lung cancer patients. *Med Oncol* 2008; 25: 394-399
- 29 Li SG, Ye ZY, Zhao ZS, Tao HQ, Wang YY, Niu CY. Correlation of integrin beta3 mRNA and vascular endothelial growth factor protein expression profiles with the clinicopathological features and prognosis of gastric carcinoma. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 421-427
- 30 Shi Q, Le X, Abbruzzese JL, Peng Z, Qian CN, Tang H, Xiong Q, Wang B, Li XC, Xie K. Constitutive Sp1 activity is essential for differential constitutive expression of vascular endothelial growth factor in human pancreatic adenocarcinoma. *Cancer Res* 2001; 61: 4143-4154
- 31 伏洁, 张煦, 王靖. 应用胃癌组织芯片研究RUNX3、VEGF与MVD的相关性及其意义. *世界华人消化杂志* 2009; 17: 321-325
- 32 Deng T, Zhang Y. 5-Aza-2'-deoxycytidine reactivates expression of RUNX3 by deletion of DNA methyltransferases leading to caspase independent apoptosis in colorectal cancer Lovo

同行评价

本实验设计合理, 技术和方法可靠, 结论明确, 对于探索胃癌浸润转移确切机制具有参考价值。

- cells. *Biomed Pharmacother* 2009; 63: 492-500
- 33 彭春艳, 陈世耀, 刘天舒. runt相关转录因子3及其甲基化在人胃癌细胞中的表达及调节因素的初步研究. *中华消化杂志* 2007; 27: 247-250
- 34 Tamura G. Alterations of tumor suppressor and tumor-related genes in the development and progression of gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 192-198
- 35 Prabhu JS, Korlimarla A, Banerjee A, Wani S, K P, Sahoo R. Gene-specific methylation: potential markers for colorectal cancer. *Int J Biol Markers* 2009; 24: 57-62

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

ISSN 1009-3079 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	胃肠病学和肝病学杂志	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.

戊型肝炎病毒感染免疫研究进展

耿彦生, 王佑春

耿彦生, 王佑春, 北京协和医学院研究生院 中国药品生物制品检定所细胞室 北京市 100050
国家高技术研究发展计划(863)基金资助项目, No. 2006AA02Z453

作者贡献分布: 本文综述由耿彦生完成, 王佑春审校。

通讯作者: 王佑春, 研究员, 100050, 北京市崇文区天坛西里2号, 北京协和医学院研究生院, 中国药品生物制品检定所细胞室. wychun3@yahoo.com

电话: 010-67095488

收稿日期: 2009-12-22 修回日期: 2010-02-03

接受日期: 2010-02-09 在线出版日期: 2010-03-28

Advances in immunology of hepatitis E virus infection

Yan-Sheng Geng, You-Chun Wang

Yan-Sheng Geng, You-Chun Wang, Graduate School of Peking Union Medical College; Department of Cellular Biology, National Institute for the Control of Pharmaceutical and Biological Products, Beijing 100050, China

Supported by: the National High Technology Research and Development Program of China (863 Program), No. 2006AA02Z453

Correspondence to: Professor You-Chun Wang, Graduate School of Peking Union Medical College; Department of Cellular Biology, National Institute for the Control of Pharmaceutical and Biological Products, 2 Tiantanxili, Chongwen District, Beijing 100050, China. wychun3@yahoo.com

Received: 2009-12-22 Revised: 2010-02-03

Accepted: 2010-02-09 Published online: 2010-03-28

Abstract

Hepatitis E virus (HEV) is the cause of human hepatitis E. Hepatitis E is endemic in many developing countries, including China, and represents a major public health problem. In this article, we will review the current knowledge on humoral and cellular immune responses and mechanisms of immunologic injury in HEV infection as well as the development of HEV vaccines.

Key Words: Hepatitis E virus; Infectious immunity; Vaccine

Geng YS, Wang YC. Advances in immunology of hepatitis E virus infection. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(9): 897-901

摘要

戊型肝炎病毒(hepatitis E virus, HEV)是引起

戊型肝炎的病原体. 在发展中国家戊型肝炎是一个重要的公共卫生问题, 我国是HEV的流行区. 本文就近期HEV感染后的体液免疫反应、细胞免疫反应、免疫损伤机制的研究以及HEV疫苗研制的进展进行综述.

关键词: 戊型肝炎病毒; 感染免疫; 疫苗

耿彦生, 王佑春. 戊型肝炎病毒感染免疫研究进展. 世界华人消化杂志 2010; 18(9): 897-901

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/897.asp>

0 引言

戊型肝炎(hepatitis E)是由戊型肝炎病毒(hepatitis E virus, HEV)引起的急性病毒性肝炎, 主要流行于亚洲、非洲和中美洲的发展中国家, 即可呈散发, 也可引起暴发流行. 戊型肝炎的临床表现与甲型肝炎类似, 以感染青壮年为主, 表现为急性、自限性, 病死率小于0.1%. 然而孕妇感染HEV常出现严重的肝脏衰竭, 病死率较高, 可达20%^[1]. 最近研究又发现, 接受器官移植者、免疫功能低下的患者以及老年人HEV感染后, 能够转为慢性感染^[2,3]. 我国是戊型肝炎的流行区, 戊型肝炎严重危害我国人民的健康, 是一个重要的公共卫生问题. 研究HEV感染后机体的免疫反应对于了解HEV的致病机制、研究HEV的诊断方法以及HEV感染的预防和戊型肝炎的治疗具有重要意义. 本文将对HEV感染免疫研究进展进行综述.

1 HEV基因组及其编码蛋白

HEV的病毒体为二十面体对称结构, 直径约27-34 nm, 没有包膜. 其基因组为单股、正链RNA, 长约7.2 kb, 由一个25 nt的5'端非翻译区(UTR)、三个开放读码框架(ORF1, ORF2及ORF3)和一个约65-74 nt的末端为多聚腺苷酸(Poly A)的3'UTR组成. ORF1位于5'端, 长约5 kb, 编码一些非结构蛋白, 包括RNA合成过程中所需的鸟苷酸转移酶、甲基转移酶、半胱氨酸蛋白酶、RNA解旋酶和RNA聚合酶等^[4]. ORF2长

■背景资料

戊型肝炎病毒(HEV)是戊型肝炎的病原体, 主要通过粪-口途径经肠道传播. 戊型肝炎既可呈散发, 也可引起暴发流行, 我国是戊型肝炎的流行区. 戊型肝炎通常为急性肝炎, 但其病程与机体免疫状况有关. 孕妇感染HEV病死率较高, 器官移植或其他免疫功能低下者感染HEV可能会发展为慢性.

■同行评议者

刘正稳, 教授, 西安交通大学医学院第一附属医院感染科; 范学工, 教授, 中南大学湘雅医院感染病科

■研发前沿

对HEV感染的细胞免疫反应以及免疫损伤机制的深入研究将为疾病的预防和治疗提供新的思路和方法,因此是目前HEV感染免疫研究的重点。

约2 kb, 位居编码区的3'端, 编码病毒的衣壳蛋白. ORF3是一个小的读码框, 长度为372 nt, 在3'端与ORF2有331 nt的重叠, 编码一个具有免疫原性的不超过123个氨基酸的小分子磷蛋白. ORF3蛋白的功能尚未确定, 但发现其能够与细胞骨架蛋白^[5], 以及病毒衣壳蛋白^[6]相结合, 可能参与或调节细胞的信号传导过程^[7], 最近的研究发现ORF3蛋白与病毒复制过程中病毒体从宿主细胞内的释放有关^[8].

2 HEV感染的体液免疫反应

2.1 抗体产生的规律 HEV感染后, 可刺激机体产生抗体. 通过对散发性急性戊型肝炎患者的研究发现, HEV IgM和IgA抗体通常在发病就诊时即可检出, 发病的第6-7天IgM和IgA抗体水平达到最高, 在随后的几周略有降低, 之后在4-6 mo内迅速降低, 直至无法检出; 在发病的第9天可以检测到IgG抗体, 血清HEV IgG抗体出现时血清转氨酶(ALT)浓度处于高峰, IgG在体内持续存在的时间比较长, 8年后仍以高浓度存在^[9,10]. HEV抗体及其他感染标志物的出现规律在早期的动物感染性试验研究中也得到证实^[11].

体液免疫反应主要是由ORF2和ORF3编码蛋白刺激产生的. ORF2衣壳蛋白高度保守, 免疫原性强, 并且是细胞免疫应答的主要靶物质, 其产生的抗体具有中和性保护作用, 抗体水平高, 在体内维持时间长. ORF3蛋白可以刺激机体产生抗体, 其抗体在体内存在时间很短, 可能没有中和病毒的作用. ORF1蛋白虽然具有免疫原性, 但免疫原性弱, 并且由于不是病毒体的结构成分, 其抗体可能不具有保护作用^[12].

诊断急性戊型肝炎除了通过RT-PCR检测血清或粪便中的HEV基因组以外, 主要是通过检测新产生的HEV抗体, 尤其是特异性HEV IgM抗体. HEV-IgM抗体的检测通常应用HEV基因组ORF2和ORF3羧基端(C-端)重组蛋白作为已知抗原^[13]. 目前已经有了商品化的EIA检测试剂盒. 另外, 专门针对中和抗体的EIA检测方法也已经建立^[14].

2.2 体液免疫对机体的保护作用 抗HEV的体液免疫反应能产生足够的保护作用, 从而清除HEV或阻止HEV感染. 将HEV单克隆抗体与病毒悬液在体外混合孵育后注射动物, 或预先给动物注射单克隆抗体后再用HEV攻击动物, 单克隆抗体都能够显示出保护作用, 试验动物不发生感染^[15]. 在HEV流行地区对曾感染HEV的

人群进行长期跟踪, 发现HEV感染者体内抗体可以持续存在并且不再感染HEV^[16]. 将曾感染HEV的猴子的抗体阳性血清转移到另一个猴子体内, 再用HEV攻击时, 后者不再感染; 曾感染过HEV恢复后的猴子在接受HEV时也不再感染, 显示抗血清对病毒具有中和作用^[17,18]. 然而, 较早的研究用HEV感染者恢复后的血清进行被动免疫, 结果没有起到预防的作用, 可见单份血清中低浓度的免疫球蛋白不足以控制HEV感染^[15].

早期的免疫电镜研究还证实, 来自世界不同国家和地区的HEV病毒体存在血清学交叉免疫反应. 随后的研究证实, 来自墨西哥的Mexican HEV病毒株的ORF2和ORF3区域的基因重组蛋白与来自巴基斯坦及索马里等HEV爆发流行地区的血清能够发生反应^[9]. 基于型别相同的抗原表位的存在, 目前认为尽管感染哺乳动物和人的HEV有4个不同的基因类型, 而血清型只有1个.

2.3 HEV中和性抗原表位的定位 一般认为具有保护作用的体液免疫反应由ORF2蛋白诱导产生. ORF2衣壳蛋白抗原性强, 其抗体对HEV具有中和作用, 能够阻断病毒与敏感细胞的结合, 也可能通过加强细胞免疫清除病毒, 因此中和性抗原表位的认定主要集中于ORF2蛋白.

全长ORF2基因编码产生一个含有660个氨基酸的72 kDa蛋白, ORF2蛋白是病毒体的衣壳蛋白, 目前发现只有这一种衣壳蛋白. 根据HEV ORF2区域的核苷酸序列推测出ORF2编码蛋白的氨基酸序列, 通过化学合成或基因重组蛋白表达的方法, 可获得一系列相互重叠的ORF2基因编码的多肽片段, 以此作为抗原进行研究, 已经认定了许多线性的和空间构象的ORF2编码蛋白的抗原表位. 用ORF2区重叠的多肽片段免疫小鼠制备单克隆抗体(mAb), 通过动物病毒感染试验或细胞病毒感染试验筛选出了对HEV具有中和作用的mAb^[19-24], 进一步通过免疫印迹试验(WB试验)或酶联免疫吸附试验(ELISA)确定可与中和抗体结合的多肽片段, 从而确定了一些中和性抗原表位的位置^[19,20]. Meng等发现抗ORF2 452-617氨基酸基因重组蛋白的抗体能够与HEV结合并阻断培养细胞对HEV的吸附, 而这个单克隆抗体不与人工合成的同样序列的线性多肽结合, 因此首先确定了HEV的中和性抗原表位为立体构象, 并发现HEV基因1型Burme病毒株的中和表位位于ORF2区域452-617氨基酸间^[21]; 最近又发现基因4型HEV中和性表位

于477-613氨基酸之间, 而第477位和613位的亮氨酸(Leu477 and/or Leu613)对于这个中和表位的形成至关重要^[22], 另一个研究也证实了这段区域能够被中和抗体识别^[14]. 应用类似的方法, 禽HEV ORF2蛋白也有两个中和表位已经确定^[23].

3 HEV感染的细胞免疫反应

3.1 HEV感染细胞免疫反应的研究 与体液免疫反应相比较, 对HEV感染过程中细胞免疫反应的研究比较少, 但最近有了一些新的进展. 研究发现, HEV急性患者外周血单核细胞(peripheral blood mononuclear cell, PBMCs)中CD4⁺ T细胞数量升高, 患者PBMCs在受到ORF2抗原刺激时反应增强, 产生干扰素- γ (IFN- γ)的量明显高于对照, 而TNF- α 、IL-2和IL-4的产生量并未受影响. 可能ORF2蛋白抗原特异性地刺激PBMCs产生IFN- γ , 具有正调节作用. 这与非特异性有丝分裂原植物血凝素(phytohaemagglutinin, PHA)对PBMCs的刺激作用不同, PHA可以使上述四种细胞因子的产量提高. HEV患者血清中IL-1 β 的含量明显高于对照组. 根据此结果推断, 既不属于Th1也不属于Th2的CD4⁺ IFN- γ 分泌细胞, 可能在戊型肝炎急性患者中介导或参与了对肝细胞的损伤^[24]. 通过分离HEV感染急性期患者和正常对照的外周血单核细胞, 在体外进行培养, 用不同片段的ORF2重组蛋白进行刺激, 结果40例患者中有32个(80%)有明显的单核细胞增殖刺激增长作用, 而21个对照中只有7个(33%)表现出同样的刺激作用($P < 0.001$), 能够刺激外周血单核细胞增殖为HEV ORF2区域73-156, 289-372, 361-444和505-588的多肽片段; 而HEV ORF3的多肽片段池(peptide pools)没有诱导单核细胞的增殖作用, 表明介导细胞免疫应答的抗原表位可能存在于ORF2蛋白而非ORF3蛋白. 289-372区域的HEV ORF2蛋白片段的诱导作用与HLA-DRB1 010X等位基因的出现有关^[25].

3.2 细胞免疫反应在临床诊断中的应用 基于上述研究结果, 已经发展了高灵敏度的IFN- γ ELISPOT试验用于测定HEV感染的细胞免疫应答, 以检测是否曾经感染过HEV. 用试验性感染了HEV的猩猩以及戊型肝炎恢复后患者的血清以及PBMCs进行试验, 结果表明HEV特异性IFN- γ ELISPOT反应与抗HEV ELISA反应的试验结果高度一致. 因此, HEV特异性IFN- γ ELISPOT试验可作为另一个可选择的方法用于

HEV感染临床诊断, 还可以用于细胞免疫致病作用的研究^[26].

4 免疫损伤机制的研究

病毒感染可通过感染因子的直接作用或间接的抗宿主免疫反应引起宿主细胞的损伤. HEV感染时, IgM和IgG出现与转氨酶升高、黄疸等症状的出现时间一致, 间接表明了肝细胞损伤与抗体的产生有关^[16]. 戊型肝炎急性期, 患者淋巴细胞受抗原刺激后的增殖反应明显增强^[27]. 因此, 体液免疫和细胞免疫反应可能在HEV感染的肝细胞损伤过程中都起重要作用.

孕妇感染HEV, 肝损伤严重, 病死率高达20%. 对患急性戊型肝炎的孕妇进行免疫学指标的测定, 并与未怀孕的戊型肝炎急性患者、健康孕妇、健康非孕妇女相比较, 结果显示急性戊型肝炎孕妇PBMCs对PHA刺激的反应性明显低于健康孕妇和健康非孕妇女, 而HEV急性患者-无论在孕妇或非孕妇, 淋巴细胞受抗原刺激后的增殖反应要明显升高. 患急性戊型肝炎的孕妇PHA和HEV抗原刺激PBMCs产生的Th1细胞因子显著降低, 而Th2细胞因子明显升高. 因此认为, HEV感染孕妇高死亡率的原因可能与细胞介导的免疫反应以及Th1/Th2产生的细胞因子比例有关^[27].

5 HEV疫苗的研制

HEV ORF2编码区的氨基酸序列保守, 病毒衣壳蛋白的抗原性稳定, 只有一个血清型, 甚至最近发现的禽HEV(暂定为基因5型)与1-4型HEV也存在交叉免疫^[28,29]; HEV感染后, 体内可产生具有中和性保护作用的抗体, 抗体在体内存在时间较长, 学者们一致认为能够制备有效的HEV疫苗用以预防HEV感染. 由于ORF2所编码的衣壳蛋白高度保守、抗原性强、其抗体具有中和性保护作用, 并且是引起细胞免疫应答的主要抗原^[30-32], 因此, HEV疫苗的研究瞄准了ORF2区域或其编码蛋白.

与其他病毒疫苗的研制一样, 目前正在研制的HEV疫苗的种类主要有DNA疫苗、HEV假病毒疫苗以及HEV重组蛋白疫苗, 而进展最快的当属美国国立卫生研究院(NIH)Purcell领导的课题组研制的ORF2重组蛋白疫苗^[33]. 他们应用昆虫细胞/杆状病毒载体系统表达ORF2蛋白片段, 在昆虫细胞内, 内切酶将衣壳蛋白依次切割为逐渐递减的小片段, 首先切去氨基端一段111 aa

■创新盘点

本文对HEV感染后的体液免疫反应、细胞免疫反应、免疫损伤机制以及HEV疫苗的研制等多个方面的最新研究进展进行了综述.

■同行评价

本文阐述清晰, 对了解HEV的致病机制、HEV的诊断方法以及HEV感染的预防和戊型肝炎的治疗具有一定意义。

信号序列样, 接着从羧基端相继进行切割, 得到63、62、56、53 kDa的片段。研究发现, 62 kDa和56 kDa的片段保护性最好, 而56 kDa的片段最稳定。因为有些中和抗原表位在自然情况下为空间立体结构, 维持这些蛋白的自然结构也非常必要。应用恒河猴进行的临床前期的试验表明, 56 kDa重组蛋白对感染的预防功效为83%, 对试验中用HEV 1、2、3型病毒攻击的猴子的保护率为100%。基于动物(猴子)试验显示的良好保护作用, 葛兰素史克公司(GSK)采用双盲随机试验在尼泊尔高危人群中进行了临床II阶段试验, 尼泊尔军人志愿者参与试验, 其中半数人接种疫苗, 另一半人接受安慰剂, 分3个剂量, 分别在0、1、6 mo时进行接种, 随后进行跟踪观察。结果表明疫苗的保护率为95.5%, 而只接种两个剂量的疫苗, 保护率仍可达87%^[1,15]。然而, 目前并没有获得批准的HEV疫苗实际应用于HEV感染的预防。

6 结论

HEV感染机体后的免疫反应主要由HEV ORF2和ORF3蛋白引起, 体液免疫和细胞免疫同时存在。目前已经定位了一些抗原表位, 中和性抗原表位主要存在于ORF2蛋白。研究表明HEV感染后的肝细胞损伤与免疫反应有关, 但免疫损伤机制仍需进一步研究。HEV疫苗的研究主要基于ORF2区域或其编码蛋白, ORF2 56 kDa的基因重组蛋白疫苗经过临床试验已经证明能够有效预防HEV感染, 但目前尚没有获得批准的HEV疫苗。

7 参考文献

- Purcell RH, Emerson SU. Hepatitis E: an emerging awareness of an old disease. *J Hepatol* 2008; 48: 494-503
- Aggarwal R. Hepatitis E: does it cause chronic hepatitis? *Hepatology* 2008; 48: 1328-1330
- Kamar N, Selves J, Mansuy JM, Ouezani L, Péron JM, Guitard J, Cointault O, Esposito L, Abravanel F, Danjoux M, Durand D, Vinel JP, Izopet J, Rostaing L. Hepatitis E virus and chronic hepatitis in organ-transplant recipients. *N Engl J Med* 2008; 358: 811-817
- Panda SK, Thakral D, Rehman S. Hepatitis E virus. *Rev Med Virol* 2007; 17: 151-180
- Zafrullah M, Ozdener MH, Panda SK, Jameel S. The ORF3 protein of hepatitis E virus is a phosphoprotein that associates with the cytoskeleton. *J Virol* 1997; 71: 9045-9053
- Tyagi S, Korkaya H, Zafrullah M, Jameel S, Lal SK. The phosphorylated form of the ORF3 protein of hepatitis E virus interacts with its non-glycosylated form of the major capsid protein, ORF2. *J Biol Chem*

- 2002; 277: 22759-22767
- Korkaya H, Jameel S, Gupta D, Tyagi S, Kumar R, Zafrullah M, Mazumdar M, Lal SK, Xiaofang L, Sehgal D, Das SR, Sahal D. The ORF3 protein of hepatitis E virus binds to Src homology 3 domains and activates MAPK. *J Biol Chem* 2001; 276: 42389-42400
- Yamada K, Takahashi M, Hoshino Y, Takahashi H, Ichiyama K, Nagashima S, Tanaka T, Okamoto H. ORF3 protein of hepatitis E virus is essential for virion release from infected cells. *J Gen Virol* 2009; 90: 1880-1891
- Seriwatana J, Shrestha MP, Scott RM, Tsarev SA, Vaughn DW, Myint KS, Innis BL. Clinical and epidemiological relevance of quantitating hepatitis E virus-specific immunoglobulin M. *Clin Diagn Lab Immunol* 2002; 9: 1072-1078
- Takahashi M, Kusakai S, Mizuo H, Suzuki K, Fujimura K, Masuko K, Sugai Y, Aikawa T, Nishizawa T, Okamoto H. Simultaneous detection of immunoglobulin A (IgA) and IgM antibodies against hepatitis E virus (HEV) is highly specific for diagnosis of acute HEV infection. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 49-56
- Tsarev SA, Emerson SU, Reyes GR, Tsareva TS, Legters LJ, Malik IA, Iqbal M, Purcell RH. Characterization of a prototype strain of hepatitis E virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992; 89: 559-563
- Sehgal D, Thomas S, Chakraborty M, Jameel S. Expression and processing of the Hepatitis E virus ORF1 nonstructural polyprotein. *Virol J* 2006; 3: 38
- Li TC, Zhang J, Shinzawa H, Ishibashi M, Sata M, Mast EE, Kim K, Miyamura T, Takeda N. Empty virus-like particle-based enzyme-linked immunosorbent assay for antibodies to hepatitis E virus. *J Med Virol* 2000; 62: 327-333
- Zhou YH, Purcell RH, Emerson SU. An ELISA for putative neutralizing antibodies to hepatitis E virus detects antibodies to genotypes 1, 2, 3, and 4. *Vaccine* 2004; 22: 2578-2585
- Mushahwar IK. Hepatitis E virus: molecular virology, clinical features, diagnosis, transmission, epidemiology, and prevention. *J Med Virol* 2008; 80: 646-658
- Bryan JP, Tsarev SA, Iqbal M, Ticehurst J, Emerson S, Ahmed A, Duncan J, Rafiqui AR, Malik IA, Purcell RH. Epidemic hepatitis E in Pakistan: patterns of serologic response and evidence that antibody to hepatitis E virus protects against disease. *J Infect Dis* 1994; 170: 517-521
- Arankalle VA, Chadha MS, Chobe LP. Long-term serological follow up and cross-challenge studies in rhesus monkeys experimentally infected with hepatitis E virus. *J Hepatol* 1999; 30: 199-204
- Tsarev SA, Tsareva TS, Emerson SU, Govindarajan S, Shapiro M, Gerin JL, Purcell RH. Successful passive and active immunization of cynomolgus monkeys against hepatitis E. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; 91: 10198-10202
- Takahashi M, Hoshino Y, Tanaka T, Takahashi H, Nishizawa T, Okamoto H. Production of monoclonal antibodies against hepatitis E virus capsid protein and evaluation of their neutralizing activity in a cell culture system. *Arch Virol* 2008; 153: 657-666
- Schofield DJ, Glamann J, Emerson SU, Purcell RH. Identification by phage display and characterization of two neutralizing chimpanzee monoclonal

- antibodies to the hepatitis E virus capsid protein. *J Virol* 2000; 74: 5548-5555
- 21 Meng J, Dai X, Chang JC, Lopareva E, Pillot J, Fields HA, Khudyakov YE. Identification and characterization of the neutralization epitope(s) of the hepatitis E virus. *Virology* 2001; 288: 203-211
 - 22 Zhang H, Dai X, Shan X, Meng J. The Leu477 and Leu613 of ORF2-encoded protein are critical in forming neutralization antigenic epitope of hepatitis E virus genotype 4. *Cell Mol Immunol* 2008; 5: 447-456
 - 23 Zhou EM, Guo H, Huang FF, Sun ZF, Meng XJ. Identification of two neutralization epitopes on the capsid protein of avian hepatitis E virus. *J Gen Virol* 2008; 89: 500-508
 - 24 Srivastava R, Aggarwal R, Jameel S, Puri P, Gupta VK, Ramesh VS, Bhatia S, Naik S. Cellular immune responses in acute hepatitis E virus infection to the viral open reading frame 2 protein. *Viral Immunol* 2007; 20: 56-65
 - 25 Aggarwal R, Shukla R, Jameel S, Agrawal S, Puri P, Gupta VK, Patil AP, Naik S. T-cell epitope mapping of ORF2 and ORF3 proteins of human hepatitis E virus. *J Viral Hepat* 2007; 14: 283-292
 - 26 Shata MT, Barrett A, Shire NJ, Abdelwahab SF, Sobhy M, Daef E, El-Kamary SS, Hashem M, Engle RE, Purcell RH, Emerson SU, Strickland GT, Sherman KE. Characterization of hepatitis E-specific cell-mediated immune response using IFN- γ ELISPOT assay. *J Immunol Methods* 2007; 328: 152-161
 - 27 Pal R, Aggarwal R, Naik SR, Das V, Das S, Naik S. Immunological alterations in pregnant women with acute hepatitis E. *J Gastroenterol Hepatol* 2005; 20: 1094-1101
 - 28 Huang W, Zhang H, Harrison TJ, Lang S, Huang G, Wang Y. Cross-protection of hepatitis E virus genotypes 1 and 4 in rhesus macaques. *J Med Virol* 2008; 80: 824-832
 - 29 Guo H, Zhou EM, Sun ZF, Meng XJ, Halbur PG. Identification of B-cell epitopes in the capsid protein of avian hepatitis E virus (avian HEV) that are common to human and swine HEVs or unique to avian HEV. *J Gen Virol* 2006; 87: 217-223
 - 30 Im SW, Zhang JZ, Zhuang H, Che XY, Zhu WF, Xu GM, Li K, Xia NS, Ng MH. A bacterially expressed peptide prevents experimental infection of primates by the hepatitis E virus. *Vaccine* 2001; 19: 3726-3732
 - 31 Zhang M, Emerson SU, Nguyen H, Engle R, Govindarajan S, Blackwelder WC, Gerin J, Purcell RH. Recombinant vaccine against hepatitis E: duration of protective immunity in rhesus macaques. *Vaccine* 2002; 20: 3285-3291
 - 32 Purcell RH, Nguyen H, Shapiro M, Engle RE, Govindarajan S, Blackwelder WC, Wong DC, Prieels JP, Emerson SU. Pre-clinical immunogenicity and efficacy trial of a recombinant hepatitis E vaccine. *Vaccine* 2003; 21: 2607-2615
 - 33 Shrestha MP, Scott RM, Joshi DM, Mammen MP Jr, Thapa GB, Thapa N, Myint KS, Fourneau M, Kushner RA, Shrestha SK, David MP, Seriwatana J, Vaughn DW, Safary A, Endy TP, Innis BL. Safety and efficacy of a recombinant hepatitis E vaccine. *N Engl J Med* 2007; 356: 895-903

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

ISSN 1009-3079 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)

慢性HBV感染YMDD自然变异的研究进展

屈军校, 曾庆磊, 徐光华

■背景资料

慢性乙型肝炎(CHB)主要治疗方法是抗病毒治疗。目前抗HBV的药物主要有两大类,一类是干扰素(IFN),另一类是核苷类似物(NA)。IFN的疗效相对确定,但不良反应相对多见,且一般不用于某些病情(如失代偿期肝硬化)。NA使用方便、价格相对低廉、疗效相对确切且耐受性较好,其中拉米夫定目前在临床上应用最广;但长期使用NA可导致HBV变异并对其产生耐药性。主要是由于HBV在复制过程中要经过一个逆转录过程,经逆转录形成HBV DNA的负链,这一过程是在HBV DNA P的指导下完成的,由于HBV DNA P缺乏校正功能,所以HBV在复制过程中具有较高的自然变异率。

屈军校, 曾庆磊, 徐光华, 延安大学附属医院感染病科 陕西省延安市 716000

延安大学科技计划基金资助项目, No. 2007

作者贡献分布: 屈军校与曾庆磊对此文所作贡献均等; 本文由徐光华审核。

通讯作者: 曾庆磊, 716000, 陕西省延安市, 延安大学附属医院感染病科, zengqinglei2009@163.com

电话: 0911-8261714

收稿日期: 2009-12-13 修回日期: 2010-01-18

接受日期: 2010-01-26 在线出版日期: 2010-03-28

Advances in research on natural YMDD mutations in the hepatitis B virus DNA polymerase in patients with chronic hepatitis B

Jun-Xiao Qu, Qing-Lei Zeng, Guang-Hua Xu

Jun-Xiao Qu, Qing-Lei Zeng, Guang-Hua Xu, Department of Infectious Diseases, the Affiliated Hospital of Yan'an University, Yan'an 716000, Shaanxi Province, China
Supported by: the Yan'an Municipal Science and Technology Program, No. 2007

Correspondence to: Qing-Lei Zeng, Department of Infectious Diseases, the Affiliated Hospital of Yan'an University, Yan'an 716000, Shaanxi Province, China. zengqinglei2009@163.com

Received: 2009-12-13 Revised: 2010-01-18

Accepted: 2010-01-26 Published online: 2010-03-28

Abstract

Mutations of the hepatitis B virus (HBV) DNA polymerase, mainly occurring in the YMDD region, are related to resistance to lamivudine. Although these mutations often occur after lamivudine use, they can also emerge naturally. Many scholars have demonstrated the existence of natural YMDD mutations. Although many methods are currently used to detect YMDD mutations, a unified approach for detection of YMDD mutations is still unavailable. The emergence of YMDD mutations may be associated with HBV DNA levels and genotypes.

Key Words: Hepatitis B virus; YMDD; Natural mutation

Qu JX, Zeng QL, Xu GH. Advances in research on natural YMDD mutations in the hepatitis B virus DNA polymerase in patients with chronic hepatitis B. *Shijie*

Huaren Xiaohua Zazhi 2010; 18(9): 902-905

摘要

HBV DNA聚合酶(polymerase, P)的变异主要发生在YMDD区域,并与拉米夫定的耐药有关。尽管这些变异株会在应用拉米夫定之后出现,但是他们也会"自然产生"。很多学者都已证实了YMDD自然变异株的存在。目前检测YMDD变异的方法有多种,但还没有一个完全统一的方法。HBV YMDD变异可能与HBV DNA水平及其基因型等有一定的关系。

关键词: 乙型肝炎病毒; YMDD; 自然变异

屈军校, 曾庆磊, 徐光华. 慢性HBV感染YMDD自然变异的研究进展. 世界华人消化杂志 2010; 18(9): 902-905

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/902.asp>

0 引言

慢性乙型肝炎(chronic hepatitis B, CHB)是我国最主要的慢性肝炎类型, CHB主要的治疗方法是抗病毒治疗。目前抗HBV的药物主要有两大类,一类是干扰素(interferon, IFN),另一类是核苷类似物(nucleoside analogue, NA)。IFN的疗效相对确定,但不良反应相对多见,且一般不用于某些病情(如失代偿期肝硬化)。NA使用方便、价格相对低廉、疗效相对确切且耐受性较好,其中拉米夫定目前在临床上应用最广;但长期使用NA可导致HBV变异并对其产生耐药性。主要是由于HBV在复制过程中要经过一个逆转录过程,经逆转录形成HBV DNA的负链,这一过程是在HBV DNA P的指导下完成的,由于HBV DNA P缺乏校正功能,所以HBV在复制过程中具有较高的自然变异率^[1],且每24 h可以产生 3.2×10^{10} - 10^{11} 含有单一位点突变的HBV DNA^[2]。最常见的是HBV DNA P基因的酪氨酸-蛋氨酸-天门冬氨酸-天门冬氨酸(YMDD)区域发生变异,主要突变为YI(异亮氨酸)DD或YV(缬氨酸)DD,即由YMDD变异为YIDD(rtM204I)或YVDD(rtM204V),在抗病毒药物的压力下变异

■同行评议者

高润平, 教授, 吉林大学第一医院肝病科

率可能更高^[3], 从而会影响抗病毒的疗效. HBV自然变异可能会对抗病毒治疗提出一定的挑战.

1 HBV感染发生其DNA P基因YMDD自然变异

在应用NA(特别是拉米夫定)之后易出现HBV DNA P基因的YMDD变异, 实际上有些患者体内HBV变异株与野生株共存, 只是野生株占优势, 不易被一般检测方法检测, 长期的药物作用抑制了野生株的复制, 此时耐药的变异株成了优势株, 临床上就会表现出耐药^[4]. 近年日本学者检测18例未经拉米夫定和其他抗病毒药物治疗的HBV无症状携带者, 且ALT保持正常范围1年以上, 结果发现有5例发生了YMDD变异, 证明了HBV无症状携带者YMDD变异是自然存在的^[5,6]. 韩国学者^[7]报道40例未经拉米夫定治疗的CHB患者中发现有3例患者出现YMDD基因序列变异, 变异率为7.5%. 中国学者研究196例未经抗病毒治疗的CHB患者中有21例发生YMDD变异, 其中20例为YVDD变异、1例为YIDD变异^[8]. 研究还发现肝硬化患者中也存在YMDD自然变异的现象, 变异率为26.41%^[9]. 以上主要是东亚的报道, 而伊朗学者发现没有接受拉米夫定治疗的CHB患者YMDD变异率为0%^[10].

2 HBV DNA P基因YMDD变异的检测方法

2.1 核酸序列分析 核酸的序列测定是所有其他快速简便检测变异技术的基础, 是最直接最基本的检测点变异的方法. 大部分测序的基本原理均采用Sanger发明的双脱氧DNA链末端终止法. 其基本原理为: DNA链在进行复制时, 在DNA P作用下以互补单链DNA为模板, 以带有3'-OH末端的单链寡核苷酸为引物, 不断地将4种dNTP(dATP、dTTP、dCTP、dGTP)加到新生链的3'-OH末端, dNTP为单脱氧核糖核酸, 即脱去了第二位C原子上的氧原子, 而第三位C原子上的氧原子能够与另一dNTP第五位C原子上的磷酸基团形成3'、5'磷酸二酯键, 双脱氧核糖核酸(ddNTP)的第三位C原子上的氧原子也被脱去, 这样在DNA合成过程中, 他能够与正常核苷酸形成磷酸二酯键, 但由于其3'-OH中氧原子的脱去而不能与下一个核苷酸形成3'、5'磷酸二酯键, 延伸中的DNA链被终止. 所以在进行DNA延伸时当dNTP掺入时, 链能够继续延伸, 而当ddNTP掺入时, 链被终止, 由于ddNTP的掺入是随机的, 能够发生在链延伸的任何一点, 这样便形成相差仅一个碱基的大小不等的一系列DNA片段, 经聚丙烯酰胺凝胶电泳, 放射自显影后即

可读出所测DNA的序列. 这种直接测序是HBV测序的经典方法, 但是敏感性低, 只有当变异病毒占总病毒的25%以上时才能被检测到^[11].

2.2 双寡聚核苷酸引物技术 此项技术为韩国Seegene公司的专利技术, 这种设计独特的双寡聚核苷酸引物(dual priming oligonucleotide, DPO)技术为多重PCR技术的应用提供了新的前景. DPO引物由5'端、多聚脱氧次黄嘌呤核苷区和3'端三部分组成. PCR扩增时, 多聚脱氧次黄嘌呤核苷区并不与模板结合, 而是形成了泡状突起, 使引物的5'端和3'端各具不同的功能: 5'端的18-25个碱基起始引物与模板结合起固定作用, 3'端的6-12个碱基决定着引物的特异性延伸, 两者相互作用, 既保证扩增的特异性, 又大大提高了扩增效率; DPO引物与模板发生错配的几率很小, 一旦有三个以上碱基错配, 就不会成功扩增^[12]. 此方法通过简单的引物设计便极大地提高了PCR的敏感度与特异性, 应用DPO引物的这一特点该方法可用于检测基因突变, 采用此技术通过多重PCR可同时检测rtM204I/V/S和rtL180M变异, 检测灵敏度为 1×10^3 拷贝/mL, 能检测出最少2%的变异株^[13,14]. 目前已开发出用于拉米夫定耐药检测的试剂盒. 此外这种基于DPO技术的多重PCR还可以用于幽门螺杆菌的检测^[15]. 该方法具有较高的灵敏度和特异性, 操作简单, 性价比高, 将是一种很有前途的检测YMDD变异的方法.

2.3 MGB-Taqman探针实时PCR法 目前国内已有经国家食品药品监督管理局批准的用于检测拉米夫定耐药的试剂盒. Taqman探针是实时PCR常用的探针, 用于变异株的检测又称为3'核酸酶法. 将MGB(minor groove binder)结合到Taqman探针的3'端不仅可以有效提高探针的退火温度, 还可以显著降低错配序列与探针的退火温度, 使MGB-Taqman探针较普通Taqman探针在检测单核苷酸变异时具有更高的敏感性与特异性. 该法检测YVDD和YIDD的灵敏度可精确到10和50拷贝, 最少能测出10%的变异株; 用该方法在一项21份样本的YMDD检测中, 有15例检测出YMDD变异株阳性, 而直接测序和反向杂交的阳性数分别为11例和9例; 提示MGB-Taqman探针实时PCR法是检测YMDD变异灵敏的准确的方法^[16]. 研究发现该方法应用于YMDD多重变异更具临床意义^[17].

2.4 扩增阻碍突变系统(amplification refractory mutation system, ARMS) ARMS于1989年建立,

■研发前沿

YMDD的变异和自然变异与血清病毒载量等有一定的关系. 在应用NA抗病毒治疗前检测YMDD变异有重要意义, 但目前检测YMDD自然变异尚没有一个公认统一的标准.

■相关报道

最常见的是HBV DNA P基因的酪氨酸-蛋氨酸-天门冬氨酸-天门冬氨酸(YMDD)区域发生变异,主要突变为YI(异亮氨酸)DD或YV(缬氨酸)DD,即由YMDD变异为YIDD(rtM204I)或YVDD(rtM204V),在抗病毒药物的压力下变异率可能更高,从而会影响抗病毒的疗效。HBV自然变异可能会对抗病毒治疗提出一定的挑战。

是PCR技术应用的发展,也有学者将其译为放大受阻突变系统,也称等位基因特异性扩增法(allele-specific amplification, ASA)。该方法是基于引物3'端错配PCR的方法,如引物3'端碱基与模板错配会导致Taq酶扩增效率下降。根据这个原理设计引物3'端与HBV耐药株序列互补而与野生株错配,此时PCR反应将选择性扩增变异株,这种方法称放大受阻突变PCR(ARMS-PCR),该方法在 10^5 - 10^9 拷贝/mL的野生株病毒内可最低检测到0.01%变异株。研究发现该方法联合分子信标技术可在YMDD变异株成为优势株前进行有效的预测^[11]。

不同的方法在灵敏度、特异性、性价比等方面各有优缺点,虽然YMDD变异株的临床与科研需要检测方法标准化,但是目前还不能确定哪一种方法是检测的"金标准"。

3 HBV DNA P基因YMDD变异的相关性研究

3.1 HBV DNA P基因YMDD变异与部分血清学标志物水平的关系 在拉米夫定治疗中,发生YMDD变异病例的HBV DNA载量明显高于无变异者, DNA载量小于 10^5 拷贝/mL的很少发生变异;治疗前HBV DNA高载量提示治疗期间发生YMDD变异的概率要大,所以治疗前的病毒载量对治疗中YMDD变异具有指示性作用,且ALT与HBV DNA的相互关联能够指导临床对NA的合理应用^[18-20]。如果治疗前HBeAg阳性且ALT和DNA水平较高,这种病例发生YMDD变异的可能性较大,最终可能导致病情反弹^[21]。

3.2 HBV DNA P基因YMDD变异与HBV基因型的关系 P基因YMDD变异与性别、国家、家族聚集史没有直接关联,跟病程和病情的严重程度有一定的关系;HBV的C基因型发生YVDD(rtM204V)变异100%伴随rtL180M变异,其发生rtL180M/M204V明显高于B基因,而且C基因型不发生点变异,rtM204I和rtL180M发生的点变异只存在于B基因型^[20,22],总体来说B基因型更易发生YMDD自然变异^[8]。与B基因型相比C基因型在发生耐药后HBV DNA的载量会更高,HBV基因型、治疗前ALT和DNA水平可作为独立的因素用于判断YMDD变异的模式^[23]。

4 结论

拉米夫定易导致HBV DNA P基因发生YMDD变异,事实上有些患者体内HBV变异株与野生株共存,只是野生株占优势,一般的检测方法不易

将其检测出来。YMDD的变异和自然变异与血清病毒载量等有一定的关系。在应用NA抗病毒治疗前检测YMDD变异有重要意义,但目前检测YMDD自然变异尚没有一个公认统一的标准。

5 参考文献

- 1 Ganem D, Prince AM. Hepatitis B virus infection--natural history and clinical consequences. *N Engl J Med* 2004; 350: 1118-1129
- 2 Villet S, Billioud G, Pichoud C, Lucifora J, Hantz O, Sureau C, Dény P, Zoulim F. In vitro characterization of viral fitness of therapy-resistant hepatitis B variants. *Gastroenterology* 2009; 136: 168-176.e2
- 3 Conzelmann I, Wintermeyer P, Wirth S, Radke R, Gerner P. Complete hepatitis B virus genome analysis in chronically infected children before and during lamivudine treatment. *J Med Virol* 2005; 77: 194-202
- 4 Kobayashi S. Clinical characteristics of asymptomatic hepatitis B virus carriers with YMDD mutant not treated with lamivudine. *Kurume Med J* 2003; 50: 87-90
- 5 Kobayashi S, Ide T, Sata M. Detection of YMDD motif mutations in some lamivudine-untreated asymptomatic hepatitis B virus carriers. *J Hepatol* 2001; 34: 584-586
- 6 Akarsu M, Sengonul A, Tankurt E, Sayiner AA, Topalak O, Akpinar H, Abacioglu YH. YMDD motif variants in inactive hepatitis B carriers detected by Inno-Lipa HBV DR assay. *J Gastroenterol Hepatol* 2006; 21: 1783-1788
- 7 Shin YM, Heo J, Kim GH, Kang DH, Song GA, Cho M, Yang US, Kim CM, Park HK, Jang HJ. [Natural YMDD motif mutations of HBV polymerase in the chronic hepatitis B virus infected patients] *Taehan Kan Hakhoe Chi* 2003; 9: 1-9
- 8 Min XC, Miao XH, Zhao SM, Zhao KK, Yang DG. [The spontaneous YMDD mutation rate in chronic hepatitis B patients.] *Zhonghua Ganzangbing Zazhi* 2009; 17: 887-890
- 9 屈军校, 刘蓉, 任迎全, 冯继红. 乙肝肝硬化发生HBV YMDD自然变异的探讨. *临床肝胆病杂志* 2008; 24: 116-117
- 10 Ramezani A, Velayati AA, Roshan MR, Gachkar L, Banifazl M, Keyvani H, Aghakhani A. Rate of YMDD motif mutants in lamivudine-untreated Iranian patients with chronic hepatitis B virus infection. *Int J Infect Dis* 2008; 12: 252-255
- 11 Ntziora F, Paraskevis D, Haida C, Magiorkinis E, Manesis E, Papatheodoridis G, Manolakopoulos S, Beloukas A, Chrysosy S, Magiorkinis G, Sypsa V, Hatzakis A. Quantitative detection of the M204V hepatitis B virus minor variants by amplification refractory mutation system real-time PCR combined with molecular beacon technology. *J Clin Microbiol* 2009; 47: 2544-2550
- 12 Chun JY, Kim KJ, Hwang IT, Kim YJ, Lee DH, Lee IK, Kim JK. Dual priming oligonucleotide system for the multiplex detection of respiratory viruses and SNP genotyping of CYP2C19 gene. *Nucleic Acids Res* 2007; 35: e40
- 13 Kim JK, Lee HJ, Lee YJ, Chun JY, Lee IK, Lim YS, Suh DJ, Ko SY, Kim MH, Oh HB. Direct detection of lamivudine-resistant hepatitis B virus mutants by a multiplex PCR using dual-priming oligonucleotide

- primers. *J Virol Methods* 2008; 149: 76-84
- 14 Woo HY, Park H, Kim BI, Jeon WK, Kim YJ. Evaluation of dual priming oligonucleotide-based multiplex PCR for detection of HBV YMDD mutants. *Arch Virol* 2008; 153: 2019-2025
- 15 Woo HY, Park DI, Park H, Kim MK, Kim DH, Kim IS, Kim YJ. Dual-priming oligonucleotide-based multiplex PCR for the detection of *Helicobacter pylori* and determination of clarithromycin resistance with gastric biopsy specimens. *Helicobacter* 2009; 14: 22-28
- 16 Hua R, Tanaka Y, Fukai K, Tada M, Seto M, Asaoka Y, Ohta M, Goto T, Kanai F, Kato N, Yoshida H, Kawabe T, Yokosuka O, Omata M. Rapid detection of the hepatitis B virus YMDD mutant using TaqMan-minor groove binder probes. *Clin Chim Acta* 2008; 395: 151-154
- 17 Yoshida S, Hige S, Yoshida M, Yamashita N, Fujisawa S, Sato K, Kitamura T, Nishimura M, Chuma M, Asaka M, Chiba H. Quantification of lamivudine-resistant hepatitis B virus mutants by type-specific TaqMan minor groove binder probe assay in patients with chronic hepatitis B. *Ann Clin Biochem* 2008; 45: 59-64
- 18 Kong LH, Gao SX, Gui YP, Liu WH. [Relationship between hepatitis B virus YMDD mutation and serum viral DNA loadings] *Nanfang Yike Daxue Xuebao* 2007; 27: 1262-1263
- 19 Kobayashi M, Suzuki F, Akuta N, Yatsuji H, Hosaka T, Sezaki H, Kobayashi M, Kawamura Y, Suzuki Y, Arase Y, Ikeda K, Mineta R, Iwasaki S, Watahiki S, Kumada H. Correlation of YMDD mutation and breakthrough hepatitis with hepatitis B virus DNA and serum ALT during lamivudine treatment. *Hepatol Res* 2009 Sep 25. [Epub ahead of print]
- 20 Cao XX, Li J, Qiu LM, Luo YW, Chen YH, Ran Y. [Identification of factors associated with YMDD mutation in patients with chronic hepatitis B receiving lamivudine treatment] *Zhonghua Ganzangbing Zazhi* 2009; 17: 641-644
- 21 Kim do Y, Ahn SH, Lee HW, Park JY, Kim SU, Paik YH, Lee KS, Han KH, Chon CY. Clinical course of virologic breakthrough after emergence of YMDD mutations in HBeAg-positive chronic hepatitis B. *Intervirology* 2008; 51: 293-298
- 22 Masaadeh HA, Hayajneh WA, Alqudah EA. Hepatitis B virus genotypes and lamivudine resistance mutations in Jordan. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 7231-7234
- 23 Pan XP, Li LJ, Du WB, Li MW, Cao HC, Sheng JF. Differences of YMDD mutational patterns, precore/core promoter mutations, serum HBV DNA levels in lamivudine-resistant hepatitis B genotypes B and C. *J Viral Hepat* 2007; 14: 767-774

■同行评价

本文论述层次清晰, 文献复习全面, 对临床医生合理认识和使用核苷类似物抗病毒治疗具有指导意义。

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2010年版权归世界华人消化杂志

●消息●

《中国期刊引证报告(扩刊版)》发布《世界华人消化杂志》 2008年影响因子0.729

本刊讯 《中国期刊引证报告(扩刊版)》是依托中国科学技术信息研究所国家工程技术数字图书馆“知识服务”系统, 在“万方数据-数字化期刊群”基础上, 结合中国科技论文与引文数据库(CSTPCD), 以我国正式出版的各学科6108种中英文期刊为统计源期刊。对全部期刊的引文数据, 严格按题名、作者、刊名、年、卷、期、页等进行分项切分后, 进行规范化处理和有效链接, 经统计分析, 编制而成。2008年《世界华人消化杂志》总被引频次3683次, 影响因子0.729, 即年指标0.142, 引用期刊数732, 学科扩散指标0.533, 被引半衰期4.303, H指数8。(编辑部主任: 李军亮 2010-01-08)

瞬时弹性扫描仪在肝纤维化诊断中的应用价值

朱霞, 唐红

■背景资料

肝脏活检目前仍然是诊断肝脏纤维化的金标准, 但是由于肝活检的有创性和抽样误差限制了其在临床的使用, Fibroscan是近年内研发的无创、简便的测定肝脏纤维化的仪器, 其诊断的价值对临床有指导作用。

朱霞, 唐红, 四川大学华西医院感染性疾病中心 生物治疗国家重点实验室(四川大学)感染性疾病研究室 四川省成都市 610041
国家“十一五”科技重大专项基金资助项目, No. 2008ZX10002-006
四川省重大科技专项基金资助项目, No. 2008SZ0039
作者贡献分布: 朱霞对此文撰写主要贡献; 文章思路由唐红提出并提供基金支持; 唐红对文章进行审阅并提出修改意见。
通讯作者: 唐红, 教授, 610041, 四川省成都市, 四川大学华西医院感染性疾病中心, htang6198@hotmail.com
电话: 028-85422647
收稿日期: 2009-11-19 修回日期: 2010-01-20
接受日期: 2010-01-26 在线出版日期: 2010-03-28

Application value of Fibroscan in the diagnosis of hepatic fibrosis

Xia Zhu, Hong Tang

Xia Zhu, Hong Tang, Center for Infectious Diseases, West China Hospital, Sichuan University; Division of Infectious Diseases, State Key Laboratory of Biotherapy (Sichuan University), Chengdu 610041, Sichuan Province, China
Supported by: the National Key Technology Research and Development Program of China during the 11th Five-Year Plan Period, No. 2008ZX10002-006, and the Major Science and Technology Project of Sichuan Province, No. 2008SZ0039

Correspondence to: Professor Hong Tang, Center for Infectious Diseases, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, Sichuan Province, China. htang6198@hotmail.com
Received: 2009-11-19 Revised: 2010-01-20
Accepted: 2010-01-26 Published online: 2010-03-28

Abstract

Fibroscan (FS) is a novel non-invasive method to assess hepatic fibrosis in patients with chronic liver disease by measuring liver stiffness. It is a rapid and user-friendly technique that can be easily performed with immediate results and good reproducibility. So far, FS has been used not only in patients with chronic hepatitis C but also in those with chronic liver diseases of other etiologies, such as chronic hepatitis B, alcoholic liver disease, and non-alcoholic liver disease. Moreover, FS appears to be an excellent tool for early detection of cirrhosis and complications of cirrhosis. As FS has excellent patient acceptance, it is useful for monitoring fibrosis progression and regression in the individual case. However,

some influencing factors and certain limitations exist in the clinical application of FS. The aim of this article is to review the application value of FS in the diagnosis of hepatic fibrosis.

