

免疫靶向纳米药物在肝癌治疗中的应用

黄涛, 秦建民

黄涛, 秦建民, 上海中医药大学附属普陀医院普外科 上海市 200062

秦建民, 副教授, 主要从事肝胆胰脾疾病的外科诊治。

上海市科委纳米专项基金资助项目, No. 1052nm06000

上海市普陀区卫生系统自主创新科研基金资助项目, No. 普科委2010-33

作者贡献分布: 本文综述由黄涛完成; 由秦建民审校。

通讯作者: 秦建民, 副教授, 200062, 上海市, 上海中医药大学附属普陀医院普外科. jianminqin@yahoo.com

电话: 021-62572723-8221

收稿日期: 2011-08-20 修回日期: 2011-12-05

接受日期: 2011-12-15 在线出版日期: 2011-12-18

Application of immunologically targeted nanomedicine in the treatment of liver cancer

Tao Huang, Jian-Min Qin

Tao Huang, Jian-Min Qin, Department of General Surgery, Putuo Hospital Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200062, China
Supported by: the Nano Research Special Fund of the Science and Technology Commission of Shanghai, No. 1052nm06000; and the Health System Research and Innovation Fund of Putuo District of Shanghai, No. Pukewei 2010-33

Correspondence to: Jian-Min Qin, Associate Professor, Department of General Surgery, Putuo Hospital Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200062, China. jianminqin@yahoo.com

Received: 2011-08-20 Revised: 2011-12-05

Accepted: 2011-12-15 Published online: 2011-12-18

Abstract

Liver cancer is a common malignant tumor. If detected at an early stage, liver cancer can be treated by surgery. However, most of cases are diagnosed at advanced stage and can not undergo radical resection. In many alternative therapeutic modalities for liver cancer, immunologically targeted nanomedicine has attracted wider attention because of its slow release, low toxicity and side effect, and good targeting. In this article, we summarize the application of immunologically targeted nanomedicine in the treatment of liver cancer.

Key Words: Immune targeting; Nanomedicine; Liver cancer

Huang T, Qin JM. Application of immunologically

targeted nanomedicine in the treatment of liver cancer. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2011; 19(35): 3557-3561

摘要

肝癌是临床上常见的恶性肿瘤之一, 只有少数患者能早期发现而手术治疗, 相当一部分患者发现时已属晚期只能选择非手术治疗。在诸多的非手术治疗方法中, 免疫靶向纳米药物由于其缓释性好、不良反应低、靶向性强等优点, 已经成为肝癌药物治疗研究的热点之一。本文就近年来免疫靶向纳米药物在肝癌治疗中的应用作一综述。

关键词: 免疫靶向; 纳米药物; 肝癌

黄涛, 秦建民. 免疫靶向纳米药物在肝癌治疗中的应用. 世界华人消化杂志 2011; 19(35): 3557-3561

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/3557.asp>

0 引言

肝癌是临床上最常见的恶性肿瘤之一, 我国发患者数约占全球的55%, 肿瘤相关死亡原因的第2位, 仅29%-47.92%的肝癌患者能够得到早期诊断, 接受手术治疗, 大部分中晚期肝癌只能采用非手术治疗^[1,2]。化疗药物、介入、冷冻等治疗方法是非手术治疗肝癌的重要手段, 但由于原发性肝癌80%以上合并肝硬化, 肝功能差, 化疗药物对肿瘤的选择性不高, 不良反应大, 患者多不能耐受其严重的不良反应, 从而使抗肿瘤药的临床应用受到限制。介入和冷冻等微创治疗肝癌有一定疗效, 但受患者肝功能、肿瘤数目、大小和有无血管、淋巴结转移等因素影响和制约。因此, 研制能够提高肿瘤局部药物浓度, 延长其作用时间, 有效杀灭瘤细胞, 同时减少药物不良反应的抗肿瘤靶向药物, 成为目前肿瘤治疗研究的热门课题。纳米药物的开发为肝癌的治疗开辟了新的途径, 通过纳米粒子控释药物, 可延长药物在肿瘤内的存留时间, 从而在不同细胞周期水平发挥抗肿瘤作用, 明显提高了药物疗效, 显著降低其不良反应。在药物纳米化

■背景资料

由于原发性肝癌80%以上合并肝硬化, 肝功能差, 化疗药物对肿瘤的选择性不高, 不良反应大, 患者多不能耐受其严重的不良反应, 从而使抗肿瘤药的临床应用受到限制。介入和冷冻等微创治疗肝癌有一定疗效, 但受患者肝功能、肿瘤数目、大小和有无血管、淋巴结转移等因素影响和制约。

■同行评议者

吴道澄, 教授, 西安交通大学生命学院

■研发前沿

免疫靶向纳米药物的研制是提高药物肝靶向性、优化药物传输、提高治疗效果的重要手段,已成为肝癌治疗的研究热点,体内外实验研究已初步显示出巨大的应用前景。

基础上,针对肿瘤抗原,对纳米药物进行免疫抗体修饰,制备免疫靶向纳米药物,利用抗原-抗体之间的特异性识别机制发挥主动靶向特定肿瘤细胞,特异性杀灭肿瘤细胞,集纳米药物的特性和免疫抗体的靶向性于一体,不仅提高了药物靶向性,选择性地发挥抗肿瘤作用,而且显著降低了药物对正常组织器官的不良反应,开创了肝癌化疗药物靶向治疗的新途径。

1 免疫脂质体

免疫脂质体(immunoliposomes)是单克隆抗体(monoclonal antibody, mAb, 简称“单抗”)或其片段修饰的脂质体的简称,其对靶细胞具有分子水平上的识别能力,具有很多优势,包括对肿瘤靶细胞呈现明显的选择性杀伤作用,且杀伤活性比游离药物、非特异抗体脂质体、单独单抗等更强:在荷瘤动物体内呈特异性分布,肿瘤病灶药物浓度升高,药物毒不良反应较小;体内循环半衰期长及运载药物最大等。免疫脂质体靶向药物治疗是通过将载药脂质体与抗体直接或间接连于脂质体表面构成,借助抗体与靶细胞表面抗原特异性结合的作用,经接触释放、吸附、吞噬、吞饮及融合等方式,释放出包封的药物,来特异性的杀伤靶细胞,达到治疗肿瘤的目的^[3]。陈鹰等^[4]利用单抗对于原发性肝癌组织中的酸性铁蛋白具有高特异性,制备出多柔比星聚氨基丙烯酸正丁酯毫微粒,再采用磷脂双分子层包裹得到多柔比星磷脂纳米粒,将抗酸性铁蛋白单克隆抗体(McAb-PAF)与其相连,制备肝癌特异性多柔比星免疫磷脂纳米粒,粒径为97.2 nm,抗体结合率78.8%。体外细胞毒实验及裸鼠体内抑瘤实验均表现出强的靶向性,与普通脂质体相比,其体内药物消除半衰期大大延长,在肝肿瘤中药物分布明显增加,对心脏、肾等组织的毒性明显减小。

2 单抗偶联物

自1975年单克隆抗体首次被发现可以与肿瘤细胞的抗原结合治疗肿瘤后,极大地促进了靶向药物的发展,单克隆抗体导向治疗以其高度特异性、对正常组织损害较轻的特点,使免疫偶联物的毒性大大降低,进而提高了抗肿瘤疗效,使其在恶性肿瘤的治疗中备受瞩目,一些导弹药物已经显示出在临床前研究模型中特异性的抗肿瘤活性^[5,6]。单克隆抗体具有靶点特异性高、不良反应低、治疗依从性好特点,可有效

携带化疗药物、放射性物质、毒素等偶联物,对表达有关抗原的肿瘤细胞具有选择性杀伤作用,而对抗原性无关细胞的作用弱或无作用,选择性杀伤作用是单抗药物用于肿瘤治疗的重要基础^[7]。