Key Words: Fibroscan; Hepatic fibrosis; Application value

Zhu X, Tang H. Application value of Fibroscan in the diagnosis of hepatic fibrosis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(9): 906-912

摘要

瞬时弹性扫描仪(Fibroscan, FS)是一种新型的、无创性的通过测定肝脏硬度值来评估慢性肝脏疾病患者肝纤维化程度的仪器。它具有操作简单、快速、重复性好等优点。目前, FS不仅用于慢性丙型肝炎患者肝纤维化的测定, 也可用于其他原因引起的肝脏疾病的肝纤维化测定。FS对测定早期肝硬化及合并肝硬化并发症患者的肝脏硬度值有较大的价值。由于FS能被患者普遍接受及可以重复测定, 因此可用于监测肝脏纤维化的进展或逆转, 指导临床治疗。但FS在临床应用中也存在一些影响因素和一定局限性。本文就FS在肝纤维化诊断方面的应用价值作一综述。

关键词: 瞬时弹性扫描仪; 肝纤维化; 应用价值

朱霞, 唐红. 瞬时弹性扫描仪在肝纤维化诊断中的应用价值. 世界华人消化杂志 2010; 18(9): 906-912
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/906.asp>

0 引言

肝脏纤维化是所有慢性肝脏疾病进展的结果^[1], 是肝硬化发展过程中的中间环节, 在代偿期肝硬化的患者中, 每年发展成失代偿期肝硬化, 肝癌的比例及死亡率分别为4%、3%、3%^[2]。对肝纤维化的早期诊断有助于预测疾病的后果及早期制定合理治疗方案, 从而延缓肝纤维化发展成肝硬化甚至肝癌的进程。肝纤维化的诊断方法在最近几年进展很快, 研发无创性的、可靠的测定肝纤维化的方法一直是近年的研究热

■同行评议者

朱传武, 主任医师, 江苏省苏州市第五人民医院传染科

点, 瞬时弹性扫描仪(fibroscan, FS)是2003年由Sandrin等研制的应用超声波技术测定肝组织弹性的方法, 他是一种新型、无创、快速、操作简单、可以重复及床旁测定肝脏纤维化的仪器。有许多研究证实, FS测定的肝纤维化值和肝脏组织纤维化程度的METAVIR分期相关^[3-5]。但他对评价肝纤维化程度的准确性及各期的分界(Cutoff)值与肝组织纤维化METAVIR分期的对应性, 受一些因素的影响。

1 原理和结果解释

FS是以超声检查为基础, 通过测定肝脏硬度值判断肝纤维化和肝硬化分级^[6], FS由3个部位组成: 能产生超声波并作为超声波接收器的换能器, 位于换能器上能发出低频震动波的探头及记录数据的软件程序。超声换能器探头安装在振动器的轴上, 低振幅、低频率的振动通过换能器探头换能, 产生一种弹性剪切波在组织中传播, 脉冲-回波超声捕获装置跟踪剪切波并测定他的速度, 剪切波在肝脏组织中的传播速度直接反应肝组织弹性度, 组织越硬, 剪切波传播越快, 测定的值越高。测定时, 患者仰卧位, 右上肢上举放在头部, 换能器的探头放在患者右侧肝脏部位肋间隙的皮肤上, 垂直于皮肤, 测量位置定好后, 检查者按探头按钮开始采集图像, 软件会自动分析测定是否成功, 测定值的单位用千帕(kPa)表示, 成功测定10次后取中位数即是最后测定值, 测定的深度在距离皮肤25-65 cm, 测定的肝脏弹性度值的范围为2.5-75 kPa, 肝脏硬度测定结果的有效性取决于两个重要的参数, 四分位数间距: 反应了有效测定值的一致性, 不能超过中位数的20%-30%; 成功率: 是测定成功的次数除以总的采集次数, 至少60%以上。以测定的敏感度为纵坐标, 1-特异度为横坐标, 每个阈值的敏感度和相对应的特异度在坐标图上都成为一个点, 将这些点连成线, 即为接受者操作特性曲线(ROC曲线)。ROC曲线下面积(AUROC)反应测定组织硬度的准确性, 曲线下面积越接近于1, 准确性越高^[7]。

2 FS在肝纤维化诊断中的应用价值

FS作为肝纤维化无创性诊断的检查方法之一, 评价其应用价值在于其诊断肝纤维化的准确性及其与金标准肝组织纤维化分期的相关性。肝活检仍然被看做是诊断肝脏纤维化的金标准, 但肝活检是有创性的检查, 可能给患者带来痛

苦及出现一些并发症甚至死亡(据报道死亡率为0.1%-0.01%)^[8]。一部分患者不能接受, 而且肝活检难以重复进行、存在抽样误差, 不利于了解肝纤维化这个动态发展过程^[9-11]。几种血清学的指标: 如透明质酸, 层粘蛋白, IV型胶原纤维及III型前胶原; 几种肝纤维化评分模型: 如APRI指数, AAR指数, Forns指数, FibroTest等, 均可以用于测定肝纤维化程度^[12-15], 但这些血清学指标易受肝外情况的影响^[16,17], 当这些评分模型单独用于研究时, 由于各实验室间的差异使他们的诊断性能降低^[18-20]。多个研究证实: FS可以测定肝病患者的肝纤维化程度, 肝纤维化程度越重, FS测定值越高, 且FS测定值和肝纤维化METAVIR分期相关性高^[6,21-23]。FS是无创性、简洁、快速的检查, 大多数患者都容易接受, 反复检测可以监测肝纤维化的进展或者逆转情况^[24]。FS测定值是一个客观的物理学参数, 该参数与肝脏硬度直接相关, 不受肝外情况的影响, 理论上用于所有的慢性肝病患者^[25,26]。因此FS的应用范围宽, 适用人群广, 可重复性好, 具有很大的应用价值。

3 FS在各种肝病所致肝纤维化中的应用价值

3.1 病毒性肝炎

3.1.1 FS在丙型肝炎后肝纤维化诊断中的应用价值: 丙型肝炎病毒所致的肝纤维化是丙型肝炎进展的结果, 其纤维化的程度作为疾病进展、是否需要抗病毒治疗及了解抗病毒治疗疗效的重要参考^[27,28]。FS在诊断丙型肝炎后肝纤维化或者丙型肝炎病毒合并艾滋病毒感染致肝纤维化均有较大意义, 肝脏硬度测定(LSM)值与肝纤维化的METAVIR分期相关性较高, 尤其对于明显肝纤维化和肝硬化患者(表1), $F \geq 3$ 的AUROC为0.85-0.91, $F = 4$ 的AUROC为0.90-0.99。因此LSM值可以作为丙型肝炎治疗时机的选择和判定治疗效果的参考指标之一。Castéra指出, 在FS和FibroTest结果一致的情况下, 对 $F \geq 2$, $F \geq 3$, $F = 4$ 的患者分别有84%, 95%, 94%的患者肝活检可以证实, 联合以上二种检查方法能让大部分患者避免肝活检^[29,30]。

3.1.2 FS在乙型肝炎后肝纤维化诊断中的应用价值: FS最先用于丙型肝炎后肝纤维化的诊断, 近年来对FS在乙型肝炎后肝纤维化的研究逐渐增多, 对乙型肝炎病毒致肝纤维化, 其肝脏硬度值与肝纤维化的分期的相关性也大, 特别是对于明显肝纤维化和肝硬化的患者(表2), 且与丙型肝炎病毒致肝纤维化具有相近的Cutoff值, $F \geq$

■ 研发前沿

本文主要针对乙型肝炎病毒、丙型肝炎病毒、丙型肝炎病毒合并获得性免疫缺陷病毒感染、酒精性、非酒精性导致的肝纤维化各METAVIR分期与FS测定的Cutoff值的相关关系, 及FS值的影响因素。

■相关报道

FS测定的可重复性较好,对肝脏纤维化METAVIA分期 $F \geq 3$ 及 $F \geq 4$ 的患者,FS值和肝脏纤维化分期的相关性较好。

表 1 诊断慢性丙型肝炎纤维化分级的肝脏硬度阈值 (Cutoff)

作者	n	合并HIV	肝脏纤维化分级(Metavir)							
			F ≥ 1		F ≥ 2		F ≥ 3		F = 4	
			Cutoff值(kPa)	AUROC	Cutoff值(kPa)	AUROC	Cutoff值(kPa)	AUROC	Cutoff值(kPa)	AUROC
Ziol等 ^[61]	327	否			8.7	0.79	9.6	0.91	14.5	0.97
Sandrin等 ^[48]	106	否	5.1	0.90	7.6	0.88		0.91		0.99
Castera等 ^[29]	183	否			7.1	0.83	9.5	0.90	12.5	0.95
Obara等 ^[4]	51	否	5.6	0.87	9.5	0.92	10.3	0.85	17.2	0.90
Ogawa等 ^[62]	161	否	6.7(中位数)		9.1(中位数)		13.7(中位数)		26.4(中位数)	
Ledinghen等 ^[63]	72	是				0.72		0.91	11.8–14.5	0.97
Vergara等 ^[64]	169	是			7.2	0.87			14.6–17.6	0.95

AUROC: ROC曲线下面积,反映试验的诊断价值, AUROC越接近1, 诊断的准确性越高. Cutoff值为各纤维化分期的肝硬度平均值。

表 2 诊断慢性乙型肝炎纤维化分级的肝脏硬度阈值 (Cutoff)

作者	n	肝脏纤维化分级(Metavir)							
		F ≥ 1		F ≥ 2		F ≥ 3		F = 4	
		Cutoff值(kPa)	AUROC	Cutoff值(kPa)	AUROC	Cutoff值(kPa)	AUROC	Cutoff值(kPa)	AUROC
Marcellin等 ^[65]	202			7.2	0.81	8.1 ^m /10.5 ⁿ	0.93	11.0 ^m /18.2 ⁿ	0.93
Chan等 ^[5]	161	6.8/4.2	0.80			8.4	0.87	9.0 ^m /13.4 ⁿ	0.93
Ogawa等 ^[62]	68	6.4(中位数)		9.5(中位数)		11.4(中位数)		15.4(中位数)	

^m灵敏度和特异度之和最大时; ⁿ诊断准确性最高时。

表 3 诊断肝硬化及其并发症的肝脏硬度阈值 (Cutoff)

作者	n	病因	Cutoff(kPa)	AUROC	预测并发症的肝脏硬度值(Cutoff(kPa))				
					食管静脉曲张	肝硬化	腹水史	肝癌	食管出血
					2级以上	ChildB/C级			
Ganne-Garrie等 ^[31]	1 257	各种 ^a	14.6	0.95					
Foucher等 ^[22]	711	各种 ^a	17.6	0.96	27.5	37.5	49.1	53.7	62.7
Kim等 ^[66]	194	各种 ^a	10.3	0.80					
Castera等 ^[33]	298	丙型肝炎病毒	12.5	0.96	21.5				

^a包括丙型肝炎病毒、乙型肝炎病毒、丙型肝炎病毒和艾滋病毒合并感染、酒精性、非酒精性、自身免疫性等。

3的AUROC为0.87-0.93, F = 4的AUROC为0.93. 乙型肝炎与丙型肝炎后肝纤维化的F0-F4分期的Cutoff值是否一致, 需要积累更多的临床资料. 若有差异, 可根据病因来制定肝纤维化分期的Cutoff值。

3.2 肝硬化及合并并发症患者 FS对于诊断慢性肝病患者肝硬化的准确性高, 但报道的Cutoff值在10.3-17.6 kPa之间, 各报道存在差异(表3). 这和所选的研究人群和肝硬化的病因有关. Ganne-Carrie指出使用14.6 kPa作为肝硬化的分界, 排除肝硬化比预测肝硬化的意义更大, 假阴性率主要由于非活动性肝硬化或者大结节性肝硬化^[31].

因此在临床的应用中, 这个值可作为用来作为排除肝硬化的Cutoff值. Foucher还指出不同的Cutoff值不仅可以诊断肝硬化, 还可以区分肝硬化的并发症如食管静脉曲张, 腹水史, 肝癌和食管出血. 多个研究指出肝硬化的Cutoff值可区分有伴食管静脉曲张的肝硬化的患者, 报道的Cutoff值在21 kPa以上^[23,32,33], 肝脏硬度值的测定可以预示肝硬化的并发症, 肝脏硬度值越高, 越可能合并严重并发症, 通过肝脏硬度值测定, 临床医师可以评估患者发生并发症的风险及行食管内窥镜检查的风险, 积极预防并发症的出现^[34,35]. 尽管Fibroscan测定值对预测严重肝纤维化和肝

硬化准确率更高,但可以较早发现早期肝纤维化的患者,从临床的意义来说,对预防其发展成肝硬化及出现并发症意义重大^[4,36]。

3.3 酒精性肝病及非酒精性脂肪性肝病 FS对酒精性及非酒精性肝病患者肝脏硬度测定的Cutoff值与其纤维化分期相关性好。NGUYEN-KHAC等指出酒精性肝病的患者,对METAVIR分期 $F \geq 2$ 的AUROC在0.90以上, METAVIR分期 $F \geq 1$, $F \geq 2$, $F \geq 3$, $F \geq 4$ 的Cutoff值分别为5.9、7.8、11、19.5 kPa^[37]。Yoneda等发现肝脏硬度值与非酒精性脂肪性肝病患者肝纤维化程度明显相关,且不受脂肪变性的影响,FS预测各期肝纤维化的ROC曲线下面积分别为 $F1: 0.93$, $F2: 0.87$, $F3: 0.90$, $F4: 0.99$, METAVIR分期 $F > 1$, $F > 2$, $F > 3$, $F > 4$ 的Cutoff值分别为5.9、6.65、9.8、17.5 kPa^[38,39]。对于明显肝纤维化和肝硬化的患者,其Cutoff值及AUROC与病毒性肝炎具有相近的值。

4 FS测定值的影响因素

许多研究已经证实了FS的临床应用价值,他的测定值和肝脏组织的纤维化程度(F0-F4)均有高度的相关性^[29,40-42]。但是,肝脏硬度值也受肝纤维化以外的其他因素的影响,几项研究显示了在转氨酶升高的慢性病毒性肝炎患者和急性肝脏损害的患者中肝脏硬度值可能受转氨酶影响,Coco对228例病毒性肝炎的患者研究后指出,在慢性肝炎患者中,除了肝脏本身纤维化,ALT是独立影响肝脏纤维化FS测定值的因素,对处于相同肝纤维化分期的患者,ALT正常者的肝脏硬度值较ALT升高者低,当ALT升高时,患者的肝硬度值升高1.3-3倍^[43]。Sagir等报道20例各种原因引起的急性肝脏损害患者的肝硬度值,其中15个患者肝脏急性炎症期肝脏硬度值超过12.5 kPa,这些患者的超声检查没有提示肝硬化,11个患者肝活检也没提示肝硬化,6个患者在转氨酶恢复正常后肝脏硬度值都降到了12.5 kPa以下^[44]。Arena等报道了18名急性病毒性肝炎的患者的肝硬度值和转氨酶水平的下降是平行的^[45]。Chan等研究显示,转氨酶对肝脏硬度值有影响,特别是血清转氨酶的升高对无纤维化的患者的FS测定值影响大,而对桥接肝纤维化和肝硬化的影响较小^[5]。因此对明显急性肝脏炎症的患者,临床医师对FS测定值的解释应多加注意,同时应动态观察,其值不一定反映肝脏硬度,肝脏硬度值除受肝纤维化程度影响外,还受肝细胞炎症、水肿、肝脏血管充血影响^[44]。胆红素也是

影响FS测定肝纤维化的一个重要因素, Kim等测定急性肝炎患者炎症期和恢复后的肝脏硬度值,认为总胆红素的改变可能是影响肝脏硬度值改变的因素之一^[46]。总胆红素的升高使肝脏硬度测定值升高, Millonig等测定肝外胆汁淤积的患者的肝脏硬度值提示,不管肝脏纤维化程度如何,肝外胆汁淤积使肝脏硬度值增加,15个胆汁淤积的患者有13个患者在胆汁淤积解除后FS测定值均下降。肝外胆汁淤积的患者解除梗阻后,FS评估肝脏硬度是有价值^[47]。最近Lucidarme等提出IQR/M(四分位差/肝脏硬度平均值)影响FS测定值和肝活检不一致的影响因素,最适的值是0.21,而成功率不影响肝纤维化分级的准确性^[3]。据报道:未发现肝脏脂肪变性对FS测定值有影响^[43,48,49],为提高FS诊断肝纤维化的准确性,减少这些因素的干扰,应该考虑在患者转氨酶水平或胆红素水平恢复正常后再行FS检查。

5 FS的可重复性和局限性

FS对肝脏硬度值测量的可重复性是他能广泛用于临床的前提条件^[50,51]。Sandrin等评估了106名丙型肝炎患者指出,FS检查的重复性好,操作者之内和操作者之间的变异系数小,分别为3.2%和3.3%^[6,48,52]。Boursier对操作者之间的一致性进行了研究,对250例慢性肝脏疾病的患者,初学者和专家之间检查的肝脏硬度的一致性随着肝脏硬度的不同而有差异,对于FS测定值 < 9 kPa的患者,组间相关系数是0.49,对于FS测定值 ≥ 9 kPa的患者,组间相关系数是0.87^[49]。对肝脏硬度值更高的患者进行肝脏硬度的测定,初学者和专家测定的值的相关性更高。Quelli等对不同病因的慢性肝脏疾病的200例患者分别由2个操作者对每个患者测2次LSM,操作者之内和操作者之间的重复性极好,组内相关系数是0.98,对轻度的肝纤维化,操作者之间的一致性降低(F0-F1的组间相关系数是0.6, $F \geq 2$ 的相关系数是0.99),对于肝脂肪变性细胞 $\geq 25\%$ 的相关系数是0.90,而肝脂肪变性细胞 $< 25\%$ 的相关系数是0.98,对于体质量指数 ≥ 25 kg/m²相关系数是0.94,体质量指数 < 25 kg/m²相关系数是0.98^[52],体质量指数和肝脏脂肪变性对操作者的一致性无明显影响。有Meta分析表明:FS对肝硬化诊断价值大,但是对早期肝纤维化的诊断准确性有所降低^[53],FS对于测定明显肝纤维化或者肝硬化患者的LSM值重复性好。FS可以测定95%以上的慢性肝脏疾病患者的肝脏硬度值,在不同的研究中报道失

■创新盘点

此文对Fibroscan在肝脏纤维化诊断中的临床应用及局限性进行了综述,有利于更好的指导临床应用。

■应用要点

Fibroscan对临床上无创性评估慢性肝病患者肝纤维化的程度具有一定的指导价值。

败率为2.4%-9.4%^[29,48,52]。导致失败的因素主要是肥胖, Foucher测量2 114例慢性肝脏疾病患者的肝脏硬度指出, 通过多因素分析唯一影响成功率的因素是体质量指数 $>28^{[54]}$, 肥胖或超重的患者由于使弹性波或者超声逐渐减弱, 导致肝脏硬度无法测定^[54-56]。Kettaneh指出: 体质量指数和年龄影响成功率。肋间隙狭窄, 年龄偏大的患者^[57]测定成功率降低, 但有报道称年龄不会影响肝脏硬度值^[58], 对于合并腹水的患者, 不能成功测定其LSM值^[6,54]。有学者建议对提高Fibroscan检测的成功率, 可以通过改进超声的探头来实现。

6 结论

FS具有无创、无痛、快速、操作简单等优点, 对肝纤维化的诊断具有较高的准确性和较好的重复性, 尤其对于明显肝纤维化及肝硬化的患者, FS还可动态的随访肝病患者肝脏纤维化的变化。对各种原因引起的肝病所致的肝硬化的诊断及治疗后疗效判定等, 都有很大的应用价值。目前, 虽然FS还不能完全替代肝组织活检, 但他必将有很大的应用前景^[59]。在我国一些医院已投入临床使用, 在不久的将来, FS将可能作为肝病患者一项常规的检查。FS对肥胖、肋间隙狭窄的患者成功率低, 有学者建议通过改进超声的探头来提高成功率。目前对肝组织METAVIA纤维化分期相对应的FS测定的界限值尚未固定, 因此需要积累更多的临床资料。有学者提出: 联合FS, 血清生化学指标及B超检查, 也许可以提高其诊断价值, 使一部分患者避免肝活检。但这些都需积累更多的资料进一步的研究证实^[60]。相信随着临床应用的增多及经验的积累, FS将会在肝病的临床诊治中起到重要的作用。

7 参考文献

- Poynard T, Mathurin P, Lai CL, Guyader D, Poupon R, Tainturier MH, Myers RP, Muntenau M, Ratzu V, Manns M, Vogel A, Capron F, Chedid A, Bedossa P. A comparison of fibrosis progression in chronic liver diseases. *J Hepatol* 2003; 38: 257-265
- Benvegnù L, Gios M, Boccato S, Alberti A. Natural history of compensated viral cirrhosis: a prospective study on the incidence and hierarchy of major complications. *Gut* 2004; 53: 744-749
- Lucidarme D, Foucher J, Le Bail B, Vergniol J, Castera L, Duburque C, Forzy G, Filoche B, Couzigou P, de Ledinghen V. Factors of accuracy of transient elastography (fibroscan) for the diagnosis of liver fibrosis in chronic hepatitis C. *Hepatology* 2009; 49: 1083-1089
- Obara N, Ueno Y, Fukushima K, Nakagome Y, Kakazu E, Kimura O, Wakui Y, Kido O, Ninomiya M, Kogure T, Inoue J, Kondo Y, Shiina M, Iwasaki T, Yamamoto T, Shimosegawa T. Transient elastography for measurement of liver stiffness measurement can detect early significant hepatic fibrosis in Japanese patients with viral and nonviral liver diseases. *J Gastroenterol* 2008; 43: 720-728
- Chan HL, Wong GL, Choi PC, Chan AW, Chim AM, Yiu KK, Chan FK, Sung JJ, Wong VW. Alanine aminotransferase-based algorithms of liver stiffness measurement by transient elastography (Fibroscan) for liver fibrosis in chronic hepatitis B. *J Viral Hepat* 2009; 16: 36-44
- Sandrin L, Fourquet B, Hasquenoph JM, Yon S, Fournier C, Mal F, Christidis C, Ziol M, Poulet B, Kazemi F, Beaugrand M, Palau R. Transient elastography: a new noninvasive method for assessment of hepatic fibrosis. *Ultrasound Med Biol* 2003; 29: 1705-1713
- Poynard T, Halfon P, Castera L, Munteanu M, Imbert-Bismut F, Ratzu V, Benhamou Y, Bourlière M, de Ledinghen V. Standardization of ROC curve areas for diagnostic evaluation of liver fibrosis markers based on prevalences of fibrosis stages. *Clin Chem* 2007; 53: 1615-1622
- Cadranel JF, Rufat P, Degos F. Practices of liver biopsy in France: results of a prospective nationwide survey. For the Group of Epidemiology of the French Association for the Study of the Liver (AFEF). *Hepatology* 2000; 32: 477-481
- Regev A, Berho M, Jeffers LJ, Milikowski C, Molina EG, Pyrsopoulos NT, Feng ZZ, Reddy KR, Schiff ER. Sampling error and intraobserver variation in liver biopsy in patients with chronic HCV infection. *Am J Gastroenterol* 2002; 97: 2614-2618
- Bedossa P, Dargère D, Paradis V. Sampling variability of liver fibrosis in chronic hepatitis C. *Hepatology* 2003; 38: 1449-1457
- Intraobserver and interobserver variations in liver biopsy interpretation in patients with chronic hepatitis C. The French METAVIR Cooperative Study Group. *Hepatology* 1994; 20: 15-20
- Wai CT, Greenson JK, Fontana RJ, Kalbfleisch JD, Marrero JA, Conjeevaram HS, Lok AS. A simple noninvasive index can predict both significant fibrosis and cirrhosis in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology* 2003; 38: 518-526
- Imbert-Bismut F, Ratzu V, Pieroni L, Charlotte F, Benhamou Y, Poynard T. Biochemical markers of liver fibrosis in patients with hepatitis C virus infection: a prospective study. *Lancet* 2001; 357: 1069-1075
- Sebastiani G, Vario A, Guido M, Noventa F, Plebani M, Pistis R, Ferrari A, Alberti A. Stepwise combination algorithms of non-invasive markers to diagnose significant fibrosis in chronic hepatitis C. *J Hepatol* 2006; 44: 686-693
- Fontaine H, Petitprez K, Roudot-Thoraval F, Trinchet JC. Guidelines for the diagnosis of uncomplicated cirrhosis. *Gastroenterol Clin Biol* 2007; 31: 504-509
- Calès P, Oberti F, Michalak S, Hubert-Fouchard I, Rousselet MC, Konaté A, Gallois Y, Ternisien C, Chevailler A, Lunel F. A novel panel of blood markers to assess the degree of liver fibrosis. *Hepatology* 2005; 42: 1373-1381
- Poynard T, Munteanu M, Imbert-Bismut F, Charlotte F, Thabut D, Le Calvez S, Messous D, Thibault V, Benhamou Y, Moussalli J, Ratzu V.

- Prospective analysis of discordant results between biochemical markers and biopsy in patients with chronic hepatitis C. *Clin Chem* 2004; 50: 1344-1355
- 18 Colletta C, Smirne C, Fabris C, Toniutto P, Rapetti R, Minisini R, Pirisi M. Value of two noninvasive methods to detect progression of fibrosis among HCV carriers with normal aminotransferases. *Hepatology* 2005; 42: 838-845
 - 19 Ghany MG, Doo E. Assessment of liver fibrosis: palpate, poke or pulse? *Hepatology* 2005; 42: 759-761
 - 20 Myers RP, Tainturier MH, Ratzliff V, Piton A, Thibault V, Imbert-Bismut F, Messous D, Charlotte F, Di Martino V, Benhamou Y, Poinard T. Prediction of liver histological lesions with biochemical markers in patients with chronic hepatitis B. *J Hepatol* 2003; 39: 222-230
 - 21 Forns X, Ampurdanès S, Llovet JM, Aponte J, Quintó L, Martínez-Bauer E, Bruguera M, Sánchez-Tapias JM, Rodés J. Identification of chronic hepatitis C patients without hepatic fibrosis by a simple predictive model. *Hepatology* 2002; 36: 986-992
 - 22 Foucher J, Chanteloup E, Vergniol J, Castéra L, Le Bail B, Adhoute X, Bertet J, Couzigou P, de Ledinghen V. Diagnosis of cirrhosis by transient elastography (FibroScan): a prospective study. *Gut* 2006; 55: 403-408
 - 23 Bureau C, Metivier S, Peron JM, Selves J, Robic MA, Gourraud PA, Rouquet O, Dupuis E, Alric L, Vinel JP. Transient elastography accurately predicts presence of significant portal hypertension in patients with chronic liver disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2008; 27: 1261-1268
 - 24 Castera L, Forns X, Alberti A. Non-invasive evaluation of liver fibrosis using transient elastography. *J Hepatol* 2008; 48: 835-847
 - 25 Friedrich-Rust M, Ong MF, Herrmann E, Dries V, Samaras P, Zeuzem S, Sarrazin C. Real-time elastography for noninvasive assessment of liver fibrosis in chronic viral hepatitis. *AJR Am J Roentgenol* 2007; 188: 758-764
 - 26 Talwalkar JA, Yin M, Fidler JL, Sanderson SO, Kamath PS, Ehman RL. Magnetic resonance imaging of hepatic fibrosis: emerging clinical applications. *Hepatology* 2008; 47: 332-342
 - 27 Yang Y, Song B, Wu B, Lei XZ. [Assessment of disease activity and liver fibrosis in chronic viral hepatitis by magnetic resonance diffusion-weighted imaging] *Zhongguo Yixue Kexueyuan Xuebao* 2009; 31: 155-159
 - 28 Lewin M, Poujol-Robert A, Boëlle PY, Wendum D, Lasnier E, Viallon M, Guéchet J, Hoeffel C, Arrivé L, Tubiana JM, Poupon R. Diffusion-weighted magnetic resonance imaging for the assessment of fibrosis in chronic hepatitis C. *Hepatology* 2007; 46: 658-665
 - 29 Castéra L, Vergniol J, Foucher J, Le Bail B, Chanteloup E, Haaser M, Darriet M, Couzigou P, De Ledinghen V. Prospective comparison of transient elastography, Fibrotest, APRI, and liver biopsy for the assessment of fibrosis in chronic hepatitis C. *Gastroenterology* 2005; 128: 343-350
 - 30 Castera L, Foucher J, Bertet J, Couzigou P, de Ledinghen V. FibroScan and FibroTest to assess liver fibrosis in HCV with normal aminotransferases. *Hepatology* 2006; 43: 373-374; author reply 375-376
 - 31 Ganne-Carrié N, Ziol M, de Ledinghen V, Douvin C, Marcellin P, Castera L, Dhumeaux D, Trinchet JC, Beaugrand M. Accuracy of liver stiffness measurement for the diagnosis of cirrhosis in patients with chronic liver diseases. *Hepatology* 2006; 44: 1511-1517
 - 32 Kazemi F, Kettaneh A, N'kontchou G, Pinto E, Ganne-Carrié N, Trinchet JC, Beaugrand M. Liver stiffness measurement selects patients with cirrhosis at risk of bearing large oesophageal varices. *J Hepatol* 2006; 45: 230-235
 - 33 Castéra L, Le Bail B, Roudot-Thoraval F, Bernard PH, Foucher J, Merrouche W, Couzigou P, de Ledinghen V. Early detection in routine clinical practice of cirrhosis and oesophageal varices in chronic hepatitis C: comparison of transient elastography (FibroScan) with standard laboratory tests and non-invasive scores. *J Hepatol* 2009; 50: 59-68
 - 34 Vizzutti F, Arena U, Romanelli RG, Rega L, Foschi M, Colagrande S, Petrarca A, Moscarella S, Belli G, Zignego AL, Marra F, Laffi G, Pinzani M. Liver stiffness measurement predicts severe portal hypertension in patients with HCV-related cirrhosis. *Hepatology* 2007; 45: 1290-1297
 - 35 Carrión JA, Navasa M, Bosch J, Bruguera M, Gilibert R, Forns X. Transient elastography for diagnosis of advanced fibrosis and portal hypertension in patients with hepatitis C recurrence after liver transplantation. *Liver Transpl* 2006; 12: 1791-1798
 - 36 Corpechot C, El Naggar A, Poujol-Robert A, Ziol M, Wendum D, Chazouillères O, de Ledinghen V, Dhumeaux D, Marcellin P, Beaugrand M, Poupon R. Assessment of biliary fibrosis by transient elastography in patients with PBC and PSC. *Hepatology* 2006; 43: 1118-1124
 - 37 Nguyen-Khac E, Chatelain D, Tramier B, Decrombecque C, Robert B, Joly JP, Brevet M, Grignon P, Lion S, Le Page L, Dupas JL. Assessment of asymptomatic liver fibrosis in alcoholic patients using fibroscan: prospective comparison with seven non-invasive laboratory tests. *Aliment Pharmacol Ther* 2008; 28: 1188-1198
 - 38 Yoneda M, Yoneda M, Mawatari H, Fujita K, Endo H, Iida H, Nozaki Y, Yonemitsu K, Higurashi T, Takahashi H, Kobayashi N, Kirikoshi H, Abe Y, Inamori M, Kubota K, Saito S, Tamano M, Hiraishi H, Maeyama S, Yamaguchi N, Togo S, Nakajima A. Noninvasive assessment of liver fibrosis by measurement of stiffness in patients with nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Dig Liver Dis* 2008; 40: 371-378
 - 39 Yoneda M, Yoneda M, Fujita K, Inamori M, Tamano M, Hiraishi H, Nakajima A. Transient elastography in patients with non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Gut* 2007; 56: 1330-1331
 - 40 Goodman ZD, Becker RL Jr, Pockros PJ, Afdhal NH. Progression of fibrosis in advanced chronic hepatitis C: evaluation by morphometric image analysis. *Hepatology* 2007; 45: 886-894
 - 41 Saito H, Tada S, Nakamoto N, Kitamura K, Horikawa H, Kurita S, Saito Y, Iwai H, Ishii H. Efficacy of non-invasive elastometry on staging of hepatic fibrosis. *Hepatol Res* 2004; 29: 97-103
 - 42 Afdhal NH, Curry M. Technology evaluation: a critical step in the clinical utilization of novel diagnostic tests for liver fibrosis. *J Hepatol* 2007; 46: 543-545
 - 43 Coco B, Oliveri F, Maina AM, Ciccorossi P, Sacco R, Colombatto P, Bonino F, Brunetto MR. Transient elastography: a new surrogate marker

同行评价

本文提供的信息具有一定的新颖性, 对临床应用 Fibroscan 以评估慢性肝病患者肝纤维化的程度有一定的指导价值。

- of liver fibrosis influenced by major changes of transaminases. *J Viral Hepat* 2007; 14: 360-369
- 44 Sagir A, Erhardt A, Schmitt M, Häussinger D. Transient elastography is unreliable for detection of cirrhosis in patients with acute liver damage. *Hepatology* 2008; 47: 592-595
- 45 Arena U, Vizzutti F, Corti G, Ambu S, Stasi C, Bresci S, Moscarella S, Boddi V, Petrarca A, Laffi G, Marra F, Pinzani M. Acute viral hepatitis increases liver stiffness values measured by transient elastography. *Hepatology* 2008; 47: 380-384
- 46 Kim SU, Han KH, Park JY, Ahn SH, Chung MJ, Chon CY, Choi EH, Kim do Y. Liver stiffness measurement using FibroScan is influenced by serum total bilirubin in acute hepatitis. *Liver Int* 2009; 29: 810-815
- 47 Millionig G, Reimann FM, Friedrich S, Fonouni H, Mehrabi A, Büchler MW, Seitz HK, Mueller S. Extrahepatic cholestasis increases liver stiffness (FibroScan) irrespective of fibrosis. *Hepatology* 2008; 48: 1718-1723
- 48 Sandrin L, Fourquet B, Hasquenoph JM, Yon S, Fournier C, Mal F, Christidis C, Ziol M, Poulet B, Kazemi F, Beaugrand M, Palau R. Transient elastography: a new noninvasive method for assessment of hepatic fibrosis. *Ultrasound Med Biol* 2003; 29: 1705-1713
- 49 Boursier J, Konate A, Guilluy M, Gorea G, Sawadogo A, Quemener E, Oberti F, Reaud S, Hubert-Fouchard I, Dib N, Calès P. Learning curve and interobserver reproducibility evaluation of liver stiffness measurement by transient elastography. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2008; 20: 693-701
- 50 Yin M, Talwalkar JA, Glaser KJ, Manduca A, Grimm RC, Rossman PJ, Fidler JL, Ehman RL. Assessment of hepatic fibrosis with magnetic resonance elastography. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2007; 5: 1207-1213.e2
- 51 Yin M, Woollard J, Wang X, Torres VE, Harris PC, Ward CJ, Glaser KJ, Manduca A, Ehman RL. Quantitative assessment of hepatic fibrosis in an animal model with magnetic resonance elastography. *Magn Reson Med* 2007; 58: 346-353
- 52 Fraquelli M, Rigamonti C, Casazza G, Conte D, Donato MF, Ronchi G, Colombo M. Reproducibility of transient elastography in the evaluation of liver fibrosis in patients with chronic liver disease. *Gut* 2007; 56: 968-973
- 53 Talwalkar JA, Kurtz DM, Schoenleber SJ, West CP, Montori VM. Ultrasound-based transient elastography for the detection of hepatic fibrosis: systematic review and meta-analysis. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2007; 5: 1214-1220
- 54 Foucher J, Castéra L, Bernard PH, Adhoute X, Laharie D, Bertet J, Couzigou P, de Lédinghen V. Prevalence and factors associated with failure of liver stiffness measurement using FibroScan in a prospective study of 2114 examinations. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2006; 18: 411-412
- 55 Roulot D, Czernichow S, Le Clésiau H, Costes JL, Vergnaud AC, Beaugrand M. Liver stiffness values in apparently healthy subjects: influence of gender and metabolic syndrome. *J Hepatol* 2008; 48: 606-613
- 56 Kettaneh A, Marcellin P, Douvin C, Poupon R, Ziol M, Beaugrand M, de Lédinghen V. Features associated with success rate and performance of FibroScan measurements for the diagnosis of cirrhosis in HCV patients: a prospective study of 935 patients. *J Hepatol* 2007; 46: 628-634
- 57 Salles N, Dussarat P, Foucher J, Villars S, de Lédinghen V. Non-invasive evaluation of liver fibrosis by transient elastography and biochemical markers in elderly inpatients. *Gastroenterol Clin Biol* 2009; 33: 126-132
- 58 Sirli R, Sporea I, Tudora A, Deleanu A, Popescu A. Transient elastographic evaluation of subjects without known hepatic pathology: does age change the liver stiffness? *J Gastrointestin Liver Dis* 2009; 18: 57-60
- 59 Castera L, Denis J, Babany G, Roudot-Thoraval F. Evolving practices of non-invasive markers of liver fibrosis in patients with chronic hepatitis C in France: time for new guidelines? *J Hepatol* 2007; 46: 528-529; author reply 529-530
- 60 Moreno-Otero R, Trapero-Marugan M, Mendoza J. Liver fibrosis assessment by transient elastography in hepatitis C patients with normal alanine aminotransferase. *Gut* 2006; 55: 1055-1056
- 61 Ziol M, Handra-Luca A, Kettaneh A, Christidis C, Mal F, Kazemi F, de Lédinghen V, Marcellin P, Dhumeaux D, Trinchet JC, Beaugrand M. Noninvasive assessment of liver fibrosis by measurement of stiffness in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology* 2005; 41: 48-54
- 62 Ogawa E, Furusyo N, Toyoda K, Takeoka H, Otaguro S, Hamada M, Murata M, Sawayama Y, Hayashi J. Transient elastography for patients with chronic hepatitis B and C virus infection: Non-invasive, quantitative assessment of liver fibrosis. *Hepatol Res* 2007; 37: 1002-1010
- 63 de Lédinghen V, Douvin C, Kettaneh A, Ziol M, Roulot D, Marcellin P, Dhumeaux D, Beaugrand M. Diagnosis of hepatic fibrosis and cirrhosis by transient elastography in HIV/hepatitis C virus-coinfected patients. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2006; 41: 175-179
- 64 Vergara S, Macías J, Rivero A, Gutiérrez-Valencia A, González-Serrano M, Merino D, Ríos MJ, García-García JA, Camacho A, López-Cortés L, Ruiz J, de la Torre J, Viciano P, Pineda JA. The use of transient elastometry for assessing liver fibrosis in patients with HIV and hepatitis C virus coinfection. *Clin Infect Dis* 2007; 45: 969-974
- 65 Marcellin P, Ziol M, Bedossa P, Douvin C, Poupon R, de Lédinghen V, Beaugrand M. Non-invasive assessment of liver fibrosis by stiffness measurement in patients with chronic hepatitis B. *Liver Int* 2009; 29: 242-247
- 66 Kim do Y, Kim SU, Ahn SH, Park JY, Lee JM, Park YN, Yoon KT, Paik YH, Lee KS, Chon CY, Han KH. Usefulness of FibroScan for detection of early compensated liver cirrhosis in chronic hepatitis B. *Dig Dis Sci* 2009; 54: 1758-1763

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

结直肠癌干细胞研究进展

杨治力, 王志刚, 郑起

杨治力, 王志刚, 郑起, 上海交通大学附属第六人民医院外科上海市 200233

作者贡献分布: 本文综述由杨治力与王志刚完成, 郑起审校.
通讯作者: 郑起, 教授, 200233, 上海市, 上海交通大学附属第六人民医院外科. zhengqi1957@yahoo.com.cn

收稿日期: 2009-12-16 修回日期: 2010-01-09

接受日期: 2010-01-26 在线出版日期: 2010-03-28

Advances in research on colorectal cancer stem cells

Zhi-Li Yang, Zhi-Gang Wang, Qi Zheng

Zhi-Li Yang, Zhi-Gang Wang, Qi Zheng, Department of Surgery, Shanghai Sixth People's Hospital Affiliated to Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200233, China

Correspondence to: Professor Qi Zheng, Shanghai Sixth People's Hospital Affiliated to Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200233, China. zhengqi1957@yahoo.com.cn

Received: 2009-12-16 Revised: 2010-01-09

Accepted: 2010-01-26 Published online: 2010-03-28

Abstract

Colorectal cancer is a worldwide enormous cancer burden and a major therapeutic challenge as other solid tumors. The cancer stem cell hypothesis provides a cellular mechanism to account for the development, progression, recurrence and metastasis of colorectal cancer. The aim of this paper is to review the advances in research on colorectal cancer stem cells.

Key Words: Colorectal cancer; Cancer; Stem cell

Yang ZL, Wang ZG, Zheng Q. Advances in research on colorectal cancer stem cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(9): 913-919

摘要

结直肠癌与其他实体肿瘤一样是我国乃至世界范围的重要疾病负担, 其治疗也面临许多挑战. 近几年, 日益受到重视的癌症干细胞理论似乎可以解释结直肠癌的发生发展、复发转移的细胞学机制. 本文就结直肠癌干细胞的研究进展作一综述.

关键词: 结直肠癌; 癌症; 干细胞

杨治力, 王志刚, 郑起. 结直肠癌干细胞研究进展. 世界华人消化杂志 2010; 18(9): 913-919

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/913.asp>

0 引言

结直肠癌与其他实体肿瘤一样是我国乃至世界范围的重要疾病负担, 其治疗也面临许多挑战. 近几年, 日益受到重视的癌症干细胞(cancer stem cell, CSC)理论似乎可以解释结直肠癌的发生发展、复发转移的细胞学机制, 可能为改进结直肠癌的治疗策略提供理论依据, 从而改善结直肠癌患者的预后.

1 CSC理论的提出与初步证据

同一组织的恶性肿瘤存在不同的病理学分类, 且表达不同的生物标志. 随着基因芯片与蛋白组学技术的进展, 对同一组织的恶性肿瘤分类已达到分子水平. 这些肿瘤生物学现象可以理解为不同亚型的肿瘤起源于不同的细胞. 然而, 同一细胞来源的肿瘤经常显示出细胞在功能上的异质性(functional heterogeneity), 表现为不同的增殖与分化能力^[1,2]. 目前, 能解释此现象的CSC模型(图1)越来越被大多数学者所接受. CSC是指具有自我更新及产生组成肿瘤不同细胞能力的肿瘤细胞亚群^[3-5]. 这些细胞显示出干细胞样特性与持续维持致瘤的能力. Lapidot等对急性粒系白血病细胞的研究首次证实CSC的存在^[6]. 大约占白血病细胞总数的0.01%-1%的细胞移植入免疫缺陷小鼠后能诱导形成白血病. 尤其值得关注的是在实体肿瘤中也被证实CSC的存在. Al-Hajj等从乳腺癌组织中分离出CD44⁺CD24^{low}的细胞亚群, 并发现他们具有起始肿瘤的能力^[7]. Singh等利用CD133作为分选标志分离并鉴定出脑肿瘤中的CSC^[8]. 此后, 日益增加的证据显示几乎所有的实体肿瘤包括结肠、肝^[9]、胰^[10]、前列腺^[11]、卵巢^[12]、肺^[13]、黑色素瘤^[14]等都被特有的CSC亚群按等级组织与维持. 至今, 乳腺癌与脑恶性肿瘤的CSC研究更为深入. 已有证据显示CSC的生物学行为随

■背景资料

近几年, 日益受到重视的癌症干细胞(CSC)理论似乎可以解释结直肠癌的发生发展、复发转移的细胞学机制, 可能为改进结直肠癌的治疗策略提供理论依据, 从而改善结直肠癌患者的预后.

■同行评议者

王晓艳, 副教授, 湖南长沙中南大学湘雅三医院消化内科; 朴云峰, 教授, 吉林大学第一临床医院消化科

■ 研发前沿

目前所有的结直肠癌CSC的研究,尽管在分选标志上的差异,甚至有矛盾的结果,但仍可认为在结直肠癌中存在干细胞样的细胞亚群,其特异性细胞表型还需深入研究。

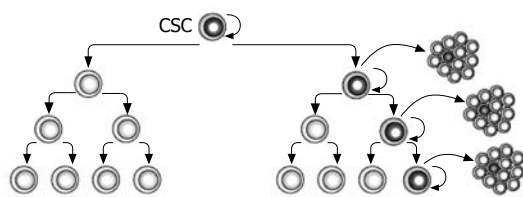


图1 CSC模型。

整个肿瘤生长进展或经受临床干预过程而变化(图2), Barabe等^[15]研究显示白血病干细胞具有随时间积累而出现进化潜能,表现为从最初细胞类型到含有重分配的免疫球蛋白H基因,这一研究提示CSC本身可能出现克隆进化(clonal evolution); Clark等^[16]报道肿瘤细胞体内系列移植可产生更多的侵袭性肿瘤; Creighton等^[17]对经历常规内分泌与化学治疗后残余乳腺癌的研究显示其中CD44⁺CD24^{low}表型的CSCs出现更多间质标志基因表达。这些研究报道均提示CSCs受其所处小境(niche)的影响可能出现生物学特性的变化。

2 结直肠癌干细胞存在的实验证据

首次报道结直肠癌干细胞存在的两个研究小组是O'Brien等^[18]与Ricci-Vitiani等^[19],前者在17例原发与转移结肠癌组织中用FACS分析显示原发结肠癌组织中CD133⁺细胞占7.5%-15.9%,转移结肠癌中CD133⁺细胞占3.2%-24.5%,分选出CD133⁺与CD133⁻细胞后,分别植入NOD/SCID小鼠肾囊内鉴定肿瘤起始细胞(colon cancer-initiating cell, CC-IC),结果显示262个CD133⁺肿瘤细胞中有1个CC-IC;后者的19例结肠癌组织中有16例含有CD133⁺细胞,约占总细胞的0.7%-6.1%,另3例未检出CD133⁺细胞,通过体内外实验显示一小群未分化的CD133⁺细胞皮下植入NOD/SCID小鼠能产生与父代相似的结肠癌。随后, Todaro等^[20]报道在21例结肠癌组织中CD133表达为0.3%-3%,裸鼠皮下移植结果显示 2×10^6 CD133⁺细胞在15 wk的观察期间无肿瘤生长,而 2.5×10^3 CD133⁺细胞生成肿瘤体积在1.5 cm³左右;进一步分析显示CD133⁺细胞能通过分泌IL-4保护这些细胞免于凋亡以及抵抗常规治疗。至此, CD133作为结直肠癌CSC的标志已被大多数学者所认可。

除了CD133作为结直肠癌CSC的标志外, CD44与结直肠癌CSC的研究也有报道。Dalerba等^[21]对人类结肠CSCs的表型研究显示:(EpCAM)^{high}/CD44⁺表型的结肠癌细胞为CSC,

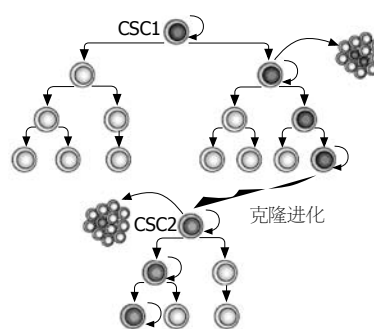


图2 CSC生物学特征的变化。

同时对此表型的细胞表面标志谱分析发现CD166也能作为CSC的表型;此外,作者还发现CD44⁺细胞代表了CD133⁺细胞群中的小部分亚群细胞。即与CD133⁺结肠癌细胞比较, CD44⁺结肠癌细胞中更有效地富集了CSCs。Du等^[22]利用慢病毒RNA干扰技术敲出结直肠癌细胞中的CD44或CD133基因后显示:仅CD44基因敲出能明显阻止癌细胞克隆形成以及抑制移植模型中细胞的致瘤性。该研究提示CD44在结直肠癌CSC中具有很重要的功能意义。

为了验证再生一个异质性结直肠癌的能力是否存在于一个单克隆结直肠癌细胞群体或依靠多个不同的CSCs,也即按目前研究所定义的单个结直肠癌CSC是否确实具有多向分化潜能。Vermeulen等^[23]对原发与肝转移结直肠癌细胞行结肠球培养,这些球能在免疫缺陷小鼠中成瘤,从球分离成单个癌细胞培养结果显示20个细胞中大约有1个细胞能形成克隆,同时在球培养中大约16个CD133⁺细胞中有1个细胞能形成球,而CD133⁻细胞需250个中有1个细胞能形成球;在与CD133共表达的标志如CD44、CD166、CD24、CD29中,以CD133⁺CD24⁺细胞有更高的克隆形成能力(约20%);通过对单细胞克隆的结肠CSCs的体内外研究显示CSCs具有多向分化潜能,PI3K信号通路参与了CSCs分化的决定。该研究支持了拥有多向分化潜能的CSC导致了组成肿瘤的细胞层级的假说。

为了解决单用免疫方法检测CD133表达的不确定性, Shmelkov等^[24]建立了在CD133基因的启动区域敲进报道基因lacZ的遗传小鼠模型,结果发现CD133广泛表达在成年小鼠结肠上皮细胞;用CD133抗体检测成年人正常结肠上皮显示其表达在绝大多数分化的上皮细胞;在原发的人结肠癌标本中免疫染色也显示CD133广泛表达在所有恶性上皮细胞中;随后的II110^{-/-}

CD133^{lacZ}的自发结肠癌小鼠模型中也得到一致的CD133表达的结果. 该研究结果引起了人们对CD133作为原发结直肠癌干细胞标志的质疑. 随后Horst等^[25]与Kojima等^[26]应用作用于不同表位的抗体对结直肠癌的CD133免疫染色结果也支持该研究, 即CD133并不局限表达在少数结直肠癌上皮细胞中.

醛脱氢酶1(aldehyde dehydrogenase 1, ALDH1)近来被认为是一个有前景的CSC标志. ALDH是氧化细胞内醛的一个解毒酶, 他的存在可能是干细胞长期存活的基础. 自从Jones等^[27]首次描述了利用测量细胞内ALDH酶活性分离造血祖细胞之后, 已有研究报道在鼠脑中分离出ALDH⁺细胞具有自我更新与多向分化的潜能以及ALDH1是乳腺CSC的特异性标志^[28,29]. Huang等^[30]对7例结肠癌患者的研究显示: ALDH⁺ESA⁺细胞范围在3.5%±1.0%, 低于CD44⁺ESA⁺与CD133⁺ESA⁺细胞范围的5-7倍; 500个ALDH⁺ESA⁺细胞NOD/SCID小鼠移植在30 d内能形成肿瘤, 而10 000 ALDH⁺ESA⁺细胞在50 d内仍不能形成肿瘤; ALDH⁺CD133⁺ESA⁺细胞比ALDH⁺ESA⁺细胞的致瘤率高(89% vs 58%), ALDH⁺CD44⁺ESA⁺细胞与ALDH⁺ESA⁺细胞的致瘤率相同(70%). 该研究提示ALDH1是结肠CSC的一个标志, 结合CD133可以稍稍增加CSC的富集. 但Chu等^[31]却报道了不一致的结果, 从4例原发结肠癌小鼠移植瘤中分离出CD44^{hi}具有高的致瘤性, 结合ALDH标志分选出的细胞其致瘤性较单独的CD44^{hi}有明显增加, 而CD44^{hi}与CD133结合却不增加其致瘤能力. 比较这两个研究, 可能与后者的研究采用了CD44表达强度高的细胞有关.

综合目前所有的结直肠CSC的研究, 尽管在分选标志上的差异, 甚至有矛盾的结果, 但仍可认为在结直肠癌中存在干细胞样的细胞亚群, 其特异性细胞表型还需深入研究.

3 结直肠癌干细胞的起源

CSCs是否直接起源于突变的干细胞或肿瘤形成过程中获得干细胞特性的成熟细胞目前还不清楚. Mani等^[32]对永生化的人乳腺上皮细胞行上皮间质转换(epithelial-mesenchymal transition, EMT)诱导后, 产生了有干细胞特性的细胞, 同时乳腺癌中分离的干样细胞也表达EMT的标志. 该研究提示癌细胞受EMT的临时诱导可能是CSC的来源. 另一方面, CSCs的特性极其类似

于正常的干细胞, 都具有自我更新与多潜力分化的能力以及表达共同的表面标志^[33]. 在大多数实体组织中, 由于他们的干细胞及其子代细胞还无确切的细胞表面免疫表型, 因此更难确定CSCs类似的细胞类型或起源于某种细胞. 但就结肠CSC的起源目前已有一些研究显示可能来源于干细胞的突变.

Zhu等^[34]用Cre及LacZ报道基因敲入Prom1(即CD133)的基因位点(Prom1^{C-L})建立小鼠模型, 谱系跟踪研究显示Prom1⁺细胞位于小肠隐窝基底部, 并共表达另一个肠干细胞基因Lgr5^[35], 产生完整的小肠上皮, 因此是小肠干细胞; 当该小鼠含有 β -catenin突变时, 出现了隐窝结构破坏与隐窝基底部不相称地Prom1⁺细胞扩展, 谱系跟踪证实Prom1⁺细胞的子代细胞代替了整个小肠肿瘤黏膜, 其病理为局灶性高级别上皮内瘤变与隐窝腺瘤形成, 有7%的这些子代肿瘤细胞仍表达Prom1. 此研究提示Prom1标记的成体小肠干细胞易受肿瘤转化并维持部分突变的Prom1⁺肿瘤细胞.

Barker等^[36]建立了敲入Lgr5并他莫昔芬诱导Cre重组酶表达在肠长期生存的干细胞或短生存期的传递-放大细胞的小鼠模型, 当诱导肠Lgr5⁺干细胞APC基因缺失的数天内就出现肿瘤性转化, 转化的干细胞位于肠隐窝的底部, 驱动微腺瘤无阻止性生长, 从而在3-5 wk后发展成肉眼所见的腺瘤; 而当APC基因缺失在隐窝的传递至放大细胞时, 诱导的微腺瘤被明显推迟, 甚至在30 wk之后大的腺瘤仍非常少. 该研究提示隐窝干细胞特异性APC缺失将导致进行性生长的肿瘤.

目前多数研究提示人类结肠隐窝的干细胞数大约占隐窝总细胞数的1%, 即每个隐窝不到20个干细胞, 他们位于隐窝基底部. Boman等^[37]通过对结肠癌触发事件行计算机模拟建立数学模型, 提出了干细胞过剩(stem cell overpopulation)假说, 即仅仅隐窝干细胞数量增加可能解释导致结肠癌发生的早期组织学异常, 而不是非干细胞群体的凋亡、分化或增殖变化所致. 并认为隐窝干细胞过剩是在细胞层面上连接结肠分子水平的触发(如典型的APC突变)到组织水平的早期变化(隐窝增殖异常)的关键事件. 随后, 在家族性腺瘤性息肉病标本中利用免疫组织化学染色显示腺瘤发生过程中结肠隐窝MSH2、Bcl-2、survivin等标志的变化, 得到了支持隐窝基底细胞扩展的证据^[38]; 另两个利用结肠细胞

■相关报道

Mani等对永生化的人乳腺上皮细胞行上皮间质转换(EMT)诱导后, 产生了有干细胞特性的细胞, 同时乳腺癌中分离的干样细胞也表达EMT的标志.

■应用要点

随着CSC研究领域快速发展,以及基因组学等高通量的筛选技术的进步,必将有助于识别结直肠CSC新的标志。

表观遗传标志甲基化的研究显示在家族性腺瘤性息肉病中伴随结肠癌发生的干细胞生存能力被增强^[39,40];这些研究间接支持了在结肠癌发生发展中干细胞过剩假说。最近, Huang等^[30]的研究显示ALDH1⁺细胞在人结肠隐窝中是稀少的,并局限在隐窝基底部干细胞占据的位置,在从正常上皮到APC突变上皮,再到腺瘤,ALDH1⁺细胞在数量上增加以及向隐窝上段分布,且少量ALDH1⁺结肠癌细胞就能在免疫缺陷小鼠中致瘤,提示在结肠瘤变与驱动结肠癌发展过程中出现了进行性的结肠干细胞过剩。Boman等^[41]进一步研究认为结肠癌变过程中导致干细胞过剩的机制可能与控制能增殖的结肠隐窝细胞比例与其处于细胞周期S期的概率失调有关。

结合以上关于肠干细胞与结肠癌的关系研究,可以推测结肠隐窝干细胞在获得或遗传APC基因突变的第一次打击后出现突变的干细胞数量过剩,在随后所处的小境变化时受到了再次突变的第二次打击后形成了CSCs,在组织学上出现细胞癌变。

4 转移性结直肠癌干细胞的研究

在癌细胞中仅CSCs具有自我更新与多向分化的特性,可以预测也只有CSCs才能在远隔部位形成转移性肿瘤。Hermann等^[10]对胰腺癌细胞系的研究支持了这个概念,同时证实CSCs中独特亚群CD133⁺CXCR4⁺表型细胞为转移性胰腺CSCs。早在此研究之前, Brabletz等^[42]以结直肠癌为模型,阐述了原发肿瘤细胞发生EMT后具有转移能力,癌细胞经过循环迁移到远隔部位后发生MET并形成与原发肿瘤组织构型一致的肿瘤,借此推断恶性肿瘤进展过程中可能存在具有运动迁移特性的CSCs,首次提出迁移性CSCs(migrating cancer stem cells)的概念。细胞发生EMT已经被发现能获得干细胞特性,可能是CSCs的起源;而CSCs发生EMT是否能产生转移性CSCs还有待实验证实。

在结肠癌肝转移病例中, Shmelkov等^[24]利用FACS分析了19例标本,其中有11例出现CD133⁺细胞(1.9%-30%),且在CD133⁺的转移性结肠癌中分离出的CD133⁺细胞与CD133⁻细胞都能在免疫缺陷小鼠形成肿瘤;与CD133⁺细胞比较,CD133⁻细胞体内展示更快生长率与体外显示有更高的反映肿瘤侵袭性标志CEA的阳性率。提示CD133可能也不是转移性结直肠CSCs的标志。

我们通过对来源于同一患者的原发肿瘤

所建立的细胞系SW480及其转移淋巴结所建立的细胞系SW620用FACS分析显示: CD133在SW480细胞系中阴性表达,在SW620细胞系中为阴性与阳性两群细胞;从SW620细胞系中分选出CD133⁺与CD133⁻细胞,侵袭性实验显示CD133⁻细胞强于CD133⁺细胞;软琼脂克隆形成实验显示CD133⁻细胞形成克隆能力高于CD133⁺细胞;鉴于结肠癌细胞体外3D球培养可模拟肿瘤早期微转移^[43,44],我们通过悬吊培养CD133⁻细胞与CD133⁺细胞,二者都能形成球,分析显示CD133⁻细胞的球中出现了CD133⁺细胞,而CD133⁺细胞的球中并无CD133⁻细胞产生。我们的研究支持CD133不是转移性结直肠CSCs的标志,并提示转移性结直肠癌细胞中出现的CD133⁺细胞可能来源于从原发肿瘤中迁移出去的CD133⁻细胞。

结直肠癌组织的侵袭前沿(invasive front)常出现一些分离的或成簇的癌细胞,称之为肿瘤出芽(budding),大数量的研究提示肿瘤出芽与结直肠癌细胞EMT有密切关系^[45]。推测正是这些肿瘤出芽细胞发生了EMT,并执行远处转移的生物行为。Horst等^[25]对结直肠癌组织免疫染色示肿瘤腺泡CD133表达,在其侵袭前沿未分化的肿瘤“芽”CD133染色阴性。我们的研究也获得了一致的结果,对50例组织学上有肿瘤出芽的结直肠癌标本行CD133免疫染色,结果显示大多数肿瘤腺体细胞表达CD133,而所有出芽的肿瘤细胞为CD133阴性表达,其相应的转移淋巴结或肝转移灶免疫染色显示存在CD133⁺与CD133⁻的两群细胞。

综合以上研究,我们提出CD133与结直肠癌转移的假说,即结直肠癌侵袭前沿CD133⁻细胞经循环迁移至远隔淋巴结或肝脏等器官;在局部微环境影响下,部分CD133⁻细胞上调CD133的表达,表现为转移灶中含有CD133⁺与CD133⁻细胞。在转移肿瘤CD133⁻细胞中寻找转移性结直肠CSCs可能是一个有效的途径。

5 结直肠癌干细胞研究的相关问题

CD133是最先作为结直肠CSCs的标志,但也是质疑较多的分子。目前常用的CD133抗体为AC133与AC141单克隆抗体(Miltenyi, 德国),他们作用于CD133的糖基化表位。这就意味着当用这两个抗体识别与分选CSCs时,CD133的糖基化状态可能成为CSC表型的间接标志,而不是CD133蛋白本身表达^[46]。已有研究报道在结肠癌

中CD133表位(AC133)具有细胞周期依赖性变化的特点^[47]。因此,应用CD133多克隆抗体以及结合其mRNA水平才能反应细胞CD133的表达。由于在我们的研究中CD133⁺的结直肠癌细胞能形成结肠球, Shmelkov等^[24]的研究中CD133⁺结直肠癌细胞移植在免疫缺陷小鼠能致瘤,暗示CD133本身并不执行肿瘤生长的功能,这与Du等^[22]以及Horst等^[48]。在结肠癌细胞中敲出CD133后未观察到CD133具有功能作用的报道一致。但是理解这一问题还有待阐明CD133的分子细胞功能。到目前为止,结直肠CSCs还缺乏特异性好、稳定性高、实用性强的单个或一组分选标志。

鉴定肿瘤细胞是否为CSC的“金标准”为移植成瘤实验。大多数情况下异种移植的效率显著低于同种移植,部分原因在于生长因子、细胞因子与相应受体、配体的种属特异性。正如Kelly等^[49]研究提示异种移植可能对在异种环境能生存的细胞具有选择性。而就是这样生存下来的细胞被我们公认为CSCs。但是,建立完全拥有人体微环境的小鼠模型却是一个巨大的挑战。另一个影响异种移植效率的因素是现有的免疫缺陷小鼠体内残存的免疫效应细胞。比如目前广泛用于CSCs研究的NOD/SCID小鼠仍维持有自然杀伤细胞的活性。而Quintana等^[50]应用缺乏自然杀伤细胞的更加严重的免疫缺陷NOD/SCID-IL2R γ^{null} 小鼠进行人黑色素瘤细胞致瘤实验,结果显示能致瘤的细胞频率显著增加。此外,异种移植的部位也影响致瘤细胞的频率。O'Brien等^[18]在结直肠CSC的鉴定过程中发现在肾囊内移植100-200个细胞就能出现显著差异,而Ricci-Vitiani等^[19]在皮下移植却需至少3 000个细胞才能显示出差异。这可能与肾囊内丰富的血管环境有关系。目前还没有结直肠CSC原位移植实验的报道。

6 结论

随着CSC研究领域的快速发展,以及基因组学等高通量的筛选技术的进步,必将有助于识别结直肠CSC新的标志;结合对结直肠癌干细胞起源机制的进一步研究,将使靶向结直肠CSCs的治疗成为可能,真正达到能治愈结直肠癌的目标。

7 参考文献

- 1 Southam CM, Brunschwig A, Levin AG, Dizon QS. Effect of leukocytes on transplantability of human cancer. *Cancer* 1966; 19: 1743-1753
- 2 Heppner GH, Miller BE. Tumor heterogeneity:

- biological implications and therapeutic consequences. *Cancer Metastasis Rev* 1983; 2: 5-23
- 3 Bonnet D, Dick JE. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med* 1997; 3: 730-737
- 4 Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* 2001; 414: 105-111
- 5 Clarke MF, Dick JE, Dirks PB, Eaves CJ, Jamieson CH, Jones DL, Visvader J, Weissman IL, Wahl GM. Cancer stem cells--perspectives on current status and future directions: AACR Workshop on cancer stem cells. *Cancer Res* 2006; 66: 9339-9344
- 6 Lapidot T, Sirard C, Vormoor J, Murdoch B, Hoang T, Caceres-Cortes J, Minden M, Paterson B, Caligiuri MA, Dick JE. A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature* 1994; 367: 645-648
- 7 Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ, Clarke MF. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100: 3983-3988
- 8 Singh SK, Hawkins C, Clarke ID, Squire JA, Bayani J, Hide T, Henkelman RM, Cusimano MD, Dirks PB. Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature* 2004; 432: 396-401
- 9 Ma S, Chan KW, Hu L, Lee TK, Wo JY, Ng IO, Zheng BJ, Guan XY. Identification and characterization of tumorigenic liver cancer stem/progenitor cells. *Gastroenterology* 2007; 132: 2542-2556
- 10 Hermann PC, Huber SL, Herrler T, Aicher A, Ellwart JW, Guba M, Bruns CJ, Heeschen C. Distinct populations of cancer stem cells determine tumor growth and metastatic activity in human pancreatic cancer. *Cell Stem Cell* 2007; 1: 313-323
- 11 Collins AT, Berry PA, Hyde C, Stower MJ, Maitland NJ. Prospective identification of tumorigenic prostate cancer stem cells. *Cancer Res* 2005; 65: 10946-10951
- 12 Curley MD, Therrien VA, Cummings CL, Sergeant PA, Koulouris CR, Friel AM, Roberts DJ, Seiden MV, Scadden DT, Rueda BR, Foster R. CD133 expression defines a tumor initiating cell population in primary human ovarian cancer. *Stem Cells* 2009; 27: 2875-2883
- 13 Eramo A, Lotti F, Sette G, Pilozzi E, Biffoni M, Di Virgilio A, Conticello C, Ruco L, Peschle C, De Maria R. Identification and expansion of the tumorigenic lung cancer stem cell population. *Cell Death Differ* 2008; 15: 504-514
- 14 Monzani E, Facchetti F, Galmozzi E, Corsini E, Benetti A, Cavazzin C, Gritti A, Piccinini A, Porro D, Santinami M, Invernici G, Parati E, Alessandri G, La Porta CA. Melanoma contains CD133 and ABCG2 positive cells with enhanced tumorigenic potential. *Eur J Cancer* 2007; 43: 935-946
- 15 Barabé F, Kennedy JA, Hope KJ, Dick JE. Modeling the initiation and progression of human acute leukemia in mice. *Science* 2007; 316: 600-604
- 16 Clark EA, Golub TR, Lander ES, Hynes RO. Genomic analysis of metastasis reveals an essential role for RhoC. *Nature* 2000; 406: 532-535
- 17 Creighton CJ, Li X, Landis M, Dixon JM, Neumeister VM, Sjolund A, Rimm DL, Wong H, Rodriguez A, Herschkowitz JI, Fan C, Zhang X, He X, Pavlick A, Gutierrez MC, Renshaw L, Larionov

■同行评价

本文立意新颖,证据充分,可读性较好。

- AA, Faratian D, Hilsenbeck SG, Perou CM, Lewis MT, Rosen JM, Chang JC. Residual breast cancers after conventional therapy display mesenchymal as well as tumor-initiating features. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009; 106: 13820-13825
- 18 O'Brien CA, Pollett A, Gallinger S, Dick JE. A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice. *Nature* 2007; 445: 106-110
 - 19 Ricci-Vitiani L, Lombardi DG, Pilozzi E, Biffoni M, Todaro M, Peschle C, De Maria R. Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells. *Nature* 2007; 445: 111-115
 - 20 Todaro M, Alea MP, Di Stefano AB, Cammareri P, Vermeulen L, Iovino F, Tripodo C, Russo A, Gulotta G, Medema JP, Stassi G. Colon cancer stem cells dictate tumor growth and resist cell death by production of interleukin-4. *Cell Stem Cell* 2007; 1: 389-402
 - 21 Dalerba P, Dylla SJ, Park IK, Liu R, Wang X, Cho RW, Hoey T, Gurney A, Huang EH, Simeone DM, Shelton AA, Parmiani G, Castelli C, Clarke MF. Phenotypic characterization of human colorectal cancer stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; 104: 10158-10163
 - 22 Du L, Wang H, He L, Zhang J, Ni B, Wang X, Jin H, Cahuzac N, Mehrpour M, Lu Y, Chen Q. CD44 is of functional importance for colorectal cancer stem cells. *Clin Cancer Res* 2008; 14: 6751-6760
 - 23 Vermeulen L, Todaro M, de Sousa Mello F, Sprick MR, Kemper K, Perez Alea M, Richel DJ, Stassi G, Medema JP. Single-cell cloning of colon cancer stem cells reveals a multi-lineage differentiation capacity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 105: 13427-13432
 - 24 Shmelkov SV, Butler JM, Hooper AT, Hormigo A, Kushner J, Milde T, St Clair R, Baljevic M, White I, Jin DK, Chadburn A, Murphy AJ, Valenzuela DM, Gale NW, Thurston G, Yancopoulos GD, D'Angelica M, Kemeny N, Lyden D, Rafii S. CD133 expression is not restricted to stem cells, and both CD133+ and CD133- metastatic colon cancer cells initiate tumors. *J Clin Invest* 2008; 118: 2111-2120
 - 25 Horst D, Kriegl L, Engel J, Kirchner T, Jung A. CD133 expression is an independent prognostic marker for low survival in colorectal cancer. *Br J Cancer* 2008; 99: 1285-1289
 - 26 Kojima M, Ishii G, Atsumi N, Fujii S, Saito N, Ochiai A. Immunohistochemical detection of CD133 expression in colorectal cancer: a clinicopathological study. *Cancer Sci* 2008; 99: 1578-1583
 - 27 Jones RJ, Barber JP, Vala MS, Collector MI, Kaufmann SH, Ludeman SM, Colvin OM, Hilton J. Assessment of aldehyde dehydrogenase in viable cells. *Blood* 1995; 85: 2742-2746
 - 28 Corti S, Locatelli F, Papadimitriou D, Donadoni C, Salani S, Del Bo R, Strazzer S, Bresolin N, Comi GP. Identification of a primitive brain-derived neural stem cell population based on aldehyde dehydrogenase activity. *Stem Cells* 2006; 24: 975-985
 - 29 Ginestier C, Hur MH, Charafe-Jauffret E, Monville F, Dutcher J, Brown M, Jacquemier J, Viens P, Kleer CG, Liu S, Schott A, Hayes D, Birnbaum D, Wicha MS, Dontu G. ALDH1 is a marker of normal and malignant human mammary stem cells and a predictor of poor clinical outcome. *Cell Stem Cell* 2007; 1: 555-567
 - 30 Huang EH, Hynes MJ, Zhang T, Ginestier C, Dontu G, Appelman H, Fields JZ, Wicha MS, Boman BM. Aldehyde dehydrogenase 1 is a marker for normal and malignant human colonic stem cells (SC) and tracks SC overpopulation during colon tumorigenesis. *Cancer Res* 2009; 69: 3382-3389
 - 31 Chu P, Clanton DJ, Snipas TS, Lee J, Mitchell E, Nguyen ML, Hare E, Peach RJ. Characterization of a subpopulation of colon cancer cells with stem cell-like properties. *Int J Cancer* 2009; 124: 1312-1321
 - 32 Mani SA, Guo W, Liao MJ, Eaton EN, Ayyanan A, Zhou AY, Brooks M, Reinhard F, Zhang CC, Shipitsin M, Campbell LL, Polyak K, Briskin C, Yang J, Weinberg RA. The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell* 2008; 133: 704-715
 - 33 Clarke MF, Fuller M. Stem cells and cancer: two faces of eve. *Cell* 2006; 124: 1111-1115
 - 34 Zhu L, Gibson P, Currle DS, Tong Y, Richardson RJ, Bayazitov IT, Poppleton H, Zakharenko S, Ellison DW, Gilbertson RJ. Prominin 1 marks intestinal stem cells that are susceptible to neoplastic transformation. *Nature* 2009; 457: 603-607
 - 35 Barker N, van Es JH, Kuipers J, Kujala P, van den Born M, Cozijnsen M, Haegebarth A, Korving J, Begthel H, Peters PJ, Clevers H. Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene Lgr5. *Nature* 2007; 449: 1003-1007
 - 36 Barker N, Ridgway RA, van Es JH, van de Wetering M, Begthel H, van den Born M, Danenberg E, Clarke AR, Sansom OJ, Clevers H. Crypt stem cells as the cells-of-origin of intestinal cancer. *Nature* 2009; 457: 608-611
 - 37 Boman BM, Fields JZ, Bonham-Carter O, Runquist OA. Computer modeling implicates stem cell overproduction in colon cancer initiation. *Cancer Res* 2001; 61: 8408-8411
 - 38 Boman BM, Walters R, Fields JZ, Kovatich AJ, Zhang T, Isenberg GA, Goldstein SD, Palazzo JP. Colonic crypt changes during adenoma development in familial adenomatous polyposis: immunohistochemical evidence for expansion of the crypt base cell population. *Am J Pathol* 2004; 165: 1489-1498
 - 39 Yatabe Y, Tavaré S, Shibata D. Investigating stem cells in human colon by using methylation patterns. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98: 10839-10844
 - 40 Kim KM, Shibata D. Methylation reveals a niche: stem cell succession in human colon crypts. *Oncogene* 2002; 21: 5441-5449
 - 41 Boman BM, Fields JZ, Cavanaugh KL, Guetter A, Runquist OA. How dysregulated colonic crypt dynamics cause stem cell overpopulation and initiate colon cancer. *Cancer Res* 2008; 68: 3304-3313
 - 42 Brabletz T, Jung A, Spaderna S, Hlubek F, Kirchner T. Opinion: migrating cancer stem cells - an integrated concept of malignant tumour progression. *Nat Rev Cancer* 2005; 5: 744-749
 - 43 Valcárcel M, Arteta B, Jaureguibeitia A, Lopategi A, Martínez I, Mendoza L, Muruzabal FJ, Salado C, Vidal-Vanaclocha F. Three-dimensional growth as multicellular spheroid activates the proangiogenic phenotype of colorectal carcinoma cells via LFA-1-dependent VEGF: implications on hepatic micrometastasis. *J Transl Med* 2008; 6: 57
 - 44 Weiswald LB, Richon S, Validire P, Briffod M, Lai-Kuen R, Cordelières FP, Bertrand F, Dargere D, Massonnet G, Marangoni E, Gayet B, Pocard M, Bieche I, Poupon MF, Bellet D, Dangles-Marie V.

- Newly characterised ex vivo colospheres as a three-dimensional colon cancer cell model of tumour aggressiveness. *Br J Cancer* 2009; 101: 473-482
- 45 Prall F. Tumour budding in colorectal carcinoma. *Histopathology* 2007; 50: 151-162
- 46 Bidlingmaier S, Zhu X, Liu B. The utility and limitations of glycosylated human CD133 epitopes in defining cancer stem cells. *J Mol Med* 2008; 86: 1025-1032
- 47 Jaksch M, Múnera J, Bajpai R, Terskikh A, Oshima RG. Cell cycle-dependent variation of a CD133 epitope in human embryonic stem cell, colon cancer, and melanoma cell lines. *Cancer Res* 2008; 68: 7882-7886
- 48 Horst D, Scheel SK, Liebmann S, Neumann J, Maatz S, Kirchner T, Jung A. The cancer stem cell marker CD133 has high prognostic impact but unknown functional relevance for the metastasis of human colon cancer. *J Pathol* 2009; 219: 427-434
- 49 Kelly PN, Dakic A, Adams JM, Nutt SL, Strasser A. Tumor growth need not be driven by rare cancer stem cells. *Science* 2007; 317: 337
- 50 Quintana E, Shackleton M, Sabel MS, Fullen DR, Johnson TM, Morrison SJ. Efficient tumour formation by single human melanoma cells. *Nature* 2008; 456: 593-598

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

ISSN 1009-3079 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》计量单位标准

本刊讯 本刊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±前后都要列出. 如37.6 °C ± 1.2 °C, 45.6岁 ± 24岁, 56.4 d ± 0.5 d. 3.56 pg/ml ± 0.27 pg/ml 应为3.56 ng/L ± 0.27 ng/L. BP用kPa(mmHg), RBC数用 $\times 10^{12}/L$, WBC数用 $\times 10^9/L$, WBC构成比用0.00表示, Hb用g/L. M_r 明确的体内物质以mmol/L, nmol/L或 μ mol/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 μg, 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值的文句中, 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酒精; 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.

长期慢性束缚水浸应激对大鼠胃窦Cajal间质细胞数量的影响

张丹, 夏志伟, 韩亚京

■背景资料

在胃肠电活动及其动力功能的研究中, 越来越多的研究已证实Cajal间质细胞(ICC)在其中发挥了重要作用, 然而目前的研究大多集中在胃肠器质性病变与ICC关系和机制的研究上, 对于慢性应激及胃肠的功能性病变与ICC的变化未见研究. 本研究旨在通过慢性应激动物模型来观察ICC在不同应激阶段内的数量变化, 以探讨ICC在慢性应激导致的胃功能改变中所起的作用.

张丹, 夏志伟, 韩亚京, 北京大学第三医院消化科 北京市100191

作者贡献分布: 此课题由夏志伟与张丹共同设计; 研究过程和数据分析由张丹完成; 实验技术选择和操作方法由韩亚京指导支持; 文章撰写由张丹与夏志伟共同完成.

通讯作者: 夏志伟, 副教授, 100191, 北京市, 北京大学第三医院消化科. xiazhawei@medmail.com.cn

电话: 010-82266699-8768

收稿日期: 2009-09-20 修回日期: 2009-12-20

接受日期: 2009-12-29 在线出版日期: 2010-03-28

Long-term chronic water immersion-restraint stress alters the number of interstitial cells of Cajal in the gastric antrum of rats

Dan Zhang, Zhi-Wei Xia, Ya-Jing Han

Dan Zhang, Zhi-Wei Xia, Ya-Jing Han, Department of Digestive Diseases, Peking University Third Hospital, Beijing 100191, China

Correspondence to: Associate Professor Zhi-Wei Xia, Department of Digestive Diseases, Peking University Third Hospital, Beijing 100191, China. xiazhawei@medmail.com.cn

Received: 2009-09-20 Revised: 2009-12-20

Accepted: 2009-12-29 Published online: 2010-03-28

Abstract

AIM: To investigate the impact of long-term chronic water immersion-restraint stress on the number of interstitial cells of Cajal (ICC) in the gastric antrum of rats and to explore the relationship between ICC and gastric motility changes caused by chronic stress.

METHODS: Forty-eight male Sprague-Dawley rats were randomly and equally divided into six groups: three experiment groups and three matched control groups. The three experimental groups underwent water immersion-restraint stress for one hour daily for 3, 7 and 14 d, respectively, while the three control groups were allowed free access to food and water. On days 4, 8 and 29, the rats in both groups were sacrificed. Gastric tissue samples were collected from areas at the lesser curvature of the membranous

stomach and the lesser curvature of the glandular stomach as well as areas near the upper one third of the great curvature of the glandular stomach and the pylorus of the glandular stomach. Paraffin-embedded sections were then made. The number of ICC was counted after immunohistochemical staining for c-Kit.

RESULTS: Intermuscular (ICC-MY) and intramuscular ICC (ICC-IM) were predominant types of ICC in normal rats, whereas submucosal ICC (ICC-SM) and ICC in the deep muscular plexus (ICC-DMP) were minor ones. The number of ICC were statistically different between the experiment and control groups on days 7 and 28 after stress: the number of ICC increased on day 7 but decreased on day 28 in the experiment groups. After stress, significant changes were found in the number of ICC-MY and ICC-IM, but not in that of ICC-SM and ICC-DMP.

CONCLUSION: Long-term chronic water immersion-restraint stress alters the number of ICC in the gastric antrum of rats.

Key Words: Stomach; Interstitial cell of Cajal; Chronic water immersion-restraint stress

Zhang D, Xia ZW, Han YJ. Long-term chronic water immersion-restraint stress alters the number of interstitial cells of Cajal in the gastric antrum of rats. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(9): 920-925

摘要

目的: 研究不同时程低强度束缚水浸应激对大鼠Cajal间质细胞(interstitial cells of Cajal, ICC)数量的影响, 探讨慢性应激导致胃动力改变与ICC的相关性.