2.1 化学免疫偶联物 将细胞毒性化疗药物通过化学、生物方法与单抗偶联,利用抗原抗体特异性结合的能力,将其“精确”地运送到靶细胞,不仅有效地提高肿瘤局部的药物浓度,而且极大地降低药物在体内其他组织、器官的浓度,从而起到增效减毒的作用。阚和平等^[8]使用抗人肝癌单克隆抗体HAb18与载阿霉素(ADM)的人血清白蛋白毫微粒[HSA(ADM)-NS]偶联,制备成抗人肝癌免疫毫微粒[HAb18-HSA(ADM)-NS],体内外分别应用HAb18-HSA(ADM)-NS、HSA(ADM)-NS和ADM制剂,体外细胞毒性实验结果显示HAb18-HSA(ADM)-NS具有单抗活性,能与肝癌细胞特异结合,其体外杀伤SMMC-7721肝癌细胞的 IC_{50} 为44.6 $\mu\text{g/mL}$,与HSA(ADM)-NS(IC_{50} 为345.5 $\mu\text{g/mL}$)、ADM(IC_{50} 为365.5 $\mu\text{g/mL}$)相比,明显降低;HAb18-HSA(ADM)-NS体内肿瘤抑制率比HSA(ADM)-NS及ADM明显增强($P<0.001$)。肝癌对体外化疗药物敏感性试验发现对肝癌敏感性最高的是泰素(PTX)^[9],阚和平等^[10]用异型双功能交联剂N-琥珀酰亚胺基3-(2-吡啶基二硫)丙酸酯(SPDP),将抗人肝癌单克隆抗体HAb18与载PTX人血清白蛋白NS偶联,制成免疫毫微粒HAb18-HSA(PTX)-NS,体外细胞试验表明HAb18-HSA(PTX)-NS具有对靶细胞的特异杀伤性,杀伤SMMC-7721细胞 IC_{50} 值为46.9 $\mu\text{g/mL}$,与HSA(PTX)-NS(356.5 $\mu\text{g/mL}$)及PTX(378.3 $\mu\text{g/mL}$)相比,明显降低,比PTX具有更强大的杀伤肿瘤细胞的活性。人肝癌裸鼠治疗结果显示HAb18-HSA(PTX)-NS具有单抗活性,能与肝癌细胞特异结合,选择性地集中于肝癌组织,体内肿瘤抑制率比HSA(PTX)-NS及PTX显著增强($P<0.001$)。表明体内应用时, HAb18-HSA(PTX)-NS由于主动靶向作用,使肝癌组织较长时间处于有效的药物浓度中,与单用化疗药物PTX相比具有更强的杀伤活性,是一种有效的肝癌靶向治疗制剂。

刘晓波等^[11]采用异型双功能交联剂SPDP将人肝癌单抗HAb18与载米托蒽醌的白蛋白毫微粒化学偶联,体外试验证明抗体与载药毫微粒偶联及免疫毫微粒能特异性结合并杀伤靶细胞

SMMC-7721人肝癌株, 并认为HAb18-DHAQ-BSA-NP选择性杀伤人肝癌细胞有以下可能途径: 免疫毫微粒缓慢释药, 药物在靶细胞周围形成局部高浓度, 药物扩散入胞内, 产生杀伤效应, 免疫毫微粒如同免疫脂质体经“内化”入靶细胞内, 在胞内释药产生杀伤作用。

Wu等^[12]制备的肝癌特异性免疫纳米粒, 是高特异性的抗人肝癌酸性同功铁蛋白单克隆抗体同多柔比星-聚氰基丙烯酸正丁酯纳米粒相结合, 动物体内实验表明该免疫纳米粒药物半衰期明显延长, 药物大部分聚集在肝肿瘤中, 对其他脏器毒性大大降低, 显示出了强靶向性及其对其他脏器的低毒性。

多药耐药(MDR)是导致肿瘤化疗失败的重要原因, 其产生机制复杂, 但其基因(MDRI)及其编码的细胞膜p2糖蛋白(pgp)表达增加是MDR产生的最重要原因。pgp是一种腺苷三磷酸依赖的“药泵”, 能将细胞内的药物泵出胞外, 使胞内药物量降低而无法达到对肿瘤的有效杀伤^[13,14]。李云春等^[15]在研究抗人肝癌单克隆抗体HAb18为导向载体的阿霉素(ADM)人体白蛋白(HSA)免疫毫微粒HAb18-ADR-HAS-NP抗肝癌作用时发现, HAb18-ADR-HAS-NP能够在SMMC-7721/MDR⁺肝癌细胞表面结合并内化, 该内化作用由HAb18抗体介导, 能增强SMMC-7721/MDR⁺肝癌细胞对ADM杀伤的敏感性, 可能与免疫毫微粒通过内化进入细胞, 避免了细胞膜上pgp的作用, 在胞内释药从而杀伤MDR细胞有关。

以肝癌相关性抗原甲胎蛋白(alpha-fetal protein, AFP)作为治疗肝癌的靶目标^[16], 由于抗体的抗原性主要存在于其Fc段, 因此以去掉Fc段的F(ab')₂或Fab段为导向载体可降低人抗鼠抗体(HAMA)反应^[17]。李云春等^[18]用抗人肝癌特异性单抗HAb18的F(ab')₂片段为导向载体, 采用改进的SPDP法将其与ADR-HAS-NP-偶联, 制备免疫毫微粒HAb18F(ab')₂-ADR2HSA-NP。研究发现HAb18F(ab')₂-ADR-HAS-NP在体外不但能有效特异性靶向结合人肝癌细胞, 而且能通过抗人肝癌单克隆抗体HAb18的F(ab')₂片段介导特异性杀伤肝癌细胞, 为肝癌的免疫治疗提供了新的途径。

2.2 生物毒素偶联物 生物毒素对细胞具有强烈的杀伤作用, 但其杀伤作用没有选择性, 对正常细胞伤害很大, 通过基因工程技术将生物毒素与单克隆抗体融合^[19], 不仅能够有效降低整个融合分子的大小, 增加其对肿瘤组织的穿透力, 提

高靶向定位杀伤肿瘤细胞作用, 而且能够极大降低生物毒素对正常细胞的杀伤作用。Yang等^[20]将HAb18F(ab')₂片段作为载体与葡萄球菌肠毒素A偶联, 结果发现大多数肝癌细胞的细胞质和(或)细胞膜均呈阳性, HAb18F(ab')₂与葡萄球菌肠毒素A偶联物对外周血单核细胞有促进生长作用, 为葡萄球菌肠毒素A应用于肝癌免疫靶向治疗提供了理论依据。

2.3 放射性元素偶联物及免疫磁性纳米微粒 利用对肿瘤具有特异性亲和力的抗体作为载体, 携带高活性放射性核素或磁性纳米微粒, 借助放射性核素的电离辐射作用于DNA分子, 导致其损伤或断裂, 他在生物体内电离水分子可产生自由基, 自由基再损伤生物大分子, 导致细胞损伤, 或以外加磁场, 使药物有效成分在肿瘤组织聚集, 从而达到杀伤肿瘤细胞或抑制其生长的目的。谭家驹^[21]制备了具有生物-磁双重靶向作用的¹⁸⁸Re免疫(Hepama-1)磁性纳米微粒, 具有良好的磁感应性能、免疫活性及明显的肝靶向性, 在磁场作用下肝靶向性增强, 对SMMC-7721肝癌细胞的抑制作用优于单纯¹⁸⁸ReO₄-或¹⁸⁸Re-Hepama-1。陈璟等^[22]通过研制¹³¹I标记抗血管内皮生长因子单克隆抗体Sc-7269和葡聚糖磁性纳米颗粒复合物(¹³¹I-Sc-7269-DMN), 于荷人肝癌裸鼠肿瘤部位体表持续设置磁场, 分别经瘤内注射或尾静脉注射¹³¹I-Sc-7269-DMN(约0.74 MBq)。结果显示¹³¹I-Sc-7269-DMN组肿瘤生长延迟时间(TGD)为13.3 d ± 3.3 d, 肿瘤抑制率为89.0%, 与其他组相比差异有显著性(*P* < 0.05)。表明以磁导向¹³¹I-Sc-7269-DMN瘤内注射治疗荷人肝癌裸鼠安全、有效, 磁场诱导的以DMN为载体的放射免疫治疗具有高靶向性、安全和高效特点。冯彦林等^[23]等通过动物实验研究人肝癌¹⁸⁸Re-免疫(Hepama-1)磁性纳米微粒生物学作用, 结果显示¹⁸⁸Re-免疫磁性纳米微粒在肝内摄取量最大, 磁区肝组织放射性较非磁区肝组织明显增加, 二者的放射性比值为137, 表明¹⁸⁸Re-免疫磁性纳米微粒具有良好的磁感应性能、免疫活性及明显的肝靶向性, 为原发性肝癌的生物磁靶向放射治疗展示了美好的应用前景。

3 前体药物

前体药物与酶-单克隆抗体形成偶联物用于肿瘤的靶向治疗, 被称作抗体导向酶的前体药物疗法(antibody-directed enzyme pro-drug therapy,

■ 相关报道

冯彦林等通过动物实验研究人肝癌¹⁸⁸Re-免疫(Hepama-1)磁性纳米微粒生物学作用, 表明¹⁸⁸Re-免疫磁性纳米微粒具有良好的磁感应性能、免疫活性及明显的肝靶向性, 为原发性肝癌的生物磁靶向放射治疗展示了美好的应用前景。

■应用要点

纳米药物的开发为肝癌的治疗开辟了新的途径,通过纳米粒子控释药物,可延长药物在肿瘤内的存留时间,从而在不同细胞周期水平发挥抗肿瘤作用,明显提高了药物疗效,显著降低其不良反应。

ADEPT), 该方法开拓了靶向抗癌药物研究的新方向。

纳米微粒具有结合、浓缩DNA及RNA和将他们高效导入各种细胞的能力,其表面正电荷与核苷酸带负电的磷酸根发生静电作用,形成纳米载体与质粒DNA的复合物。纳米颗粒表面耦联特异性的靶向分子,如特异性抗体或单克隆抗体等,通过靶向性分子与细胞表面特异性受体结合,在细胞摄粒作用下,使基因进入细胞内,达到安全有效的靶向性基因转染。Eichman等^[24]研制出一种具有纳米结构的树突状多聚体,将装载DNA的树状聚合体注入组织后,以细胞内吞作用方式进入细胞,使DNA分子释放出来,进入细胞核,实现基因的整合。其携带的DNA在较大PH值范围内和不同缓冲条件的水溶液中稳定存在长达几周。陈汝福等^[25]制备以纳米微粒PBLG-PEG(聚乙二醇-聚谷氨酸苄酯共聚物)为载体含热休克蛋白70启动子的HSV-TK/CD双自杀基因质粒,将HSV-TK/CD双自杀基因靶向转染肝癌细胞,通过局部加热,选择性诱导HSV-TK/CD在肿瘤局部表达,代谢前体药物(5-FC和GCV)成细胞毒药物,进一步杀伤肿瘤细胞,从而提高自杀基因治疗肝癌的靶向性和疗效。

在纳米颗粒的表面耦联特异性抗体或单克隆抗体,利用肿瘤细胞表面特异性表达的受体或蛋白是解决靶向性的最常用方法。Gaucheron J^[26]等利用唾液酸糖蛋白ASGP能与肝细胞上去唾液酸糖蛋白受体特异性结合,用脂质体转染法将含有半乳糖残基的DNA复合物转染入表达ASGP受体的人肝癌细胞HepG2及不表达ASGP受体的肺Ⅱ型上皮细胞A549,结果发现只有表达ASGP受体的肝癌细胞发生了特异受体介导的DNA内吞作用。Reynolds等^[27]以耦联有特异性基因表达调控元件整合蛋白 $\alpha v \beta 3$ 受体的多聚阳离子脂质体纳米微粒作为基因转运载体,以抗血管生成的ATP μ -Raf基因为治疗基因,静脉应用此纳米微粒后使荷瘤小鼠肿瘤组织中内皮细胞凋亡,抑制原发肿瘤及转移瘤的生长,为肿瘤靶向基因治疗提供理论基础。

4 结论

随着纳米技术的发展,以及分子生物学和分子药理学对肝脏疾病本质和作用机制的阐释,免疫靶向纳米药物的研制是提高药物肝靶向性、优化药物传输、提高治疗效果的重要手段,已成为肝癌治疗的研究热点,体内外实验研究已

初步显示出巨大的应用前景。但是免疫靶向纳米药物临床应用于肝癌的治疗,还存在一定的距离,仍需要进行深入的基础理论、实验和临床研究。如免疫靶向纳米药物对实体瘤的穿透性差、肿瘤组织的异质性、载药量较小及稳定性较差、病变组织细胞表面抗原或受体的异质性等^[28]。如何进一步改变免疫靶向纳米药物的单一分子靶向对肝癌细胞治疗产生耐药性,提高对实体瘤的穿透性、药物靶向能力和稳定性,发现新的肝靶向特异性分子,设计同时阻断促进细胞增殖不同路径的药物及不同结合靶点的药物联合应用等一系列问题,是免疫靶向纳米药物在肝癌治疗应用中最具挑战性的重要课题之一。相信随着上述问题的逐步深入与解决,免疫靶向纳米药物将成为肝癌治疗的重要方法。

5 参考文献

- 1 Cha CH, Ruo L, Fong Y, Jarnagin WR, Shia J, Blumgart LH, DeMatteo RP. Resection of hepatocellular carcinoma in patients otherwise eligible for transplantation. *Ann Surg* 2003; 238: 315-321; discussion 321-323
- 2 Yin ZY, Wang XM, Yu RX, Zhang BM, Yu KK, Li N, Li JS. Total vascular exclusion technique for resection of hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2003; 9: 2194-2197
- 3 莫方芬, 邓盛齐. 新型药物载体免疫脂质体的研究进展. *中国抗生素杂志* 2011; 36: 249-254
- 4 陈鹰, 汛初, 黄威. 肝癌特异性多柔比星免疫磷脂纳米粒的实验研究. *中国药师* 2002; 5: 712-714
- 5 顾觉奋. 抗肿瘤微生物药物的研究进展. *中国抗生素杂志* 2009; 34: 70-81
- 6 范鸣. 抗乳腺癌药曲妥珠单抗-DM1. *药学进展* 2010; 34: 428-429
- 7 马玲娟, 严俊, 张晓莉. 单克隆抗体耦联物治疗肿瘤的研究与进展. *国际检验医学杂志* 2010; 31: 1142-1144
- 8 阚和平, 刘正军, 谭永法. 抗人肝癌免疫毫微球的制备及其抗癌效果观察. *南方医科大学学报* 2008; 28: 1503-1505
- 9 陈涛, 褚忠华, 刘建平, 王捷, 赵海燕, 区庆嘉. 体外化疗药物敏感实验对指导原发性肝癌个体化治疗的临床意义. *癌症* 2005; 24: 1018-1022
- 10 阚和平, 谭永法, 李春芳. 泰素免疫毫微球的制备及其抗人肝癌效果的动物实验研究. *现代消化及介入诊疗* 2010; 15: 227-229
- 11 刘晓波, 蔡美英. 抗人肝癌免疫毫微球的制备及体外免疫学性质的鉴定. *中国免疫学杂志* 2000; 16: 262-265
- 12 Wu J, Nantz MH, Zern MA. Targeting hepatocytes for drug and gene delivery: emerging novel approaches and applications. *Front Biosci* 2002; 7: d717-d725
- 13 Flens MJ, Zaman GJ, van der Valk P, Izquierdo MA, Schroeijers AB, Scheffer GL, van der Groep P, de Haas M, Meijer CJ, Scheper RJ. Tissue distribution of the multidrug resistance protein. *Am J Pathol* 1996; 148: 1237-1247
- 14 Cuvier C, Roblot-Treupel L, Millot JM, Lizard G, Chevillard S, Manfait M, Couvreur P, Poupon MF. Doxorubicin-loaded nanospheres bypass tumor cell multidrug resistance. *Biochem Pharmacol* 1992; 44:

- 509-517
- 15 李云春, 蔡美英, 刘晓波. 单抗导向阿霉素免疫毫微粒抗肝癌作用的机制. 中国药理学通报 2001; 17: 463-466
- 16 张利旺, 张红梅, 贾军. 以AFP为靶点的肝癌树突状细胞免疫治疗的实验研究. 现代肿瘤医学 2005; 13: 736-739
- 17 Carrasquillo JA, Krohn KA, Beaumier P, McGuffin RW, Brown JP, Hellström KE, Hellström I, Larson SM. Diagnosis of and therapy for solid tumors with radiolabeled antibodies and immune fragments. *Cancer Treat Rep* 1984; 68: 317-328
- 18 李云春, 蔡美英, 王仲琼. 单抗F(ab')₂段导向抗肝癌阿霉素免疫毫微粒球的制备及其体外杀伤癌细胞作用. 华西医学报 2002; 33: 8-11
- 19 申苏建, 吴金明, 金思思, 黄智铭, 吴建胜. 免疫毒素EGFR mab-RTA的制备及鉴定. 中国生物制品学杂志 2010, 23: 510-513
- 20 Yang LJ, Sui YF, Chen ZN. Preparation and activity of conjugate of monoclonal antibody HAb18 against hepatoma F(ab')(2) fragment and staphylococcal enterotoxin A. *World J Gastroenterol* 2001; 7: 216-221
- 21 谭家驹. <'188>Re-抗人肝癌免疫磁性纳米药物的制备与生物学效应研究. 中南大学 2007
- 22 陈璟, 韩德艳, 谢长生, 吴华. 磁导向¹³¹I-Sc-7269-DMN治疗荷人肝癌裸鼠的实验研究. 中华核医学杂志 2004; 24: 336-339
- 23 冯彦林, 谭家驹, 梁生, 孙静, 温广华, 吴校, 夏姣云. 抗人肝癌¹⁸⁸Re-免疫磁性纳米微粒的生物学分布和肿瘤细胞抑制实验. 国际放射医学核医学杂志 2007; 31: 321-324, 328
- 24 Eichman JD, Bielinska AU, Kukowska-Latallo JF, Baker JR. The use of PAMAM dendrimers in the efficient transfer of genetic material into cells. *Pharm Sci Technol Today* 2000; 3: 232-245
- 25 陈汝福, 陈积圣. 纳米技术在肿瘤诊断与治疗中的应用. 癌症 2004; 23: 1714-1716
- 26 Gaucheron J, Santaella C, Vierling P. In vitro gene transfer with a novel galactosylated spermine bola-amphiphile. *Bioconjug Chem* 2001; 12: 569-575
- 27 Reynolds AR, Moein Moghimi S, Hodivala-Dilke K. Nanoparticle-mediated gene delivery to tumour neovasculature. *Trends Mol Med* 2003; 9: 2-4
- 28 黄容琴, 裴元英. 主动肿瘤靶向给药系统的研究进展. 中国医药工业杂志 2005; 36: 505-510