方法: 雄性SPF级SD大鼠48只被随机分为6组, 即实验3 d、7 d、28 d组和对照3 d、7 d、28 d组, 每组8只. 实验组23℃水域箱内束缚水浸1 h/d, 对照组自由摄食饮水. 4 d、8 d、29 d晨序贯脱颈处死. 取膜胃小弯侧(ICC-1)、腺胃小弯侧(ICC-3)、腺胃大弯侧上1/3处(ICC-5)、

■同行评议者

魏睦新, 教授, 南京医科大学第一附属医院中医内科

腺胃幽门旁0.5 cm处(ICC-7)组织各一块放入固定液中, 制成石蜡切片; 抗c-kit免疫组织化学染色, 观察不同层次ICC计数。

结果: 正常大鼠胃内ICC主要分布在肌内(ICC-MY)和肌间(ICC-IM), 而黏膜下(ICC-SM)和深肌丛(ICC-DMP)较少。实验3 d组的各层ICC数量与对照组相比无明显差异, 实验7 d和28 d组大鼠不同部位、不同层次及同一部位不同层次ICC数量明显异于同期对照组。应激时间长短对不同部位不同层次及同一部位不同层次ICC总数有明显影响, 其大致规律是先正常后增加再减少, 即先升高后降低。应激主要引起ICC-MY及ICC-IM数量发生变化, 而本来较少的ICC-SM和ICC-DMP受影响较轻。

结论: 长时间低强度的慢性束缚水浸应激可以使大鼠胃窦ICC数量发生变化。

关键词: 胃; Cajal间质细胞; 慢性束缚水浸应激

张丹, 夏志伟, 韩亚京. 长期慢性束缚水浸应激对大鼠胃窦Cajal间质细胞数量的影响. 世界华人消化杂志 2010; 18(9): 920-925
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/920.asp>

0 引言

近年来, 随着现代生活方式的转变及旧医学模式向社会-心理-生物医学模式的转变, 应激对机体造成的心身损害越来越引起人们的重视。一些腹胀、腹痛、腹泻、便秘等胃肠道症状而无相应器质性病变的功能性胃肠病(functional gastrointestinal diseases, FGIDs)已成为一种常见病多发病。精神因素在本组疾病发生中起重要作用, 而胃肠动力障碍及其电活动异常又是FGIDs的主要病理生理基础^[1,2]。在胃肠电活动及其动力功能的研究中, 越来越多的研究已证实Cajal间质细胞(interstitial cell of Cajal, ICC)在其中发挥了重要作用, 然而目前的研究大多集中在胃肠器质性病变与ICC关系和机制的研究上, 对于慢性应激及胃肠的功能性病变与ICC的变化未见研究^[3-5]。本研究旨在通过慢性应激动物模型来观察ICC在不同应激阶段内的数量变化, 以探讨ICC在慢性应激导致的胃功能改变中所起的作用。

1 材料和方法

1.1 材料 SPF级成年同龄SD大鼠48只, ♂(实验动物许可证号SCXK京2006-0008), 体质量150 g左

右, 购自北京大学医学部实验动物部。本研究得到北京大学医学部动物保护委员会认可。

1.2 方法

1.2.1 分组: 首先将大鼠置于昼夜节律光照条件下, 自由进食进水, 室温在18 ℃-22 ℃, 饲养1 wk以适应环境, 每日触摸1次, 每次5 min。随后将48只大鼠随机分成实验3、7、28 d组和同期对照组, 共6组, 每组8只。

1.2.2 造模: 对照组不接受任何刺激, 自由摄食饮水; 实验组大鼠2 ℃水域箱内束缚水浸1 h/d, 分别于第4、8、29天晨将相应组别的大鼠于禁食12 h后序贯脱颈处死。

1.2.3 取材: 每组大鼠禁食12 h后予阿拉伯胶炭糊15 mL/kg灌胃, 30 min后脱颈处死, 开腹, 结扎胃贲门和幽门, 游离全胃, 用滤纸拭干后称全质量; 注入2%多聚甲醛5 mL内固定20 min; 沿胃大弯剪开胃体, 洗去胃内容物后拭干, 称净质量。分别剪取ICC-1(膜胃小弯侧)、ICC-3(腺胃上部小弯侧)、ICC-5(腺胃上部大弯侧)、ICC-7(腺胃幽门前区0.5 cm前壁大弯侧)各1块全层组织约0.5 cm×0.5 cm×0.5 cm大小立即置于40 g/L多聚甲醛溶液中固定2 h, 常规洗涤、脱水、透明、浸蜡、石蜡包埋后, 切片待测。

1.2.4 ICC测定方法: 采用c-kit免疫组织化学法(选用美国Santa Cruz PV-6001二步法, C-Kit/CD117试剂盒, 购自北京中杉金桥公司)。石蜡切片脱蜡至水→抗原修复液(购自北京世济合力生物科技有限公司)修复抗原: 微波高火15 min, 自然冷却20 min, 冷水浴10 min→去离子水涮洗后PBS浸洗5 min→3% H₂O₂室温孵育10 min以阻断内源性过氧化物酶→PBS浸洗5 min 3次→3%牛血清白蛋白45 ℃温箱孵育20 min→滤纸吸干→滴加1:400一抗温箱孵育2 h→PBS浸洗5 min 4次→滴加二抗(PV-6001山羊抗兔IgG抗体-HRP多聚体)温箱孵育30 min→PBS浸洗5 min 4次→DAB(3 mL去离子水加A、B、C各1滴)显色3-10 min, 光镜下观察见细胞质出现褐色片状或颗粒状物为c-Kit阳性→PBS涮洗, 去离子水涮洗→苏木素复染→分色→返蓝→脱水透明→树胶封片。

1.2.5 ICC数量观察: 按照ICC分布的4个层次观察: 黏膜下ICC(ICC-SM): 位于黏膜下及环状肌层表面; 肌间ICC(ICC-MY): 存在于环状和纵行肌之间; 肌内ICC(ICC-IM): 存在于环状肌和纵行肌束内; 深肌丛ICC(ICC-DMP): 处于环状肌层内。在×400镜下, 每个部位每个层次随机选

■研发前沿

继续延长应激时间后, 各部位ICC的数量均明显减少, 而最突出的体现在ICC-MY和ICC-IM的数量上变化。这种变化是否可逆, 有待于进一步研究。

■相关报道

研究表明, ICC是胃肠慢波的起搏细胞, 并推进电活动的传播; ICC对肠神经信号的传递具有调节作用。

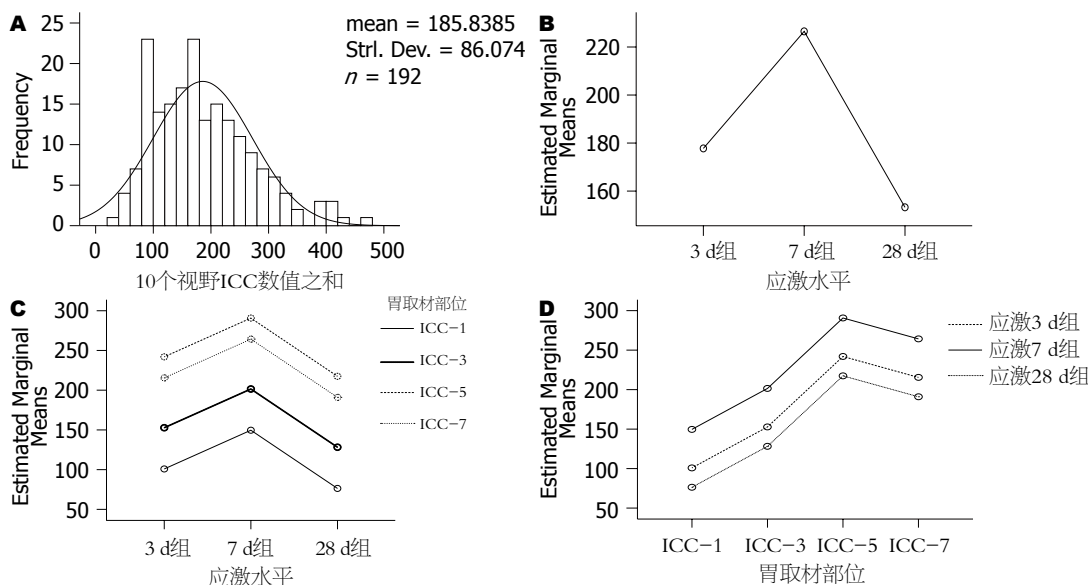


图1 各部位10个视野ICC总数均值的比较. A: 正态分布图; B: 应激水平对各部位ICC总的影响; C: 应激水平对不同部位ICC总数均值的影响; D: 不同部位ICC总数均值的组间比较。

表1 不同取材部位ICC总数的比较 (mean $\pm$ SD)

分组	ICC-1		ICC-3		ICC-5		ICC-7	
	对照组	实验组	对照组	实验组	对照组	实验组	对照组	实验组
3 d	100.6 $\pm$ 23.4	99.6 $\pm$ 21.7	150.3 $\pm$ 36.8	153.8 $\pm$ 39.5	259.1 $\pm$ 46.7	253.3 $\pm$ 41.0	204.3 $\pm$ 42.3	200.8 $\pm$ 42.9
7 d	111.0 $\pm$ 19.4	157.3 $\pm$ 45.2	161.0 $\pm$ 28.3	229.5 $\pm$ 82.8	251.3 $\pm$ 42.7	305.7 $\pm$ 79.5	212.4 $\pm$ 27.1	384.5 $\pm$ 53.1
28 d	121.1 $\pm$ 28.7	64.0 $\pm$ 19.7	163.9 $\pm$ 49.1	106.1 $\pm$ 28.2	270.0 $\pm$ 56.1	161.4 $\pm$ 44.4	221.2 $\pm$ 67.3	121.4 $\pm$ 67.3

取10个视野, 计数ICC阳性胞体和突起的个数之和。免疫组织化学法染色后ICC呈现棕黄色, 分布在肌间、肌内、黏膜下、深肌层, 为梭形、圆形、多角形和不规则形等, 高倍光镜下容易辨别^[6-8]。

统计学处理 采用SPSS13.0对数据进行统计学处理, 采用T-Test、一般线性模型、LSD-*t*检验分析, 以 $P = \text{Sig}(2\text{-tail}) < 0.05$ 为差异有统计学意义, $P = \text{Sig}(2\text{-tail}) < 0.01$ 为差异有显著统计学意义。

2 结果

2.1 各部位ICC总数的比较

2.1.1 T-Test: 正态性检验结果符合正态分布(图1A)。由表1可知, 实验3 d组和对照3 d组比较, ICC-1、3、5、7四个部位的ICC数量无差异($P > 0.05$)。而实验7 d组和对照7 d组比较, ICC-1组差异有统计学意义($P < 0.05$), 而ICC-3、5、7组差异显著($P < 0.01$)。实验28 d组和对照28 d组

比较四个部位的数值均有显著差异($P < 0.01$)。

2.1.2 一般线性模型: 应激时间长短对不同部位ICC总的影响, 有显著意义($F = 25.081, P < 0.01$, 图1B); 同一大鼠各取材部位ICC总数的组间比较: 实验3 d组与实验7 d组、实验7 d组与实验28 d组比较均差异显著($P < 0.01$), 实验3 d组与实验28 d组比较有统计学差异($P = 0.021 < 0.05$, 图1C)。不同部位对ICC总值间的影响, 有明显统计学差异($F = 54.46, P < 0.01$); 各部位间比较均有统计学意义($P \leq 0.05$ 或 0.01 , 图1D)。

2.2 不同取材部位不同层次ICC数量的变化

2.2.1 T-Test: 3 d时实验组各层次ICC数量与对照组无差别; 7 d时, 部位1、3、5的ICC-SM、ICC-DMP与对照组无差别, 上述部位的ICC-MY和ICC-IM数量、部位7的各层ICC数量与对照组差别明显。应激28 d时, 部位1、3的ICC-SM、ICC-DMP和部位5的ICC-SM与对照组无差别, 上述部位其他层次及部位5、7的各层ICC数量均与

表 2 位置1、3不同层次ICC数量的比较 (mean ± SD)

分组	ICC-1				ICC-3			
	ICC-MY	ICC-IM	ICC-SM	ICC-DMP	ICC-MY	ICC-IM	ICC-SM	ICC-DMP
实验3 d组	41.3 ± 10.2	29.2 ± 5.6	9.7 ± 3.4	20.5 ± 4.9	68.3 ± 15.4	44.7 ± 13.5	16.9 ± 4.2	31.3 ± 8.0
对照3 d组	40.1 ± 10.2	28.0 ± 6.2	12.1 ± 3.9	21.8 ± 4.5	63.8 ± 16.1	42.5 ± 9.1	14.6 ± 3.4	31.9 ± 11.7
实验7 d组	66.2 ± 18.2	45.8 ± 12.5	15.0 ± 6.5	32.4 ± 10.3	92.3 ± 30.6	70.2 ± 28.1	21.9 ± 8.7	47.2 ± 19.1
对照7 d组	48.7 ± 5.7	30.2 ± 10.2	9.3 ± 5.4	26.1 ± 8.0	62.5 ± 13.6	47.1 ± 12.1	13.9 ± 5.2	38.8 ± 8.3
实验28 d组	27.3 ± 7.3	17.2 ± 7.0	9.9 ± 3.7	16.8 ± 5.7	41.6 ± 12.5	30.8 ± 9.2	9.4 ± 3.3	24.2 ± 6.5
对照28 d组	50.3 ± 16.2	31.6 ± 12.8	16.4 ± 4.1	24.1 ± 2.8	63.7 ± 22.6	48.2 ± 17.5	15.6 ± 5.4	35.3 ± 8.9

■同行评价

本研究设计合理, 数据可信, 有助于了解胃运动调节机制, 有很好的学术价值。

表 3 位置5、7不同层次ICC数量的比较 (mean ± SD)

分组	ICC-5				ICC-7			
	ICC-MY	ICC-IM	ICC-SM	ICC-DMP	ICC-MY	ICC-IM	ICC-SM	ICC-DMP
实验3 d组	102.1 ± 14.4	77.8 ± 12.8	24.6 ± 5.5	50.2 ± 10.8	80.7 ± 19.4	60.1 ± 12.0	19.7 ± 4.7	39.2 ± 8.8
对照3 d组	107.7 ± 19.9	76.5 ± 14.4	23.9 ± 4.5	53.4 ± 10.3	87.8 ± 20.4	58.7 ± 14.3	16.9 ± 8.4	42.4 ± 6.6
实验7 d组	123.6 ± 31.7	88.0 ± 24.6	33.4 ± 7.8	61.3 ± 20.2	157.1 ± 25.7	111.9 ± 16.9	39.4 ± 17.5	76.2 ± 12.4
对照7 d组	91.7 ± 21.4	72.3 ± 7.2	28.2 ± 7.2	50.7 ± 10.5	83.8 ± 18.0	63.4 ± 9.9	19.2 ± 4.8	47.4 ± 2.0
实验28 d组	65.9 ± 17.3	46.2 ± 10.7	19.5 ± 6.6	32.1 ± 12.7	45.8 ± 15.6	34.3 ± 19.9	11.7 ± 3.3	28.6 ± 9.5
对照28 d组	109.4 ± 25.1	78.3 ± 17.4	30.0 ± 6.2	52.8 ± 11.7	87.3 ± 25.8	64.4 ± 19.3	28.3 ± 12.8	44.8 ± 12.1

对照组间存在差异(表2, 3)。

2.2.2 一般线形模型: 应激时间对部位1各层ICC数量有显著影响($F = 17.07$, $P < 0.01$), 部位1不同层次ICC数量有明显差异($P < 0.01$); 组间比较: 部位1的ICC-SM数量在不同应激时间组间比较无差别; ICC-DMP的3 d与28 d组间比较无差异($P = 0.329 > 0.05$), 其余层次ICC数量各组间比较均有显著统计学差异, 见图2A。

应激时间对部位3各层ICC数量有显著影响($F = 16.05$, $P < 0.01$)。组间比较: 部位3的ICC-SM各组间比较无显著性差异; ICC-DMP的3 d与28 d组间比较无差异($P = 0.12 > 0.05$), 其余层次ICC数量各组间比较均有显著统计学差异(图2B)。应激时间对部位5各层ICC数量有显著影响($F = 12.79$, $P < 0.01$)。组间比较: 部位5之ICC-DMP的3 d与7 d组间比较无差异($P > 0.05$), 其余

各层次ICC数量各组间比较均有显著统计学差异(均 $P < 0.01$, 图2C)。应激时间对部位7各层ICC数量有显著影响($F = 37.2$, $P < 0.01$)。组间比较: 部位7之ICC-DMP的3 d与28 d组间比较无差异($P > 0.05$)。其余各层次ICC数量各组间比较均有显著统计学差异(均 $P < 0.01$, 图2D)。

3 讨论

研究表明, ICC是胃肠慢波的起搏细胞, 并推进电活动的传播; ICC对肠神经信号的传递具有调节作用^[9,10]。ICC的缺失或处于病理条件时可出现胃肠道平滑肌反射能力减弱的现象^[11]。因此在众多胃肠动力障碍性疾病中都有ICC的参与。慢传输性便秘、Hirschsprung病、慢性假性肠梗阻, 甚至炎症性肠病等也有ICC数目减少, 以及ICC形态和超微结构的改变^[12-15]。

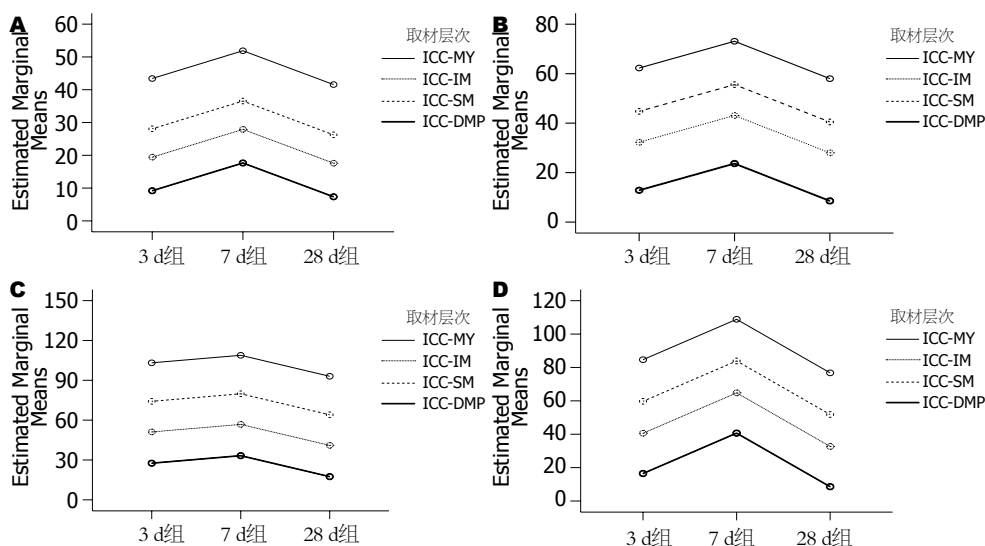


图2 应激时间对不同部位各层ICC数量的影响. A: 部位1; B: 部位3; C: 部位5; D: 部位7.

慢性束缚水浸应激(以下简称应激)可导致类似功能性胃肠病的胃肠功能改变,在其病理机制中除有肠神经系统(enteric nervous system, ENS)、胃肠激素、中枢神经系统(central nervous system, CNS)等参与外,还有不可忽视的肌源性机制-即ICC的参与.胃肠神经-ICC-平滑肌网络作为胃肠动力的基本单位,ICC在其中担当接受与传递兴奋和抑制性神经递质的角色,即起搏和传递胃慢波的功能.

除3 d外,应激7 d、28 d后不同部位、不同层次及同一部位不同层次ICC总数均值几乎均较对照组有明显改变;应激时间长短对不同部位、不同层次及同一部位不同层次ICC总数有明显影响,其大致规律是先正常后增加再减少,即先不变再升高后降低;应激主要引起ICC-MY及ICC-IM数量发生变化,而本来较少的ICC-SM和ICC-DMP受影响较轻.也就是说,除3 d组外,应激对大鼠胃内不同部位、不同层次及同一部位不同层次ICC总数是有明显影响的,且随着应激时间的延长,其规律是:不变(3 d)-升高(7 d)-下降(28 d).在此先升后降的过程中,还伴随发生了ICC细胞分布上的变化,所有对照组及应激3天组的ICC细胞分布均以胃体大弯部数量最多,ICC细胞数量多少顺序为:腺胃大弯部>腺胃窦部>腺胃体小弯部>膜胃部;而7天应激组却以胃窦部ICC数量最多,依次顺序为:腺胃窦部>腺胃体大弯部>腺胃体小弯部>膜胃部,且各部位ICC数量均较3 d组相同部位增多,并以具有起搏和传导功能的ICC-MY和ICC-IM增多为主;应激28 d组ICC细胞的分布

布部位又恢复到以腺胃体大弯部数量最多,且各部位ICC数量均较3 d组相同部位明显减少,并以ICC-MY和ICC-IM减少为主.而正常状态下,腺胃体大弯上1/3处是胃的主要起搏区域,该部位ICC的数量对胃动力起着至关重要的作用.据此推测,应激刺激后ICC的变化一方面主要体现在数量上,而随着应激时间的延长,实验组ICC胃内分布的优势区域与对照组比较发生明显的变化.这种变化主要体现在ICC-MY、ICC-IM的数量上.而幽门前区的ICC数量明显增加,提示胃驱动蠕动发生的起搏部位可能发生变化,因此可能导致胃运动功能紊乱^[16,17].继续延长应激时间后,各部位ICC的数量均明显减少,而最突出的体现在ICC-MY和ICC-IM的数量上变化.这种变化是否可逆,有待于进一步研究.

以往的研究表明,大鼠在接受应激刺激后可出现胃运动功能的障碍,胃排空降低,且随着应激时间的延长逐渐加重^[18,19],但其所采用的应激实验均为较高强度的应急刺激.

慢性应激和急性应激情况下,胃功能的改变可能有不同.本文作者此前的资料显示:慢性应激可以导致大鼠胃排空变化,早期排空加快,后期减慢,这可能与神经、内分泌、肌源性多种机制的调节剂补偿机制存在相关.

总之,大鼠接受慢性应激刺激初期,ICC的数量变化并不明显,分布亦无变化,而随着应激时间延长,大鼠ICC的数量和分布的优势区域发生变化.这种数量和分布的变化可能参与应激刺激后胃运动功能异常的改变.

4 参考文献

- 1 李晓波, 刘文忠. 功能性消化不良的病因和发病机制. 胃肠病学 2006; 11: 50-52
- 2 陈露, 李昌平. 功能性消化不良的病因研究进展. 临床消化病杂志 2003; 15: 187-189
- 3 林琳, 徐丽明, 罗云, 吴高珏, 汤玉蓉, 张红杰, 李学良. 糖尿病结肠动力障碍时Cajal间质细胞和干细胞因子的变化以及胰岛素的干预效应. 胃肠病学 2008; 13: 200-204
- 4 Bennett EJ, Piesse C, Palmer K, Badcock CA, Tennant CC, Kellow JE. Functional gastrointestinal disorders: psychological, social, and somatic features. *Gut* 1998; 42: 414-420
- 5 蔡亦蕴, 施慎逊, 徐三荣. 慢性应激对大鼠认知及胃肠功能的影响. 中国行为医学科学 2005; 14: 398-399
- 6 罗金燕, 齐惠滨. 1.7 Cajal间质细胞的功能与疾病. 基础医学与临床 2001; 21: 19-21
- 7 Ward SM, Sanders KM, Hirst GD. Role of interstitial cells of Cajal in neural control of gastrointestinal smooth muscles. *Neurogastroenterol Motil* 2004; 16 Suppl 1: 112-117
- 8 谭婧, 金孝炬. Cajal间质细胞的研究进展. 医学综述 2009; 15: 1294-1297
- 9 Ward SM, Beckett EA, Wang X, Baker F, Khoyi M, Sanders KM. Interstitial cells of Cajal mediate cholinergic neurotransmission from enteric motor neurons. *J Neurosci* 2000; 20: 1393-1403
- 10 童卫东, 刘宝华. Cajal间质细胞与结肠动力紊乱. 中华胃肠外科杂志 2007; 10: 189-191
- 11 Ward SM, Brennan MF, Jackson VM, Sanders KM. Role of PI3-kinase in the development of interstitial cells and pacemaking in murine gastrointestinal smooth muscle. *J Physiol* 1999; 516 (Pt 3): 835-846
- 12 Lyford GL, He CL, Soffer E, Hull TL, Strong SA, Senagore AJ, Burgart LJ, Young-Fadok T, Szurszewski JH, Farrugia G. Pan-colonic decrease in interstitial cells of Cajal in patients with slow transit constipation. *Gut* 2002; 51: 496-501
- 13 Horiguchi K, Keef KD, Ward SM. Distribution of interstitial cells of Cajal in tunica muscularis of the canine rectoanal region. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2003; 284: G756-G767
- 14 Isozaki K, Hirota S, Miyagawa J, Taniguchi M, Shinomura Y, Matsuzawa Y. Deficiency of c-kit+ cells in patients with a myopathic form of chronic idiopathic intestinal pseudo-obstruction. *Am J Gastroenterol* 1997; 92: 332-334
- 15 Porcher C, Baldo M, Henry M, Orsoni P, Julé Y, Ward SM. Deficiency of interstitial cells of Cajal in the small intestine of patients with Crohn's disease. *Am J Gastroenterol* 2002; 97: 118-125
- 16 张侃, 杨杰, 余晓云, 侯晓华. 正向低频长脉冲对逆向刺激模拟胃异位起搏点诱发胃电过速的治疗作用. 胃肠病学和肝病学杂志 2008; 17: 460-463
- 17 Hagger R, Finlayson C, Jeffrey I, Kumar D. Role of the interstitial cells of Cajal in the control of gut motility. *Br J Surg* 1997; 84: 445-450
- 18 苗丹民, 石茹. 心身疾病防御机制、预防与康复. 现代康复 1999; 3: 1154-1155, 1173
- 19 高巍, 黄裕新, 陈洪, 赵宁侠, 孙大勇, 张洪新, 王庆莉. 电针对胃经-脑肠肽-免疫网络的调控机制. 世界华人消化杂志 2001; 9: 279-283

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

ISSN 1009-3079 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)

胃癌与慢性胃炎唾液蛋白质组鉴别诊断模型

张晓丽, 王济国, 曹美群, 吴正治

■背景资料

慢性萎缩性胃炎与胃癌的发生率呈显著的正相关。慢性胃炎的发展, 初始为炎性细胞浸润为主, 表现为慢性浅表性胃炎, 如炎症长期不能控制, 则可引起腺体破坏或肠化, 逐渐发展为慢性萎缩性胃炎。胃癌与慢性胃炎的早期鉴别诊断十分重要。

张晓丽, 王济国, 曹美群, 吴正治, 深圳市第二人民医院 广东省深圳市 518035

国家自然科学基金资助项目, No. 30640071

作者贡献分布: 此课题由吴正治设计并执行; 张晓丽完成MALDI-TOF-MS大部分实验; 王济国与曹美群完成部分实验并收集病例资料; 张晓丽、吴正治及王济国撰写本文。

通讯作者: 吴正治, 教授, 518035, 广东省深圳市, 深圳市第二人民医院. szwzz001@163.com

电话: 0755-83246393

收稿日期: 2009-12-16 修回日期: 2010-01-29

接受日期: 2010-02-09 在线出版日期: 2010-03-28

Differential salivary proteome profile-based predictive model for discrimination between gastric cancer and chronic gastritis

Xiao-Li Zhang, Ji-Guo Wang, Mei-Qun Cao, Zheng-Zhi Wu

Xiao-Li Zhang, Ji-Guo Wang, Mei-Qun Cao, Zheng-Zhi Wu, Shenzhen Second Hospital, Shenzhen 518035, Guangdong Province, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30640071

Correspondence to: Professor Zheng-Zhi Wu, Shenzhen Second Hospital, Shenzhen 518035, Guangdong Province, China. szwzz001@163.com

Received: 2009-12-16 Revised: 2010-01-29

Accepted: 2010-02-09 Published online: 2010-03-28

Abstract

AIM: To investigate the differential salivary protein expression profile between chronic gastritis and gastric cancer using mass spectrometry-based proteomic technique, and to seek specific biomarkers for discrimination between gastric cancer and chronic gastritis.

METHODS: Saliva specimens collected from gastric cancer patients and chronic gastritis patients were detected using weak cation exchange magnetic beads and matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS). Corresponding peptide mass fingerprint was obtained to develop a differential diagnostic model for discrimination between chronic gastritis and gastric cancer.

RESULTS: A total of 77 differential protein

peaks were observed between chronic gastritis patients and gastric cancer patients. One protein peak with a mass-to-charge ratio of 6 021.72 Da was statistically significant ($P < 0.05$). Based on the analysis of the expression profile of this differential protein, a predictive model for discrimination between gastric cancer and chronic gastritis was developed. The model has a specificity of 95.65% and a sensitivity of 71.43%.

CONCLUSION: The protein expression profiles of saliva specimens collected from gastric cancer patients and chronic gastritis patients are obtained. The diagnostic model for discrimination between gastric cancer and chronic gastritis is developed based on the expression profile of a differential protein with a molecular weight of 6 021.72 Da.

Key Words: Chronic gastritis; Gastric cancer; Discrimination diagnosis; Saliva; MALDI-TOF-MS

Zhang XL, Wang JG, Cao MQ, Wu ZZ. Differential salivary proteome profile-based predictive model for discrimination between gastric cancer and chronic gastritis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(9): 926-931

摘要

目的: 探讨用蛋白质组学质谱技术筛选慢性胃炎患者与胃癌患者唾液蛋白质表达谱, 寻找可用于胃癌与慢性胃炎鉴别诊断的特异性生物标志物。

方法: 采用蛋白质组学基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(MALDI-TOF-MS)技术, 并运用弱阳离子磁珠(WCX)检测慢性胃炎患者和胃癌患者的唾液, 得到相应的肽质量指纹图谱, 建立鉴别诊断模型。

结果: 慢性胃炎患者与胃癌患者两组共得到蛋白质峰为77个, 其中1个有统计差异显著的蛋白峰($P < 0.05$), 质荷比为: 6 021.72 Da, 通过分析差异蛋白峰表达谱, 建立了分类预测模型, 识别率为83.54%, 预测能力60.23%。以此模型进行临床回代检验结果14例慢性胃炎, 其中10例被准确检出, 23例胃癌, 22例

■同行评议者

周晓武, 副主任医师, 中国人民解放军空军总医院普通外科

被准确检出, 灵敏度71.43%(10/14), 特异度95.65%(22/23).

结论: 初步得到了慢性胃炎与胃癌唾液差异蛋白质表达谱, 并初步建立了以6021.72 Da蛋白质区分慢性胃炎与胃癌的唾液蛋白鉴别诊断模型.

关键词: 慢性胃炎; 胃癌; 鉴别诊断; 唾液; 蛋白质组学基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱

张晓丽, 王济国, 曹美群, 吴正治. 胃癌与慢性胃炎唾液蛋白质组鉴别诊断模型. 世界华人消化杂志 2010; 18(9): 926-931

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/926.asp>

0 引言

胃癌(gastric cancer, GC)是发生在胃部的恶性肿瘤, 胃癌在我国极为常见, 在我国其发病率居各类肿瘤的首位, 危害性大. 慢性萎缩性胃炎与胃癌的发生率呈显著的正相关. 慢性胃炎的发展, 初始为炎性细胞浸润为主, 表现为慢性浅表性胃炎, 如炎症长期不能控制, 则可引起腺体破坏或肠化, 逐渐发展为慢性萎缩性胃炎. 胃癌与慢性胃炎的早期鉴别诊断十分重要. 本研究我们利用基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(matrix assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry, MALDI-TOF-MS)技术, 对胃癌患者与慢性胃炎患者唾液中的蛋白质峰进行对比分析, 筛选唾液中胃癌与慢性胃炎鉴别诊断的特异性生物标志物.

1 材料和方法

1.1 材料 所有研究对象的唾液样品均为南方医院及深圳市第二人民医院内科住院或门诊患者经胃镜和或组织病理检查确诊为胃癌患者与慢性胃炎患者的标本. 研究分组: 慢性胃炎21例(包括慢性浅表性胃炎12例, 慢性萎缩性胃炎9例), 男10例, 女11例, 平均年龄48.00岁±13.54岁; 胃癌患者34例, 男21例, 女13例, 平均年龄50.53±10.23岁. 经统计学分析, 各组性别、年龄分布比较差异无显著性($P>0.05$), 具有可比性. WCX磁珠试剂盒(Bruker公司). α -氰基-4-羟基肉桂酸[α -Cyano-4-hydroxycinnamic acid(HCCA), Bruker公司], 质量浓度0.3 g/L, 乙醇(色谱级)/丙酮(色谱级) = 2/1, 新鲜配置. 质谱仪: AutoFlex III型MALDI-TOF质谱仪(Bruker公司).

1.2 方法

1.2.1 标本收集: 唾液收集时间为6:00-8:00, 收集

前一晚睡前不再进食及服用任何药物, 收集前2 h开始禁食水. 用清水漱口后静坐于椅上. 前5 min内的唾液自然吞下后开始收集, 口腔唾液积聚至一定量后, 吐入置于冰浴预冷的50 mL离心管内, 每个唾液样本采集2-5 mL, 采集时间为20-30 min. 每个样本采集完立即放入冰盒内. 唾液采集在15 mL离心管中, 以10 000 r/min, 10 min, 4 °C离心. 取50 μ L唾液分装在0.5 mL EP管中, 于-80 °C冰箱保存. 实验时由-80 °C冰箱取出样本, 常温解冻. 所有检测唾液均1次冻融.

1.2.2 WCX磁珠处理: 4 °C冰箱取出WCX磁珠试剂盒, 处理过程参照试剂盒说明书, 主要经混匀、清洗及洗脱等步骤. 最后将洗脱的多肽样品溶液移入干净的0.5 mL样品管中, 备质谱分析.

1.2.3 点样及质谱分析: 将磁珠分选后的多肽样品溶液各取1 μ L分别点靶, 室温下干燥后, 再各点1 μ L浓度为3 g/L的 α -氰基-4-羟基肉桂酸基质溶液(溶于50%乙腈, 2%三氟乙酸). 然后将制备好的点样板置于MALDI-TOF质谱仪上进行分析. 应用线性模式, 采集相对分子量范围为1 000-10 000 Da. 激光能量为20%, 累计400 shots. 质谱信号单次扫描累加50次, 获得肽质量指纹图(PMF).

统计学处理 利用Bruker公司FlexAnalysis 3.0和ClinProTools软件2.1进行数据的分组指标及相关性进行分析. 并用软件ClinProTools2.1中的统计学检验方法(参数T-Test和非参数方法Wilcoxon Test)寻找差异蛋白, 分析有差异趋势的多肽, 并利用软件中的遗传算法结合KNN(k-nearest neighbour, $k = 1, 3, 5, 7$)建立分类预测模型. 首先使用遗传算法, 设变异率为0.2, 交叉率为0.5, 初始染色体个数为1 000, 适应度函数用KNN判定结果的准确率, 最终经过10 000次进化, 遍历k, 最终在差异蛋白中, 选用了其中的几个蛋白峰, 建立模型. 计算模型的识别率和预测能力. 并用随机抽样方法(随机选择80%样本建立模型, 其余的20%作为验证样本, 运行10次), 验证模型的有效性(平均特异性、灵敏度). $P<0.05$ 为差异有统计学意义.

2 结果

慢性胃炎组与胃癌组两组除算法选择问题被排除的样本共37例, 对所有的样本检测质谱图进行分析比较, 两个组共得到差异蛋白质峰为77个, 其中通过遗传算法找到1个统计差异显著的蛋白峰, 质荷比为6 021.72 Da, 通过分析差

■研究前沿

随着对唾液中蛋白质的深入研究, 人们发现越来越多疾病的生物学标志物, 唾液在疾病早期发现及早期诊断方面的优势开始逐渐显示出来.

■应用要点

本研究的发现也进一步说明利用蛋白质组学质谱技术检测唾液中的特异性生物标志物是可行的,他为蛋白质组学水平探索疾病的发病机制、分子标志与治疗靶点研究提供了一条新途径。

异蛋白峰表达谱,并建立了分类预测模型,识别率为83.54%,预测能力60.23%。以此模型进行临床回代检验结果14例慢性胃炎,其中10例被准确检出,23例胃癌,22例被准确检出,灵敏度71.43%(10/14),特异度95.65%(22/23,表1)。

3 讨论

胃癌是威胁人类健康最常见的消化系肿瘤之一,尽管近年来发病率和死亡率有所降低,但其发病率仍居各种恶性肿瘤的首位,而且近年来发病有明显年轻化趋势。相当多的胃癌患者发现时已经是晚期。我国每年死于胃癌的患者达15-20万,几乎接近全部恶性肿瘤死亡人数的1/4。每年新发现的胃癌患者约达20万。胃癌的常见症状为上腹部不适或上腹部疼痛,进食后症状往往加剧,而早期胃癌70%以上无明显症状,随着病情的发展,可逐渐出现非特异性的、类同于胃炎或胃十二指肠溃疡的症状,包括上腹部饱胀不适或隐痛、泛酸、嗝气、恶心,偶有呕吐、食欲减退、消化不良、黑便等。而近年大量研究成果表明,萎缩性胃炎伴肠化生、不典型增生与胃癌的发生存在着密切关系。萎缩性胃炎时,化生的上皮细胞是癌的巢穴,化生程度越重,癌变机会越多。

蛋白质是生命活动的执行者和体现者,是生物体最重要的结构部分,是生命的物质基础。转录后的不同剪接方式,翻译后的不同修饰使得基因和蛋白质不是一一对应关系,一个蛋白质不是一个基因的直接产物。蛋白质的翻译后修饰加工、转运定位、空间立体构型变化、蛋白质之间的相互作用、蛋白质与其他生物分子的相互作用等活动,仅靠基因组学的研究是远远不能获得足够的信息。在人类基因组大规模测序的基础上,随着分析仪器和生物信息学的飞速发展,创立了与基因组学相对应的蛋白质组学。

近年来, MALDI-TOF-MS已成为生命科学领域蛋白质组研究中必不可少的重要关键技术之一^[23]。MALDI产生的离子常用飞行时间(time-of-flight, TOF)检测器来检测,因此MALDI-TOF质谱很适合对蛋白质、多肽、核酸和多糖等生物大分子的研究^[1,2]。基于MALDI-TOF的液体芯片飞行时间质谱系统用于疾病生物标志物的研究无疑走在分子诊断的前沿,引领分子诊断的发展^[3]。目前较多用于肿瘤^[4-10]的早期诊断和早期的前瞻性研究,也可见于其他一些常见

疾病^[11,12]的研究。蛋白质组学研究技术已成为发现新的生物标志物的有力工具。质谱技术与蛋白质组学的结合也为这项研究提供了广阔前景^[3]。蛋白质组的研究不仅能为生命活动规律提供物质基础,也能为众多疾病机制的阐明及攻克提供理论根据和解决途径。通过对正常个体及病理个体间的蛋白质组比较分析,我们可以找到某些“疾病特异性的蛋白质分子”,他们可成为新药物设计的分子靶点,或者也会为疾病的早期诊断提供分子标志。作为蛋白质组学最重要技术的质谱技术,将在更高水平上寻找复杂疾病(如心脑血管疾病、肿瘤、中风和神经退行性疾病等)的蛋白质/肽谱和生物标志物谱以及单独生物标志物,并在复杂疾病发病机制、诊断和治疗方面取得重大突破,为复杂疾病的研究、诊断和治疗带来新的希望^[3]。蛋白质表达图谱比基因组表达图谱更能真实地反映生物体的功能机制,所以蛋白质组的研究具有深远重大的意义。他在组织细胞的整体蛋白质水平上探索蛋白质作用模式、功能机制、调节控制以及蛋白质群体内的相互关系,获得对疾病过程、细胞生理病理过程及调控网络的全面而深入的认识,揭示生命活动的基本规律^[13]。

唾液由于作为一种来源简单而丰富的材料,加之取材方便且没有创伤性使其在疾病诊断中具有特别的优势。早在1901年Michaels就率先用检查唾液成分作为诊断疾病的辅助工具。现在唾液作为疾病诊断标本方面的价值已受到前所未有的重视。随着对唾液中蛋白质的深入研究,人们发现越来越多疾病的生物学标志物,唾液在疾病早期发现及早期诊断方面的优势开始逐渐显示出来^[14-22]。目前国内外对唾液蛋白质组学的研究还处于探索的初级阶段,而且多为单个指标的检测研究,具有比较大的局限性。

本研究采用AutoFlexIII型基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱仪(MALDI-TOF-MS),并运用WCX(弱阳离子磁珠)检测慢性胃炎患者和胃癌患者唾液,得到相应的肽质量指纹图谱(PMF),结果慢性胃炎组与胃癌组两个组共得到差异蛋白峰为77个,其中通过遗传算法找到1个有统计差异显著的蛋白峰,质荷比为6 021.72 Da,通过分析差异蛋白峰表达谱,初步建立了分类预测鉴别诊断模型,识别率为83.54%,预测能力60.23%,可望成为早期胃癌和慢性胃炎的鉴别诊断方法,值得进一步深入研究。

先前我们利用MALDI-TOF-MS进行胃癌患

表 1 慢性胃炎组与胃癌组之间的差异蛋白质峰(按照PWKW排序, 共77个)

Mass	DAve	PTTA	PWKW	PAD	Ave1	Ave2	StdDev1	StdDev2
6 021.72	10.29	0.383	0.0498	0.000833	18.80	8.51	11.14	5.44
5 222.47	11.59	0.848	0.6560	<0.000001	32.80	21.21	35.09	30.26
3 778.64	10.00	0.848	0.6560	0.006950	37.68	27.67	16.04	15.80
6 822.91	7.03	0.848	0.6560	0.000657	22.19	15.17	13.31	7.95
7 651.73	6.20	0.848	0.6560	0.001790	23.20	17.00	9.30	14.48
8 291.16	5.71	0.848	0.6560	<0.000001	20.75	15.04	21.78	19.30
7 733.87	5.49	0.848	0.6560	0.000090	25.11	19.62	13.95	17.14
7 846.82	3.16	0.848	0.6560	0.000102	16.16	13.00	7.33	8.89
8 937.59	3.09	0.888	0.6560	<0.000001	22.98	26.07	13.62	29.18
9 050.04	1.59	0.888	0.7750	<0.000001	15.75	14.16	9.72	14.18
5 693.60	93.34	0.848	0.8620	<0.000001	66.91	160.24	33.54	200.12
2 723.68	22.71	0.848	0.8620	0.000094	80.44	57.73	54.96	26.79
1 805.11	21.42	0.848	0.8620	0.000003	41.11	62.52	23.16	54.05
6 323.31	20.02	0.848	0.8620	<0.000001	44.30	64.32	45.33	88.89
1 786.64	19.73	0.848	0.8620	0.000004	47.49	67.22	17.20	48.75
1 296.39	19.11	0.848	0.8620	<0.000001	15.48	34.60	9.35	38.74
5 584.66	16.70	0.848	0.8620	0.010200	50.16	66.87	22.02	45.78
1 472.58	9.48	0.848	0.8620	0.000021	34.06	43.54	9.14	23.01
5 461.45	9.18	0.848	0.8620	0.000013	21.99	31.16	9.53	24.01
4 119.87	8.84	0.848	0.8620	0.000007	35.32	26.47	27.99	25.60
5 528.54	8.82	0.848	0.8620	0.003210	24.14	32.96	12.18	20.28
2 181.28	7.86	0.848	0.8620	0.002100	45.73	53.59	28.10	34.64
1 288.45	7.39	0.848	0.8620	0.000012	42.76	35.37	30.85	32.64
1 194.11	5.83	0.848	0.8620	0.000235	32.19	26.36	25.70	22.26
6 690.91	5.68	0.848	0.8620	0.000030	24.77	19.09	14.08	17.37
4 526.61	5.56	0.848	0.8620	0.000983	34.16	28.60	20.52	18.99
5 501.47	5.35	0.879	0.8620	0.000006	29.45	34.81	29.03	24.77
4 548.22	3.81	0.848	0.8620	0.359000	23.91	20.10	9.19	11.90
7 767.39	3.45	0.848	0.8620	0.341000	23.00	19.56	7.57	9.26
4 897.67	3.29	0.848	0.8620	0.000212	22.06	18.77	11.19	11.10
4 240.99	3.26	0.888	0.8620	0.012600	32.20	28.94	18.31	21.46
9 785.58	2.75	0.848	0.8620	0.000002	14.42	17.16	3.37	14.26
5 031.86	2.06	0.968	0.8620	0.000020	48.26	50.32	27.96	59.32
8 733.03	1.50	0.888	0.8620	0.090900	16.51	15.00	7.38	9.50
6 575.16	1.01	0.888	0.8620	0.002490	18.57	17.56	6.04	9.66
5 860.96	0.88	0.968	0.8620	<0.000001	18.12	19.00	8.04	19.88
6 291.44	0.65	0.985	0.8620	0.000002	34.27	33.62	25.81	32.85
8 837.63	0.49	0.968	0.8620	0.000615	19.53	20.02	6.97	14.04
8 555.80	0.10	0.996	0.8620	<0.000001	22.49	22.39	14.55	21.81
4 829.93	0.03	0.996	0.8620	<0.000001	20.28	20.25	9.15	21.16
2 325.25	10.73	0.848	0.8910	<0.000001	46.06	35.33	44.55	32.36
3 924.35	5.98	0.848	0.8910	0.156000	42.34	48.32	18.66	25.10
1 733.58	42.05	0.848	0.9200	0.000007	144.05	186.10	98.81	176.37
2 995.70	14.54	0.848	0.9200	0.000002	55.75	70.28	49.02	65.78
4 370.23	14.78	0.914	0.9290	<0.000001	54.99	69.77	94.54	169.65
8 137.37	11.47	0.848	0.9290	0.000021	52.68	64.15	48.66	56.05
9 944.80	7.33	0.848	0.9290	<0.000001	16.45	23.78	9.83	28.74
2 916.60	38.76	0.879	0.9930	<0.000001	177.79	216.54	193.04	200.80
4 490.64	35.54	0.848	0.9930	<0.000001	53.34	88.88	42.32	100.06
2 937.57	26.97	0.848	0.9930	0.000223	138.84	165.82	74.29	140.84
1 589.59	16.48	0.848	0.9930	0.000615	68.36	84.84	36.37	71.55
6 236.16	16.24	0.879	0.9930	<0.000001	62.22	78.46	70.95	94.00

■同行评价

本文选题较新, 方法可靠, 文献引用较新, 具有重要的理论及实际意义。

2 336.06	15.63	0.848	0.9930	<0.000001	31.71	47.34	21.56	56.12
5 113.63	15.57	0.848	0.9930	<0.000001	42.25	57.82	52.95	77.45
1 629.83	15.01	0.848	0.9930	<0.000001	37.10	52.11	36.67	99.42
5 430.99	7.81	0.848	0.9930	<0.000001	29.51	37.32	19.85	35.19
1 227.27	7.57	0.933	0.9930	0.511000	139.12	131.55	67.35	82.89
2 132.47	5.57	0.888	0.9930	<0.000001	50.37	44.80	45.22	35.50
6 171.09	4.25	0.848	0.9930	0.019700	24.63	28.88	7.61	15.13
4 473.02	3.60	0.848	0.9930	0.006300	18.75	22.35	9.64	14.59
6 635.26	2.91	0.968	0.9930	<0.000001	54.35	51.44	78.19	59.07
4 769.48	2.63	0.888	0.9930	<0.000001	18.04	20.67	15.33	20.08
5 182.42	2.59	0.888	0.9930	<0.000001	22.43	19.84	20.01	17.44
3 370.09	2.04	0.968	0.9930	0.004180	50.79	52.83	27.55	35.86
4 135.92	1.77	0.968	0.9930	<0.000001	38.67	36.90	26.04	30.56
3 490.63	1.37	0.980	0.9930	0.002750	76.03	74.67	48.51	37.65
4 995.20	1.35	0.888	0.9930	0.013400	16.03	17.38	8.21	11.92
7 480.16	0.31	0.968	0.9930	0.000033	11.32	11.64	6.63	8.81
4 189.18	0.30	0.996	0.9930	0.000026	35.09	34.79	26.52	30.55
1 820.67	22.06	0.848	1.0000	<0.000001	50.77	72.83	31.20	73.96
6 933.58	18.89	0.848	1.0000	<0.000001	77.56	58.67	86.36	52.91
4 962.07	10.25	0.888	1.0000	0.000009	66.59	76.84	64.33	71.06
3 275.28	9.59	0.848	1.0000	<0.000001	30.33	39.92	19.55	62.99
1 441.76	5.75	0.888	1.0000	0.032800	65.96	71.71	37.86	52.87
4 630.43	3.01	0.848	1.0000	0.020000	27.14	30.15	8.17	17.40
4 419.62	2.30	0.968	1.0000	<0.000001	33.20	30.90	42.24	26.61
3 442.10	1.77	0.968	1.0000	0.021100	61.89	63.67	29.48	30.81

者与正常人的唾液蛋白质组的研究,取得了有意义的研究结果^[24]。本研究的发现也进一步说明利用蛋白质组学质谱技术检测唾液中的特异性生物标志物是可行的,他为蛋白质组学水平探索疾病的发病机制、分子标志与治疗靶点研究提供了一条新途径。

4 参考文献

- Patterson SD. Data analysis--the Achilles heel of proteomics. *Nat Biotechnol* 2003; 21: 221-222
- Aebersold R, Mann M. Mass spectrometry-based proteomics. *Nature* 2003; 422: 198-207
- 马庆伟, 程肖蕊. 液体芯片飞行时间质谱技术在分子诊断研究中的应用. *生物技术世界* 2007: 57-60
- Villanueva J, Philip J, Entenberg D, Chaparro CA, Tanwar MK, Holland EC, Tempst P. Serum peptide profiling by magnetic particle-assisted, automated sample processing and MALDI-TOF mass spectrometry. *Anal Chem* 2004; 76: 1560-1570
- Leung SM, Dikler S, Samuel CM. A new approach for profiling ovarian cancer serum using functionalized magnetic beads, anchor chip technology, MALDI-TOF MS, MALDI-TOF/TOF MS, and bioinformatics. Sixth International Symposium on Mass Spectrometry in the Health and Life Science, August 24-28, 2003, San Francisco, CA, United States
- Leung SM, Dikler S, Lau CC. A novel and rapid approach to protein expression profiling of cerebrospinal fluid(CSF) from medullblastoma patients using functionalized magnetic beads,

anchorchip technology, MALDI-TOF AND MALDI-TOF/TOF mass spectrometry. Society Of Neuroscience Meeting, 2003

- Cazares LH, Mitchell-Green S, Leung SM, Stack BC, Wadsworth JT, Drake RR, Semmes OJ. Serum Protein Expression Patterns in Head and Neck Cancer for Biomarker Discovery and Identification using MALDI-TOF/TOF MS. American Association for Cancer Research (AACR) meeting, April 2005, Abstract 4795
- Elssner T, Fahr K, Thomas I. Magnetic bead based human plasma profiling to discriminate acute lymphatic leukaemia from non-disease samples. ASMS, 2004
- Dekker LJ, Boogerd W, Stockhammer G, Dalebout JC, Siccama I, Zheng P, Bonfrer JM, Verschuuren JJ, Jenster G, Verbeek MM, Luijckx TM, Smitt PA. MALDI-TOF mass spectrometry analysis of cerebrospinal fluid tryptic peptide profiles to diagnose leptomeningeal metastases in patients with breast cancer. *Mol Cell Proteomics* 2005; 4: 1341-1349
- Villanueva J, Shaffer DR, Philip J, Chaparro CA, Erdjument-Bromage H, Olshen AB, Fleisher M, Lilja H, Brogi E, Boyd J, Sanchez-Carbajo M, Holland EC, Cordon-Cardo C, Scher HI, Tempst P. Differential exoprotease activities confer tumor-specific serum peptidome patterns. *J Clin Invest* 2006; 116: 271-284
- Zhang X, Leung SM, Morris CR, Shigenaga MK. Evaluation of a novel, integrated approach using functionalized magnetic beads, bench-top MALDI-TOF-MS with prestructured sample supports, and pattern recognition software for profiling potential biomarkers in human plasma. *J Biomol Tech* 2004;

- 15: 167-175
- 12 Ketterlinus R, Hsieh SY, Teng SH, Lee H, Pusch W. Fishing for biomarkers: analyzing mass spectrometry data with the new ClinProTools software. *Biotechniques* 2005; Suppl: 37-40
- 13 Blackstock WP, Weir MP. Proteomics: quantitative and physical mapping of cellular proteins. *Trends Biotechnol* 1999; 17: 121-127
- 14 Christodoulides N, Mohanty S, Miller CS, Langub MC, Floriano PN, Dharshan P, Ali MF, Bernard B, Romanovicz D, Anslyn E, Fox PC, McDevitt JT. Application of microchip assay system for the measurement of C-reactive protein in human saliva. *Lab Chip* 2005; 5: 261-269
- 15 St John MA, Li Y, Zhou X, Denny P, Ho CM, Montemagno C, Shi W, Qi F, Wu B, Sinha U, Jordan R, Wolinsky L, Park NH, Liu H, Abemayor E, Wong DT. Interleukin 6 and interleukin 8 as potential biomarkers for oral cavity and oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2004; 130: 929-935
- 16 Tuxen MK, Sölétormos G, Dombernowsky P. Serum tumour marker CA 125 in monitoring of ovarian cancer during first-line chemotherapy. *Br J Cancer* 2001; 84: 1301-1307
- 17 Lawrence HP. Salivary markers of systemic disease: noninvasive diagnosis of disease and monitoring of general health. *J Can Dent Assoc* 2002; 68: 170-174
- 18 Hu S, Arellano M, Boonthueung P, Wang J, Zhou H, Jiang J, Elashoff D, Wei R, Loo JA, Wong DT. Salivary proteomics for oral cancer biomarker discovery. *Clin Cancer Res* 2008; 14: 6246-6252
- 19 Li Y, Denny P, Ho CM, Montemagno C, Shi W, Qi F, Wu B, Wolinsky L, Wong DT. The Oral Fluid MEMS/NEMS Chip (OFMNC): diagnostic and translational applications. *Adv Dent Res* 2005; 18: 3-5
- 20 Kaufman E, Lamster IB. The diagnostic applications of saliva—a review. *Crit Rev Oral Biol Med* 2002; 13: 197-212
- 21 Streckfus CF, Bigler LR. Saliva as a diagnostic fluid. *Oral Dis* 2002; 8: 69-76
- 22 Samaranayake L. Saliva as a diagnostic fluid. *Int Dent J* 2007; 57: 295-299
- 23 Ma QW, Cheng XR. MALDI-TOF-MS Guides A New Era for The Molecular Diagnosis. *Shengwu Jishu Shijie* 2006; 5: 66-68
- 24 Wu ZZ, Wang JG, Zhang XL. Diagnostic model of saliva protein finger print analysis of patients with gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2009; 15: 865-870

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

ISSN 1009-3079 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》数字用法标准

本刊讯 遵照国家标准GB/T 15835-1995出版物上数字用法的规定, 本刊论文中数字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 1 000-1 500 kg, 3.5 ± 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6 347意指6 000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mean $\pm$ SD应考虑到个体的变差, 一般以SD的1/3来定位数, 例如3 614.5 $\pm$ 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 $\pm$ 0.4 kg, 过多的位数并无意义. 又如8.4 $\pm$ 0.27 cm, 其SD/3 = 0.09 cm, 达小数点后第2位, 故平均数也应补到小数点后第2位. 有效位数以后的数字是无效的, 应该舍. 末尾数字, 小于5则舍, 大于5则进, 如恰等于5, 则前一位数逢奇则进, 逢偶(包括“0”)且5之后全为0则舍. 末尾时只可1次完成, 不得多次完成. 例如23.48, 若不要小数点, 则应成23, 而不应该23.48 $\rightarrow$ 23.5 $\rightarrow$ 24. 年月日采用全数字表达法, 请按国家标准GB/T 7408-94书写. 如1985年4月12日, 可写作1985-04-12; 1985年4月, 写作1985-04; 从1985年4月12日23时20分50秒起至1985年6月25日10时30分止, 写作1985-04-12 T23:20:50/1985-06-25 T10:30:00; 从1985年4月12日起至1985年6月15日止, 写作1985-04-12/06-16, 上午8时写作08:00, 下午4时半写作16:30. 百分数的有效位数根据分母来定: 分母 $\leq$ 100, 百分数到个位; $101 \leq$ 分母 $\leq$ 1 000, 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1 486 800.475 65. 完整的阿拉伯数字不移行!