编辑 李军亮 电编 闫晋利

■同行评价

本文综述了免疫靶向纳米药物在肝癌治疗中的应用, 包括免疫脂质体、单克隆抗体偶联物和前体药物3个方面, 描述了该领域研究的现状和发展, 对存在的问题与发展前景进行了展望, 具有一定的价值。

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

• 消息 •

《世界华人消化杂志》性质、刊登内容及目标

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

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

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

《世界华人消化杂志》的目标是出版高质量的胃肠病学和肝病领域的专家评论及临床实践和基础研究相结合具有实践意义的文章, 为内科学、外科学、感染病学、中医学、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。

5-Aza-dC及TSA对人胃癌细胞株SGC-7901 Runx3基因甲基化及表达水平的影响

方中良, 沈干, 胡世莲, 孙玉蓓, 徐维平, 黄大兵, 姜晓东, 王海, 黄毕林

■背景资料

胃癌是全球发病率最高的癌症之一, 每年新发病例近百万, 其中约2/3的患者来自发展中国家, 仅中国就占到42%, 目前普遍认为表观遗传学改变是继遗传学改变之外, 与胃癌的发生发展和治疗具有密切关系的另一重要机制。

方中良, 沈干, 胡世莲, 王海, 黄毕林, 安徽医科大学附属安徽省立医院老年医学科 安徽省合肥市 230001

孙玉蓓, 黄大兵, 姜晓东, 安徽医科大学附属安徽省立医院肿瘤科 安徽省合肥市 230001

徐维平, 安徽省循证医学中心 安徽省合肥市 230001

方中良, 在读硕士, 主要从事老年肿瘤疾病相关研究。

国家自然科学基金资助项目, No. 81071808

安徽省卫生厅基金资助项目, No. 09A083

作者贡献分布: 此课题由沈干与胡世莲设计; 研究过程由方中良、孙玉蓓、徐维平、黄大兵、姜晓东、王海及黄毕林操作完成; 研究所用试剂及分析工具由胡世莲提供; 数据分析由方中良完成; 本论文写作由方中良与沈干完成。

通讯作者: 沈干, 教授, 230001, 安徽省合肥市庐江路17号, 安徽医科大学附属医院安徽省立医院老年医学科, shenganbjw@126.com
电话: 0551-2283589

收稿日期: 2011-09-23 修回日期: 2011-10-28

接受日期: 2011-11-04 在线出版日期: 2011-12-18

Effect of 5-Aza-2'-deoxycytidine and trichostatin A on expression and methylation of the Runx3 gene in human gastric carcinoma line SGC-7901

Zhong-Liang Fang, Gan Shen, Shi-Lian Hu, Yu-Bei Sun, Wei-Ping Xu, Da-Bing Huang, Xiao-Dong Jiang, Hai Wang, Bi-Lin Huang

Zhong-Liang Fang, Gan Shen, Shi-Lian Hu, Da-Bing Huang, Hai Wang, Bi-Lin Huang, Department of Geriatrics, Anhui Provincial Hospital, Anhui Medical University, Hefei 230001, Anhui Province, China

Yu-Bei Sun, Da-Bing Huang, Xiao-Dong Jiang, Department of Oncology, Anhui Provincial Hospital, Anhui Medical University, Hefei 230001, Anhui Province, China

Wei-Ping Xu, Anhui Evidence-based Medicine Center, Hefei 230001, Anhui Province, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 81071808; and the Foundation of Anhui Health Bureau, No. 09A083

Correspondence to: Gan Shen, Professor, Department of Geriatrics, Anhui Provincial Hospital, Anhui Medical University, Hefei 230001, Anhui Province, China. shenganbjw@126.com

Received: 2011-09-23 Revised: 2011-10-28

Accepted: 2011-11-04 Published online: 2011-12-18

Abstract

AIM: To evaluate the effect of 5-Aza-2'-deoxycytidine (5-Aza-dC) and trichostatin A (TSA) on the methylation and expression of the Runx3

gene in human gastric cancer cell line SGC-7901.

METHODS: After cultured SGC-7901 cells were treated with 5-Aza-dC and TSA, the methylation levels of the promoter region of the Runx3 gene were detected by quantitative real-time methylation-specific polymerase chain reaction (QMSP), and Runx3 mRNA and protein expression was detected by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and Western blotting, respectively.

RESULTS: Treatment with 5-Aza-dC or TSA alone reduced the methylation levels of the promoter region of the Runx3 gene (70%, 63% vs 100%) and increased Runx3 mRNA (0.29 ± 0.01 , 0.28 ± 0.03 vs 0.14 ± 0.03 , both $P < 0.05$) and protein expression levels (0.35 ± 0.02 , 0.37 ± 0.02 vs 0.09 ± 0.01 , $P < 0.05$) compared to control cells. Treatment with 5-Aza-dC in combination with TSA could more significantly reduce Runx3 gene promoter methylation levels (37%) and increase Runx3 mRNA (0.45 ± 0.02) and protein expression levels (0.50 ± 0.01) compared to cells treated with 5-Aza-dC or TSA alone (all $P < 0.05$).

CONCLUSION: 5-Aza-dC and TSA can synergistically reverse Runx3 gene methylation and recover Runx3 mRNA and protein expression in SGC-7901 cells.

Key Words: Gastric carcinoma; Methylation; 5-Aza-2'-deoxycytidine; Trichostatin A; Runx3

Fang ZL, Shen G, Hu SL, Sun YB, Xu WP, Huang DB, Jiang XD, Wang H, Huang BL. Effect of 5-Aza-2'-deoxycytidine and trichostatin A on expression and methylation of the Runx3 gene in human gastric carcinoma line SGC-7901. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(35): 3562-3567

摘要

目的: 探讨5-Aza-dC及TSA对人胃癌细胞系SGC-7901中抑癌基因Runx3启动子区甲基化、mRNA及蛋白表达水平的影响。

■同行评议者

陈国忠, 副主任医师, 广西中医学院第一附属医院消化内科

方法: 单独或联合应用5-Aza-dC及TSA处理体外培养的SGC-7901细胞, 提取各组细胞的DNA、RNA及蛋白质, 应用甲基化特异性定量PCR法(QMSP)检测Runx3基因启动子区甲基化状态, 逆转录PCR法(RT-PCR)检测Runx3 mRNA的表达, 免疫印迹法(Western blotting)法检测Runx3蛋白表达水平。

结果: 5-Aza-dC和TSA均能降低Runx3基因启动子区的甲基化水平(5-Aza-dC组及TSA组分别为对照组的0.70倍、0.63倍), 提高mRNA表达水平(0.29 ± 0.01 、 0.28 ± 0.03 vs 0.14 ± 0.03 , $P < 0.05$)及蛋白表达水平(0.35 ± 0.02 、 0.37 ± 0.02 vs 0.09 ± 0.01 , $P < 0.05$); 与单独使用5-Aza-dC和TSA相比, 两药联合组Runx3基因启动子区甲基化水平(对照组的0.37倍)及mRNA表达水平(0.45 ± 0.02)和蛋白表达水平(0.50 ± 0.01)均较单药组效果更明显($P < 0.05$)。

结论: 5-Aza-dC和TSA均能逆转胃癌细胞SGC-7901 Runx3基因的甲基化水平, 恢复其mRNA和蛋白表达, 且具有协同作用, 为5-Aza-dC和TSA应用于胃癌的临床治疗提供了试验依据。

关键词: 胃癌; 甲基化; 5-氮杂-2'-脱氧胞苷; 曲古抑菌素A; Runx3

方中良, 沈干, 胡世莲, 孙玉菡, 徐维平, 黄大兵, 姜晓东, 王海, 黄毕林. 5-Aza-dC及TSA对人胃癌细胞株SGC-7901 Runx3基因甲基化及表达水平的影响. 世界华人消化杂志 2011; 19(35): 3562-3567

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/3562.asp>

0 引言

流行病学调查显示胃癌是全球发病率最高的恶性肿瘤之一, 且是第2大癌症致死病因^[1,2]。在我国每年有40万新发胃癌患者, 每3 min就有1人死于胃癌, 其患病率和死亡率均高于世界平均水平, 严重危害我国人民的身体健康^[3]。目前针对胃癌患者的治疗手段主要有手术治疗和化疗药物治疗: 大部分患者发现时已处于胃癌中晚期, 手术效果欠佳; 常规化疗药物也只对部分患者有效, 仍有相当比例患者对其不敏感, 且具有严重的不良反应。大量相关研究证明DNA甲基化在胃癌的发生发展过程中起到重要作用, 其中抑癌基因启动子区异常甲基化导致的抑癌基因失活参与了胃癌的发生发展^[4-8], 由于抑癌基因的异常甲基化具有可逆性^[25-27], 因此应用相关药物逆转抑癌基因的异常甲基化状态, 使其

重新表达从而发挥抑癌基因的作用具有重要的临床意义。我们通过研究药物干预对胃癌细胞系SGC-7901中Runx3基因启动子区甲基化状态及其mRNA和蛋白表达水平的影响, 探讨去甲基化药物5-氮杂-2'-脱氧胞苷(5-Aza-2'-deoxycytidine, 5-Aza-dC)和组蛋白去乙酰化酶抑制剂曲古抑菌素A(Trichostatin A, TSA)在胃癌细胞系SGC7901中对Runx3基因甲基化、mRNA及蛋白表达水平的影响, 为5-Aza-dC和TSA应用于胃癌的临床治疗提供试验依据。

1 材料和方法

1.1 材料 胃癌细胞系SGC-7901由安徽医科大学分子生物学实验室赠予, RPMI1640培养基和胎牛血清为GIBCO公司产品, 5-Aza-dC及TSA为Sigma产品, DNA提取试剂盒购自TIANGEN公司, DNA修饰试剂盒(BisulFlash DNA Modification Kit)为GEPiGENTeK公司产品, QMSP所需的Real Time PCR试剂为TAKARA公司产品, RNA抽提试剂TRIzol为Invitrogen公司产品, RT-PCR试剂盒为Promega公司产品, Taq酶及dNTP均为Fermentas公司产品, 引物及探针的合成由TAKARA公司完成, Runx3兔抗人多克隆抗体购自博奥森生物技术有限公司, β -Actin一抗、二抗为北京中杉金桥公司产品。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养及药物干预: 将胃癌细胞SGC-7901接种于含100 mL/L的胎牛血清的RPMI 1640培养基中, 在37 °C, 50 mL/L CO₂的培养箱中培养。取对数生长期细胞分为以下4组: (1)对照组: 不加药; (2)5-Aza-dC组: 在5-Aza-dC浓度为5 μ mol/L的培养基中培养72 h; (3)TSA组: 在TSA浓度为300 nmol/L的培养基中培养24 h; (4)5-Aza-dC+TSA组: 在5-Aza-dC浓度为5 μ mol/L的培养基中培养48 h后再加TSA 300 nmol/L培养24 h。

1.2.2 甲基化特异性定量PCR法分析各组细胞中Runx3基因甲基化状态: 按DNA提取试剂盒说明书提取各组细胞的DNA, 用紫外分光光度计检测DNA的纯度和浓度, 并用琼脂糖凝胶电泳检测; 用BisulFlash DNA Modification Kit对DNA进行修饰, 引物和探针(表1), 在ABI 7500定量PCR仪上扩增, 扩增条件为: 95 °C 30 s, 然后95 °C 5 s、60 °C 34 s扩增50个循环, 各组细胞的目的基因和内参基因分别做3个复孔, 用相对定量法中的 $\Delta\Delta$ Ct法对各组细胞中Runx3基因甲

■ 研发前沿

随着人类对胃癌个体化治疗认识的深入, 抑癌基因甲基化与肿瘤病人对化疗药物敏感性之间的机制研究逐渐成为肿瘤患者个体化治疗领域研究的热点之一, 甲基化水平的监测和逆转为进一步探索靶向及个体化治疗提供了一个新的可能的突破点。

■相关报道

有研究证实decitabine能够逆转胃癌细胞系中RASSF1A基因的甲基化水平,并且HDACs抑制剂与decitabine联用能协同逆转RASSF1A基因的甲基化状态和mRNA表达水平,较单一应用decitabine的作用显著增强。

表 1 QMSP所需的引物和探针序列

基因	QMSP所需引物及探针序列 (5'-3')	
Runx3 ^[9]	Forward Primer	CGTTCGATGGTGGACGTGT
	Reverse Primer	GACGAACAACGTCTTATTACAACGC
	Probe	FAM-CGCACGAACTCGCCTACGTAATCCG-TAMRA
β-Actin ^[10]	Forward Primer	TGGTGATGGAGGAGGTTTAGTAAGT
	Reverse Primer	AACCAATAAACCTACTCTCCCTTAA
	Probe	FAM-ACCACCACCCAACACACAATAACAAACACA-TAMRA

表 2 Runx3及β-Actin基因RT-PCR所需引物序列及反应条件

基因	Forward Primer(5'-3')	Reverse Primer(5'-3')	产物大小(bp)	退火温度(°C)	循环数
Runx3 ^[11]	CAGAAGCTGGAGGACCAGAC	TCGGAGAATGGGTTTCAGTTC	179	52	35
β-Actin ^[12]	TGGCACCCAGCACAATGAA	CTAAGTCATAGTCCGCCTAGAAGCA	186	52	35

基化水平进行分析(甲基化水平的平均相对含量 = 加药组/对照组 = $2^{-\Delta\Delta C_t}$).

1.2.3 逆转录PCR法分析各组细胞中Runx3基因mRNA的表达: 按TRIzol试剂盒说明书方法提取各组细胞的总RNA, 用PROMEGA试剂盒将其逆转录为cDNA, Runx3及β-Actin基因的引物由TAKARA公司合成(表2), 按反应条件进行扩增: 95 °C 预变性5 min后, 95 °C 30 s、52 °C 30 s、72 °C 30 s扩增35个循环, 再72 °C 延伸5 min, 结束后用琼脂糖凝胶电泳验证试验结果, 并使用Quantity One软件分析Runx3基因与β-Actin基因目的条带灰度值的比值, 重复实验3次并计算各组灰度值比值的mean±SD作为Runx3 mRNA表达水平的结果。

1.2.4 免疫印迹法分析各组细胞中Runx3基因蛋白的表达: 收集各组细胞按方法提取蛋白, 采用BCA蛋白浓度测定试剂盒测定蛋白浓度. 取调节后的蛋白加上样缓冲液煮沸5 min使其充分变性. 用15%SDS-PAGE凝胶电泳, 恒压15 V半干转膜30 min后, 将凝胶上的蛋白转移至PVDF膜上. 用50 g/L脱脂奶粉室温封闭PVDF膜1 h, 加入一抗稀释液(1:500稀释)4 °C孵育过夜, 第2天用TBST漂洗PVDF膜8 min×4次, 加入二抗稀释液(1:5000)37 °C孵育1 h, 第2天用TBST漂洗PVDF膜8 min×4次. 采用辣根过氧化物酶HRP-ECL发光法曝光. 使用Bio-Rad凝胶图像处理系统分析结果, 以Runx3蛋白与β-Actin蛋白条带灰度值比值作为Runx3蛋白的相对表达水平。

统计学处理 采用SPSS13.0软件进行统计分析, mRNA及蛋白表达结果以mean±SD的形式表示, 2组均数的比较采用t检验, $P<0.05$ 为差异

有统计学意义。

2 结果

2.1 各组细胞中Runx3基因启动子甲基化状态以对照组的甲基化水平作为1, 其他3组加药细胞的甲基化水平的平均相对含量与对照组比较: 5-Aza-dC组的甲基化水平为对照组的0.70倍, TSA组的甲基化水平为对照组的0.63倍, 5-Aza-dC+TSA组的甲基化水平为对照组的0.37倍(图1, 表3)。

2.2 各组细胞中Runx3基因mRNA表达 各组细胞中Runx3基因mRNA相对表达量分别为: 对照组: 0.14 ± 0.03 ; 5-Aza-dC组: 0.29 ± 0.01 ; TSA组: 0.28 ± 0.03 ; 5-Aza-dC+TSA组: 0.45 ± 0.02 . 5-Aza-dC组、TSA组、5-Aza-dC+TSA组相对表达量与对照组相对表达量比较, 差异有统计学意义($P<0.05$); 5-Aza-dC组、TSA组相对表达量与5-Aza-dC+TSA组相对表达量比较差异有统计学意义($P<0.05$, 图2, 3)。

2.3 各组细胞中Runx3基因蛋白表达 对照组、5-Aza-dC组、TSA组及5-Aza-dC+TSA组细胞的蛋白表达水平分别为 0.09 ± 0.01 、 0.35 ± 0.02 、 0.37 ± 0.02 、 0.50 ± 0.01 , 对照组蛋白表达水平与其他3组蛋白表达水平比较差异都有统计学意义($P<0.05$), 5-Aza-dC+TSA组蛋白表达水平分别与5-Aza-dC组及TSA组蛋白水平比较差异都有统计学意义($P<0.05$, 图4, 5)。

3 讨论

现代肿瘤学理论认为, 遗传基因缺陷以及基因表观遗传学改变会导致恶性肿瘤的发生. 基因

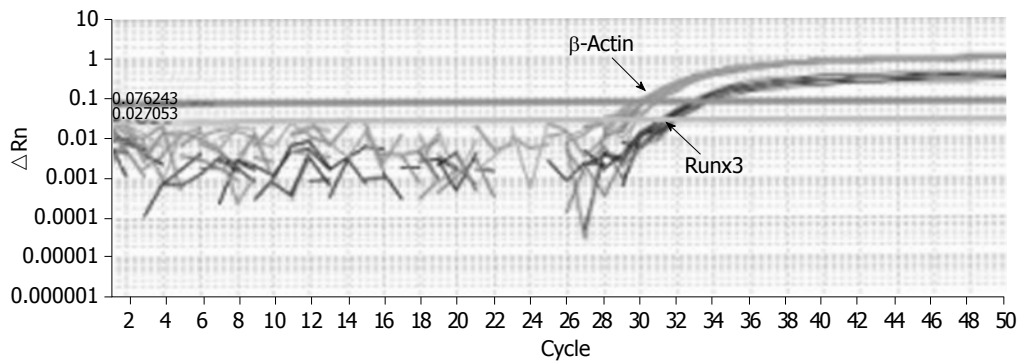


图 1 QMSP法Runx3及β-Actin基因扩增曲线.