鸡尾酒疗法对大鼠肝星状细胞的增殖及 I 型胶原、TIMP-1 mRNA 表达的影响

廖明, 李彦, 舒伟, 卓朗

■背景资料

肝纤维化是一系列复杂的多因素过程, 目前, 对肝纤维化的治疗尚缺乏理想的治疗方案, 许多药物由于抗肝纤维化作用靶位单一导致疗效并不理想, 而有些药物不良反应大于治疗作用, 不宜用于临床。因此, 将作用于肝纤维化发生发展不同环节、靶点的药物联合应用即鸡尾酒疗法以阻断肝纤维化发展的目的, 可能是抗肝纤维化药物研究的新方向。

廖明, 舒伟, 广西医科大学医学科学实验中心 区域性高发肿瘤早期防治研究教育部重点实验室 广西壮族自治区南宁市 530021

李彦, 广西大学 广西壮族自治区南宁市 530004

卓朗, 新加坡国立生物工程和纳米技术研究院 新加坡 169483

广西地方性高发疾病防治研究重点实验室开放基金资助项目, No. 0842009-K5

作者贡献分布: 此课题由廖明与卓朗设计; 研究过程由廖明与舒伟完成; 数据分析由李彦完成; 本论文写作由廖明与李彦完成。

通讯作者: 廖明, 讲师, 530021, 广西壮族自治区南宁市, 广西医科大学医学科学实验中心。lminggx@163.com

电话: 0771-5358354

收稿日期: 2009-12-09 修回日期: 2010-01-26

接受日期: 2010-02-09 在线出版日期: 2010-03-28

Effects of cocktail therapy on cell proliferation and Collagen I and TIMP-1 mRNA expression in rat hepatic stellate cells

Ming Liao, Yan Li, Wei Shu, Lang Zhuo

Ming Liao, Wei Shu, Medical Scientific Research Center of Guangxi Medical University, Key Laboratory for Early Prevention and Treatment of Endemic Tumors, Ministry of Education, Nanning 530021, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China

Yan Li, Guangxi University, Nanning 530004, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China

Lang Zhuo, Institute of Bioengineering and Nanotechnology, 169483, Singapore

Supported by: the Research Fund of Guangxi Key Laboratory for Prevention & Treatment of High-Incidence Endemic Diseases, No. 0842009-K5

Correspondence to: Ming Liao, Medical Scientific Research Center of Guangxi Medical University, Nanning 530021, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China. lminggx@163.com

Received: 2009-12-09 Revised: 2010-01-26

Accepted: 2010-02-09 Published online: 2010-03-28

Abstract

AIM: To investigate the effects of cocktail therapy on cell proliferation and collagen I (Col I) and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) mRNA expression in rat hepatic stellate cells.

METHODS: Hepatic stellate cells (HSC-T6) cultured *in vitro* were exposed to taurine (taurine group), epigallocatechin gallate (EGCG; EGCG

group), genistein (genistein group), and a combination of these three drugs (cocktail-treated group) for 24 h, respectively. Cell proliferation was determined by methyl thiazol tetrazolium (MTT) assay. The expression of Col I and TIMP-1 mRNAs was measured by semi-quantitative reverse-transcription polymerase chain reaction (RT-PCR).

RESULTS: Cell proliferation was significantly inhibited in the taurine group, EGCG group, genistein group and cocktail-treated group compared with the control group (0.237 ± 0.007 , 0.216 ± 0.009 , 0.242 ± 0.008 and 0.130 ± 0.004 vs 0.452 ± 0.011 , respectively; all $P < 0.05$). The reduced rate of cell proliferation was more significant in the cocktail-treated group than in other treatment groups (all $P < 0.05$). The expression levels of Col I and TIMP-1 mRNAs markedly decreased in all treatment groups when compared with the control group (all $P < 0.05$). The expression levels of Col I and TIMP-1 mRNAs were significantly lower in the cocktail-treated group than in other treatment groups ($P < 0.05$).

CONCLUSION: Cocktail therapy significantly inhibits cell proliferation and down-regulates Col I and TIMP-1 mRNA expression in HSCs. Cocktail therapy may be more effective than monotherapy in the treatment of liver fibrosis.

Key Words: Cocktail therapy; Hepatic stellate cell; Gene expression

Liao M, Li Y, Shu W, Zhuo L. Effect of cocktail therapy on cell proliferation and collagen I and TIMP-1 mRNA expression in rat hepatic stellate cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(9): 932-936

摘要

目的: 研究不同类型的抗肝纤维化药物联合应用即鸡尾酒疗法对大鼠肝星状细胞(HSC)的干扰效果。

方法: 将体外培养的大鼠肝星状细胞株 HSC-T6 分为牛磺酸组、表没食子儿茶素没食子酸酯(EGCG)组、4, 5, 7-三羟基异黄酮组、

■同行评议者

王凯, 教授, 山东大学齐鲁医院肝病科

鸡尾酒组 and 对照组; 各组药物作用 HSC-T6 24 h 后, 用噻唑兰比色法(MTT)测定活细胞数, 采用半定量 RT-PCR 法检测细胞中 I 型胶原及基质金属蛋白酶组织抑制因子-1 的 mRNA 表达水平。

结果: MTT 实验观察到牛磺酸、EGCG、三羟基异黄酮、鸡尾酒组 HSC-T6 的活细胞数目减少, 与对照组的 A 值比较有显著性差异 (0.237 ± 0.007 , 0.216 ± 0.009 , 0.242 ± 0.008 , 0.130 ± 0.004 vs 0.452 ± 0.011 , 均 $P < 0.05$), 其中鸡尾酒组与单一用药各组相比也有显著性差异 ($P < 0.05$)。与对照组相比, 各组的 Col- I、TIMP-1 的 mRNA 表达降低, 并且鸡尾酒组与单一用药各组相比有统计学意义 ($P < 0.05$)。

结论: 鸡尾酒疗法可抑制大鼠 HSC-T6 的增殖, 与单一用药相比更能有效降低 Col- I、TIMP-1 的 mRNA 表达, 可能具有更高的纤维化效果。

关键词: 鸡尾酒疗法; 肝星状细胞; 基因表达

廖明, 李彦, 舒伟, 卓朗. 鸡尾酒疗法对大鼠肝星状细胞的增殖及 I 型胶原、TIMP-1 mRNA 表达的影响. 世界华人消化杂志 2010; 18(9): 932-936

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/932.asp>

0 引言

迄今为止, 对肝纤维化的治疗尚缺乏理想的治疗方案。多年来针对肝纤维化的药物治疗在众多离体和动物模型实验中显示了一定的疗效, 主要包括抑制肝星状细胞(hepatic stellate cell, HSC)的药物如干扰素^[1], 作用于细胞外基质(extracellular matrix, ECM)和细胞因子的药物^[2-6], 抗氧化剂^[7], 抗炎制剂^[8]等。但令众多学者困惑的是几乎所有的抗肝纤维化药物在动物模型有效而临床无效或效果很差, 这严重限制了抗肝纤维化药物的临床应用和治疗效果。因为肝纤维化是一系列复杂的多因素过程, 许多药物由于抗肝纤维化作用靶位单一导致疗效并不理想, 而有些药物不良反应大于治疗作用, 不宜用于临床。因此, 将作用于肝纤维化发生发展不同环节、靶点的药物联合应用即鸡尾酒疗法以阻断肝纤维化发展, 达到保护肝脏的目的, 可能是抗肝纤维化药物研究的新方向。牛磺酸和表没食子儿茶素没食子酸酯(epigallocatechin gallate, EGCG)已有报道具有抗肝纤维化的作用; 其中, 牛磺酸能促进 HSC 的凋亡^[9], 抑制转化生长因子 $\beta 1$ 的表

达和阻断 TGF- $\beta 1$ /Smad 信号通路^[10-12]; EGCG 具有很强的抗氧化作用并能抑制胶原的形成^[13-15]; 4, 5, 7-三羟基异黄酮作为酪氨酸激酶抑制子, 可抑制肝纤维化大鼠肝窦内皮细胞的增殖^[16]。本实验的目的是联合应用以上三种作用于肝纤维化不同环节的药物干扰大鼠 HSC, 采用 MTT 法和 RT-PCR 法观察鸡尾酒疗法对 HSC 增殖和 I 型胶原(collagen I, Col- I)及基质金属蛋白酶组织抑制因子-1(tissue inhibitors of metal protease-1, TIMP-1) mRNA 表达的影响。

1 材料和方法

1.1 材料 HSC-T6 细胞由广西医科大学姜海行教授馈赠。牛磺酸和 4, 5, 7-三羟基异黄酮购自 Sigma 公司。EGCG 购自四川乐山禹伽茶业科技开发有限公司。DMEM 购自 Gibco 公司。胎牛血清购自 Hyclone 公司。TRIzol 购自 Invitrogen 公司。逆转录试剂盒购自 Fermentas 公司。2×PCR mix 购自 TaKaRa 公司。CO₂ 培养箱、高速冷冻离心机、酶标仪为美国 Thermo 公司产品。核酸蛋白测定仪为日本岛津公司产品。相差倒置显微镜为德国 Zeiss 公司产品。PCR 仪、凝胶成像分析系统、低压电泳仪为美国 Bio-Rad 公司产品。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养: 将冷冻保存于超低温冰箱中的 HSC-T6 复苏后接种于含 100 mL/L 胎牛血清的高糖 DMEM 培养液中, 37 °C、50 mL/L CO₂ 条件下培养。当细胞呈单层致密状时, 0.25% 胰蛋白酶消化后传代。每次实验均在呈指数生长的细胞中进行。

1.2.2 用药: 实验分为 5 组, 即对照组、牛磺酸组 (60 mg/L)、EGCG 组 (70 mg/L)、三羟基异黄酮组 (14 mg/L)、鸡尾酒组 (同时应用牛磺酸、EGCG、三羟基异黄酮, 剂量不变)。

1.2.3 MTT 法测定药物对细胞增殖的影响: 将 HSC 以 5×10^7 /L 接种于 96 孔板, 培养 12 h 后, 换含各组药物的培养液 (每个组设 5 个复孔) 继续培养, 20 h 后每孔加入 MTT 20 μ L, 继续培养 4 h, 吸出全部液体, 加入 100 μ L DMSO, 微量振荡器上振荡 5 min, 酶标仪双波长 (570/630 nm) 比色。

1.2.4 RT-PCR 法检测 Col- I 和 TIMP-1 mRNA 的表达: (1) 将细胞以 5×10^7 /L 接种于 50 mL 培养瓶中, 培养 12 h 后, 换含各组药物的培养液 (每个组设 5 个重复) 继续培养 24 h。 (2) 采用 TRIzol 法抽提细胞中总 RNA。用核酸蛋白测定仪测定 RNA 含量及纯度, 保证 A_{260}/A_{280} 均在 1.8-2.0。 (3) 取 RNA 5 μ g, 采用 M-MuLV 逆转录酶将其逆转

■ 研发前沿

牛磺酸和表没食子儿茶素没食子酸酯已有报道具有抗肝纤维化的作用, 而 4, 5, 7-三羟基异黄酮作为酪氨酸激酶抑制子, 可抑制肝纤维化大鼠肝窦内皮细胞的增殖。联合应用以上三种作用于肝纤维化不同环节的药物即鸡尾酒疗法干扰大鼠肝星状细胞, 以评价鸡尾酒疗法的效果尚未见有报道。

■ 相关报道

戚合德等发现安络化纤丸联合恩替卡韦用药更有利于阻断或逆转肝纤维化的形成和发展; 曾佑祥等在采用阿米洛利联合苦参素预防大鼠肝纤维化的研究发现, 两者联用有一定的协同作用。

■ 创新盘点

采用MTT法和RT-PCR法观察鸡尾酒疗法对HSC增殖和Col- I 及TIMP-1的mRNA表达的影响,首次探讨鸡尾酒疗法的抗肝纤维化效果。

表 1 各组对HSC-T6的Col- I 和TIMP-1 mRNA表达的影响 ($n = 5$, mean $\pm$ SD)

分组	Col- I	TIMP-1
对照组	0.881 $\pm$ 0.031	1.135 $\pm$ 0.045
鸡尾酒组	0.211 $\pm$ 0.009 ^a	0.404 $\pm$ 0.019 ^a
牛磺酸组	0.322 $\pm$ 0.012 ^{ac}	0.733 $\pm$ 0.015 ^{ac}
EGCG组	0.318 $\pm$ 0.023 ^{ac}	0.721 $\pm$ 0.036 ^{ac}
三羟基异黄酮组	0.330 $\pm$ 0.014 ^{ac}	0.745 $\pm$ 0.011 ^{ac}

^a $P < 0.05$ vs 对照组; ^c $P < 0.05$ vs 鸡尾酒组。

录成cDNA。根据NCBI的GenBank基因序列自行设计引物,引物序列为: β -actin: FP: 5'-AACCCCTAAGGCCAACCGTGAAAAG-3', RP: 5'-TCATGAGGTAGTCTGTCAGGT-3', 产物长度: 240 bp; Col- I: FP: 5'-TGCCGTGACCTCAAGATGTG-3', RP: 5'-CACAA GCGTGCTGTAGGTGA-3', 产物长度: 462 bp; TIMP-1: FP: 5'-CATGGTGA GCCTCTGTGGAT-3', RP: 5'-GTTCAGGCTTCAGCTTTTGC-3', 产物长度: 393 bp。 (4)PCR扩增cDNA, 条件为: 94 $^{\circ}$ C预变性5 min, 94 $^{\circ}$ C变性30 s, 各自退火温度(Col- I 为55 $^{\circ}$ C; TIMP-1为52 $^{\circ}$ C)30 s, 72 $^{\circ}$ C延伸30 s, 72 $^{\circ}$ C延伸10 min, 总共30个循环。 (5)所有PCR产物在2%琼脂糖凝胶上电泳后,用凝胶成像系统拍照,Quantity One软件测定灰度值,灰度值以各基因产物与 β -actin的积分吸光度(A)的比值表示。

统计学处理 应用SPSS13.0软件进行统计分析。数据均以mean $\pm$ SD表示,组间比较采用 t 检验, $P < 0.05$ 表示存在统计学意义。

2 结果

2.1 MTT检测 牛磺酸组、EGCG组、三羟基异黄酮组、鸡尾酒组与对照组的A值比较均有显著性差异(0.237 $\pm$ 0.007, 0.216 $\pm$ 0.009, 0.242 $\pm$ 0.008, 0.130 $\pm$ 0.004 vs 0.452 $\pm$ 0.011, 均 $P < 0.05$),说明能抑制细胞的增殖。鸡尾酒组与单一用药各组相比亦有显著的抑制细胞增殖($P < 0.05$),说明鸡尾酒疗法能明显抑制HSC的增殖。

2.2 Col- I 和TIMP-1 mRNA表达 以细胞总RNA为模板,进行RT-PCR反应,扩增产物经凝胶电泳可获得清晰目标基因产物条带(图1)。灰度分析结果表明,Col- I mRNA的表达量为牛磺酸组(0.322 $\pm$ 0.012)、EGCG组(0.318 $\pm$ 0.023)、三羟基异黄酮组(0.330 $\pm$ 0.014)、鸡尾酒组(0.211 $\pm$ 0.009)与对照组(0.881 $\pm$ 0.031)相比有显著降低($P < 0.05$),鸡尾

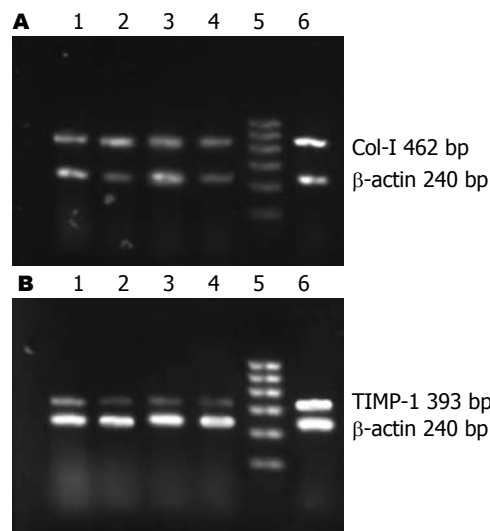


图 1 各组Col- I 和TIMP-1mRNA表达的变化. A: Col- I; B: TIMP-1, 1: 牛磺酸; 2: EGCG; 3: 三羟基异黄酮; 4: 鸡尾酒; 5: Marker; 6: 对照。

酒组与单一用药各组相比也有显著降低($P < 0.05$); TIMP-1 mRNA的表达量为牛磺酸组(0.733 $\pm$ 0.015)、EGCG组(0.721 $\pm$ 0.036)、三羟基异黄酮组(0.745 $\pm$ 0.011)、鸡尾酒组(0.404 $\pm$ 0.019)与对照组(1.135 $\pm$ 0.045)比较有显著降低($P < 0.05$),鸡尾酒组与单一用药各组相比也有显著降低($P < 0.05$),说明肝纤维化药物的鸡尾酒疗法能明显抑制Col- I 和TIMP-1 mRNA的表达(表1)。

3 讨论

鉴于众多抗肝纤维化药物的单一应用的临床疗效很差,作用于肝纤维化不同环节的药物联合应用日益成为关注的焦点。有关实验研究初步证实联合应用具有协同作用。威合德等^[17]发现安络化纤丸联合恩替卡韦用药更有利于阻断或逆转肝纤维化的形成和发展;曾佑祥等^[18]在采用阿米洛利联合苦参素预防大鼠肝纤维化的研究发现,两者对二甲亚硝胺诱导的肝纤维化均有预防作用,两者联用有一定的协同作用;拉米夫定联合大黄素或肝纤方的抗肝纤维化作用研究表明,联合用药更有利于阻断或逆转肝纤维化的形成与发展,具有一定的临床试用价值^[19]。抗纤维化药物的联合应用主要有以下优点,首先作用于肝纤维化形成的不同环节的药物联合应用能更有效地阻断肝纤维化的发展,达到比任何单一药物更好的肝保护作用,这一点对于在目前大多单一的纤维化药物临床效果极差或无效的情况下尤为重要^[20]。其次,联合用药可以减少单一药物的有效剂量,降低与药物剂量相

关的不良反应^[21]。

HSC的活化被认为是肝纤维化形成的中心环节。近来研究表明, 逆转肝纤维化关键在于减少活化的HSC数量。活化HSC数目减少, 不仅可以使ECM分泌减少, 而且还可影响ECM的降解, 因此抑制活化的HSC成为抗肝纤维化的研究热点。HSC的数量是由HSC增殖和凋亡共同决定的, 从理论上讲, 减少活化HSC数量有这些途径: (1)抑制HSC增殖; (2)诱导HSC凋亡, 直接减少HSC数量; (3)逆转HSC的激活, 让HSC由活化型变回静止型等。但研究表明抑制增殖和诱导凋亡是减少活化型HSC数量的主要途径, 因此, 抑制HSC增殖是抗肝纤维化有效途径^[22]。我们检测了联合用药的鸡尾酒疗法对大鼠肝纤维化细胞株HSC-T6的影响。MMT检测结果发现鸡尾酒疗法能显著抑制HSC-T6的增殖($P<0.05$), 并且, 与单一用药各组相比, 鸡尾酒组有显著性差异($P<0.05$), 证实鸡尾酒疗法能明显抑制HSC的增殖。

目前认为ECM的过度增多和异常沉积是肝纤维化发生的主要原因, 而Col- I 是肝纤维化ECM的主要成分^[23-25]。在肝脏内参与ECM降解的主要是基质金属蛋白酶(matrix metal protease, MMPs), 其中间质胶原酶(matrix metal protease -1, MMP-1)在降解肝脏ECM的主要成分- I 型胶原的过程中起重要作用, 而对MMP-1的活性起重要作用的是TIMP-1, TIMP-1通过抑制MMPs(主要是MMP-1)的活性从而促进肝纤维化的形成和发展^[26,27]。本实验结果表明, 联合应用作用于肝纤维化不同环节的药物作用HSC后, 明显抑制Col- I 和TIMP-1的mRNA表达, 与单一用药各组相比有显著性差异($P<0.05$), 从而进一步证实鸡尾酒疗法的干扰效果。

4 参考文献

- 1 Weng H, Mertens PR, Gressner AM, Dooley S. IFN-gamma abrogates profibrogenic TGF-beta signaling in liver by targeting expression of inhibitory and receptor Smads. *J Hepatol* 2007; 46: 295-303
- 2 Son G, Iimuro Y, Seki E, Hirano T, Kaneda Y, Fujimoto J. Selective inactivation of NF-kappaB in the liver using NF-kappaB decoy suppresses CCl4-induced liver injury and fibrosis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2007; 293: G631-G639
- 3 Seki E, Brenner DA. Toll-like receptors and adaptor molecules in liver disease: update. *Hepatology* 2008; 48: 322-335
- 4 Iimuro Y, Brenner DA. Matrix metalloproteinase gene delivery for liver fibrosis. *Pharm Res* 2008; 25: 249-258
- 5 Dooley S, Hamzavi J, Ciuclan L, Godoy P, Ilkavets I, Ehnert S, Ueberham E, Gebhardt R, Kanzler S, Geier A, Breitkopf K, Weng H, Mertens PR. Hepatocyte-specific Smad7 expression attenuates TGF-beta-mediated fibrogenesis and protects against liver damage. *Gastroenterology* 2008; 135: 642-659
- 6 Inagaki Y, Higashi K, Kushida M, Hong YY, Nakao S, Higashiyama R, Moro T, Itoh J, Mikami T, Kimura T, Shiota G, Kuwabara I, Okazaki I. Hepatocyte growth factor suppresses profibrogenic signal transduction via nuclear export of Smad3 with galectin-7. *Gastroenterology* 2008; 134: 1180-1190
- 7 Comporti M, Signorini C, Arezzini B, Vecchio D, Monaco B, Gardi C. Isoprostanes and hepatic fibrosis. *Mol Aspects Med* 2008; 29: 43-49
- 8 Dumont JM, Maignan MF, Janin B, Herbage D, Perrissoud D. Effect of malotilate on chronic liver injury induced by carbon tetrachloride in the rat. *J Hepatol* 1986; 3: 260-268
- 9 Chen YX, Zhang XR, Xie WF, Li S. Effects of taurine on proliferation and apoptosis of hepatic stellate cells in vitro. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2004; 3: 106-109
- 10 韦新, 梁健, 张锡流, 毛德文, 韦明. 牛磺酸对肝纤维化大鼠转化生长因子 β 1和肿瘤坏死因子表达的影响. *广西医学* 2003; 25: 2099-2100
- 11 Kato J, Ido A, Hasuike S, Uto H, Hori T, Hayashi K, Murakami S, Terano A, Tsubouchi H. Transforming growth factor-beta-induced stimulation of formation of collagen fiber network and anti-fibrotic effect of taurine in an in vitro model of hepatic fibrosis. *Hepatol Res* 2004; 30: 34-41
- 12 邓鑫, 梁健, 黄彬, 李益忠, 覃黎葵, 张锡流. 天然牛磺酸对肝纤维化大鼠TGF- β 1/Smad信号通路的影响. *大连医科大学学报* 2007; 29: 336-338
- 13 Nagle DG, Ferreira D, Zhou YD. Epigallocatechin-3-gallate (EGCG): chemical and biomedical perspectives. *Phytochemistry* 2006; 67: 1849-1855
- 14 Nakamuta M, Higashi N, Kohjima M, Fukushima M, Ohta S, Kotoh K, Kobayashi N, Enjoji M. Epigallocatechin-3-gallate, a polyphenol component of green tea, suppresses both collagen production and collagenase activity in hepatic stellate cells. *Int J Mol Med* 2005; 16: 677-681
- 15 Zhen MC, Wang Q, Huang XH, Cao LQ, Chen XL, Sun K, Liu YJ, Li W, Zhang LJ. Green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate inhibits oxidative damage and preventive effects on carbon tetrachloride-induced hepatic fibrosis. *J Nutr Biochem* 2007; 18: 795-805
- 16 刘小菁, 黄明慧, 成嫌, 肖文君, 王一平. 4, 5, 7-三羟基异黄酮对肝纤维化大鼠肝窦内皮细胞窗孔、增殖及合成一氧化氮的影响. *中华肝脏病杂志* 2002; 10: 200-203
- 17 戚合德, 杨阳, 龚守军. 安络化纤丸联合恩替卡韦治疗慢性乙型肝炎肝纤维化疗效观察. *中国现代医生* 2008; 46: 88-89
- 18 曾佑祥, 杨伟峰, 刘凌云. 阿米洛利联合苦参素预防大鼠肝纤维化的实验. *医药导报* 2006; 25: 995-998
- 19 陈国军, 陈然峰, 董长林, 黄晓文, 陈孟春, 金晓东. 拉米夫定联合大黄素抗肝纤维化作用的临床研究. *中国实验诊断学* 2003; 7: 43-45
- 20 钱红霞, 韩颖, 李永丰, 张永华. 肝纤维化的中西医结合治疗进展. *现代中西医结合杂志* 2008; 17: 2748-2750
- 21 郑青山, 张劲松, 桂常青, 王学文, 杨会杰, 李爱华, 汪幼霞, 孙瑞元. 纳米红色元素硒与葡萄糖醛酸内酯联用对大鼠肝纤维化形成过程的干预及其定量分析. *中国药理学通报* 2002; 18: 99-102
- 22 Gäbele E, Brenner DA, Rippe RA. Liver fibrosis: signals leading to the amplification of the fibrogenic hepatic stellate cell. *Front Biosci* 2003; 8: d69-d77
- 23 Giannelli G, Antonaci S. Immunological and

■应用要点

本研究探讨了鸡尾酒疗法对HSC增殖及Col- I 及TIMP-1 mRNA表达的影响, 为下一步的鸡尾酒疗法抗肝纤维化能力研究和临床前研究奠定基础。

■同行评价

本文选题明确,具有一定的创新性,实验方法简单可靠,可重复性强,学术价值较好。

- molecular aspects of liver fibrosis in chronic hepatitis C virus infection. *Histol Histopathol* 2005; 20: 939-944
- 24 Friedman SL. Mechanisms of disease: Mechanisms of hepatic fibrosis and therapeutic implications. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol* 2004; 1: 98-105
- 25 Tsukada S, Parsons CJ, Rippe RA. Mechanisms of liver fibrosis. *Clin Chim Acta* 2006; 364: 33-60
- 26 Yoshiji H, Kuriyama S, Miyamoto Y, Thorgeirsson UP, Gomez DE, Kawata M, Yoshii J, Ikenaka Y, Noguchi R, Tsujinoue H, Nakatani T, Thorgeirsson SS, Fukui H. Tissue inhibitor of metalloproteinases-1 promotes liver fibrosis development in a transgenic mouse model. *Hepatology* 2000; 32: 1248-1254
- 27 Murphy FR, Issa R, Zhou X, Ratnarajah S, Nagase H, Arthur MJ, Benyon C, Iredale JP. Inhibition of apoptosis of activated hepatic stellate cells by tissue inhibitor of metalloproteinase-1 is mediated via effects on matrix metalloproteinase inhibition: implications for reversibility of liver fibrosis. *J Biol Chem* 2002; 277: 11069-11076

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

ISSN 1009-3079 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, 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, 包括原始文章、原始清样、制作文件等。

《世界华人消化杂志》从收稿到发行每一步都经过严格审查, 保证每篇文章高质量出版, 是消化病学专业人士发表学术论文首选的学术期刊之一。为保证作者研究成果及时公布, 《世界华人消化杂志》保证每篇文章从投稿到刊出4 mo内完成。(编辑部主任: 李军亮 2010-01-18)

青黛颗粒对溃疡性结肠炎大鼠结肠黏膜MUC2和iNOS基因表达的影响

杜立阳, 刘清芳, 程晓磊, 陈铭诗, 李鲜明, 仇靖

杜立阳, 刘清芳, 程晓磊, 陈铭诗, 李鲜明, 仇靖, 中国医科大学附属第一医院中医科 辽宁省沈阳市 110001

辽宁省自然科学基金资助项目, No. 20092130

作者贡献分布: 此课题由杜立阳指导; 由刘清芳设计; 整体动物实验部分由刘清芳、程晓磊、陈铭诗、李鲜明及仇靖共同操作完成; 基因检测及数据分析部分由刘清芳完成; 论文撰写由刘清芳完成。

通讯作者: 杜立阳, 副教授, 110001, 辽宁省沈阳市和平区北二马路, 中国医科大学附属第一医院中医科. cmuzgy@163.com
电话: 024-83282536

收稿日期: 2009-12-11 修回日期: 2010-02-04

接受日期: 2010-02-09 在线出版日期: 2010-03-28

Qingdai Granules up-regulate MUC2 mRNA expression but down-regulate iNOS mRNA expression in the colonic mucosa of rats with ulcerative colitis

Li-Yang Du, Qing-Fang Liu, Xiao-Lei Cheng, Ming-Shi Chen, Xian-Ming Li, Jing Qiu

Li-Yang Du, Qing-Fang Liu, Xiao-Lei Cheng, Ming-Shi Chen, Xian-Ming Li, Jing Qiu, Department of Traditional Chinese Medicine, the First Hospital of China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China

Supported by: the National Natural Science Foundation of Liaoning Province, No. 20092130

Correspondence to: Associate Professor Qing-Fang Liu, Department of Traditional Chinese Medicine, the First Hospital of China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China. cmuzgy@163.com

Received: 2009-12-11 Revised: 2010-02-04

Accepted: 2010-02-09 Published online: 2010-03-28

Abstract

AIM: To investigate the effects of Qingdai Granules (QDG) on the expression of mucin 2 (MUC2) and inducible nitric oxide synthase (iNOS) mRNAs in the colonic mucosa of rats with ulcerative colitis.

METHODS: Ulcerative colitis was induced in rats by giving an enema of trinitrobenzene sulphonic acid (TNBS) and ethanol. The experimental animals were randomly divided into six groups: normal group, model group, sulfasalazine (SASP) group (500 mg/kg), and low-,

medium- and high-dose QDG groups (600, 900 and 1 200 mg/kg). Except the normal group, the other groups were given intragastrically normal saline, SASP, and different concentrations of QDG, respectively, from day 3 after model establishment for 10 d. On day 14, rats were killed to evaluate disease activity index (DAI) and colon mucosa damage index (CMDI). The expression of MUC2 and iNOS mRNAs in the colonic mucosa of rats was detected by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR).

RESULTS: Compared with the model group, the DAI and CMDI in the medium- and high-dose QDG groups significantly decreased, the expression of MUC2 mRNA in the colon of rats in the medium- and high-dose QDG groups was significantly up-regulated (2.06 ± 0.70 vs 1.24 ± 0.47 and 2.34 ± 0.86 vs 1.24 ± 0.47 ; both $P < 0.01$), and the expression of iNOS mRNA in the high-dose QDG group was significantly down-regulated (0.35 ± 0.12 vs 0.62 ± 0.31 , $P < 0.05$).

CONCLUSION: QDG can exert protective effects against rat ulcerative colitis perhaps by up-regulating MUC2 mRNA expression and down-regulating iNOS mRNA expression.

Key Words: Ulcerative colitis; Qingdai Granules; Mucin 2; Inducible nitric oxide synthase

Du LY, Liu QF, Cheng XL, Chen MS, Li XM, Qiu J. Qingdai Granules up-regulate MUC2 mRNA expression but down-regulate iNOS mRNA expression in the colonic mucosa of rats with ulcerative colitis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(9): 937-941

摘要

目的: 观察青黛颗粒对TNBS诱导的溃疡性结肠炎(UC)大鼠结肠黏膜黏蛋白(MUC2)及诱导型一氧化氮合成酶(iNOS)基因表达的影响, 探讨其治疗UC的可能作用机制。

方法: 将54只SD实验大鼠随机分为正常对照组、模型对照组、阳性药物治疗组(SASP,

■背景资料

青黛颗粒是中国医科大学附属第一医院中医科治疗溃疡性结肠的传统验方, 临床应用30多年来取得显著的疗效。尤其在促进溃疡愈合方面, 临床上亦可用于鹅口疮的治疗。本次实验主要是在本课题组前期研究的基础上, 探讨其是否可通过调节影响肠道黏膜上皮修复进行研究。

■同行评议者

江学良, 主任医师, 中国人民解放军济南军区总医院消化科

■ 研发前沿

目前治疗溃疡性结肠炎仍以氨基水杨酸制剂、糖皮质激素、免疫抑制剂为主,但效果并不理想,有必要从传统医学的角度来寻找新的治疗UC的途径。

500 mg/kg)、青黛颗粒600、900、1 200 mg/kg治疗组。造模后第3天开始灌胃给药,共给药10 d。实验第14天,处死大鼠,剖取其病变结肠组织,比较各组大鼠的DAI积分和CMDI评分,用逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)法检测MUC2及iNOS基因的表达。

结果:较模型组青黛颗粒900、1 200 mg/kg治疗组能显著降低实验大鼠DAI积分和CMDI评分,上调结肠组织中MUC2的基因表达(2.06 ± 0.70 vs 1.24 ± 0.47 ; 2.34 ± 0.86 vs 1.24 ± 0.47 , 均 $P < 0.01$),且青黛颗粒1 200 mg/kg治疗组能下调iNOS的基因表达(0.35 ± 0.12 vs 0.62 ± 0.31 , $P < 0.05$)。

结论:青黛颗粒可能通过上调结肠黏膜MUC2的基因表达并下调iNOS的基因表达而起到抗TNBS诱导的大鼠溃疡性结肠炎的作用。

关键词: 溃疡性结肠炎; 青黛颗粒; MUC2; 诱导型一氧化氮合成酶

杜立阳, 刘清芳, 程晓磊, 陈铭诗, 李鲜明, 仇靖. 青黛颗粒对溃疡性结肠炎大鼠结肠黏膜MUC2和iNOS基因表达的影响. 世界华人消化杂志 2010; 18(9): 937-941

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/937.asp>

0 引言

溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)是结肠黏膜的慢性非特异性炎性疾病, UC的病因和发病机制尚不十分明确,许多资料显示其与环境、遗传、感染、免疫等因素密切相关^[1-6]。目前治疗仍以氨基水杨酸制剂、糖皮质激素、免疫抑制剂为主,但效果并不理想,有必要从传统医学的角度来寻找新的治疗UC的途径。青黛颗粒为中国医科大学附属第一医院中医科老中医祖传验方,临床应用30年来,取得了良好的治疗效果。本课题组前期研究表明青黛颗粒可能通过其抗脂质过氧化作用及下调炎症介质(TNF- α 、IL-1、ICAM),抵抗TNBS诱导的大鼠UC^[7,8]。本研究通过青黛颗粒灌胃治疗UC模型大鼠,比较各组大鼠DAI积分、CMDI评分;检测结肠黏膜屏障保护因子MUC2以及炎症因子iNOS的表达水平,从而评价青黛颗粒治疗UC的效果,从分子水平上探讨其可能的作用机制,为其临床应用提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料 成年SD大鼠,♂,体质量 $250 \text{ g} \pm 20 \text{ g}$,购

于军事医学科学院实验动物中心, No. 0000737, 室温,光照周期12 h:12 h条件饲养;青黛颗粒(QDG, 中国医科大学);柳氮磺胺吡啶(SASP, 批号: 040106, 上海三维制药有限公司);2, 4, 6-三硝基苯磺酸(TNBS, 批号: P2297, 美国Sigma公司);TRIzol(批号: 155906-026 invitrogen);RT-PCR试剂盒(批号: DRR012A, 大连宝生物工程有限公司);PCR仪(德国Whatman Biometra公司)。

1.2 方法

1.2.1 TNBS法大鼠UC造模^[9]:取SD大鼠54只,随机分为6组:正常对照组、模型对照组、阳性药物治疗组(SASP, 500 mg/kg),青黛颗粒600、900、1 200 mg/kg治疗组。各组动物于造模前禁食24 h,用1 000 mg/kg乌拉坦腹腔注射麻醉,固定于平板上,板下部垫高使动物尾部与头部夹角呈40度角。将体积分数为50 g/L的TNBS水溶液与500 mL/L乙醇以体积比1:1混匀。取一外径2.0 mm、长约12 cm的硅胶输液管(用液体石蜡润滑),插入大鼠肛门8 cm,按剂量100 mg/kg缓慢灌注TNBS乙醇溶液,1 min灌注完,倒置2 min后松开固定,使其平卧于鼠笼中,注意避免TNBS自肛门流出。造模结束后第2天随机处死大鼠6只,剖腹摘取直肠和结肠,肉眼观察结肠充血水肿情况,确定造模成功。造模后第3天开始各组动物灌胃给药,连续给药10 d。空白对照组和模型对照组动物按每千克体质量10 mL灌胃给予蒸馏水。实验期间每日记录动物体质量、体征、大便性状和隐血情况。按表1标准进行DAI积分评定。灌胃10 d后处死大鼠,剖腹摘取病变结肠组织,进行CMDI评分^[10]:评分标准为:0分,无损伤;1分,轻度充血、水肿,表面光滑,无糜烂或溃疡;2分,充血水肿,黏膜粗糙呈颗粒状,有糜烂或肠粘连;3分,高度充血水肿,黏膜表面有坏死及溃疡形成,溃疡最大纵径 $< 1 \text{ cm}$,肠壁增厚或表面有坏死及炎症;4分,在3分基础上溃疡最大纵径 $> 1 \text{ cm}$,或全肠壁坏死。将结肠组织置于 $-80 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存以备RT-PCR实验用。

1.2.2 结肠组织黏膜MUC2、iNOS mRNA的检测: TRIzol法提取组织RNA,按试剂盒说明逆转录合成cDNA, RT-PCR半定量法检测MUC2、iNOS基因表达。本实验以TBP(TATA-box binding protein)管家基因为内参照。TBP反应条件: $94 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 预变性2 min, $94 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 变性1 min, $55 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 退火30 s, $72 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸1 min,共30个循环, $72 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 共延伸10 min。15 g/L琼脂糖凝胶电泳分离; MUC2反应条

表 1 DAI评分表

计分	体质量下降	大便性状	便血
0	无	正常	阴
1	1-5	-	-
2	6-10	半稀便	隐血(+)
3	11-15	-	-
4	>15	稀便	肉眼血便

正常大便: 成形大便; 半稀便: 不黏附于肛门的糊状、半成形大便; 稀便: 可黏附于肛门的稀水样便。DAI = (体质量下降分数+大便性状分数+便血分数)/3。

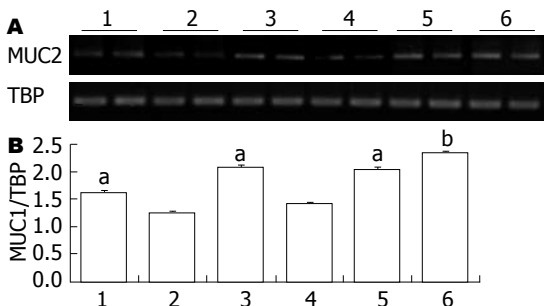


图 1 RT-PCR法检测结肠黏膜MUC2 mRNA的表达, 凝胶成像系统检测各组PCR产物的灰度值。A: 各组PCR产物灰度值比较; B: 依据统计结果所做的柱形图, 1: 正常对照组; 2: 模型对照组; 3: 阳性药物治疗组; 4: 低青黛颗粒组; 5: 中青黛颗粒组; 6: 高青黛颗粒组。* $P<0.05$, ^b $P<0.01$ vs 模型组。