■创新盘点

本研究通过QMSP方法检测基因甲基化状态, 使各组细胞Runx3基因的甲基化水平得到直观的展现, 目前此方法在国内研究中尚较少使用。

表 3 各组细胞甲基化水平的相对定量结果

分组	Ct(Runx3)	Ct(β-Actin)	ΔCt	ΔΔCt	2 ^{-ΔΔCt}
对照组	31.28 ± 0.18	30.40 ± 0.20	0.88	0	1
5-Aza-dC组	31.35 ± 0.23	29.96 ± 0.14	1.39	0.51	0.70
TSA组	31.68 ± 0.12	30.13 ± 0.25	1.55	0.67	0.63
5-Aza-dC + TSA组	31.63 ± 0.27	29.31 ± 0.19	2.32	1.44	0.37

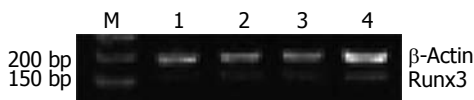


图 2 各组细胞Runx3基因mRNA的表达. M: Marker; 1: 对照组; 2: 5-Aza-dC组; 3: TSA组; 4: 5-Aza-dC + TSA组.

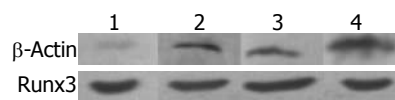


图 4 各组细胞Runx3蛋白表达结果. 1: 对照组; 2: 5-Aza-dC组; 3: TSA组; 4: 5-Aza-dC+TSA组.

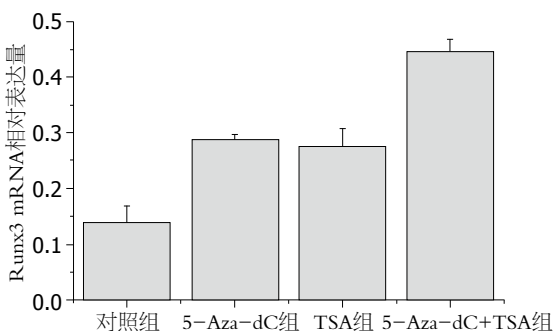


图 3 各组细胞Runx3基因mRNA的相对表达量.

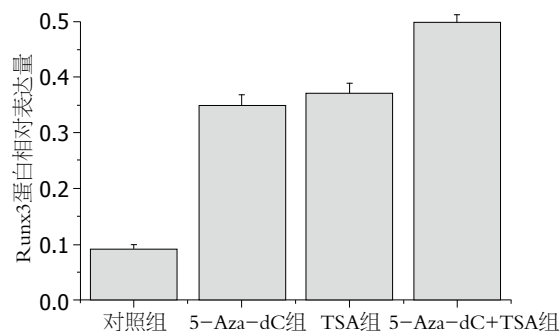


图 5 各组细胞Runx3蛋白的相对表达量.

缺陷如突变、缺失会破坏编码区结构和功能; 表观遗传学改变通过DNA甲基化或组蛋白乙酰化/去乙酰化等自身化学修饰方式的改变来影响转录水平, 进而影响基因表达, 从而调控DNA功能^[13-15]. 胃癌的发生发展是一个多因素参与的过程, 其中涉及表观遗传学改变, 已有大量研究证据表明胃癌的发生与抑癌基因启动子区异常甲基化有关^[16-19]. Runx3是2000年发现的与胃癌等肿瘤密切相关的抑癌基因, 在胃黏膜上皮生长调控过程中起重要作用, 研究显示Runx3基因在胃癌患者中目前发现的杂合性缺失、高甲基化

和点突变等机制均参与了Runx3基因在胃癌中的表达缺失或下调, 其中的Runx3基因启动子区域CpG岛的异常甲基化是导致其在胃癌中失活的主要机制^[20-22].

本课题组前期研究显示Runx3基因启动子区的异常甲基化及蛋白表达与胃癌的分化程度、大小、浸润深度相关^[23,24], 由于抑癌基因的异常甲基化具有可逆性^[25-27], 可以通过相关药物逆转其甲基化状态, 使其恢复表达, 重新发挥抑癌基因作用^[28,29]. 目前去甲基化疗法的药物主要有DNA甲基化转移酶抑制剂5-Aza-dC和组

■应用要点

通过5-Aza-dC及TSA干预胃癌细胞系SGC-7901,检测各加药组细胞中Runx3基因甲基化水平及表达水平并对试验结果进行分析,提示抑癌基因Runx3启动子区甲基化是导致该基因失活的重要原因之一,同时为5-Aza-dC和TSA应用于胃癌的临床治疗提供了实验依据。

蛋白去乙酰基酶抑制剂TSA,本研究结果显示经5-Aza-dC和TSA单独或联合干预后的细胞中Runx3的甲基化水平均显著降低,且联合用药组降低更明显,表明两药联用较单药去甲基化作用强,具有协同作用,可能与DNA去甲基化和组蛋白乙酰化通过甲基结合蛋白相互作用有关^[30]。mRNA表达水平结果显示5-Aza-dC和TSA均能增加Runx3基因mRNA表达水平,两药联合较单药作用明显,表明Runx3 mRNA表达水平与其启动子区甲基化水平相关,5-Aza-dC和TSA能逆转Runx3基因启动子区的异常甲基化状态,使Runx3基因重新表达,从而使Runx3基因重新起到抑癌基因的作用,与国内外研究结果一致^[30,31]。Runx3蛋白表达水平结果显示各加药组mRNA表达水平越高其蛋白表达水平越高,进一步验证了实验结果的可靠性,并且从蛋白表达水平证明了5-Aza-dC和TSA的药效以及两药联合的协调作用。

本研究中QMSP法是目前国际上检测DNA甲基化的较新颖的方法,能够定量检测出Runx3的甲基化水平,使各加药组甲基化状态与mRNA和蛋白表达水平的关系得到直观展现;同时mRNA和蛋白的表达水平随甲基化水平改变而改变,联合用药组较单药组mRNA和蛋白表达水平高,甲基化水平较低组的mRNA和蛋白表达水平越高,表明Runx3基因启动子区甲基化水平与其mRNA和蛋白表达水平相关,进一步验证了Runx3基因异常甲基化是导致该基因失活的机制^[20-22]之一。

总之,5-Aza-dC和TSA均能逆转胃癌细胞系中Runx3基因启动子区异常甲基化水平,提高Runx3基因的mRNA和蛋白表达水平,同时两药联合起到协同作用,增强了单药药效,提示抑癌基因Runx3启动子区异常甲基化是导致该基因失活的重要原因之一,同时为5-Aza-dC和TSA应用于胃癌的临床治疗提供了试验依据。

志谢 感谢唐杨琛、刘林青、吴蕾、靳松、沈建军、沈国栋、徐婷娟、杨雯雯及何国平同志在本试验和论文写作中给予的大力帮助。

4 参考文献

- Krejs GJ. Gastric cancer: epidemiology and risk factors. *Dig Dis* 2010; 28: 600-603
- Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin* 2005; 55: 74-108
- Yang L. Incidence and mortality of gastric cancer in China. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 17-20
- Sato F, Meltzer SJ. CpG island hypermethylation in