件: 94 °C预变性2 min, 94 °C变性1 min, 60 °C退火30 s, 72 °C延伸1 min, 共30个循环, 72 °C共延伸10 min。15 g/L琼脂糖凝胶电泳分离, 凝胶成像系统检测PCR产物与TBP的比值; iNOS反应条件: 94 °C预变性2 min, 94 °C变性1 min, 59 °C退火30 s, 72 °C延伸1 min, 共30个循环, 72 °C共延伸10 min, 15 g/L琼脂糖凝胶电泳分离, 凝胶成像系统检测PCR产物与TBP的比值。各引物序列及扩增长度见表2^[11-13]。

统计学处理 采用SPSS13.0统计软件处理, 计量资料以mean±SD差表示, 经单因素方差分析, 以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 症状与DAI积分 各组大鼠在用TNBS造模型后出现体毛凌乱, 活动减少, 并出现稀便, 随实验天数增加症状逐渐加重, 严重大鼠肛周可见肉眼血便。正常对照组无改变, 青黛颗粒900、1 200 mg/kg治疗组和阳性药物治疗组可改善以上症状。实验各组同时伴有不同程度的质量下降, 正常对照组体质量增加, 综合大鼠质量、大

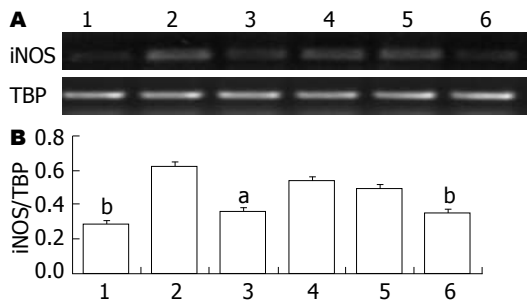


图 2 RT-PCR法检测结肠黏膜iNOS mRNA的表达, 凝胶成像系统检测各组PCR产物的灰度值。A: 各组PCR产物灰度值比较; B: 依据统计结果所做的柱形图, 1: 正常对照组; 2: 模型对照组; 3: 阳性药物治疗组; 4: 低青黛颗粒组; 5: 中青黛颗粒组; 6: 高青黛颗粒组。* $P<0.05$, ^b $P<0.01$ vs 模型组。

便性状和隐血情况进行DAI积分(表3)。

2.2 CMDI评分 正常对照组无改变, 模型组CMDI评分最高, 青黛颗粒900、1 200 mg/kg治疗组阳性药物治疗组可明显改善CMDI评分(表3)。

2.3 不同处理因素对大鼠结肠黏膜MUC2基因表达的影响 正常组大鼠结肠黏膜MUC2处于较高表达水平, 用TNBS灌肠造模后表达量不同程度下降。青黛颗粒900、1 200 mg/kg治疗组的MUC2基因表达较模型组而言有明显上升($P<0.01$)。青黛颗粒600 mg/kg治疗组的MUC2基因表达较模型组而言差异不具有统计学意义; SASP治疗组的MUC2基因表达较模型组明显上升($P<0.05$, 图1), 青黛颗粒900、1 200 mg/kg治疗组的MUC2基因表达较阳性药物治疗组差异不具有统计学意义。

2.4 不同处理因素对大鼠结肠黏膜iNOS基因表达的影响 正常组大鼠结肠黏膜iNOS处于较低表达水平, 用TNBS灌肠造模后表达量不同程度上升。与模型组比较青黛颗粒1 200 mg/kg治疗组结肠黏膜iNOS的基因表达明显降低($P<0.05$, 图2); 青黛颗粒600、900 mg/kg治疗组及阳性药物治疗组结肠黏膜iNOS的基因表达较模型组差异不具有统计学意义。

3 讨论

TNBS是一种有机化学试剂, 也可起半抗原作用^[9]。TNBS与乙醇诱发大鼠结肠炎的主要机制为乙醇破坏结肠黏膜屏障, TNBS渗入结肠与大分子物质结合, 形成全抗原引起肠壁一系列免疫应答与炎症反应, 其发病机制及病理表现与人类炎症肠炎非常相似。

细胞因子失衡是UC产生肠道非特异性炎症的关键环节^[14], 诸多细胞因子可同时或相继、直

■ 相关报道

有研究表明, 炎症性肠病中肠黏膜屏障的损伤是其发病的关键因素。

■应用要点

青黛颗粒能有效治疗TNBS诱导的大鼠的溃疡性结肠炎,其作用机制可能与其能上调结肠黏膜MUC2的基因表达并下调iNOS的基因表达有关。

表 2 目的基因引物序列

目的基因	上游引物	下游引物	碱基对
TBP	5'-CCACGGACAACCTGCGTTGAT-3'	5'-GGCTCATAGCTACTGAACTG-3'	236 bp ^[11]
MUC2	5'-CAGAGTGATCAGTGGCTGT-3'	5'-CCCGTCGAAGGTGATGTAGT-3'	242 bp ^[12]
iNOS	5'-CCTCCTCCACCCTACCAAGT-3'	5'-CACCCAAAGTGCTTCAGTCA-3'	199 bp ^[13]

表 3 实验结束后各组大鼠DAI积分、CMDI评分的比较 (n = 8, mean ± SD)

分组	剂量(mg/kg)	DAI积分	CMDI
正常对照组	—	0.25 ± 0.39	0.38 ± 0.52
模型对照组	—	2.83 ± 0.62 ^d	2.63 ± 0.74 ^d
阳性药物治疗组	500	1.46 ± 1.14 ^b	1.50 ± 1.20 ^a
青黛颗粒组(mg/kg)			
600		2.63 ± 0.76	2.50 ± 1.20
900		2.00 ± 0.69 ^a	1.75 ± 0.71 ^a
1 200		0.87 ± 0.85 ^b	1.38 ± 0.52 ^b

^aP<0.05, ^bP<0.01 vs 模型组; ^dP<0.01 vs 正常组。

接或间接作用于靶细胞,形成细胞因子网络,在UC的组织破坏及炎症反应中起着重要作用。

有研究表明,炎症性肠病中肠黏膜屏障的损伤是其发病的关键因素^[15]。黏液层是肠黏膜重要的化学屏障,主要由黏液细胞分泌的黏蛋白构成,黏蛋白MUC2为主要成分。MUC2基因敲除小鼠可自发结肠炎^[16],说明其对肠黏膜有直接的保护作用。一旦MUC2的质和量发生变化,肠道屏障功能受损,通透性增高,肠腔内的抗原、内毒素等促炎物质进入肠黏膜固有层,诱发免疫反应。现代研究表明,青黛能降低毛细血管通透性,对平滑肌有抑制作用,可调节机体免疫功能,并具有类皮质激素样作用,其化学成分珍珠为硫酸钙及多种氨基酸,有较强的抗组胺和敛和伤口并促进创口愈合的作用。在临床实践中,给予UC患者青黛颗粒灌肠治疗能显著促进创面的愈合。本研究结果显示溃疡性结肠炎模型组大鼠结肠黏膜的MUC2的基因表达较空白对照组而言有显著的下降。且青黛颗粒治疗组能显著升高结肠黏膜MUC2基因的表达,可能是其发挥疗效的机制之一。

一氧化氮是一种自由基性质的气体,其合成有赖于一氧化氮合成酶(NOS)的作用,在炎症性肠病中主要由诱生型一氧化氮合成酶(iNOS)催化产生^[17]。国内学者亦有此报道^[18]。iNOS是钙离子和钙调蛋白非依赖性酶,在正常生理状态下无表达^[19],但在UC时结肠黏膜上皮细胞过

量表达iNOS^[20,21],产生大量的NO,从而参与机体炎症和组织损伤,在消化系病理生理中起着重要作用。本研究显示,溃疡性结肠炎模型组大鼠结肠黏膜上皮细胞iNOS的基因表达较空白对照组而言有显著的上升,本研究结果显示青黛颗粒散能显著降低结肠组织iNOS基因的表达,从而降低结肠NO的产生,起到抗UC的作用。

总之,本研究提示青黛颗粒能有效治疗TNBS诱导的大鼠的溃疡性结肠炎,其作用机制可能与其能上调结肠黏膜MUC2的基因表达并下调iNOS的基因表达有关。

4 参考文献

- Loftus EV Jr. Clinical epidemiology of inflammatory bowel disease: Incidence, prevalence, and environmental influences. *Gastroenterology* 2004; 126: 1504-1517
- Newman B, Siminovitch KA. Recent advances in the genetics of inflammatory bowel disease. *Curr Opin Gastroenterol* 2005; 21: 401-407
- Schreiber S, Rosenstiel P, Albrecht M, Hampe J, Krawczak M. Genetics of Crohn disease, an archetypal inflammatory barrier disease. *Nat Rev Genet* 2005; 6: 376-388
- Sartor RB. Microbial influences in inflammatory bowel disease: role in pathogenesis and clinical implications. In: Eds Sartor RB and Sandborn WJ. *Kirsner's Inflammatory Bowel Diseases*. Philadelphia: Elsevier, 2004: 138-162
- Mow WS, Vasiliasauskas EA, Lin YC, Fleshner PR, Papadakis KA, Taylor KD, Landers CJ, Abreu-Martin MT, Rotter JL, Yang H, Targan SR. Association of antibody responses to microbial antigens and complications of small bowel Crohn's disease. *Gastroenterology* 2004; 126: 414-424
- Sartor RB, Hoentjen F. Proinflammatory cytokines and signaling pathways in intestinal innate immune cells, in *Mucosal Immunology*, J. Mestecky, M.E. Lamm, J.R. McGhee, J. Bienenstock, L. Mayer, and W. Strober, Editors. 2005, Elsevier Academic Press: London, 681-701
- 杜立阳, 邹莉波, 宗世群, 刘悦. 青黛颗粒抗氧化作用的实验研究. *中国中西医结合消化杂志* 2003; 11: 144-145
- 邹莉波, 刘艳, 先宇飞, 吴琦, 杨爱新, 杜立阳. 复方青黛散颗粒治疗溃疡性结肠炎的机制. *沈阳药科大学学报* 2006; 23: 119-122
- Morris GP, Beck PL, Herridge MS, Depew WT, Szewczuk MR, Wallace JL. Hapten-induced model of chronic inflammation and ulceration in the rat colon. *Gastroenterology* 1989; 96: 795-803
- Millar AD, Rampton DS, Chander CL, Claxson AW,

- Blades S, Coumbe A, Panetta J, Morris CJ, Blake DR. Evaluating the antioxidant potential of new treatments for inflammatory bowel disease using a rat model of colitis. *Gut* 1996; 39: 407-415
- 11 el-Marjou A, Delouvé A, Thiery JP, Radvanyi F. Involvement of epidermal growth factor receptor in chemically induced mouse bladder tumour progression. *Carcinogenesis* 2000; 21: 2211-2218
- 12 Amit-Romach E, Reifen R, Uni Z. Mucosal function in rat jejunum and ileum is altered by induction of colitis. *Int J Mol Med* 2006; 18: 721-727
- 13 De Luca A, Montagnoli C, Zelante T, Bonifazi P, Bozza S, Moretti S, D'Angelo C, Vacca C, Boon L, Bistoni F, Puccetti P, Fallarino F, Romani L. Functional yet balanced reactivity to *Candida albicans* requires TRIF, MyD88, and IDO-dependent inhibition of Rorc. *J Immunol* 2007; 179: 5999-6008
- 14 Nguyen GC, Harris ML, Dassopoulos T. Insights in immunomodulatory therapies for ulcerative colitis and Crohn's disease. *Curr Gastroenterol Rep* 2006; 8: 499-505
- 15 Moehle C, Ackermann N, Langmann T, Aslanidis C, Kel A, Kel-Margoulis O, Schmitz-Madry A, Zahn A, Stremmel W, Schmitz G. Aberrant intestinal expression and allelic variants of mucin genes associated with inflammatory bowel disease. *J Mol Med* 2006; 84: 1055-1066
- 16 Mizoguchi A, Mizoguchi E. Inflammatory bowel disease, past, present and future: lessons from animal models. *J Gastroenterol* 2008; 43: 1-17
- 17 Konturek PC, Brzozowski T, Engel M, Burnat G, Gaca P, Kwiecien S, Pajdo R, Konturek SJ. Ghrelin ameliorates colonic inflammation. Role of nitric oxide and sensory nerves. *J Physiol Pharmacol* 2009; 60: 41-47
- 18 白爱华, 沈志祥, 于皆平, 余保平, 罗莺. 一氧化氮与结肠炎模型急性期损伤. *世界华人消化杂志* 1999; 7: 900-901
- 19 Gassull MA. Review article: the role of nutrition in the treatment of inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2004; 20 Suppl 4: 79-83
- 20 Pavlick KP, Laroux FS, Fuseler J, Wolf RE, Gray L, Hoffman J, Grisham MB. Role of reactive metabolites of oxygen and nitrogen in inflammatory bowel disease. *Free Radic Biol Med* 2002; 33: 311-322
- 21 Dijkstra G, Moshage H, van Dullemen HM, de Jager-Krikken A, Tiebosch AT, Kleibeuker JH, Jansen PL, van Goor H. Expression of nitric oxide synthases and formation of nitrotyrosine and reactive oxygen species in inflammatory bowel disease. *J Pathol* 1998; 186: 416-421

■同行评价

本研究选题尚可, 结论可靠, 但临床意义有待进一步探讨。

编辑 李瑞敏 电编 吴鹏朕

ISSN 1009-3079 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》被收录情况

本刊讯 《世界华人消化杂志》被国际权威检索系统美国《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(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、中国学术期刊文摘、中国生物医学文献光盘数据库、中文科技资料目录医药卫生、解放军医学图书馆CMCC系统、中国医学文摘外科学分册(英文版)、中国医学文摘内科学分册(英文版)收录. (编辑部主任: 李军亮 2010-01-08)

TNF- α 体外对Caco-2细胞通透性的影响及其机制

王国丽, 尹菁华, 毛定安, 何芳, 尹飞

■背景资料

已有的研究发现 IBD 患者血清中促炎细胞因子水平显著增高, 这可能是 IBD 发病的重要机制之一。TNF- α 作为重要的前炎性细胞因子之一, 在不同的体内、外研究中均证实可以引起肠上皮细胞屏障通透性增加, 抗 TNF- α 抗体可以恢复受损的肠上皮细胞屏障功能, 但是 TNF- α 引起肠黏膜屏障通透性增高的具体机制尚不清楚。

王国丽, 何芳, 尹飞, 中南大学湘雅医院儿科 湖南省长沙市 410008

尹菁华, 中南大学医学院 湖南省长沙市 410008

毛定安, 中南大学湘雅第二医院儿科 湖南省长沙市 410011

中南大学大学生创新性实验计划基金资助项目, No. 081053356

作者贡献分布: 此课题由尹飞设计; 研究过程实验操作主要由王国丽与尹菁华完成; 尹菁华、毛定安及何芳对数据分析及论文写作提供帮助。

通讯作者: 尹飞, 主任医师, 博士生导师, 410008, 湖南省长沙市, 中南大学湘雅医院儿科. yf2323@hotmail.com

电话: 0731-84327208 传真: 0731-84327922

收稿日期: 2009-12-17 修回日期: 2010-02-02

接受日期: 2010-02-09 在线出版日期: 2010-03-28

Tumor necrosis factor- α increases the paracellular permeability of Caco-2 cell monolayers *in vitro*

Guo-Li Wang, Jing-Hua Yin, Ding-An Mao, Fang He, Fei Yin

Guo-Li Wang, Fang He, Fei Yin, Department of Pediatrics, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, Hunan Province, China

Jing-Hua Yin, Xiangya School of Medicine, Central South University, Changsha 410008, Hunan Province, China

Ding-An Mao, Department of Pediatrics, Second Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, Hunan Province, China

Supported by: the Innovative Pilot Project of Central South University, No. 081053356

Correspondence to: Fei Yin, Department of Pediatrics, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, Hunan Province, China. yf2323@hotmail.com

Received: 2009-12-17 Revised: 2010-02-02

Accepted: 2010-02-09 Published online: 2010-03-28

Abstract

AIM: To investigate the effects of tumor necrosis factor- α (TNF- α) on the paracellular permeability of Caco-2 cell monolayers and to explore potential mechanisms involved.

METHODS: Caco-2 cells were cultured *in vitro* to establish a model of intestinal epithelial barrier and divided randomly into two groups: control group and TNF- α treatment group. The TNF- α treatment group was further divided into four subgroups for testing at 3, 6, 12 and 24 h after TNF- α treatment. The changes in transepithelial electrical resistance (TEER) of Caco-2 cells were

measured using an electrical resistance system. The changes in cytoskeleton were observed by direct staining with rhodamine-phalloidin. The activation of nuclear factor- κ B (NF- κ B) was determined by luciferase reporter gene assay.

RESULTS: The TEER significantly decreased in all four treatment subgroups compared to the control group (all $P < 0.05$). The TEER was significantly lower in the 24-h treatment subgroup than in other subgroups (all $P < 0.05$). The activation level of NF- κ B was significantly raised in 3-, 6- and 12-h treatment subgroups compared to the control group (all $P < 0.05$). The activation level of NF- κ B in 12-h treatment subgroup was significantly higher than those in other subgroups (all $P < 0.05$). In the control group, rhodamine-phalloidin staining showed that F-actin was visualized around the cell membrane and exhibited a honeycomb pattern of fluorescent staining. After treatment with TNF- α , the fluorescence signals were weakened and distributed in a serrated pattern.

CONCLUSION: TNF- α increases the paracellular permeability of Caco-2 cell monolayers perhaps by inducing NF- κ B activation and actin reorganization.

Key Words: Tumor necrosis factor- α ; Caco-2 cell; Nuclear factor- κ B; Permeability

Wang GL, Yin JH, Mao DA, He F, Yin F. Tumor necrosis factor- α increases the paracellular permeability of Caco-2 cell monolayers *in vitro*. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(9): 942-946

摘要

目的: 探讨肿瘤坏死因子- α (TNF- α)对Caco-2细胞间通透性的影响及作用机制。

方法: 利用Caco-2细胞建立肠上皮细胞屏障模型, 模型分为正常对照组(C组)和TNF- α 预处理组(TNF- α 组), TNF- α 组根据预处理时间又分为3、6、12、24 h 4个亚组。应用电阻仪测定TNF- α 预处理后各组Caco-2细胞的跨上皮细胞电阻(transepithelial electrical resistance,

■同行评议者

崔立红, 副教授, 中国人民解放军海军总医院消化内科

TEER)变化; 罗丹明-鬼笔环肽直接染色观察细胞骨架改变; 同时采用荧光素酶报告基因检测NF- κ B活性。

结果: TNF- α 各亚组TEER均降低, 与C组比较均有显著性差异(均 $P<0.05$), 其中TNF- α 24 h亚组TEER降低明显, 与C组及TNF- α 3、6、12 h亚组比较有显著性差异(均 $P<0.05$); TNF- α 3、6、12 h亚组NF- κ B活性增高, 与C组比较均有显著性差异(均 $P<0.05$), 且TNF- α 12 h亚组NF- κ B活性明显增高, 与C组及TNF- α 3、6、24 h亚组比较有显著性差异(均 $P<0.05$); 罗丹明-鬼笔环肽直接染色可见C组的F-actin沿细胞膜分布, 呈蜂巢状线性荧光, 100 μ g/L TNF- α 预处理后导致F-actin荧光信号减弱, 并呈锯齿状异常分布。

结论: TNF- α 导致Caco-2细胞间的通透性增加, 其机制可能与NF- κ B活化及F-actin重组有关。

关键词: 肿瘤坏死因子- α ; Caco-2细胞; 核因子- κ B; 细胞间通透性

王国丽, 尹菁华, 毛定安, 何芳, 尹飞. TNF- α 体外对Caco-2细胞通透性的影响及其机制. 世界华人消化杂志 2010; 18(9): 942-946
http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/942.asp

0 引言

炎症性肠病(inflammatory bowel disease, IBD)是一组病因不明的慢性肠道炎症性疾病, 他包括溃疡性结肠炎和克罗恩病, 近年来其发病率有逐年增高趋势. IBD的病因和发病机制尚不清楚, 目前普遍认为免疫反应异常所导致的肠黏膜通透性增加在其发病中起重要作用^[1,2]. 已有的研究发现IBD患者血清中促炎细胞因子水平显著增高^[3,4], 这可能是IBD发病的重要机制之一. TNF- α 作为重要的前炎性细胞因子之一, 在不同的体内、外研究中均证实可以引起肠上皮细胞屏障通透性增加^[5-7], 抗TNF- α 抗体可以恢复受损的肠上皮细胞屏障功能^[8], 但是TNF- α 引起肠黏膜屏障通透性增高的具体机制尚不清楚. 本研究利用Caco-2细胞建立体外肠上皮细胞屏障模型, 观察TNF- α 对其通透性影响并探讨其可能的机制。

1 材料和方法

1.1 材料 胎牛血清(四季青, 中国); 电阻仪ESR-001(millipore, 日本); transwell(millipore, 日本); 罗丹明-鬼笔环肽(invitrogen, 美国); Pnf-kb-luc(美国芝加哥大学章坚教授馈赠); Lipofectamine

2000(invitrogen, 美国); 其余分析试剂为国产或进口分装。

1.2 方法

1.2.1 肠上皮细胞屏障模型的建立: Caco-2细胞株, 来源于人大肠癌细胞. 应用含有200 mL/L胎牛血清、10 g/L非必需氨基酸、10 g/L谷氨酰胺和青霉素-链霉素双抗液的DMEM培养液, 将Caco-2细胞在37 $^{\circ}$ C、50 mL/L CO₂条件下进行培养, 3-4 d可基本融合. 将分化良好的Caco-2细胞接种于Transwell板上(孔径1 μ m, 有效膜面积0.33 cm²), 接种密度为 $0.5 \times 10^4/\text{cm}^2$, 隔天换液(Transwell上层加入300 μ L培养液, 下层加入1200 μ L培养液), 倒置显微镜下观察细胞生长情况. 约21 d后细胞形成紧密单层。

1.2.2 分组: 待Caco-2细胞成紧密单层后, 无血清培养24 h, 将其分为: 正常对照组(C组)和TNF- α 预处理组(TNF- α 组). 根据TNF- α 预处理时间又分为3、6、12、24 h 4个亚组, 各亚组于其相应的时间点在Transwell基底侧加入TNF- α 100 μ g/L分别孵育3、6、12、24 h。

1.2.3 跨上皮细胞电阻(transsepithelial electrical resistance, TEER)的测定: 参照文献方法应用电阻仪测定各组Caco-2细胞的TEER^[5]. 为保证数值的准确性, 整个过程在恒定温度下(37 $^{\circ}$ C)进行, 每个Transwell均取不同方向的3个点, 重复测定3次, 取均值乘以Transwell膜面积, 即为该样品的TEER值, 以 $\Omega \cdot \text{cm}^2$ 示. 因为Transwell膜本身也具有一定的TEER, 因此标准的TEER应将样品的实测TEER值减去空白对照的TEER值。

1.2.4 F-actin染色: 各组Caco-2细胞用PBS漂洗: 2 min, 3次, 37 $^{\circ}$ C多聚甲醛4 $^{\circ}$ C孵育10 min, 冷PBS漂洗2 min, 3次, 再用5 g/L Triton-x100于4 $^{\circ}$ C孵育15 min, 冷PBS漂洗: 2 min, 3次, 最后用2 kU/L罗丹明-鬼笔环肽(Rhodamine-Phalloidin)室温避光孵育1 h, PBS漂洗: 2 min, 3次. 染色结束后用荧光倒置相差显微镜进行荧光镜检及拍照。

1.2.5 NF- κ B活性检测: 将Caco-2细胞以 $(1.5-2) \times 10^5$ 个/孔的密度接种到24孔板中, 隔天待其生长融合至70%-80%时, 利用Lipofectamine 2000将Pnf-kb-luc质粒转染入该细胞. 具体方法如下: 在A、B两个eppendorf管中分别加入1 μ g Pnf-kb-luc质粒+serum free DMEM 至终体积50 μ L每孔; 1.5 μ L lipofectamine 2000+48.5 μ L serum free DMEM至终体积为每孔50 μ L, 室温放置5 min, 将A、B二者混合, 室温放置20-30 min后将混合液缓慢而均匀地加到24孔板细胞液中, 每孔再加入无血清DMEM 400 μ L, 轻轻摇晃, 使DNA

■ 研发前沿

已有的资料显示TNF- α 可导致肠上皮细胞通透性改变, 但其具体的损伤和调控机制尚不明确. 而肠上皮通透性增加是IBD的主要病理改变之一, 因此对这一问题的深入研究有可能对IBD的治疗提供新的思路。

■ 相关报道

Amarro等的研究认为活化的RhoA能够通过激活Rho激酶调控其下游肌球蛋白轻链磷酸化,引起黏着斑和应力纤维形成,调控F-actin的重构。

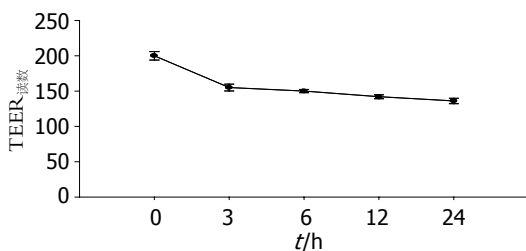


图1 TNF- α 预处理不同时间致Caco-2细胞屏障通透性的变化。

分布均匀, 37 °C、50 mL/L CO₂培养24 h后, 给每孔更换500 μ L正常的完全培养基。按照1.2.2实验分组方法, 分别于转染24、36、42、45 h后在Transwell基底侧加入100 μ g/LTNF- α , 继续孵育至48 h收取细胞, 得到TNF- α 24、12、6、3四个亚组。每组取3个样品, 按荧光素酶活性检测试剂操作指南及参考文献[9]提供的方法裂解、离心, 取20 μ L上清, 分别与100 μ L荧光检测试剂混合, 置TD-20/20荧光检测仪(Bio-Rad)中得到各组的单光子仪读数, 进行统计学分析。

统计学处理 应用SPSS13.0软件进行统计学分析。所有数据均以mean $\pm$ SD表示, 采用配对 t 检验或单因素方差分析(AVONA)的LSD方法对各组间数据进行比较。以 $P<0.05$ 为有统计学差异。

2 结果

2.1 各组细胞的TEER TNF- α 各亚组Caco-2细胞TEER值均降低, 与C组比较统计学差异有显著性(均 $P<0.05$), 其中TNF- α 24 h亚组TEER降至最低, 与C组及TNF- α 3、6、12 h亚组比较有显著性差异(均 $P<0.05$, 表1, 图1)。

2.2 各组细胞NF- κ B的活性 TNF- α 3、6、12 h组NF- κ B活性增高, 与C组比较统计学差异有显著性(均 $P<0.05$), 其中TNF- α 12 h亚组NF- κ B活性最高, 与C组及TNF- α 3、6、24 h亚组比较有显著性差异(均 $P<0.05$, 表1)。

2.3 各组细胞的F-actin改变 C组的F-actin主要分布在细胞周边, 线条完整连续, 显示出典型的鹅卵石样轮廓, 称为外周致密束。细胞间连接紧密, 未见明显缝隙形成。核的周围也有少量分布, 形成核骨架(图2A); TNF- α 3、6 h组细胞的F-actin无明显改变(图2B, C); TNF- α 12 h组细胞外周致密带边缘变得毛糙不规整, 细胞荧光染色减弱(图2D), TNF- α 24 h组外周轮廓模糊难辨, 逐渐出现锯齿样断裂, 趋于变细崩解消散(图2E)。

3 讨论

肠黏膜屏障是机体重要的免疫防御屏障, 将机

表1 各组细胞通透性及NF- κ B活性 (mean $\pm$ SD)

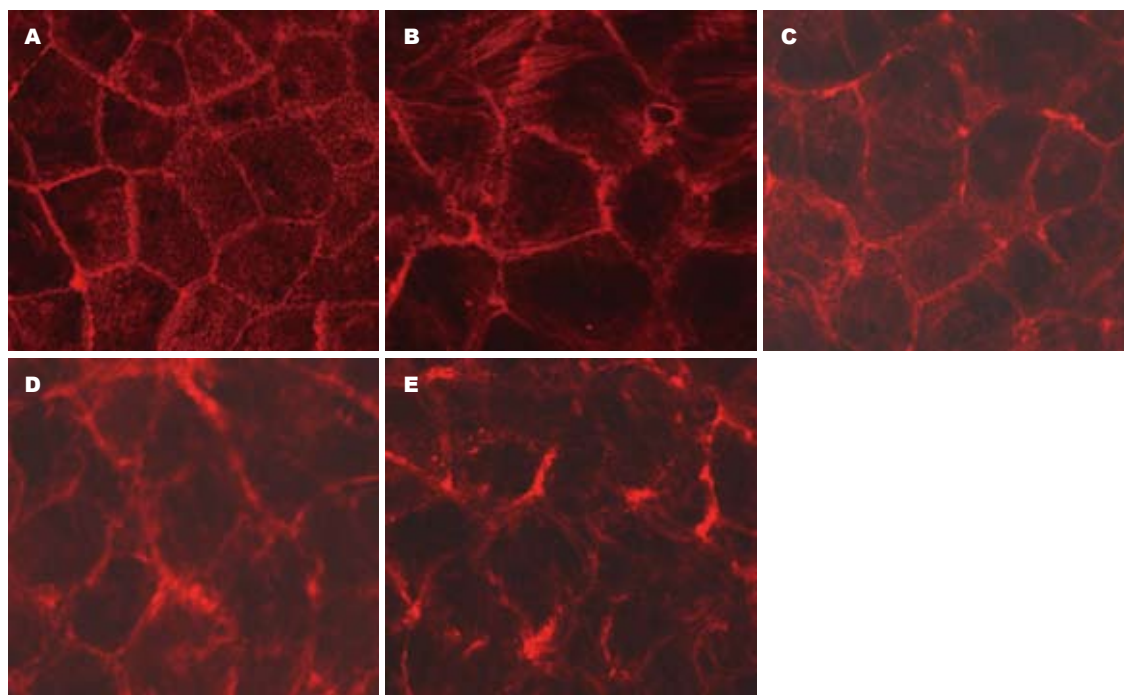
分组	TEER($\Omega\cdot\text{cm}^2$)	NF- κ B活性
C组	198 $\pm$ 2.5 ^{ae}	460 $\pm$ 49.5 ^c
TNF- α 组		
3 h	156 $\pm$ 1.5 ^{ace}	945 $\pm$ 35.1 ^{ace}
6 h	150 $\pm$ 1.3 ^{ace}	1 326 $\pm$ 65.8 ^{ace}
12 h	141 $\pm$ 0.3 ^{ae}	3 623 $\pm$ 204.0 ^{ae}
24 h	136 $\pm$ 2.0 ^{ac}	643 $\pm$ 40.3 ^c

^a $P<0.05$ vs C组; ^c $P<0.05$ vs TNF- α 12 h; ^e $P<0.05$ vs TNF- α 24 h。

体与肠道内的外源性物质隔离开, 避免病原微生物侵袭和抗原分子对机体的损伤。肠黏膜屏障包括肠上皮细胞屏障、免疫屏障和微生物屏障, 其中肠上皮细胞屏障是最重要的一道屏障, 是肠黏膜具有选择性通透的基础。已有的资料显示TNF- α 可导致肠上皮细胞通透性改变^[5-7], 但其具体的损伤和调控机制尚不明确。而肠上皮通透性增加是IBD的主要病理改变之一, 因此对这一问题的深入研究有可能对IBD的治疗提供新的思路。

由跨膜蛋白、细胞骨架蛋白及胞质附着蛋白组成的紧密连接在肠上皮细胞间隙顶端形成渗透屏障, 调节水和电解质的极向运动, 防止大分子物质经肠腔漏到周围组织中, 是肠上皮屏障的重要结构基础。其中肌动蛋白(actin)是细胞骨架蛋白主要组成成分之一, 有单体型(G-actin)和纤维多聚型(F-actin)两种存在方式。F-actin可通过与肌球蛋白和原肌球蛋白等组成不同的微丝束类型, 调节细胞形态和细胞间连接, 参与维持细胞的屏障功能。已有研究表明, 内皮细胞受到外界刺激, 如: LPS、TNF- α 等作用时, 细胞通过多种信号转导的途径介导肌动蛋白微丝发生重组, 导致血管壁通透性增加^[10]。F-actin的分布变化与细胞的屏障功能改变密切相关。

TEER是检测细胞屏障的指标^[5], 其值越大代表细胞的屏障功能越好。本实验发现TNF- α 损伤Caco-2细胞屏障功能, 导致其通透性增加, 作用24 h时细胞屏障功能最低; TNF- α 预处理12 h后Caco-2细胞actin发生重组, 24 h后重组程度加重。我们的结果与Schmitz等^[5]在大肠上皮细胞株HT-29/B6中的发现一致, 其指出TNF- α (100 μ g/L)可以降低TEER达81%, 并且冷冻蚀刻电镜显示TJ组分减少, 提示TNF- α 破坏肠上皮屏障功能是通过改变TJ的结构和功能来实现的。Claude^[11]进



■同行评价

本研究选题结合临床, 设计合理, 结果对临床工作有一定指导。

图2 各组细胞的F-actin染色($\times 200$)。A: C组; B: TNF- α 3 h组; C: TNF- α 6 h组; D: TNF- α 12 h组; E: TNF- α 24 h组。

一步证明TJ的数量与TEER直接相关, 呈对数关系, 更加支持我们的结论: TNF- α 是通过actin重组来破坏Caco-2细胞紧密连接的完整性进而增加其通透性。那么什么信号参与了上述上皮细胞肌动蛋白微丝重组、通透性增加过程中的调控呢? Amarro等^[12,13]的研究认为活化的RhoA能够通过激活Rho激酶调控其下游肌球蛋白轻链磷酸化, 引起黏着斑和应力纤维形成, 调控F-actin的重构。Adam等^[14]指出豆蔻酸佛波酰乙酯-蛋白激酶C通路, 调控F-actin细胞骨架重构, 引起内皮细胞通透性增加。虽然目前相关信号途径研究甚多, 但具体调控机制尚不明确。NF- κ B是一种重要的细胞转录因子, 其活化可启动炎症相关基因的转录。有研究表明, NF- κ B活化与TNF- α 致肠上皮细胞屏障功能损害密切相关^[7], Banan等^[15]的研究认为NF- κ B的激活在酒精致肠道黏膜屏障完整性损害方面发挥作用, 并且该过程与F-actin解聚密切相关。Puthenedam等^[16]也指出NF- κ B是上皮细胞F-actin重构的重要调控分子。以上提示, NF- κ B活化是TNF- α 致肠上皮细胞F-actin重构的重要环节, 但对该问题的研究目前国内未见相关报道。

NF- κ B荧光素酶报告基因检测是将反应元件(κ B基序)构建到报告基因(荧光素酶)上, 通过荧光素酶分析试剂测定荧光素酶的活性来反映与 κ B基序相互作用的NF- κ B活性。该法可较好检测NF- κ B反式激活能力, 与目前国内大多数学

者采用的EMSA法相比更为快速、灵敏^[17-19]。本实验利用脂质体2000将含NF- κ B启动子和荧光素酶报告基因的质粒DNA转染入Caco-2细胞, 结合荧光酶报道基因系统, 检测各组细胞的NF- κ B活性变化。实验发现TNF- α 作用3 h后Caco-2细胞的NF- κ B活性开始增高, 12 h达高峰。提示, TNF- α 致NF- κ B活性增加与上皮细胞F-actin重构、细胞屏障功能改变密切相关。

总之, TNF- α 可损伤肠黏膜屏障, 导致细胞间通透性增加。其中actin重组及NF- κ B活化可能是其重要机制。对这个问题的进一步研究, 将有助于对IBD发病机制的深入了解。

4 参考文献

- 1 Shih DQ, Targan SR. Immunopathogenesis of inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 390-400
- 2 Yamamoto-Furusho JK. Genetic factors associated with the development of inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 5594-5597
- 3 Xia B, Crusius JBA, Meuwissen SGM, Pena AS. Inflammatory bowel disease: definition, epidemiology, etiologic aspects, and immunogenetic studies. *World J Gastroenterol* 1998; 4: 446-458
- 4 Rogler G, Andus T. Cytokines in inflammatory bowel disease. *World J Surg* 1998; 22: 382-389
- 5 Schmitz H, Fromm M, Bentzel CJ, Scholz P, Detjen K, Mankertz J, Bode H, Eppe HJ, Riecken EO, Schulzke JD. Tumor necrosis factor- α (TNF α) regulates the epithelial barrier in the human intestinal cell line HT-29/B6. *J Cell Sci* 1999; 112 (Pt 1): 137-146
- 6 Ma TY, Boivin MA, Ye D, Pedram A, Said HM.

- Mechanism of TNF- α modulation of Caco-2 intestinal epithelial tight junction barrier: role of myosin light-chain kinase protein expression. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2005; 288: G422-G430
- 7 Ma TY, Iwamoto GK, Hoa NT, Akotia V, Pedram A, Boivin MA, Said HM. TNF- α -induced increase in intestinal epithelial tight junction permeability requires NF- κ B activation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2004; 286: G367-G376
- 8 Suenaeert P, Bulteel V, Lemmens L, Noman M, Geypens B, Van Assche G, Geboes K, Ceuppens JL, Rutgeerts P. Anti-tumor necrosis factor treatment restores the gut barrier in Crohn's disease. *Am J Gastroenterol* 2002; 97: 2000-2004
- 9 Yang X, Sham JS, Ng MH, Tsao SW, Zhang D, Lowe SW, Cao L. LMP1 of Epstein-Barr virus induces proliferation of primary mouse embryonic fibroblasts and cooperatively transforms the cells with a p16-insensitive CDK4 oncogene. *J Virol* 2000; 74: 883-891
- 10 Gao J, Zhao WX, Zhou LJ, Zeng BX, Yao SL, Liu D, Chen ZQ. Protective effects of propofol on lipopolysaccharide-activated endothelial cell barrier dysfunction. *Inflamm Res* 2006; 55: 385-392
- 11 Claude P. Morphological factors influencing transepithelial permeability: a model for the resistance of the zonula occludens. *J Membr Biol* 1978; 39: 219-232
- 12 Amano M, Fukata Y, Kaibuchi K. Regulation and functions of Rho-associated kinase. *Exp Cell Res* 2000; 261: 44-51
- 13 Amano M, Chihara K, Kimura K, Fukata Y, Nakamura N, Matsuura Y, Kaibuchi K. Formation of actin stress fibers and focal adhesions enhanced by Rho-kinase. *Science* 1997; 275: 1308-1311
- 14 Adam LP, Hathaway DR. Identification of mitogen-activated protein kinase phosphorylation sequences in mammalian h-Caldesmon. *FEBS Lett* 1993; 322: 56-60
- 15 Banan A, Keshavarzian A, Zhang L, Shaikh M, Forsyth CB, Tang Y, Fields JZ. NF- κ B activation as a key mechanism in ethanol-induced disruption of the F-actin cytoskeleton and monolayer barrier integrity in intestinal epithelium. *Alcohol* 2007; 41: 447-460
- 16 Puthenedam M, Williams PH, Lakshmi BS, Balakrishnan A. Modulation of tight junction barrier function by outer membrane proteins of enteropathogenic Escherichia coli: role of F-actin and junctional adhesion molecule-1. *Cell Biol Int* 2007; 31: 836-844
- 17 Wickremasinghe MI, Thomas LH, Friedland JS. Pulmonary epithelial cells are a source of IL-8 in the response to Mycobacterium tuberculosis: essential role of IL-1 from infected monocytes in a NF- κ B-dependent network. *J Immunol* 1999; 163: 3936-3947
- 18 Fairchild KD, Singh IS, Patel S, Drysdale BE, Viscardi RM, Hester L, Lazusky HM, Hasday JD. Hypothermia prolongs activation of NF- κ B and augments generation of inflammatory cytokines. *Am J Physiol Cell Physiol* 2004; 287: C422-C431
- 19 Saatian B, Zhao Y, He D, Georas SN, Watkins T, Spannhake EW, Natarajan V. Transcriptional regulation of lysophosphatidic acid-induced interleukin-8 expression and secretion by p38 MAPK and JNK in human bronchial epithelial cells. *Biochem J* 2006; 393: 657-668

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

ISSN 1009-3079 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》按时完成2009年度出版任务

本刊讯 2009-12-28,《世界华人消化杂志》按时完成2009年1-36期的出版任务,出版各类文章774篇,全部经过同行专家评议。其中评论性文章158篇(20.41%),原创性文章237篇(30.62%),研究快报91篇(11.76%),临床经验253篇(32.69%),病例报告13篇(1.68%),会议纪要2篇(0.26%)。

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。

食管测压指导Nissen胃底折叠术31例

蒋菁梅, 于磊, 刘晶, 白伟, 杜彦丽

蒋菁梅, 于磊, 刘晶, 白伟, 杜彦丽, 首都医科大学附属北京同仁医院胸外科 北京市 100730

作者贡献分布: 蒋菁梅负责具体数据收集, 论文撰写; 于磊帮助指导工作和修改文章; 刘晶协调各项工作; 白伟与杜彦丽帮助收集资料。

通讯作者: 于磊, 副主任医师, 100730, 北京市, 首都医科大学附属北京同仁医院胸外科. yulei1118@sohu.com

收稿日期: 2009-11-08 修回日期: 2009-12-30

接受日期: 2010-01-04 在线出版日期: 2010-03-28

Value of intra- and postoperative manometry for Nissen fundoplication: an analysis of 31 cases

Jing-Mei Jiang, Lei Yu, Jing Liu, Wei Bai, Yan-Li Du

Jing-Mei Jiang, Lei Yu, Jing Liu, Wei Bai, Yan-Li Du, Department of Thoracic Surgery, Beijing Tongren Hospital, Capital University of Medical Sciences, Beijing 100730, China

Correspondence to: Lei Yu, Department of Thoracic Surgery, Beijing Tongren Hospital, Capital University of Medical Sciences, Beijing 100730, China. yulei1118@sohu.com

Received: 2009-11-08 Revised: 2009-12-30

Accepted: 2010-01-04 Published online: 2010-03-28

Abstract

AIM: To evaluate the value of measurement of lower esophageal sphincter pressure (LESP) and lower esophageal sphincter length (LESL) for Nissen fundoplication (NF).

METHODS: Thirty-one patients with sliding hiatus hernia who underwent transabdominal surgery and intraoperative esophageal manometry from 2003 to 2007 were included. All the patients were followed up and subjected to manometry.

RESULTS: During the procedure, the technician generally manipulated the probe several times and made sure that LESP would rise by 10-12 mmHg and LESL by 1.0-1.5 cm. During more than 2 years of follow-up, the effective rate was 96.5%. Only one patient had acid reflux during 24-h pH monitoring.

CONCLUSION: If intraoperative esophageal manometry is performed during antireflux operation, side effects can be decreased to the least.

Intraoperative manometry is useful in standardizing the tightness of the wrap in NF and in reducing or avoiding the occurrence of complications.