- progression of esophageal and gastric cancer. *Cancer* 2006; 106: 483-493
- Esteller M. Epigenetics in cancer. *N Engl J Med* 2008; 358: 1148-1159
- Hsu HS, Chen TP, Hung CH, Wen CK, Lin RK, Lee HC, Wang YC. Characterization of a multiple epigenetic marker panel for lung cancer detection and risk assessment in plasma. *Cancer* 2007; 110: 2019-2026
- Taberlay PC, Jones PA. DNA methylation and cancer. *Prog Drug Res* 2011; 67: 1-23
- Yamashita K, Sakuramoto S, Watanabe M. Genomic and epigenetic profiles of gastric cancer: potential diagnostic and therapeutic applications. *Surg Today* 2011; 41: 24-38
- Cohen Y, Merhavi-Shoham E, Avraham RB, Frenkel S, Pe'er J, Goldenberg-Cohen N. Hypermethylation of CpG island loci of multiple tumor suppressor genes in retinoblastoma. *Exp Eye Res* 2008; 86: 201-206
- Eads CA, Lord RV, Wickramasinghe K, Long TL, Kurumboor SK, Bernstein L, Peters JH, DeMeester SR, DeMeester TR, Skinner KA, Laird PW. Epigenetic patterns in the progression of esophageal adenocarcinoma. *Cancer Res* 2001; 61: 3410-3418
- Yamada C, Ozaki T, Ando K, Suenaga Y, Inoue K, Ito Y, Okoshi R, Kageyama H, Kimura H, Miyazaki M, Nakagawara A. RUNX3 modulates DNA damage-mediated phosphorylation of tumor suppressor p53 at Ser-15 and acts as a co-activator for p53. *J Biol Chem* 2010; 285: 16693-16703
- Liu Y, Zhang W, Zhang X, Qi Y, Huang D, Zhang Y. Arsenic trioxide inhibits invasion/migration in SGC-7901 cells by activating the reactive oxygen species-dependent cyclooxygenase-2/matrix metalloproteinase-2 pathway. *Exp Biol Med (Maywood)* 2011; 236: 592-597
- Baylin SB, Herman JG. DNA hypermethylation in tumorigenesis: epigenetics joins genetics. *Trends Genet* 2000; 16: 168-174
- Vogelauer M, Wu J, Suka N, Grunstein M. Global histone acetylation and deacetylation in yeast. *Nature* 2000; 408: 495-498
- Rodríguez-Paredes M, Esteller M. Cancer epigenetics reaches mainstream oncology. *Nat Med* 2011; 17: 330-339
- Kurkjian C, Kummur S, Murgo AJ. DNA methylation: its role in cancer development and therapy. *Curr Probl Cancer* 2008; 32: 187-235
- 朱新江, 戴冬秋. 表观遗传学与胃肠道肿瘤. *世界华人消化杂志* 2006; 14: 3251-3256
- 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
- Tahara T, Shibata T, Nakamura M, Yamashita H, Yoshioka D, Okubo M, Yonemura J, Maeda Y, Maruyama N, Kamano T, Kamiya Y, Fujita H, Nakagawa Y, Nagasaka M, Iwata M, Hirata I, Arisawa T. Increased number of CpG island hypermethylation in tumor suppressor genes of non-neoplastic gastric mucosa correlates with higher risk of gastric cancer. *Digestion* 2010; 82: 27-36
- 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
- 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
- 22 Fan XY, Hu XL, Han TM, Wang NN, Zhu YM, Hu W, Ma ZH, Zhang CJ, Xu X, Ye ZY, Han CM, Pan WS. Association between RUNX3 promoter methylation and gastric cancer: a meta-analysis. *BMC Gastroenterol* 2011; 11: 92
- 23 Hu SL, Huang DB, Sun YB, Wu L, Xu WP, Yin S, Chen J, Jiang XD, Shen G. Pathobiologic implications of methylation and expression status of Runx3 and CHFR genes in gastric cancer. *Med Oncol* 2011; 28: 447-454
- 24 Hu SL, Kong XY, Cheng ZD, Sun YB, Shen G, Xu WP, Wu L, Xu XC, Jiang XD, Huang DB. Promoter methylation of p16, Runx3, DAPK and CHFR genes is frequent in gastric carcinoma. *Tumori* 2010; 96: 726-733
- 25 Luczak MW, Jagodziński PP. The role of DNA methylation in cancer development. *Folia Histochem Cytobiol* 2006; 44: 143-154
- 26 Deaton AM, Bird A. CpG islands and the regulation of transcription. *Genes Dev* 2011; 25: 1010-1022
- 27 Ren J, Singh BN, Huang Q, Li Z, Gao Y, Mishra P, Hwa YL, Li J, Dowdy SC, Jiang SW. DNA hypermethylation as a chemotherapy target. *Cell Signal* 2011; 23: 1082-1093
- 28 Kulis M, Esteller M. DNA methylation and cancer. *Adv Genet* 2010; 70: 27-56
- 29 Shen WJ, Dai DQ, Teng Y, Liu HB. Regulation of demethylation and re-expression of RASSF1A gene in gastric cancer cell lines by combined treatment of 5-Aza-CdR and NaB. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 595-600
- 30 Ou JN, Torrisani J, Unterberger A, Provençal N, Shikimi K, Karimi M, Ekström TJ, Szyf M. Histone deacetylase inhibitor Trichostatin A induces global and gene-specific DNA demethylation in human cancer cell lines. *Biochem Pharmacol* 2007; 73: 1297-1307
- 31 郑向欣, 王建. 5-氮-2-脱氧胞苷联合曲古抑菌素A对人胃癌细胞系MGC-803生物学行为的影响. *世界华人消化杂志* 2009; 17: 1655-1659

■同行评价

本研究创新性一般, 但实验设计合理, 研究方法可靠, 结果和结论可信, 具有一定的科学意义。

编辑 曹丽鸥 电编 闫晋利

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

• 消息 •

《世界华人消化杂志》参考文献要求

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

胃癌多药耐药蛋白的相互作用蛋白鉴定及分子机制

伍小平, 唐英姿, 黄卫国, 伍尤华

■背景资料

胃癌耐药是胃癌化疗失败的主要原因之一, 而多药耐药蛋白(MRP)与肿瘤细胞耐药密切相关, 是引起胃癌原发性耐药的原因之一。

伍小平, 唐英姿, 伍尤华, 南华大学附属第一医院肿瘤内科
湖南省衡阳市 421001

黄卫国, 南华大学肿瘤研究所 湖南省衡阳市 421001

伍小平, 硕士, 主要从事肿瘤化疗及其耐药机制。

湖南省卫生厅科研基金资助项目, No. B2009052

作者贡献分布: 伍小平与黄卫国对此文所作贡献均等; 此课题由伍小平与黄卫国设计; 研究过程由伍小平、黄卫国、唐英姿及伍尤华操作完成; 研究所用新试剂及分析工具由伍小平提供; 数据分析由黄卫国完成; 本论文写作由伍小平、黄卫国、唐英姿及伍尤华完成。

通讯作者: 伍小平, 副教授, 副主任医师, 421001, 湖南省衡阳市, 湖南省南华大学附一医院肿瘤内科。wxp19730806@sina.com
电话: 0734-8279059

收稿日期: 2011-10-05 修回日期: 2011-11-20

接受日期: 2011-12-07 在线出版日期: 2011-12-18

Identification of proteins interacting with multidrug resistance protein in gastric cancer

Xiao-Ping Wu, Ying-Zi Tang, Wei-Guo Huang,
You-Hua Wu

Xiao-Ping Wu, Ying-Zi Tang, You-Hua Wu, Department of Medical Oncology, the First Affiliated Hospital of University of South China, Hengyang 421001, Hunan Province, China

Wei-Guo Huang, Cancer Research Institute, University of South China, Hengyang 421001, Hunan Province, China

Supported by: the Scientific Research Foundation of Health Department of Hunan Province, No. B2009052

Correspondence to: Xiao-Ping Wu, Associate Professor, Department of Medical Oncology, the First Affiliated Hospital of University of South China, Hengyang 421001, Hunan Province, China. wxp19730806@sina.com

Received: 2011-10-05 Revised: 2011-11-20

Accepted: 2011-12-07 Published online: 2011-12-18

Abstract

AIM: To identify proteins interacting with multidrug resistance protein (MRP) in gastric cancer cells and to evaluate their effect on tumor cell drug resistance.

METHODS: Proteins interacting with MRP were identified using immunoprecipitation and mass spectrometry. Of the proteins identified, Annexin A5 was chosen to further study its role in drug resistance of gastric cancer cells. The expression of MRP and Annexin A5 protein in SGC-7901 cells and drug-resistant cell line SGC-7901/DDP was evaluated by Western blot.

The impact of Annexin A5 knockdown on MRP expression and drug resistance of gastric cancer cells was evaluated using siRNA interference technology.

RESULTS: In total, 14 proteins interacting with MRP were identified. The protein expression of MRP and Annexin A5 in drug-resistant cell line SGC-7901/DDP was higher than that in SGC-7901 cell line. SiRNA-mediated silencing of the Annexin A5 gene in SGC-7901/DDP cells down-regulated the expression of MRP. The expression of Annexin A5 showed no significant difference between SGC-7901 cells and SGC-7901/DDP cells transfected with Annexin A5-specific siRNA. In addition, siRNA-mediated silencing of the Annexin A5 gene significantly reduced the IC₅₀ values of cisplatin, paclitaxel and 5-Fu in gastric cancer cells, and increased cell sensitivity to these drugs by 36, 17 and 4 folds, respectively.