Key Words: Fundoplication; Intraoperative esophageal manometry; Outcome

Jiang JM, Yu L, Liu J, Bai W, Du YL. Value of intra- and postoperative manometry for Nissen fundoplication: an analysis of 31 cases. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(9): 947-949

摘要

目的: 评价食管下括约肌压力(LESP)、食管下括约肌总长度(LESL)在Nissen胃底折叠术中的监测价值。

方法: 2003-2007年利用食管测压指导短松式Nissen手术治疗滑动型食管裂孔疝31例。采用台式高分辨八通道胃肠动力监测系统液导法测定。对患者术前、术中及术后LESP和LESL、术后并发症、手术远期疗效等进行观察记录。

结果: 术中LESP较术前升高10-12 mmHg。LESL较术前长1-1.5 cm。术后随访2年以上, 手术有效率96.5%。全组仅1例24 h pH监测有明显酸反流, 但无症状。

结论: 通过抗反流手术加术中测压, 能够更准确判断胃底折叠缝合的松紧程度, 有利于避免或减少术后并发症。

关键词: 胃底折叠术; 术中测压; 术后疗效

蒋菁梅, 于磊, 刘晶, 白伟, 杜彦丽. 食管测压指导Nissen胃底折叠术31例. *世界华人消化杂志* 2010; 18(9): 947-949

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/947.asp>

0 引言

近年来, 反流性食管炎、食管裂孔疝等食管下段疾病的发病率呈上升趋势。经药物治疗, 多数患者症状得到缓解, 部分严重患者往往需要手术治疗。尤其近些年, 人们生活质量的提高和手

■背景资料

食管裂孔疝发病与食管下括约肌压力和长度异常有一定关系, 手术治疗效果与胃底折叠松紧程度以及食管裂孔修补情况有直接关系。

■同行评议者

李玉民, 教授, 兰州大学第一医院普外科

■研发前沿

一直以来术者手术中基本上凭借经验判断胃底折叠缝合以及食管裂孔修补的松紧程度,这往往是不够的,不能完全避免术后反流和吞咽困难等并发症的发生。

术微创化,越来越多保守治疗效果不理想的患者希望用手术的方式解除痛苦。治疗这些疾病的胃底折叠手术步骤并不繁琐,但这些手术操作过程中胃底折叠松紧程度很难精确掌握,往往引起一定的术后并发症^[1-3]。其常见并发症有反流性食管炎、术后吞咽困难、食管黏膜穿孔、食管下段黏膜憩室和食管裂孔疝等,其中术后反流性食管炎和吞咽困难最常见,且发生率较高。为更好解决这些技术难点,我科经过长期摸索,将食管测压应用到手术中,制定食管下段良性疾病手术中食管下括约肌压力和长度监测标准,以改进手术技术,保证手术效果,减少术后并发症。

1 材料和方法

1.1 材料 2003-2007年我科利用术中食管测压指导短松式Nissen手术治疗滑动型食管裂孔疝31例(13例为腹腔镜手术,18例为上腹正中切口),其中男17例,女14例;年龄31-73(中位年龄47)岁,术前病程6 mo-9年。此组患者均经内科正规治疗6-12 mo,效果不佳后选择手术治疗。患者术前均有程度不同的胃食管反流症状,经X线对比剂造影及胃镜诊断,并通过24 h pH监测、食管测压对胃食管反流症状进行定性定量分析诊断和术前病情评估,以协助明确食管裂孔疝的大小、酸反流的程度、食管黏膜的损害程度、食管下括约肌功能及食管体蠕动功能等。用便携式24 h pH自动记录仪(Digitrapper MK III型,瑞典)在常态下作24 h食管内pH监测。检查前停用抑酸药物。此研究得到首都医科大学附属北京同仁医院科教处的同意,患者在术前知情术后可能的危险,并在知情同意书上签字。

1.2 方法

1.2.1 术中食管测压:采用台式高分辨八通道胃肠动力监测系统(PC Polygraf HR, CTD Synectics, 瑞典)液导法测定。导管外径3.5 mm,内径0.8 mm,管长190 cm,末端封闭,并分别在距末端3、6、9、12 cm每隔90度处有1小孔,孔径0.5 mm,水灌注速度为0.5 mL/min。检查前禁食4 h。检查时患者平卧位,压力换能器置于腋中线水平,赶净导管内气泡,定标后将导管由鼻腔插入直至第4个通道到达胃内,用缓慢定点牵拉法将导管从胃内向外每隔0.5 cm拔出1次,电脑连续记录每一通道的压力变化。采用定点牵拉法分别检测受检者食管下括约肌压力(lower esophageal sphincter pressure, LESP)、食管下括

约肌总长度(lower esophageal sphincter length, LESL)。

术前晨起放置测压管,术中开腹后测量LESP和LESL。在胃底折叠360度之后再次测量,LESP出现明显升高。之后,依据测压结果调整胃底折叠的程度。一般情况下,术中LESP较术前升高10-12 mmHg。最后通过确定第二针位置调节LESL。LESL较术前长1-1.5 cm。

1.2.2 术后注意事项:术后避免有可能引起腹压升高因素,保持合理体质量,适当进行功能锻炼。停止吸烟和酗酒。术后一段时期内应用抑酸药物,直至术后1-2 mo复查胃镜和24 h食管pH监测后,根据对胃食管反流控制的程度不同决定是否继续服药。

1.2.3 术后随访:对患者术后症状、体征、手术方式、术后并发症、手术远期疗效等进行了记录。然后,通过患者复查电话追踪及通信等进行随访。

2 结果

术后2 wk复查食管测压。术后LESP较术中降低10%-15%,术后LESP基本稳定在15-22 mmHg;术后1-2 mo和2年复查胃镜、食管测压和24 h食管pH监测,对胃底折叠手术手术效果进行定性定量分析,同时对食管下括约肌功能和食管体收缩功能的变化进行判定。

术后随访2年以上,随访到的28例患者,随访率90.3%,随访期26-46 mo。随访患者中优26例(93%);良1例(3.5%,此患者24 h pH监测显示有酸反流,但无明显临床症状);欠佳1例(3.5%,自诉有轻度吞咽不适);差0例。手术有效率96.5%。X线造影和胃镜下未见食管下段狭窄和复发,1例患者自诉有轻度吞咽不适,1例24 h pH监测显示有酸反流,但无明显临床症状。

3 讨论

一直以来术者手术中基本上凭借经验判断胃底折叠缝合以及食管裂孔修补的松紧程度,这往往是不够的,不能完全避免术后反流和吞咽困难等并发症的发生。有学者为解决此问题,术中应用46-50 F Maloney探条或宫颈探条,以防止胃底折叠缝合过紧而造成术后患者吞咽困难的,但效果并不理想。

我院采用短松式Nissen手术中加食管测压治疗滑动型食管裂孔疝31例,即置食管内的测压装置,手术中根据LESP、LESL的监测结果^[4],

■创新盘点

经过长期摸索,本课题组先后将术中食管测压应用于抗反流手术和食管裂孔疝修补术,取得非常理想疗效,保证了手术效果,减少了术后并发症。

决定胃底折叠缝合的松紧程度. 国外曾有人将此项技术应用于贲门失迟缓症中, 通过测定食管下括约肌压力的变化, 判断食管贲门肌层切开的程度^[5-8]. 在抗反流手术中也有报道, 主要在Hill手术和Collis手术中食管内测压, 确定缝合狭窄的程度. 但在这些手术中却忽视LES监测的重要性^[9,10].

我们采用台式高分辨八通道胃肠动力监测系统液导法测定, 抗反流手术中在调节LESP同时要考虑LES. 通过术中监测LESP和LES, 术中评估胃底折叠程度. 而术后通过对短松式Nissen手术后LESP、LES的检测和术后随访, 为提高短松式Nissen手术技术提供了有用的反馈信息. 本组手术有效率96.5%, 仅1例24 h pH监测显示有酸反流, 但无明显临床症状. 较之以往我们报道的典型Nissen手术的14.3%和短松式Nissen手术的11.7%有改善^[11].

国外研究中有术中LESP低于18.2 mmHg患者病情复发的报道. 本研究术中测压组中5例患者术中LESP低于此数值, 未复发, 唯一1例术后24 h pH监测显示酸反流的患者为术中LESP最低的15.2 mmHg, 但此患者未出现明显术后反酸、恶心或吞咽困难; 术中LESP最高达到什么程度术后能出现吞咽困难, 尚无确切标准. 在一国外研究中2例患者尽管术中LESP不是最高的, 但术后仍出现吞咽困难, 他们认为更重要的是此2例患者术中LESP分别是术前的7.5和8.2倍, 这明显大于非吞咽困难患者术中LESP的升高(2.0-4.6倍)^[12]. 所以, 在本研究手术中胃底折叠时LESP较术前升高10-12 mmHg, 术后LESP基本稳定在15-22 mmHg, 以此避免因LESP过度升高引起术后吞咽困难的可能.

总之, 在Nissen手术基础上加术中食管测压, 根据术中所测LESP、LES, 判断胃折叠缝合的松紧程度, 将更有利于保证手术效果, 减少术后并发症.

4 参考文献

- 1 Stipa S, Fegiz G, Iascone C, Paolini A, Moraldi A, de Marchi C, Chieco PA. Belsey and Nissen operations

- for gastroesophageal reflux. *Ann Surg* 1989; 210: 583-589
- 2 Braghetto I, Csendes A, Burdiles P, Botero F, Korn O. Results of surgical treatment for recurrent postoperative gastroesophageal reflux. *Dis Esophagus* 2002; 15: 315-322
- 3 Bais JE, Bartelsman JF, Bonjer HJ, Cuesta MA, Go PM, Klinkenberg-Knol EC, van Lanschot JJ, Nadorp JH, Smout AJ, van der Graaf Y, Gooszen HG. Laparoscopic or conventional Nissen fundoplication for gastro-oesophageal reflux disease: randomised clinical trial. The Netherlands Antireflux Surgery Study Group. *Lancet* 2000; 355: 170-174
- 4 Stein HJ, Barlow AP, DeMeester TR, Hinder RA. Complications of gastroesophageal reflux disease. Role of the lower esophageal sphincter, esophageal acid and acid/alkaline exposure, and duodenogastric reflux. *Ann Surg* 1992; 216: 35-43
- 5 Gozzetti G, Mattioli S, Di Simone MP, Felice V, Pilotti V, Lazzari A, Raspadori A. [Intraoperative esophageal manometry] *Minerva Chir* 1991; 46: 195-200
- 6 Clemente G, D'Ugo D, Granone P, Nuzzo G, Picciocchi A. Intraoperative esophageal manometry in surgical treatment of achalasia: a reappraisal. *Hepatogastroenterology* 1996; 43: 1532-1536
- 7 Ott DJ, Glauser SJ, Ledbetter MS, Chen MY, Koufman JA, Gelfand DW. Association of hiatal hernia and gastroesophageal reflux: correlation between presence and size of hiatal hernia and 24-hour pH monitoring of the esophagus. *AJR Am J Roentgenol* 1995; 165: 557-559
- 8 Hananoki M, Haruma K, Tsuga K, Hata J, Sumii K, Kajiyama G. Evaluation of lower oesophageal sphincter pressure using endoscopic manometric sleeve assembly. *J Gastroenterol Hepatol* 2000; 15: 121-126
- 9 Fein M, Ritter MP, DeMeester TR, Oberg S, Peters JH, Hagen JA, Bremner CG. Role of the lower esophageal sphincter and hiatal hernia in the pathogenesis of gastroesophageal reflux disease. *J Gastrointest Surg* 1999; 3: 405-410
- 10 Sontag SJ, Schnell TG, Miller TQ, Nemchausky B, Serlovsky R, O'Connell S, Chejfec G, Seidel UJ, Brand L. The importance of hiatal hernia in reflux esophagitis compared with lower esophageal sphincter pressure or smoking. *J Clin Gastroenterol* 1991; 13: 628-643
- 11 Lei Y, Li JY, Jiang J, Wang J, Zhang QY, Wang TY, Krasna MJ. Outcome of floppy Nissen fundoplication with intraoperative manometry to treat sliding hiatal hernia. *Dis Esophagus* 2008; 21: 364-369
- 12 Slim K, Boulant J, Pezet D, Lechner C, Pelissier E, Delasalle P, Bommelaer G, Chipponi J. Intraoperative esophageal manometry and funduplications: prospective study. *World J Surg* 1996; 20: 55-58; discussion 59

■同行评价

本文对于临床工作有一定的指导意义.

编辑 李军亮 电编 何基才

内镜治疗肝外胆管良性狭窄29例

宫爱霞, 马 静, 葛林梅, 冷 敬, 郭世斌, 孙 康, 孙 颖

■背景资料

一直以来, 外科手术被认为是主要的治疗手段, 近年来随着内镜下逆行胰胆管造影技术的日趋完善及配件开发水平的日益提高, 使内镜下治疗成为一个有效选择。

宫爱霞, 马静, 葛林梅, 冷敬, 郭世斌, 孙康, 孙颖, 大连医科大学附属第一医院消化科 辽宁省大连市 116011

作者贡献分布: 此课题由宫爱霞设计; 研究过程由宫爱霞、马静、葛林梅、冷敬及郭世斌操作完成; 数据分析由宫爱霞完成; 本论文写作由宫爱霞、孙康及孙颖完成。

通讯作者: 宫爱霞, 教授, 116011, 辽宁省大连市, 大连医科大学附属第一医院消化科. gong0825@yahoo.com.cn

电话: 0411-83635963-3296

收稿日期: 2010-01-06 修回日期: 2010-02-05

接受日期: 2010-02-09 在线出版日期: 2010-03-28

Duodenoscopic treatment of benign extrahepatic biliary stricture: an analysis of 29 cases

Ai-Xia Gong, Jing Ma, Lin-Mei Ge, Jing Leng, Shi-Bin Guo, Kang Sun, Ying Sun

Ai-Xia Gong, Jing Ma, Lin-Mei Ge, Jing Leng, Shi-Bin Guo, Kang Sun, Ying Sun, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Dalian Medical University, Dalian 116011, Liaoning Province, China

Correspondence to: Professor Ai-Xia Gong, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Dalian Medical University, Dalian 116011, Liaoning Province, China. gong0825@yahoo.com.cn

Received: 2010-01-06 Revised: 2010-02-05

Accepted: 2010-02-09 Published online: 2010-03-28

Abstract

AIM: To evaluate the efficacy of duodenoscopic treatment for benign extrahepatic biliary stricture.

METHODS: The clinical data for 29 patients, who were hospitalized due to obstructive jaundice and diagnosed as benign extrahepatic biliary stricture based on computed tomography (CT) or magnetic resonance imaging (MRI) findings, laboratory test results and medical history, were analyzed retrospectively. Extrahepatic biliary strictures were graded from type 1 to type 3 according to the Bismuth classification. The efficacy of endoscopic sphincterotomy (EST) or endoscopic retrograde biliary drainage (ERBD) in these patients was evaluated.

RESULTS: Twenty-nine patients underwent EST or ERBD, and the response rate was 96.55%.

Of 28 patients followed up, 4 were cured after EST and showed no recurrence, and 24 underwent ERBD, of which 8 showed recurrence in half a year, 8 developed biliary restenosis (of which 4 had chronic pancreatitis, and 2 underwent previous resection of the gallbladder), and 8 showed a good response (of which 5 underwent placement of a single stent).

CONCLUSION: Duodenoscopic treatment of benign extrahepatic biliary stricture is safe and effective. The efficacy of duodenoscopic treatment for benign extrahepatic biliary stricture is associated with the cause and site of strictures. Long-term placement of multiple stents can reduce the occurrence of biliary restenosis after surgery.

Key Words: Benign extrahepatic biliary stricture; Duodenoscopic treatment; Obstructive jaundice; Endoscopic retrograde biliary drainage

Gong AX, Ma J, Ge LM, Leng J, Guo SB, Sun K, Sun Y. Duodenoscopic treatment of benign extrahepatic biliary stricture: an analysis of 29 cases. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(9): 950-953

摘要

目的: 探讨内镜在肝外胆管良性狭窄治疗中的作用。

方法: 回顾性分析29例因梗阻性黄疸入院, 均经CT或MRI及实验室检查及其病史确诊为胆管良性狭窄患者临床资料。将肝外胆管狭窄分类比照Bismuth标准分为3型, 并评价患者行十二指肠镜乳头肌切开术(EST)或行胆管内支架引流术(ERBD)的治疗效果。

结果: 29例患者经EST或ERBD治疗, 有效率为96.55%。随访患者28例, 其中行EST治疗4例, 均未复发; 放置ERBD 24例, 8例6 mo内复发、8例再狭窄患者中4例为慢性胰腺炎, 2例为有胆囊切除史者, 占该组11.11%(2/18); 其余8例中5例为单支架置入者。

结论: 肝外胆管良性狭窄的内镜下治疗安全有效, 其治疗效果与狭窄的病因和部位有关;

■同行评议者

陈积圣, 教授, 中山大学孙逸仙纪念医院肝胆外科

狭窄部位长时间、多支架置入,可以减少术后再狭窄率。

关键词: 肝外胆管良性狭窄; 内镜治疗; 梗阻性黄疸; 胆管内支架引流术

宫爱霞, 马静, 葛林梅, 冷敬, 郭世斌, 孙康, 孙颖. 内镜治疗肝外胆管良性狭窄29例. 世界华人消化杂志 2010; 18(9): 950-953
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/950.asp>

0 引言

肝外胆管良性狭窄在胆道疾病中比较常见,其病因相对广泛。该病的治疗,对外科医生和内镜医生都是一个挑战。一直以来,外科手术被认为是主要的治疗手段,近年来随着内镜下逆行胰胆管造影(endoscopic retrograde cholangiopancreatography, ERCP)技术的日趋完善及配件开发水平的日益提高,使内镜下治疗成为一个有效选择。现将我院2005-03/2008-02肝外胆管良性狭窄29例患者的治疗情况进行回顾性分析,以探讨内镜在肝外胆管良性狭窄治疗中的作用。

1 材料和方法

1.1 材料 本组患者29例,男12例,女17例,年龄26-75(平均60.2)岁;所有患者均因梗阻性黄疸入院,其中10例伴发热、8例伴腹痛;有胆囊切除史18例、慢性胰腺炎7例、硬化性胆管炎1例、先天性胆总管囊肿1例,2例原因不明,反复黄疸发作;所有患者行CT或MRI影像学检查,结合实验室及其病史,均诊断为胆管良性狭窄。

1.2 方法

1.2.1 狭窄分类 比照Bismuth标准:对肝外胆管狭窄分为3型: I型:距肝总管起始部向远端>2 cm; II型:距肝总管起始部向远端<2 cm。III型:左右肝管汇合部^[1]。

1.2.2 术式选择及手术步骤: 29例患者均按ERCP常规准备,采用PANTEX3840型十二指肠镜, BOSTON切开刀、7 Fr、8.5 Fr胆道内引流管、0.35 mm及0.25 mm黄斑马导丝及逐级扩张探条(6-9 Fr);常规方法进行选择性胆管内插管造影,根据狭窄部位及长度行经十二指肠镜乳头肌切开术(endoscopic sphincterotomy, EST)或行胆管内支架引流术(endoscopic retrograde biliary drainage, ERBD)治疗。对I型狭窄,狭窄位于胆总管末端,长度<1.0 cm者,选择EST治疗;其余狭窄类型选择ERBD治疗;留置ERBD管之前,均行探条逐级扩张,根据扩张的直径大小及难易

程度选择内引流管的直径及根数。

1.2.3 术后处理: 应用广谱抗生素2 d,术后6、24 h查血淀粉酶,如果淀粉酶升高,予抑酸药及抑制胰腺分泌的药物,定期复查血淀粉酶,直至正常为止,并注意观察有无发热、腹痛、黄疸加重等情况。

1.2.4 术后随访: 术后1 wk观察患者黄疸改善情况。对1 wk内黄疸下降50%以上,无其他临床伴随症状者,门诊随访,每3 mo复查肝脏生化学指标;1 wk内黄疸下降低于50%,无其他临床伴随症状者,15 d后复查肝脏生化学指标,如黄疸继续下降,以后每3 mo复查;1 wk内黄疸下降不明显或伴有胆管炎表现者,拔除内引流管。

1.2.5 支架更换: 如出现梗阻征象,随时更换内引流管;无梗阻征象者,勿需更换,12 mo后拔除内引流管。

2 结果

2.1 狭窄分类 29例患者中,7例I型狭窄、21例II型狭窄、1例III型狭窄,为硬化性胆管炎患者。

2.2 手术及支架更换 所有患者中4例行EST治疗,25例行ERBD治疗。25例ERBD治疗中,10例患者放置2根7 Fr内引流管,15例放置1根8.5 Fr或7 Fr内引流管;仅1例硬化性胆管炎患者因黄疸下降不明显,并出现发热、白细胞升高,术后1 wk拔除内引流管;10例勿需更换内引流管直至12 mo后拔除,均为置入双支架者;14例单支架置入者,平均内引流通畅期4.2 mo,至12mo拔管时每例需更换内支架2.3个。

2.3 随访结果 28例患者至今随访时间为10-30 mo,4例行EST治疗者均未见复发,24例放置ERBD者,8例半年内再发梗阻性黄疸,再次置入ERBD管;8例再狭窄患者中4例为慢性胰腺炎,占慢性胰腺炎57.14%(4/7),2例为有胆囊切除史者,占该组11.11%(2/18);其余8例中5例为单支架置入者。本组29例患者术后1例发生胆管炎、1例发生术后胰腺炎、2例出现高淀粉酶血症,均经内科治疗痊愈。

3 讨论

肝外胆管良性狭窄可由多种病因所致,如:手术后损伤、吻合口狭窄及慢性胰腺炎等,少见病因则有Mirizzi综合征、寄生虫感染、血管畸形等^[2]。一项回顾性研究在分析了1992-1999年间160万行胆囊切除术的患者后,发现其胆管狭窄的发生率在0.5%左右^[3]。Kassab等^[4]报道开腹胆

■ 研究前沿

肝外胆管良性狭窄在胆道疾病中比较常见,其病因相对广泛。该病的治疗,对外科医生和内镜医生都是一个挑战。

■应用要点

肝外胆管良性狭窄的内镜下治疗安全有效,且其侵袭性低、耐受性好、可重复性强,应成为治疗肝外胆管良性狭窄的重要手段。

囊切除术后胆管狭窄发生率为0.2%-0.5%,腹腔镜胆囊切除术后胆管狭窄的发生率为0%-2.7%。尽管腹腔镜切除率在增加,但胆管狭窄的发生率并未下降。本组患者有胆囊切除史18例,占62.10%,其次为慢性胰腺炎占21.14%,也是目前临床最常见的两大病因。

良性胆管狭窄的诊断对于胆囊切除术后的患者,往往仅凭临床症状及实验室的证据,就可诊断。但对于病情复杂或没有相关手术史的患者,如慢性胰腺炎,诊断良性狭窄则较为复杂,临床多采用CT、核磁共振(MRI)、ERCP结合临床症状及病程演变做出诊断。狭窄部位的胆道细胞刷刷检,对恶性胆道狭窄的诊断有良好效果,特异性达100%,敏感性达60%左右^[5,6]。近年来Siddiqui等^[7]采用液基细胞学方法诊断恶性胆管狭窄,其敏感性可达77%。但细胞学检查仅限于鉴别诊断恶性胆道狭窄,对于刷检阴性的病例仍不能做出良性胆道狭窄的诊断。本组7例慢性胰腺炎,仅2例行胆道刷检,结果为阴性,最终所有病例仍依靠临床及影像学做出诊断。

目前,对于良性胆管狭窄的治疗包括外科手术治疗和内镜下治疗。内镜下治疗主要包括EST、狭窄球囊扩张、内支架置入等方法。而最为常用的为内支架置入术,近年来多支架的置入术取得了可喜的效果^[8]。

从狭窄部位看,越接近乳头侧狭窄,治疗效果越好,尤其接近乳头侧、狭窄长度<1.0 cm者,EST治疗疗效良好。本组4例该类型狭窄,经EST治疗后,无1例复发;1例Bismuth III型狭窄支架治疗失败。而本组96.55%(28/29)为Bismuth I、II型患者,内镜治疗的有效率100%,复发率28.57%(8/28)。

从狭窄的病因看,有胆囊切除史者所致狭窄内镜治疗效果优于慢性胰腺炎者。慢性胰腺炎约占良性胆道狭窄的10%,内镜治疗结果令人失望,最近Sakai等^[9]报道慢性胰腺炎造成的胆管狭窄患者的内镜支架治疗成功率只有7.7%。本组患者置入ERBD管一年后拔除ERBD管,慢性胰腺炎再狭窄率达57.14%,而手术损伤组仅为11.11%。

对ERBD管治疗良性肝外狭窄者,究竟需要保留多久、多长时间换管至今无统一标准。多数研究认为,需保留12 mo,至少也需6 mo,通常3-6 mo应更换ERBD管。有学者研究发现,如果12 mo中未更换ERBD管,发生阻塞导致黄疸或胆管炎的比例可高达70%^[10],但是也有学者认为,只

要不出现梗阻症状,ERBD管可以不用更换^[11]。为了尽量减少ERBD术后再狭窄的发生率,本组病例ERBD管留置时间均为12 mo。从目前我国国情及减少患者经济负担角度考虑,只有在患者出现再梗阻征象时,我们才考虑更换ERBD管,此举并未引发病情加重,且更换ERBD管后,梗阻很快缓解。

对本组资料的回顾性分析发现,双支架置入和单支架置入在支架通畅期及内镜治疗后再狭窄方面有明显差异。双支架置入者留置12 mo内,无1例发生再梗阻,而单支架置入者无论7 Fr或8.5 Fr均出现再梗阻,需多次更换支架,平均更换2.3根。有研究证明,单根支架治疗良性胆管狭窄的术后再狭窄率和手术无明显差异。尤其是慢性胰腺炎所致胆管狭窄,支架取出后的再狭窄率高达72%-90%^[12],本组资料也表明,慢性胰腺炎内镜治疗后再狭窄率较高。而一些学者通过临床研究发现,在胆管狭窄处放置多个支架可以大大减少再狭窄率^[13,14]。近年来随着金属支架和可吸收生物支架的开发和应用,一些学者正在研究其用于治疗胆道良性狭窄患者的可能性,以降低再狭窄的发生率^[8,15]。

总之,我们认为,肝外胆管良性狭窄的内镜下治疗安全有效,且其侵袭性低、耐受性好、可重复性强,应成为治疗肝外胆管良性狭窄的重要手段;内镜的治疗效果与狭窄病因和部位有关;狭窄部位长时间、多支架的置入,可以减少术后再狭窄率。但对不同部位、病因的肝外胆管良性狭窄,究竟应放置几根支架、多长时间为宜,还应做细致分类、大样本临床观察研究。

4 参考文献

- 1 Bismuth H, Corlette MB. Intrahepatic cholangioenteric anastomosis in carcinoma of the hilus of the liver. *Surg Gynecol Obstet* 1975; 140: 170-178
- 2 Laasch HU, Martin DF. Management of benign biliary strictures. *Cardiovasc Intervent Radiol* 2002; 25: 457-466
- 3 Kassab C, Prat F, Liguory C, Meduri B, Ducot B, Fritsch J, Choury AD, Pelletier G. Endoscopic management of post-laparoscopic cholecystectomy biliary strictures. Long-term outcome in a multicenter study. *Gastroenterol Clin Biol* 2006; 30: 124-129
- 4 Vitale GC, Tran TC, Davis BR, Vitale M, Vitale D, Larson G. Endoscopic management of postcholecystectomy bile duct strictures. *J Am Coll Surg* 2008; 206: 918-923; discussion 924-925
- 5 Trent V, Khurana KK, Pisharodi LR. Diagnostic accuracy and clinical utility of endoscopic bile duct brushing in the evaluation of biliary strictures. *Arch Pathol Lab Med* 1999; 123: 712-715
- 6 Ponchon T, Gagnon P, Berger F, Labadie M, Liaras A, Chavaillon A, Bory R. Value of endobiliary

- brush cytology and biopsies for the diagnosis of malignant bile duct stenosis: results of a prospective study. *Gastrointest Endosc* 1995; 42: 565-572
- 7 Siddiqui MT, Gokaslan ST, Saboorian MH, Carrick K, Ashfaq R. Comparison of ThinPrep and conventional smears in detecting carcinoma in bile duct brushings. *Cancer* 2003; 99: 205-210
- 8 Judah JR, Draganov PV. Endoscopic therapy of benign biliary strictures. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 3531-3539
- 9 Sakai Y, Tsuyuguchi T, Ishihara T, Yukisawa S, Sugiyama H, Miyakawa K, Kuroda Y, Yamaguchi T, Ozawa S, Yokosuka O. Long-term prognosis of patients with endoscopically treated postoperative bile duct stricture and bile duct stricture due to chronic pancreatitis. *J Gastroenterol Hepatol* 2009; 24: 1191-1197
- 10 Bergman JJ, Burgemeister L, Bruno MJ, Rauws EA, Gouma DJ, Tytgat GN, Huibregtse K. Long-term follow-up after biliary stent placement for postoperative bile duct stenosis. *Gastrointest Endosc* 2001; 54: 154-161
- 11 De Masi E, Fiori E, Lamazza A, Ansali A, Monardo F, Lutz SE, Recchioni G. Endoscopy in the treatment of benign biliary strictures. *Ital J Gastroenterol Hepatol* 1998; 30: 91-95
- 12 Matlock J, Freeman ML. Endoscopic therapy of benign biliary strictures. *Rev Gastroenterol Disord* 2005; 5: 206-214
- 13 Costamagna G, Pandolfi M, Mutignani M, Spada C, Perri V. Long-term results of endoscopic management of postoperative bile duct strictures with increasing numbers of stents. *Gastrointest Endosc* 2001; 54: 162-168
- 14 Catalano MF, Linder JD, George S, Alcocer E, Geenen JE. Treatment of symptomatic distal common bile duct stenosis secondary to chronic pancreatitis: comparison of single vs. multiple simultaneous stents. *Gastrointest Endosc* 2004; 60: 945-952
- 15 Ginsberg G, Cope C, Shah J, Martin T, Carty A, Habecker P, Kaufmann C, Clerc C, Nuutinen JP, Törmälä P. In vivo evaluation of a new bioabsorbable self-expanding biliary stent. *Gastrointest Endosc* 2003; 58: 777-784

■同行评价

本研究选题良好,方法先进,有较好的临床参考价值。

编辑 李瑞敏 电编 吴鹏朕

ISSN 1009-3079 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》名词术语标准

本刊讯 本刊名词术语一律标准化,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。

直肠血管肉瘤1例

冯向东, 张红凯

■背景资料

胃肠道血管肉瘤是一种极为少见的肿瘤, 直结肠血管肉瘤更为罕见, 临床表现无特异性。一般发现时临床易误诊为癌。在病理检查过程中当镜下形态呈上皮样时也易与低分化癌及恶性黑色素瘤混淆。本文旨在探讨胃肠道上皮样血管肉瘤的临床病理学特点及鉴别诊断要点。

冯向东, 张红凯, 首都医科大学附属复兴医院病理科 北京市 100038

作者贡献分布: 冯向东与张红凯共同设计此课题; 论文写作由冯向东完成。

通讯作者: 张红凯, 主治医师, 100038, 北京市, 首都医科大学附属复兴医院病理科. zhk0484@sina.com.cn

电话: 010-88062019 传真: 010-88062019

收稿日期: 2009-11-13 修回日期: 2009-12-26

接受日期: 2010-01-11 在线出版日期: 2010-03-28

Clinical and pathological features of angiosarcoma of the rectum: a report of one case

Xiang-Dong Feng, Hong-Kai Zhang

Xiang-Dong Feng, Hong-Kai Zhang, Department of Pathology, Fu Xing Hospital, Capital Medical University, Beijing 100038, China

Correspondence to: Hong-Kai Zhang, Department of Pathology, Fu Xing Hospital, Capital Medical University, Beijing 100038, China. zhk0484@sina.com.cn

Received: 2009-11-13 Revised: 2009-12-26

Accepted: 2010-01-11 Published online: 2010-03-28

Abstract

AIM: To describe the clinical and pathological features of angiosarcoma of the rectum and to explore the differential diagnosis, treatment and prognosis of the disease.

METHODS: The typical histomorphological features of angiosarcoma of the rectum were observed under a light microscope. The diagnosis was confirmed by immunohistochemistry. Considering that angiosarcoma involving the rectum is quite rare, we reviewed the related literature and gave a detailed description of the disease.

RESULTS: Swelling of the lymph nodes was the first clinical manifestation of angiosarcoma of the rectum. Postoperative examination showed that it was a grey-brown nodular tumor in the rectum. The characteristic histological appearance of the lesions featuring angiosarcoma of the rectum was irregular neoplastic vascular channels that intercommunicate with each other in a sinusoidal fashion. Angiosarcoma cells were immunohistochemically positive for CD31 and

vimentin.

CONCLUSION: Angiosarcoma of the rectum is a rare type of malignant tumor with very poor prognosis and high metastatic rate. It should be differentiated from melanoma or carcinoma involving the same region.

Key Words: Angiosarcoma; Gastrointestinal tract; Pathology; Differential diagnosis; Immunohistochemistry

Feng XD, Zhang HK. Clinical and pathological features of angiosarcoma of the rectum: a report of one case. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(9): 954-957

摘要

目的: 探讨胃肠道血管肉瘤的临床病理特征及鉴别诊断及治疗预后。

方法: 在光学显微镜下对直肠血管肉瘤进行组织形态学观察, 并借助免疫组织化学进一步对血管肉瘤的特点进行分析。由于累及直肠的血管肉瘤极为罕见, 本研究对相关的文献资料进行回顾分析与总结。

结果: 累及直肠的血管肉瘤可以首先累及外膜或者先侵犯直肠黏膜。大体上为灰褐色结节状, 伴有广泛的出血坏死, 切面呈多彩状; 显微镜下组织学表现为肿瘤细胞弥漫分布, 形成大小不等互相吻合的管腔, 免疫组织化学显示肿瘤细胞表达CD31和Vimentin等血管和间叶分化。肿瘤高度恶性。本例患者术后5 mo死亡。

结论: 血管肉瘤, 特别是深部软组织及胃肠道的血管肉瘤, 具有高度侵袭性并且快速转移, 预后很差。在临床病理实践中, 必须首先与常见的发生于该部位恶性肿瘤如癌, 恶性黑色素瘤鉴别。

关键词: 血管肉瘤; 胃肠道; 病理学; 鉴别诊断; 免疫组织化学

冯向东, 张红凯. 直肠血管肉瘤1例. *世界华人消化杂志* 2010; 18(9): 954-957

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/954.asp>

■同行评议者

刘占举, 教授, 同济大学附属第十人民医院胃肠内科

0 引言

血管肉瘤是一种来自血管内皮细胞的特殊的恶性肿瘤, 占所有肉瘤的比例不足1%, 而且大多发生于皮肤及深部软组织^[1,2]。胃肠道原发性及转移性血管肉瘤非常罕见, 表现为上皮样的形态并且常是多中心性, 应与低分化癌、上皮样血管内皮瘤、恶性黑色素瘤及上皮样肉瘤等鉴别。

1 材料和方法

1.1 材料 患者1例, 男, 44岁, 因左腹股沟淋巴结肿大1 wk入院。查体: 双侧腹股沟触及多个肿大淋巴结, 左侧大者1.5 cm×1 cm, 边界清, 质硬, 活动性差; 实验室检查: Hb 5 g/dL。取左腹股沟淋巴结活检, 诊断为恶性肿瘤, 考虑为转移性; 腹部增强CT检查: 直肠中段可见不规则软组织肿块影, 大小4 cm×4.1 cm, 向腔外生长明显, 与骶骨前软组织分界不清, 腹、盆腔内多发肿大淋巴结; 肛门指诊: 距肛门8 cm, 左侧11-12点之间位置可触及一直肠壁外肿物, 质软, 活动度差, 指套无染血; 结肠镜检查: 直肠结肠黏膜光滑, 无充血糜烂、溃疡及异常隆起, 血管影清晰, 直肠距肛门8-10 cm黏膜轻度水肿。结合盆腔CT、结肠镜检查, 考虑: 淋巴瘤、平滑肌肉瘤、直肠癌, 遂行直肠切除术、肠粘连松解术, 术中见肿物距肛门约6 cm, 生长于直肠右后壁, 大小约5 cm×5 cm×4 cm, 表面血供丰富, 肿瘤内密布血窦样组织, 似海绵状, 含部分坏死组织。患者术后行CHOP方案化疗, 5 mo后死亡。所用抗体: CD31、CD34、AE1/AE3、Vimentin、EMA、CK7、CK20、SMA、HMB45、S100、Lysozyme及Ki67均由北京中杉公司提供。

1.2 方法 标本采用100 mL/L甲醛固定, 常规石蜡包埋切片, HE染色, 光学显微镜下进行形态学观察。按操作说明书上进行SP法免疫组织化学染色检测肿瘤细胞的特异性抗原表达。最后进行相关文献综述阐述累及直肠血管肉瘤这一罕见疾病的临床病理学特点。

2 结果

2.1 大体观察 切除直肠一段, 长7 cm, 周径6 cm, 黏膜面光滑, 肌壁结构正常, 外膜内见1灰褐色肿物约3 cm×2 cm×2 cm, 切面灰褐色、质软, 略呈海绵状。文献中累及胃肠道的血管肉瘤大部分呈黏膜溃疡, 或呈结节状, 可多发或者单发。临床诊断均首先考虑为直肠癌。

2.2 镜下观察 瘤细胞丰富, 部分弥漫增生成片

状, 部分形成形状不规则, 大小不等互相吻合的管腔, 腔内可见红细胞(图1A, B)。部分瘤细胞大, 呈上皮样特征, 圆形、卵圆形或多边形, 胞质丰富, 淡染嗜酸; 核大小不一, 呈空泡状, 圆形或卵圆形, 偏位或居中, 可见多核和巨核细胞; 核仁明显, 可见>2个的嗜酸或嗜碱性核仁, 并见较多奇异型核分裂, 个别瘤细胞胞质内可见小空泡形成, 偶见红细胞(图1C)。

2.3 免疫表型 瘤细胞表达CD31、Vimentin, 对CD34、AE1/AE3、EMA、CK7、CK20、SMA、HMB45、S100、Lysozyme不表达, Ki67指数约5%(图2)。

3 讨论

血管肉瘤是一种来自血管内皮细胞的特殊的恶性肿瘤, 最常见的部位是皮肤及软组织, 也可以发生在腹腔内的脏器如肝、脾, 很少发生于胃肠道。发生在胃肠道的血管肉瘤一般多发于胃及小肠^[1,3-7], 结直肠的血管肉瘤非常罕见, 1990年Smith等报道1例结肠的血管肉瘤, 至今文献报道不足百例^[2,8]。

胃肠道的血管肉瘤多表现为胃肠道出血及贫血, 这种非特异性的表现通常会延误诊断, 临床均首先考虑为胃肠道常见的癌而对患者进行手术切除。显微镜下多表现也常为上皮样的形态并且常是多中心性^[4]。当肿瘤呈现上皮样结构时, 血管分化特征不明显, 而且免疫组织化学CK可以弥漫阳性, 容易与转移性或原发性癌混淆。临床上常要借助免疫组织化学显示血管标志物, 通常CD31、CD34、FVIII阳性, 以及CK20及S100阴性而与癌和恶性黑色素瘤进行正确鉴别。血管肉瘤的侵袭性很强, 因此正确的诊断和治疗非常重要。

累及胃肠道的血管肉瘤患者发病年龄从16-86岁, 中位年龄65.5岁, 女性略多于男性, 无特异性临床表现, 可表现为恶心、呕吐、腹痛、胃肠出血病史及贫血。本例患者有贫血病史, 并出现左腹股沟淋巴结肿物, 经CT检查发现直肠壁外肿物, 其他脏器未发现病变, 考虑直肠肿物为原发性。血管肉瘤与长期接触放射线、氯乙烯有关, 可发生于以前化疗、放疗部位, 也可发生在长期滞留的异物周围、动静脉瘘周围, 本例未发现与此有关的病史^[7-13]。巨检肿瘤单发或多发, 体积1-2.8 cm, 病损为红色息肉状黏膜病变、平坦的黏膜溃疡或是浆膜面出血性软组织肿块^[14]。光镜下其形态与发生在其他部位的

■相关报道

Grewal等认为当血管肉瘤累及胃肠道及深部软组织时, 表现为上皮样的形态并且常是多中心性。

■应用要点

本研究提示,在上皮样血管瘤与低分化癌及恶性黑色素瘤形态学检查鉴别困难时,可联合应用免疫标志物CD31、CD34、HMB45、S100、CK、Vimentin相鉴别,以提高对上皮样血管瘤的诊断率。

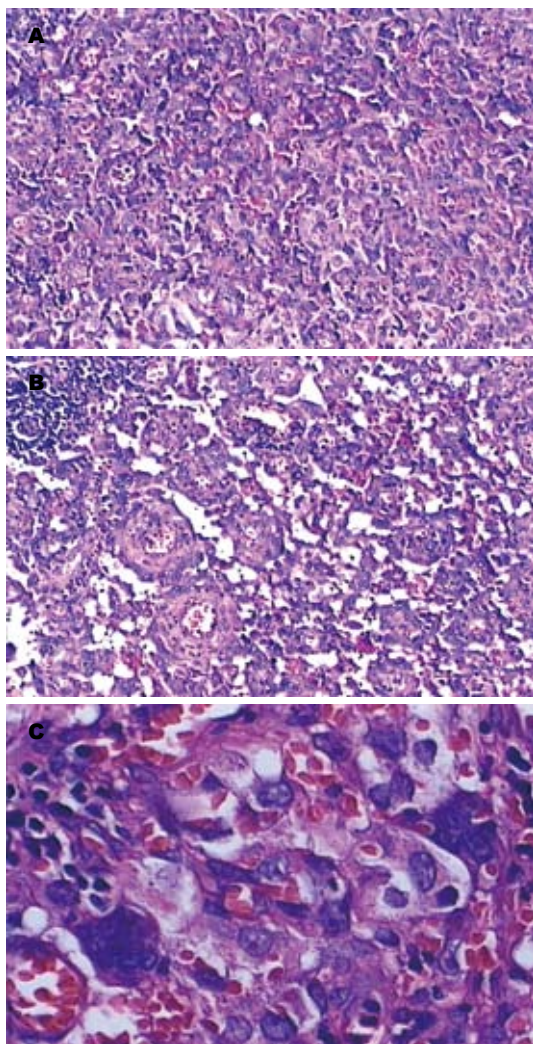


图1 镜检结果(HE × 100). A: 瘤细胞丰富,弥漫增生成片状; B: 瘤细胞形成互相吻合的管腔,腔内可见红细胞; C: 可见多核和巨核细胞,核仁明显,个别瘤细胞胞质内可见红细胞。

相似,但多表现为上皮样的形态。上皮样血管瘤是20世纪80年代以来被逐渐认识的一种肿瘤,以具有明显的上皮样血管内皮细胞为特点,最早于1982由Enzinger和Weiss首先描述^[15]。瘤细胞呈上皮样,圆形、梭形或多边形,胞质丰富,淡染嗜酸,胞核较大,圆形或卵圆形,多呈空泡状,可见多核和巨核细胞,核仁明显,病理性核分裂相较多,部分瘤细胞胞质内可见空泡,即胞质内管腔,管腔内可见红细胞,偶尔形成假腺样或腺泡样结构^[1]。大多数瘤组织内可见互相吻合的不规则血管腔,管壁内衬非典型血管内皮细胞。免疫组织化学是常用的辅助诊断手段,FVIII Ag是一种特异的诊断血管瘤的标志,但敏感性较差;Vimentin和其他血管标志物如CD31、CD34和UEA-1也可呈阳性,UEA-1敏感性好,但特异性差,CD31的敏感性优于FVIII Ag,特异性优于UEA-1。上述标志常常联合使用,以提高诊断的

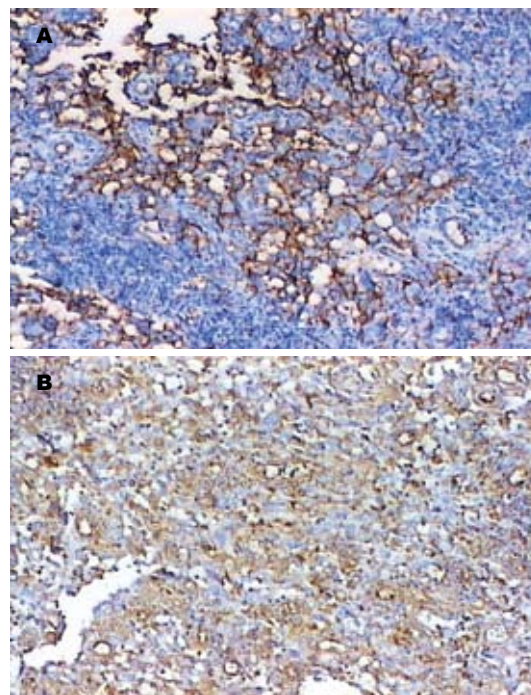


图2 免疫表型检测(× 100). A: CD31呈阳性表达; B: Vimentin呈阳性表达。

精准性。上皮标志物如Keratin和EMA一般为阴性,但当瘤细胞呈上皮样时,AE1/AE3、EMA、CK7、CK19、CK8也可以阳性^[1,5]。此时应与低分化癌、上皮样血管内皮瘤、恶性黑色素瘤、上皮样肉瘤等鉴别。上皮样血管内皮瘤以黏液样基质中见圆形或梭形嗜酸性内皮细胞形成索状和实性巢状结构,瘤细胞不典型增生不明显,核分裂相和出血坏死较少或无,生物学行为介于良、恶性肿瘤之间;恶性黑色素瘤形态多样,有时与血管瘤形态相似,但常排列呈巢状,无明显血管形成区,常有黑色素,HMB45及S100阳性,上皮标志物阴性可与上皮样血管瘤鉴别;低分化癌有时可形成假肉瘤样形态,具有自由交通的血管腔,亦表达CK、Vimentin但不表达CD31、CD34。

胃肠道血管瘤的首选治疗是外科手术,术后辅以放疗或化疗,但由于其浸润性及多灶性,完整的手术切除一般不太可能,且剩余病灶对放疗化疗不敏感,所以预后很差,患者均于诊断后1 wk到3年内死亡^[1,16]。1998年,Meis-Kindblom研究了80例软组织的血管瘤,发现患者年龄大、肿瘤发生于腹膜后、肿瘤体积大以及Ki67指数>10%预后不好^[3]。2004年,Kimberly等报道了19例累及胃肠道的血管瘤,发现完整的外科切除是与预后有关的唯一因素^[1]。本例于术后5 mo死亡。早期诊断及早期手术可以提高患者的生

存率。

总之, 胃肠道血管肉瘤较少见, 且患者缺乏特异性临床表现, 易被忽视及漏诊。当病理形态呈上皮样时, 与低分化癌及恶性黑色素瘤的病理表现相似, 对诊断困难的病例需通过多种抗体免疫组织化学染色进行鉴别。对于以淋巴结肿大等转移表现为临床首发症状时, 更应引起重视, 以免漏诊和误诊。

4 参考文献

- Allison KH, Yoder BJ, Bronner MP, Goldblum JR, Rubin BP. Angiosarcoma involving the gastrointestinal tract: a series of primary and metastatic cases. *Am J Surg Pathol* 2004; 28: 298-307
- Brown CJ, Falck VG, MacLean A. Angiosarcoma of the colon and rectum: report of a case and review of the literature. *Dis Colon Rectum* 2004; 47: 2202-2207
- Chami TN, Ratner LE, Henneberry J, Smith DP, Hill G, Katz PO. Angiosarcoma of the small intestine: a case report and literature review. *Am J Gastroenterol* 1994; 89: 797-800
- Grewal JS, Daniel AR, Carson EJ, Catanzaro AT, Shehab TM, Tworek JA. Rapidly progressive metastatic multicentric epithelioid angiosarcoma of the small bowel: a case report and a review of literature. *Int J Colorectal Dis* 2008; 23: 745-756
- Delvaux V, Sciote R, Neuville B, Moerman P, Peeters M, Filez L, Van Beckevoort D, Ectors N, Geboes K. Multifocal epithelioid angiosarcoma of the small intestine. *Virchows Arch* 2000; 437: 90-94
- Al Ali J, Ko HH, Owen D, Steinbrecher UP. Epithelioid angiosarcoma of the small bowel. *Gastrointest Endosc* 2006; 64: 1018-1021
- Kelemen K, Yu QQ, Howard L. Small intestinal angiosarcoma leading to perforation and acute abdomen: a case report and review of the literature. *Arch Pathol Lab Med* 2004; 128: 95-98
- Smith JA, Bhathal PS, Cuthbertson AM. Angiosarcoma of the colon. Report of a case with long-term survival. *Dis Colon Rectum* 1990; 33: 330-333
- Ben-Izhak O, Kerner H, Brenner B, Lichtig C. Angiosarcoma of the colon developing in a capsule of a foreign body. Report of a case with associated hemorrhagic diathesis. *Am J Clin Pathol* 1992; 97: 416-420
- Shi EC, Fischer A, Crouch R, Ham JM. Possible association of angiosarcoma with oral contraceptive agents. *Med J Aust* 1981; 1: 473-474
- Isogai R, Kawada A, Aragane Y, Tezuka T. Successful treatment of pulmonary metastasis and local recurrence of angiosarcoma with docetaxel. *J Dermatol* 2004; 31: 335-341
- Policarpio-Nicolas ML, Nicolas MM, Keh P, Laskin WB. Postradiation angiosarcoma of the small intestine: a case report and review of literature. *Ann Diagn Pathol* 2006; 10: 301-305
- Hansen SH, Holck S, Flyger H, Tange UB. Radiation-associated angiosarcoma of the small bowel. A case of multiploidy and a fulminant clinical course. Case report. *APMIS* 1996; 104: 891-894
- 冯绍平, 卢国秀, 向德兵. 消化道原发性上皮样血管肉瘤一例报道并文献复习. *肿瘤防治杂志* 2004; 11: 298-300
- Weiss SW, Enzinger FM. Epithelioid hemangioendothelioma: a vascular tumor often mistaken for a carcinoma. *Cancer* 1982; 50: 970-981
- Abraham JA, Hornicek FJ, Kaufman AM, Harmon DC, Springfield DS, Raskin KA, Mankin HJ, Kirsch DG, Rosenberg AE, Nielsen GP, Deshpande V, Suit HD, DeLaney TF, Yoon SS. Treatment and outcome of 82 patients with angiosarcoma. *Ann Surg Oncol* 2007; 14: 1953-1967

■同行评价

本文比较详细地分析了直肠血管肉瘤的临床表现、病理特征、诊断、鉴别诊断和治疗预后等, 对该病的临床诊断和治疗有一定指导价值。

编辑 李瑞敏 电编 吴鹏朕

ISSN 1009-3079 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。

Cronkhite-Canada综合征1例

华开罗, 陈可, 李莉, 朱文成, 夏冰

■背景资料

Cronkhite-Canada综合征(CCS)是一种罕见的非家族性综合征, 以皮肤和胃肠道上皮病变为特征, 多见于50-70岁男性。

华开罗, 陈可, 朱文成, 湖北省中山医院消化内科 湖北省武汉市 430033

李莉, 湖北省中山医院病理科 湖北省武汉市 430033

夏冰, 武汉大学附属中南医院消化内科 湖北省武汉市 430071
作者贡献分布: 此课题由华开罗、朱文成及夏冰设计; 病例收集由华开罗完成; 胃肠镜检查由陈可完成; 病理诊断由李莉完成; 本论文写作由华开罗、朱文成及夏冰共同完成。

通讯作者: 华开罗, 430033, 湖北省武汉市中山大道26号, 湖北省中山医院消化内科. huakailuo@yahoo.com.cn

电话: 027-83743229

收稿日期: 2009-10-28 修回日期: 2010-02-08

接受日期: 2010-02-09 在线出版日期: 2010-03-28

Cronkhite-Canada syndrome: a report of one case

Kai-Luo Hua, Ke Chen, Li Li, Wen-Chen Zhu, Bing Xia

Kai-Luo Hua, Ke Chen, Wen-Chen Zhu, Department of Gastroenterology, Hubei Zhong Shan Hospital, Wuhan 430033, Hubei Province, China

Li Li, Department of Pathology, Hubei Zhong Shan Hospital, Wuhan 430033, Hubei Province, China

Bing Xia, Department of Gastroenterology, Zhongnan Hospital of Wuhan University, Wuhan 430071, Hubei Province, China

Correspondence to: Kai-Luo Hua, Department of Gastroenterology, Hubei Zhong Shan Hospital, 26 Zhongshan Avenue, Wuhan 430033, Hubei Province, China. huakailuo@yahoo.com.cn

Received: 2009-10-28 Revised: 2010-02-08

Accepted: 2010-02-09 Published online: 2010-03-28

Abstract

Cronkhite-Canada syndrome (CCS) is a rare clinical entity of unknown etiology. It represents a syndrome of gastrointestinal polyposis associated with ectodermal changes, mainly manifesting as chronic diarrhea, abdominal discomfort, alopecia, skin hyperpigmentation, and nail dystrophy. Here, we present a case of CCS, describe the clinical and endoscopic findings, analyze the clinical features of the disease, and review the relevant literature.

Key Words: Cronkhite-Canada syndrome; Chronic diarrhea; Gastrointestinal polyposis

Hua KL, Chen K, Li L, Zhu WC, Xia B. Cronkhite-Canada syndrome: a report of one case. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(9): 958-960

摘要

Cronkhite-Canada综合征(Cronkhite-Canada

syndrome, CCS)非常罕见, 病因不明, 以胃肠道多发性息肉和外胚层三联征两大症候群为主, 主要表现为慢性腹泻、腹部不适、毛发脱落、色素沉着、指(趾)甲萎缩等。本文报道CCS 1例, 通过病史及内镜检查结果并结合相关文献对该病进行分析讨论, 探讨CCS的临床特征, 提高对该病的认识。

关键词: Cronkhite-Canada综合征; 慢性腹泻; 胃肠道息肉

华开罗, 陈可, 李莉, 朱文成, 夏冰. Cronkhite-Canada综合征1例. *世界华人消化杂志* 2010; 18(9): 958-960

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/958.asp>

0 引言

Cronkhite-Canada综合征(Cronkhite-Canada syndrome, CCS)是一种罕见的非家族性综合征, 以皮肤和胃肠道上皮病变为特征, 多见于50-70岁男性。近期我科收治1例, 现报道如下。

1 病例报告

患者, 男, 66岁, 高分子化工技术人员, 武汉人。主因间断腹泻2 mo余, 加重2 d后于2009-06-15入院。患者入院前2 mo无明显诱因出现腹泻, 呈黏液水样便, 每日5-6次, 无脓血便, 不伴腹痛, 口服思密达、黄连素、奥硝唑及静脉滴注抗生素等药物, 腹泻不能缓解, 伴毛发渐脱落、四肢掌侧色素沉着、四肢乏力、食欲差、少言懒语、消瘦(体质量下降5 kg)。入院前2 d, 因腹泻加重, 每天10-20余次, 伴恶心、呕吐, 即来我院治疗。家族中无类似疾病史。

查体: 体型瘦, 营养不佳, 头发稀少, 眉毛、腋毛、阴毛完全脱落。手(趾)指甲萎缩, 凹陷; 心肺无异常, 肝脾未触及; 双下肢轻度水肿, 手掌及脚掌皮肤可见色素沉着。

实验室检查: (1)血常规: 血红蛋白131 g/L、白细胞 $5.28 \times 10^9/L$ 、血清白蛋白29.4 g/L(34-55 g/L)、血小板 $213 \times 10^9/L$; 血钾3.16(3.50-5.50) mmol/L、血钙1.53(2.00-2.60) mmol/L、血镁

■同行评议者

李勇, 副教授, 上海中医药大学附属中医医院消化科



图 1 胃窦小弯侧息肉样隆起, 息肉表面分叶.

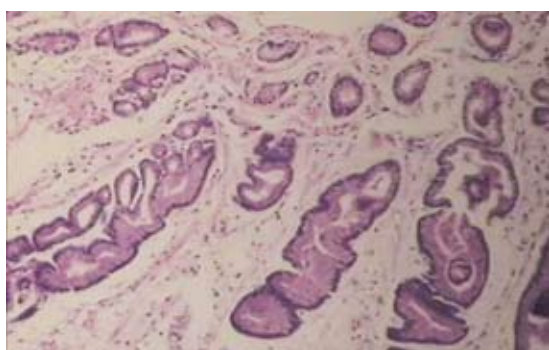


图 2 胃黏膜腺腔囊状扩张、间质水肿明显、淋巴细胞浸润(HE × 100).

0.59(0.65-1.20) mmol/L、血清铁30.3(6.6-28.3) μ mol/L、血磷0.54(0.80-1.50) mmol/L, AB型Rh阳性血; (2)粪便常规: 黄色稀水样, 黏液(+), 红细胞(+), 白细胞(++), 脓细胞(-), 巨噬细胞(-), 肠滴虫(-), 蛔虫卵(-), 鞭虫卵(-), 钩虫卵(-), 吸血虫卵(-), 阿米巴滋养体(-), 阿米巴包囊(-), 酵母样孢子(-), 隐血(++). 粪便培养未见沙门氏菌与志贺氏菌; (3)肿瘤标志物: 癌胚抗原6.0(0-3.7) μ g/L、甲胎蛋白3.7(0.0-8.0) μ g/L、CA153 6.76(0.00-30.00) U/mL、CA125 8.96(0.00-30.00) U/mL、CA199 15.26(0.00-19.00) U/mL; (4)血清免疫球蛋白及补体: 免疫球蛋白G 6.11(8.00-16.00) g/L、免疫球蛋白A 3.16(0.70-3.30) g/L、免疫球蛋白M 0.40(0.50-2.20) g/L、补体C3 0.34(0.80-1.60) g/L、补体C4 0.15(0.10-0.40) g/L、C反应蛋白4.53(0.00-5.00) mg/L; (5)肝纤维化指标: 透明质酸956.97(0-100) μ g/L、III型前胶原N端肽113.88(<120) mg/L、层粘连蛋白199.20(101.7-135.3) μ g/L、IV型胶原102.18(46.5-90.5) mg/L; (6)自身免疫检测: 抗核抗体阴性、抗双链DNA抗体阴性、可提取的核抗原阴性. 甲状腺系列游离三碘甲状腺原氨酸

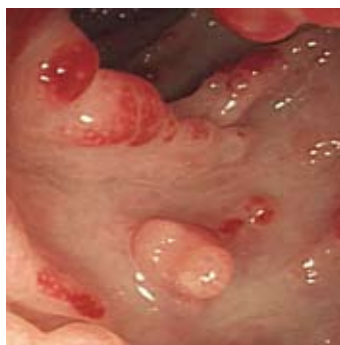


图 3 乙状结肠息肉, 表面充血, 息肉间黏膜广泛水肿.

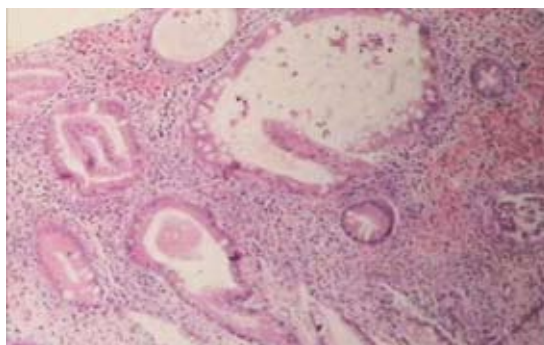


图 4 黏膜慢性炎, 腺体囊状扩张、囊内大量黏液、炎性细胞浸润、间质明显水肿(HE × 100).

<1(1.5-4.1) μ g/L, 游离甲状腺素、促甲状腺激素、甲状腺微粒体抗体、甲状腺球蛋白抗体均正常. 生长激素0.50(0.003-0.235) nmol/L, ACTH与血皮质醇正常; (7)辅助检查: 腹部B超肝、胆、胰、脾、双肾未见异常; 头颅CT示脑梗塞. 胃镜示食管光滑, 胃底局部充血水肿, 胃窦广泛充血水肿糜烂, 小弯侧可见息肉样隆起, 息肉表面分叶(图1); (8)活检结果: 胃黏膜小凹变浅、胃黏液腺增生、部分腺腔囊状扩张、间质水肿明显、淋巴细胞浸润(图2); (9)结肠镜检: 直肠至回肠末端密布0.4-1.0 cm大小不等亚蒂或扁平状息肉, 部分息肉表面充血糜烂; 息肉间黏膜广泛水肿(图3). (10)病理报告: 黏膜慢性炎, 腺体囊状扩张、囊内大量黏液、炎性细胞浸润、间质明显水肿(图4). 予奥曲肽皮下注射、结肠宁(九芝堂股份有限公司, 国药准字Z10890022, 主要药物组成: 蒲黄、丁香蓼)灌肠, 艾迪莎口服及补钾、补镁、补钙, 输入人血白蛋白治疗16 d, 腹泻好转, 大便黄色成形, 每日1-2次, 电解质恢复正常出院. 出院后4 wk死亡, 死因不详.

2 讨论

CCS是一种罕见的非家族性综合征, 以皮肤和胃肠道上皮病变为特征. 皮肤病变包括脱发、指(趾)甲萎缩、色素沉着外胚层三联征. 胃肠道

■相关报道

CCS病因尚不清楚, 有研究表明CCS患者存在高滴度抗核抗体和IgG4水平升高, 并同甲状腺机能减退和自身免疫性疾病相关.

■同行评价

本文所选病例系罕见病例,资料齐全,可供参考。

改变一般以错构瘤息肉为主,黏膜广泛水肿、增生导致消化腺体分泌异常,吸收障碍、营养不良、胃肠道出血及外科并发症。皮肤病变和胃肠道病变可同时或相继发生。本病1955年由Cronkhite和Canada^[1]首先报道2例,国内通常称之为胃肠道息肉-色素沉着-秃发-指(趾)甲萎缩综合征,目前国外文献报道超过400多例,胃肠道息肉恶变发生率在10%左右^[2]。小儿很少报道,有75%为日裔人种^[3]。1985年国内首次报道本病^[4],至2009-06共报道病例42例。曹晓沧等^[5]分析了35例中国人CCS临床特点,发现患者以胃肠道多发息肉伴外胚层三联征为主要表现,慢性腹泻、腹痛、体质量下降、贫血、水肿等症状最为常见,2例患者合并癌变。中国人病例发病年龄多为50-70岁,男女之比为1.3-2.3。本例患者以慢性腹泻为主。而国外文献^[6]报道首发症状以味觉减退和腹泻为多。贾岩等^[7]分析了33例中国人CCS,根据内镜检查及消化系造影见息肉累及除食管外的全消化系,分布以胃和大肠为多;直径0.1-3.0 cm不等;单发或多发、有蒂或无蒂、形态不一。息肉病理组织学分类包括炎症性、增生性、腺瘤性和错构瘤性息肉;8例息肉癌变。实验室检查示不同程度的低蛋白血症、少数患者免疫球蛋白下降、甲状腺功能减退。治疗方法除一般治疗、营养支持治疗以外,目前对CCS的治疗主要包括激素、内镜下治疗及外科手术治疗。患者常因肠吸收不良引起电解质紊乱、维生素缺乏、低蛋白血症,最终因营养不良、贫血、感染、全身衰竭等死亡,本病预后不良。本例患者死亡原因可能为全身衰竭。

CCS主要依据临床症状体征结合内镜检查综合诊断,目前内镜检查是确诊CCS的主要手段,临床上CCS主要与Peutz-Jeghers综合征、幼年性息肉(juvenile polyposis syndrome)、家族性结肠息肉病、Gardner综合征、Turcot综合征等肠道息肉病和Menetrier病鉴别。现在仍没有统一的临床分型,日本学者^[8]根据初发症状和体征,

将其分为5型: I型: 腹泻型(35%); II型: 味觉减退型(40.9%); III型: 口腔干燥型(6.4%); IV型: 腹部不适型(9.1%); V型: 毛发脱落(8.2%)。本例患者为腹泻型。

CCS病因尚不十分清楚,有研究表明CCS患者存在高滴度抗核抗体和IgG4水平升高^[3],并同甲状腺机能减退和自身免疫性疾病相关^[9,10]。因此,CCS病因可能与自身免疫异常有关。也有研究认为可能与感染、过度劳累有关^[11]。

3 参考文献

- 1 Cronkhite LW Jr, Canada WJ. Generalized gastrointestinal polyposis; an unusual syndrome of polyposis, pigmentation, alopecia and onychotrophy. *N Engl J Med* 1955; 252: 1011-1015
- 2 Yashiro M, Kobayashi H, Kubo N, Nishiguchi Y, Wakasa K, Hirakawa K. Cronkhite-Canada syndrome containing colon cancer and serrated adenoma lesions. *Digestion* 2004; 69: 57-62
- 3 Riegert-Johnson DL, Osborn N, Smyrk T, Boardman LA. Cronkhite-Canada syndrome hamartomatous polyps are infiltrated with IgG4 plasma cells. *Digestion* 2007; 75: 96-97
- 4 徐可宽. Cronkhite-Canada综合征一例. *中华内科杂志* 1985; 24: 43
- 5 曹晓沧, 周斌, 丁娟娟, 连佳, 陆宁, 王邦茂. 35例中国人Cronkhite-Canada综合征临床分析. *中华医学杂志* 2007; 87: 3130-3132
- 6 Blonski WC, Furth EE, Kinosian BP, Compher C, Metz DC. A case of Cronkhite-Canada syndrome with taste disturbance as a leading complaint. *Digestion* 2005; 71: 201-205
- 7 贾岩, 孙刚, 郭明洲, 杨云生. Cronkhite-Canada综合征2例报告并国内外文献评价. *胃肠病学和肝病杂志* 2009; 18: 632-635
- 8 Goto A, Mimoto H, Shibuya C, Matsunami E. Cronkhite-Canada syndrome: an analysis of clinical features and follow-up studies of 80 cases reported in Japan. *Nippon Geka Hokan* 1988; 57: 506-526
- 9 Qiao M, Lei Z, Nai-Zhong H, Jian-Ming X. Cronkhite-Canada syndrome with hypothyroidism. *South Med J* 2005; 98: 575-576
- 10 Daniel ES, Ludwig SL, Lewin KJ, Ruprecht RM, Rajacich GM, Schwabe AD. The Cronkhite-Canada Syndrome. An analysis of clinical and pathologic features and therapy in 55 patients. *Medicine (Baltimore)* 1982; 61: 293-309
- 11 Goto A. Cronkhite-Canada syndrome: epidemiological study of 110 cases reported in Japan. *Nippon Geka Hokan* 1995; 64: 3-14

编辑 李军亮 电编 何基才

结肠、肝脏及膀胱三原发癌1例

宁雅婵, 王悦华, 腾梁红, 刘家峰, 李非, 许建军, 欧彤文

宁雅婵, 王悦华, 刘家峰, 李非, 首都医科大学宣武医院普外科 北京市 100053

腾梁红, 首都医科大学宣武医院病理科 北京市 100053

许建军, 欧彤文, 首都医科大学宣武医院泌尿外科 北京市 100053

北京市卫生系统高层次卫生技术人才培养基金资助项目, No. 2009-3-65

作者贡献分布: 论文写作由宁雅婵与王悦华完成, 病理诊断由腾梁红完成; 多项临床治疗由王悦华、刘家峰、李非、许建军及欧彤文等完成。

通讯作者: 王悦华, 副主任医师, 100053, 北京市, 首都医科大学宣武医院普外科. wangyuehua301@sina.com

电话: 010-93198732

收稿日期: 2009-12-28 修回日期: 2010-02-05

接受日期: 2010-02-23 在线出版日期: 2010-03-28

A case of triple primary cancers occurring in the colon, liver and urinary bladder

Ya-Chan Ning, Yue-Hua Wang, Liang-Hong Teng, Jia-Feng Liu, Fei Li, Jian-Jun Xu, Tong-Wen Ou

Ya-Chan Ning, Yue-Hua Wang, Jia-Feng Liu, Fei Li, Department of General Surgery, Xuanwu Hospital, Capital Medical University, Beijing 100053, China

Liang-Hong Teng, Department of Pathology, Xuanwu Hospital, Capital Medical University, Beijing 100053, China
Jian-Jun Xu, Tong-Wen Ou, Department of Urology, Xuanwu Hospital, Capital Medical University, Beijing 100053, China

Supported by: the Training Foundation for High-level Health Technical Talents in Beijing Health System, No. 2009-3-65

Correspondence to: Yue-Hua Wang, Department of General Surgery, Xuanwu Hospital, Capital Medical University, Beijing 100053, China. wangyuehua301@sina.com

Received: 2009-12-28 Revised: 2010-02-05

Accepted: 2010-02-23 Published online: 2010-03-28

Abstract

Triple primary cancers involving the colon, liver and urinary bladder are extremely rare. Here we present a case of triple primary cancers involving the colon, liver and urinary bladder and review the relevant literature to summarize the clinical features of multiple primary malignant neoplasms (MPMN), with an aim to improve our understanding of MPMN. Accurate diagnosis and timely treatment are essential to improve the survival and prognosis of MPMN patients.

Key Words: Multiple primary cancer; Colon cancer; Primary liver cancer; Bladder cancer

Ning YC, Wang YH, Teng LH, Liu JF, Li F, Xu JJ, Ou TW. A case of triple primary cancers occurring in the colon, liver and urinary bladder. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(9): 961-963

摘要

临床上三原发癌少见, 其中结肠、肝脏和膀胱三种原发癌的组合更为罕见, 本文报告1例. 通过介绍本例1994-10/2009-12临床资料及查阅相关文献, 总结了多原发性恶性肿瘤相关临床知识, 以提高临床医生对多原发性恶性肿瘤的进一步认识. 及时诊断和治疗, 避免误诊或漏诊所致病情延误, 对改善患者的生存及预后是至关重要的。

关键词: 多原发癌; 结肠癌; 肝癌; 膀胱癌

宁雅婵, 王悦华, 腾梁红, 刘家峰, 李非, 许建军, 欧彤文. 结肠、肝脏及膀胱三原发癌1例. *世界华人消化杂志* 2010; 18(9): 961-963

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/961.asp>

0 引言

多原发癌的报道越来越多, 但三原发癌的报道并不多见, 文献中尚未见结肠、肝脏及膀胱三原发癌的报道。

1 病例报告

男, 86岁, 于1994-10因“右中腹隐痛2 mo”入院, CEA 80 $\mu\text{g/L}$, 钡灌肠见升结肠近端充盈缺损, 范围约4.5 cm. 纤维结肠镜见升结肠新生物, 病理示“中分化腺癌”. 当月行右半结肠切除术(Duke's C1), 输O型血1 000 mL, 病理诊断盲肠溃疡型(4 cm $\times$ 3 cm)中分化管状腺癌(图1A), 侵犯肠壁全层达浆膜, 两端未见癌, 肠系膜淋巴结未见癌转移(0/6), 分期T3N0M0, 术后未接受化疗。

2006-12初因“体检发现肝脏占位3 mo”收入院. 查体无特殊, AFP 131 $\mu\text{g/L}$, CEA正常, 丙肝抗体阳性, CT示“肝中叶及肝VI段分别有2 cm $\times$ 2 cm、3.2 cm $\times$ 3 cm实性肿物, 诊断肝转移癌”, 于当月在全麻下行手术, 见肝脏呈小结

■背景资料

本文中结肠、肝脏和膀胱三原发癌在临床上极为罕见, 具有新奇性和可续性, 通过对该患者的临床诊治情况及多原发性恶性肿瘤的有关知识的总结, 有助于提高临床医生对多原发癌的进一步认识, 从而更好服务于临床。

■同行评议者

田晓峰, 教授, 大连医科大学附属二医院普通外科

■同行评价

同时多发原位癌较少见,该总结对临床工作有一定借鉴意义。

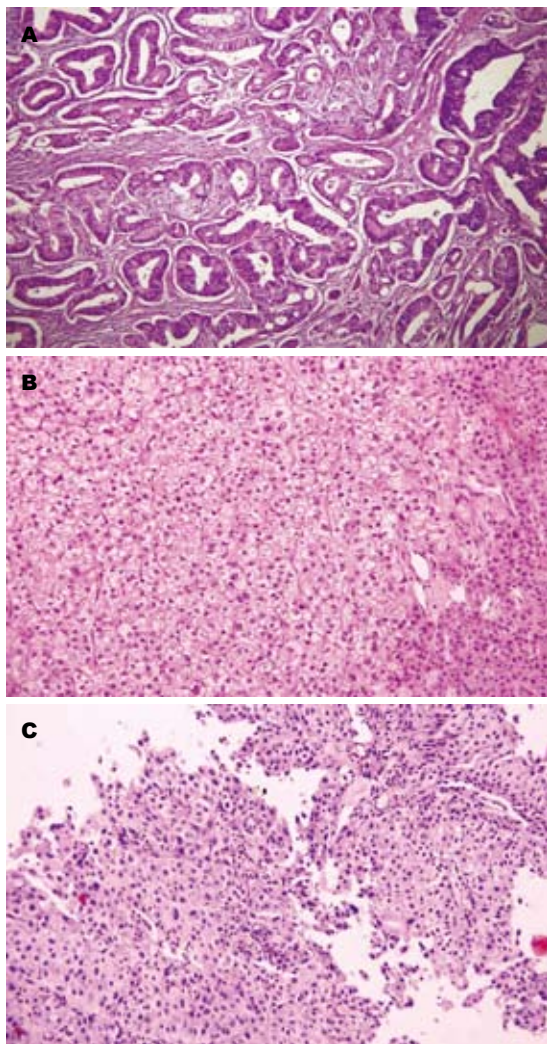


图1 多原发癌病例的病理细胞学表现($\times 20$). A: 结肠管状腺癌; B: 肝细胞癌; C: 膀胱移行细胞癌。

节肝硬化,行肝VI肿瘤局部切除、肝中叶肿瘤射频消融术。病理诊断高分化肝细胞癌(图1B),CK8118(+), α -AFP(±),确诊为原发性肝癌,分期T2N0M0。患者因年龄较大,术后拒绝其他治疗。2007-02因“肉眼血尿1 mo”,行膀胱镜检查发现膀胱颈部5点处有一个直径1 cm的菜花样新生物,病理活检为移行细胞癌(图1C),分期T1N0M0,WHO分级II级。于当月经尿道电切镜行膀胱肿瘤电切术,此后患者定期门诊复查腹部CT。于2008-06行经导管肝动脉化疗栓塞术,当时肝脏未发现新病灶。于2009-05复查CT发现肝右后叶4.0 cm $\times$ 3.5 cm新生病灶,AFP 157 μ g/L、CEA正常,诊断为肝癌复发,即在超声引导下行肝癌射频消融术,2009-08再次行肝动脉化疗栓塞术,术后1 mo复查CT肿瘤消融完全,未见碘化油沉积病灶,患者目前定期门诊复查,口服中成药,至2009年底一般情况仍良好。

2 讨论

多原发性恶性肿瘤(multiple primary malignant neoplasm, MPMN)又称重复癌、多重癌,指同一患者在身体的不同部位或器官同时或异时发生2个或2个以上的原发恶性肿瘤。国外文献报道在癌症患者中MPMN发生率为0.734%-11.7%^[1],国内为0.52%-2.45%^[2]。据美国一项调查显示在首发癌之后再发其他癌的几率最低是肝癌(1%),最高是膀胱癌(16%)^[3]。MPMN诊断多采用Warren's诊断标准^[4]:(1)每种肿瘤组织学上必须均为恶性;(2)每种肿瘤有其独特的病理形态;(3)肿瘤发生在不同部位,两者不相连续;(4)必须排除互为转移的可能。结直肠癌合并肝胆恶性肿瘤的标准发生率(SIR)为0.91%(男)和0.76%(女),而合并膀胱恶性肿瘤的标准发生率为1.0%(男)和1.04%(女)^[3]。本例属于发生于三个器官的三原发癌,文献检索见较少的结直肠癌合并肝细胞癌病例^[5],尚未见有此三种癌组合的MPMN的病例报告。

MPMN的发病机制目前尚不清楚,目前研究认为与致癌因素的持续作用、宿主的易感性、机体的免疫缺陷、理化环境因素、放化疗致癌副作用、癌症患者生存期延长以及吸烟等不良的生活方式等方面有关^[4,6]。而本例患者在患结肠癌12年后出现肝癌,可能与手术输血所致丙型肝炎及继发的肝硬化有直接关系,在20世纪90年代初,尚未对献血者常规检查丙型肝炎,而再患膀胱癌可能与上述因素有关。

MPMN应与转移癌和复发癌相鉴别,并以病理诊断为依据,特别是在患其他癌后患肝癌者,因为肝脏是其他癌易转移的器官。MPMN与转移癌和复发癌在治疗及其预后上都不同,每种癌同单原发癌一样,预后受病变的部位、分期及治疗方法等因素的影响,MPMN并不预示着预后差^[5],争取每个原发癌根治性治疗,常能提高患者生存期和生活质量。从本例患者来看,对三重癌先后分别采取了根治性的治疗措施,每种癌的治疗效果均比较理想。所以临床医生应该全面、系统的提高对MPMN的认识,避免误诊或者漏诊所导致的病情延误,这对改善患者的生存及预后是至关重要的。

3 参考文献

- 1 Demandante CG, Troyer DA, Miles TP. Multiple primary malignant neoplasms: case report and a comprehensive review of the literature. *Am J Clin*

- Oncol* 2003; 26: 79-83
- 2 侯继院, 修元德, 沈方臻. 消化道三原发癌1例. 青岛大学医学院学报 2008; 44: 102
- 3 Hayat MJ, Howlader N, Reichman ME, Edwards BK. Cancer statistics, trends, and multiple primary cancer analyses from the Surveillance, Epidemiology, and End Results (SEER) Program. *Oncologist* 2007; 12: 20-37
- 4 潘浩, 卢国文, 朱永红. 多原发性恶性肿瘤168例临床分析. 肿瘤防治研究 1994; 21: 308-310
- 5 Fernández-Ruiz M, Guerra-Vales JM, Castelbón-Fernández FJ, Llenas-García J, Caurcel-Díaz L, Colina-Ruizdelgado F. Multiple primary malignancies in Spanish patients with hepatocellular carcinoma: analysis of a hospital-based tumor registry. *J Gastroenterol Hepatol* 2009; 24: 1424-1430
- 6 张真, 蔡昌豪, 吴本俨. 141例多原发恶性肿瘤的临床分析. 中华老年多器官疾病杂志 2008; 7: 128-131, 144

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

ISSN 1009-3079 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, 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、中医中药学、肿瘤学、中西医结合学、影像学、内镜学、介入治疗学、病理学、基础研究等医生和研究人员提供转换平台, 更新知识, 为患者康复服务。

《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, 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}, V_{max}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值的文句中, 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: wcjd@wjgnet.com; http://www.wjgnet.com

2.5 统计学符号 (1) t 检验用小写 t ; (2) F 检验用英文大写 F ; (3)卡方检验用希文小写 χ^2 ; (4)样本的相关系数用英文小写 r ; (5)自由度用希文小写 ν ; (6)样本数用英文小写 n ; (7)概率用英文斜体大写 P . 在统计学处理中在文字叙述时平均数 $\pm$ 标准差表示为 $\text{mean} \pm \text{SD}$, 平均数 $\pm$ 标准误为 $\text{mean} \pm \text{SE}$. 统计学显著性用 $^aP < 0.05$, $^bP < 0.01$ ($P > 0.05$ 不注). 如同一表中另有一套 P 值, 则 $^cP < 0.05$, $^dP < 0.01$; 第三套为 $^eP < 0.05$, $^fP < 0.01$ 等.

2.6 数字用法 遵照国家标准GB/T 15835-1995出版物上数字用法的规定, 作为汉语词素者采用汉字数字, 如二氧化碳、十二指肠、三倍体、四联球菌、五四运动、星期六等. 统计学数字采用阿拉伯数字, 如1000-1500 kg, 3.5 mmol/L $\pm$ 0.5 mmol/L等. 测量的数据不能超过其测量仪器的精密度, 例如6347意指6000分之一的精密度. 任何一个数字, 只允许最后一位有误差, 前面的位数不应有误差. 在一组数字中的 $\text{mean} \pm \text{SD}$ 应考虑到个体的变差, 一般以SD的1/3来定位数, 例如3614.5 g $\pm$ 420.8 g, SD的1/3达一百多g, 平均数波动在百位数, 故应写成3.6 kg $\pm$ 0.4 kg, 过多的位数并无意义. 又如8.4 cm $\pm$ 0.27 cm, 其SD/3 = 0.09 cm, 达小数点后第2位, 故平均数也应补到小数点后第2位. 有效位数以后的数字是无效的, 应该舍. 末尾数字, 小于5则舍, 大于5则进, 如恰等于5, 则前一位数逢奇则进, 逢偶(包括“0”)且5之后全为0则舍. 末尾时只可1次完成, 不得多次完成. 例如23.48, 若不要小数点, 则应成23, 而不应该23.48 $\rightarrow$ 23.5 $\rightarrow$ 24. 年月日采用全数字表达法, 请按国家标准GB/T 7408-94书写. 如1985年4月12日, 可写作1985-04-12; 1985年4月, 写作1985-04; 从1985年4月12日23时20分50秒起至1985年6月25日10时30分止, 写作1985-04-12 T23:20:50/1985-06-25 T10:30:00; 从1985年4月12日起至1985年6月15日止, 写作1985-04-12/06-16, 上午8时写作08:00, 下午4时半写作16:30. 百分数的有效位数根据分母来定: 分母 ≤ 100 , 百分数到个位; $101 \leq$ 分母 ≤ 1000 , 百分数到小数点后1位; 余类推. 小数点前后的阿拉伯数字, 每3位间空1/4阿拉伯数字距离, 如1486800.475 65. 完整的阿拉伯数字不移行!

2.7 标点符号 遵照国家标准GB/T 15834-1995标点符号用法的要求, 本刊论文中的句号都采用黑圆点; 数字间的起止号采用“-”字线, 并列的汉语词间用顿号分开, 而并列的外文词、阿拉伯数字、外文缩略词及汉语拼音字母拼写词间改用逗号分开, 参考文献中作者间一律用逗号

分开; 表示终了的标点符号, 如句号、逗号、顿号、分号、括号及书名号的后一半, 通常不用于一行之首; 而表示开头的标点符号, 如括号及书名号的前一半, 不宜用于一行之末. 标点符号通常占一格, 如顿号、逗号、分号、句号等; 破折号应占两格; 英文连字符只占一个英文字符的宽度, 不宜过长, 如5-FU. 外文字符下划一横线表示用斜体, 两横线表示用小写, 三横线表示用大写, 波纹线表示用黑体.

3 稿件格式

3.1 题名 简明确切地反映论文的特定内容, 鲜明而有特色, 阿拉伯数字不宜开头, 不用副题名, 一般20个字. 避免用“的研究”或“的观察”等非特定词.

3.2 作者 论文作者的署名, 按照国际医学杂志编辑委员会(ICMJE, International Committee of Medical Journal Editors)作者资格标准执行. 作者标准为: (1)对研究的理念和设计、数据的获得、分析和解读做出重大贡献; (2)起草文章, 并对文章的重要的知识内容进行批评性修改; (3)接受对准备发表文章的最后一稿. 作者应符合条件1, 2, 3, 对研究工作有贡献的其他人可放入志谢中. 作者署名的次序按贡献大小排列, 多作者时姓名间用逗号, 如是单名, 则在姓与名之间空1格(正文和参考文献中不空格). 《世界华人消化杂志》要求所有署名人写清楚自己对文章的贡献. 世界华人消化杂志不设置共同第一作者和共同通信作者.

3.3 单位 作者后写单位的全称空1格后再写省市及邮政编码. 格式如: 张旭晨, 梅立新, 承德医学院病理教研室 河北省承德市 067000

3.4 第一作者简介 格式如: 张旭晨, 1994年北京中医药大学硕士, 讲师. 主要从事消化系统疾病的病理研究.

3.5 作者贡献分布 格式如: 陈湘川与庞丽娟对此文所作贡献两均等; 此课题由陈湘川、庞丽娟、陈玲、杨兰、张金芳、齐妍及李洪安设计; 研究过程由陈玲、杨兰、张金芳、蒋金芳、杨磊、李锋及曹秀峰操作完成; 研究所用新试剂及分析工具由曹秀峰提供; 数据分析由陈湘川、杨兰及庞丽娟完成; 本论文写作由陈湘川、庞丽娟及李洪安完成.

3.6 同行评议者 为了确保刊出文章的质量, 本刊即将开始实行接受稿件的同行评议公开策略, 将同行评议者姓名, 职称, 机构的名称与文章一同在脚注出版. 格式如: 房静远, 教授, 上海交通

大学医学院附属医院仁济医院,上海市消化疾病研究所。

3.7 基金资助项目 格式如: 国家自然科学基金资助项目, No. 30224801

3.8 通讯作者 格式如: 通讯作者: 黄缘, 教授, 330006, 江西省南昌市民德路1号, 南昌大学第二附属医院消化内科, 江西省分子医学重点实验室. huang9815@yahoo.com

电话: 0351-4078656 传真: 0351-4086337

收稿日期: 修回日期:

3.9 英文摘要

题名 文章的题名应言简意赅, 方便检索, 英文题名以不超过10个实词为宜, 应与中文题名一致。

作者 作者姓名汉语拼音拼写法规定为: 先名, 后姓; 首字母大写, 双名之间用半字线“-”分开, 多作者时姓名间加逗号。格式如: “潘伯荣”的汉语拼写法为“Bo-Rong Pan”。

单位 先写作者, 后写单位的全称及省市邮政编码。例如: Xu-Chen Zhang, Li-Xin Mei, Department of Pathology, Chengde Medical College, Chengde 067000, Hebei Province, China

基金资助项目 格式如: Supported by National Natural Science Foundation of China, No.30224801

通讯作者 格式如: Correspondence to: Dr. Lian-Sheng Ma, Taiyuan Research and Treatment Center for Digestive Diseases, 77 Shuangta Xijie, Taiyuan 030001, Shanxi Province, China. wcjd@wjgnet.com

收稿及修回日期 格式如: Received: Revised:

摘要 包括目的、方法、结果、结论, 书写要求与中文摘要一致。

3.10 中文摘要 必须在300字左右, 内容应包括目的(应阐明研究的背景和设想、目的), 方法(必须包括材料或对象。应描述课题的基本设计, 双盲、单盲还是开放性, 使用什么方法, 如何进行分组和对照, 数据的精确程度。研究对象选择条件与标准是否遵循随机化、齐同化的原则, 对照组匹配的特征。如研究对象是患者, 应阐明其临床表现, 诊断标准。如何筛选分组, 有多少例进行过随访, 有多少例因出现不良反应而中途停止研究), 结果(应列出主要结果, 包括主要数据, 有什么新发现, 说明其价值和局限, 叙述要真实、准确、具体, 所列数据经用何种统计学方法处理; 应给出结果的置信区间和统计学显著性检验的确切值; 概率写 P , 后应写出相应显著性检验值), 结论(全文总结, 准确无误的观点及价值)。

3.11 正文标题层次为 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。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。参考文献格式如下:

- 1 Jung EM, Clevert DA, Schreyer AG, Schmitt S, Rennert J, Kubale R, Feuerbach S, Jung F. Evaluation of quantitative contrast harmonic imaging to assess malignancy of liver tumors: A prospective controlled two-center study. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 6356-6364 [PMID: 18081224; DOI: 10.3748/wjg.13.6356]
- 2 马连生, 潘伯荣, 马景云. 世界胃肠病学杂志英文版的现状. *世界华人消化杂志* 2001; 9: 855-863
- 3 Lam SK. Academic investigator's perspectives of medical treatment for peptic ulcer. In: Swabb EA, Azabo S, eds. *Ulcer disease: investigation and basis for therapy*. New York: Marcel Dekker, 1991: 431-450
- 4 尚克中, 陈九如. 胃肠道造影原理与诊断. 第1版. 上海: 上海科学技术文献出版社, 1995: 382-385

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 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)。

5 修回稿须知

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

5.2 稿件修改 来稿经同行专家审查后,认为内容需要修改、补充或删节时,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。

5.3 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: 010-8538-1901
传真: 010-8538-1893
E-mail: wcjd@wjgnet.com
<http://www.wjgnet.com>

2010年国内国际会议预告

2010-04-02/05

第九届全国儿科放射学学术大会

会议地点: 南京市

联系方式: gausli@yahoo.com.cn

2010-04-09/12

第二十六届国际放射学大会

会议地点: 上海市

联系方式: icr2010@cma.org.cn

2010-04-14/18

第四十五届欧洲肝脏研究协会会议(EASL)

会议地点: 奥地利, 维也纳

联系方式: <http://www2.kenes.com/liver-congress/pages/home.aspx>

2010-04-16/17

2010消化疾病诊断与鉴别诊断临床思维医师论坛

会议地点: 北京市

联系方式: cmdabm@yahoo.com.cn

2010-05-01/05

美国消化疾病周(DDW)

会议地点: 美国, 新奥尔良

联系方式: <http://www.ddw.org/wmspage.cfm?parm1=679>

2010-05-13/16

第四届MDCA肿瘤分子靶向及个体化医疗高峰论坛

会议地点: 北京市

联系方式: 010-58430577

2010-05-13/15

第五届全国疑难及重症肝病大会

会议地点: 南京市

联系方式: office@cnsld.org

2010-05-28/31

2010中国普外科焦点问题学术论坛

会议地点: 兰州市

联系方式: 2010fis@gmail.com

2010-06-04/06

2010国际腹部创伤暨第十届全国脾脏外科学术研讨会

会议地点: 合肥市

联系方式: qiaohaiquan2008@yahoo.com.cn

2010-06-04/06

第二届世纪坛国际结直肠肛门病论坛

会议地点: 北京市

联系方式: luoch301@gmail.com; luoch301@gmail.com

2010-06-17/21

2010年全国肝脏疾病临床学术大会暨欧洲肝病学会日

会议地点: 厦门市

联系方式: zhgz@vip.163.com

2010-08-18/21

第二十一届世界癌症大会

会议地点: 深圳市

联系方式: bgs@caca.sina.net

2010-08-19/22

第二十二次全国中西医结合消化学术会议

会议地点: 苏州市

联系方式: szzyy88@163.com

2010-09-01

中华医学会第十次全国消化系疾病学术会议

会议地点: 成都市

联系方式: <http://www.csgd.org.cn/2010/>

2010-09-08/12

第九届全国介入放射学学术大会

会议地点: 广州市

联系方式: csir2010@163.com

2010-09-09/11

中华医学会第十一次全国感染病学术会议

会议地点: 重庆市

联系方式: infectioncma@163.com

2010-09-10/12

第四届国际肝病学会年会

会议地点: 加拿大, 蒙特利尔

联系方式: info@ilca-online.org

2010-09-16/19

第十三届全国临床肿瘤学大会暨2010年CSCO学术年会

会议地点: 北京市

联系方式: <http://reg.cSCO.org.cn/reg2010/>

2010-10-23/27

第十八届欧盟胃肠病周

会议地点: 西班牙, 巴塞罗那

联系方式: <http://uegw10.uegf.org/>

2010-10-28/30

中华医学会第十次全国消化系疾病学术会议

会议地点: 成都市

联系方式: yjliu@cma.org.cn

志谢世界华人消化杂志编委

本期文章审稿中(包括退稿), 我刊编委付出了宝贵的时间和大量的精力, 提高了《世界华人消化杂志》的学术质量, 在此表示衷心感谢!

陈积圣 教授

中山大学孙逸仙纪念医院肝胆外科

崔立红 副教授

中国人民解放军海军总医院消化内科

崔莲花 副教授

青岛大学医学院公共卫生系

范学工 教授

中南大学湘雅医院感染病科

高润平 教授

吉林大学第一医院肝病科

葛海燕 教授

同济大学附属第十人民医院普通外科

巩鹏 教授

大连医科大学附属第一医院普外二科

顾岩 教授

上海交通大学医学院附属上海第九人民医院外科

黄颖秋 教授

本溪钢铁(集团)有限责任公司总医院消化内科

江学良 主任医师

中国人民解放军济南军区总医院消化科

李华山 主任医师

中国中医科学院广安门医院肛肠科

李勇 副教授

上海中医药大学附属市中医医院消化科

李瑜元 教授

广州市第一人民医院内科

李玉民 教授

兰州大学第一医院普外科

刘占举 教授

同济大学附属第十人民医院胃肠内科

刘正稳 教授

西安交通大学医学院第一附属医院感染科

朴云峰 教授

吉林大学第一临床医院消化科

邱宝安 主任医师

中国人民解放军海军总医院肝胆外科

田晓峰 教授

大连医科大学附属第二医院普通外科

宛新建 副教授

上海市第一人民医院消化内科

王凯 教授

山东大学齐鲁医院肝病科

王石林 主任医师

中国人民解放军空军总医院普通外科

王晓艳 副教授

湖南长沙中南大学湘雅三医院消化内科

魏睦新 教授

南京医科大学第一附属医院中医内科

吴泰璜 教授

山东省立医院肝胆外科

徐可树 教授

华中科技大学同济医学院协和医院消化内科

于颖彦 教授

上海交通大学医学院附属瑞金医院器官移植中心病理室

周士胜 教授

大连大学医学院医学研究中心

周晓武 副主任医师

中国人民解放军空军总医院普通外科

朱传武 主任医师

江苏省苏州市第五人民医院传染科