CONCLUSION: Annexin A5 is a MRP-interacting protein that may be related with tumor drug resistance in gastric cancer.

Key Words: Multidrug resistance protein; Multidrug resistance; Annexin A5; Gastric cancer

Wu XP, Tang YZ, Huang WG, Wu YH. Identification of proteins interacting with multidrug resistance protein in gastric cancer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(35): 3568-3573

摘要

目的: 研究多药耐药蛋白(multidrug resistance protein, MRP)的相互作用蛋白及其对肿瘤耐药性的影响。

方法: 采用免疫沉淀结合质谱方法分离鉴定MRP的相互作用蛋白, 并对其中的耐药相关蛋白之一Annexin A5进行功能研究, Western blot及siRNA干扰技术分析MRP、Annexin A5蛋白表达的变化、相关性及其对胃癌SGC-7901细胞的耐药性变化。

结果: 经免疫沉淀结合质谱方法分离鉴定发

■同行评议者

刘海林, 主任医师, 上海交通大学医学院附属第九人民医院消化科

现了14个MRP的相互作用蛋白, 其中Annexin A5为其中得分最高的蛋白; Western blot检测显示耐药细胞株SGC-7901/DDP中MRP、Annexin A5蛋白表达均高于SGC-7901和siRNA-SGC-7901/DDP, siRNA干扰Annexin A5表达后, siRNA-SGC-7901/DDP中MRP蛋白表达下调, MRP、Annexin A5蛋白在SGC-7901和siRNA-SGC-7901/DDP之间表达无明显差异; MTT法结果显示经siRNA干扰SGC-7901/DDP后, 顺铂、5-Fu和紫杉醇作用后的IC₅₀值明显减少, 对其的敏感性分别增加了36倍、17倍和4倍。

结论: Annexin A5表达与胃癌细胞耐药有关, 是MRP的相互作用蛋白之一。

关键词: 多药耐药蛋白; 多药耐药性; 膜联蛋白A5; 胃癌

伍小平, 唐英姿, 黄卫国, 伍尤华. 胃癌多药耐药蛋白的相互作用蛋白鉴定及分子机制. 世界华人消化杂志 2011; 19(35): 3568-3573
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/3568.asp>

0 引言

胃癌是常见的恶性肿瘤之一, 在我国其发病率居各类肿瘤的首位^[1]。胃癌耐药是胃癌化疗失败的主要原因之一^[2], 他涉及多种复杂机制。肿瘤细胞的多药耐药性(multidrug resistance, MDR)是指肿瘤细胞接触一种化疗药物并对其产生耐药后, 同时对其他化学结构和作用机制不同的化疗药物产生耐药^[3]。深入研究多药耐药性无疑具有重要的理论和临床意义。以往的研究虽然揭示了一些胃癌多药耐药性产生的初步分子机制^[4,5], 但多数是从单个基因或蛋白出发, 其分子机制远未完全阐明, 由于DNA和RNA水平并不能完全反映蛋白质水平的变化, 因此有必要在蛋白质整体水平上对胃癌多药耐药产生的机制进行研究。

研究发现, 多药耐药蛋白(multidrug resistance protein, MRP)作为一种防御机制在正常胃黏膜上高度表达, 而在胃癌组织的表达高于正常胃黏膜^[6,7]; MRP在胃癌组织中呈异常高表达, 与癌旁组织有显著性差别, 与肿瘤细胞耐药有关^[8-10]。这些结果提示MRP是引起胃癌原发性耐药的原因之一。为进一步研究MRP的分子机制, 我们拟通过靶向蛋白技术, 分离鉴定MRP1蛋白的相互作用蛋白, 并通过RNAi技术干扰其中关键的蛋白表达研究其耐药的分子机制。

1 材料和方法

1.1 材料

SGC-7901及其耐药细胞株SGC-7901/DDP (人胃癌耐药顺铂细胞株)均购自中南大学细胞中心, 细胞用100 mL/L胎牛血清的RPMI 1640(GIBCO)培养液进行常规培养。RPMI 1640培养基、胰酶、胎牛血清为美国GIBCO公司产品; 鼠抗人MRP、Annexin A5单克隆抗体, 鼠抗人 β -actin抗体为美国Santa cruz公司产品; 辣根过氧化物酶标记羊抗鼠二抗购自美国DAKO公司; ECL(Enhanced chemiluminescence)试剂盒购自瑞典Amersham公司。

1.2 方法

1.2.1 免疫共沉淀: 收集107个细胞在缓冲液中4 °C裂解30 min, 11 000 r/min离心15 min, 上清液用于免疫沉淀, 1 500 μ g的总蛋白与非免疫血清一起进行预吸附, 与100 μ L的蛋白G-Sepharose结合, 进一步与10 μ g的MRP抗体结合3 h; 加入100 μ L蛋白G-Sepharose在4 °C条件下放置1 h, 离心30 s, TBST洗3次, 0.1 mol/L甘氨酸洗脱后, SDS-PAGE电泳, 凝胶用考马斯蓝染色、切胶、胰蛋白酶消化, 质谱鉴定。

1.2.2 质谱图谱分析与数据库查询: ESI-Q-TOF质谱图解谱采用MicroMass公司的MassLynx软件进行, 从原始MS-MS谱中产生PKL格式的数据文件。然后在数据库中进行查询。数据库检索参数为: 数据库选择为NCBI Inr数据库, 物种分类(Taxonomy)选择为人(Human), 酶选择为Trypsin, 允许的未酶切位点选择为1, 固定修饰(Fixed modifications)选择为碘乙酰胺Carbamidomethyl(C)修饰, MS/MS容差选择为0.3 Da, 肽片段电荷数选择为1⁺、2⁺或3⁺, 选择Monoisotopic, 数据格式Data format选择为Micromass(PKL)格式, Instrument选择为(ESI-QUAD-TOF)。查询结果得分(Scores)>36认为该蛋白为有意义的蛋白。

1.2.3 Western blot分析: (1)样品制备: 收集107个细胞后冰上裂解30 min, 4 °C离心, 12 000 g $\times$ 30 min, 转移上清, 绘制标准曲线测量蛋白浓度; (2)SDS-PAGE: 配置蛋白分离胶和积层胶, 再变性蛋白, 上样, 100 V电泳, 约需1-2 h; (3)转膜: PVDF膜三明治转移法, 100 V, 约60 min; (4)染色: 丽春红染色3-5 min, PBS漂洗2-3次, 每次3-5 min, 观察蛋白条带; (5)封闭: 5%牛奶封闭1-2 h; (6)一抗结合: PVDF膜放入杂交袋中加入封闭液和适量一抗(浓度1:1 000), 摇床上室温过夜; (7)二

■研究前沿

以往的研究虽然揭示了一些胃癌多药耐药性产生的初步分子机制, 但多数是从单个基因或蛋白出发, 其分子机制远未完全阐明, 由于DNA和RNA水平并不能完全反映蛋白质水平的变化, 因此有必要在蛋白质整体水平上对胃癌多药耐药产生的机制进行研究。

■相关报道

研究发现在头颈部鳞癌中Annexin A5比正常表皮组织表达增加、在宫颈鳞癌组织比正常宫颈上皮表达增高。其还参与了信号传导通路,如钙依赖的蛋白激酶C(PKC)的抑制,可以通过直接与受体的细胞内区域相互作用而起到了血管内生长因子(VEGF)受体信号的作用。

抗结合: 弃去封闭液和一抗,用适量的TBST漂洗3次,每次10 min,加入封闭液和适量二抗(浓度1:1000),摇床上室温摇1-2 h,剪开袋口,弃去封闭液和二抗,用适量的TBS-T液漂洗膜3次,每次10 min; (8)检测: ECL化学发光法检测,暗室中压上X光片,曝光30 s-10 min,显影,洗片。

1.2.4 耐药性检测: MTT法检测各细胞株对化疗药物的敏感度,以每孔500个细胞接种于96孔培养板中,每孔体积200 μ L,每组设定5孔平行复孔,加入不同浓度的化疗药物,以不加药物干预作为对照组,以不接种细胞而仅加培养液作为调零孔,置CO₂培养箱中孵育,每隔24 h检测一次。小心吸去上清,每孔加入200 μ L新鲜RPMI 1640培养液,再加入5 mg/mL的MTT 20 μ L,37 $^{\circ}$ C继续孵育4 h后,终止培养,小心吸弃孔内上清液,加入150 μ L DMSO,振荡10 min,使结晶物充分溶解,以空白对照孔调零,ELX800酶标仪490 nm处测定各孔的吸光度值(A_{490}),取3个重复孔的平均值,相对应 A_{490} 值表示细胞增殖能力大小。绘制不同药物浓度的细胞生长抑制率曲线,并计算各化疗药物对细胞的半数抑制浓度(IC₅₀)。

1.2.5 siRNA干扰: Annexin A5的PCR引物5'-GC UUUAUGAUGCUUAUGA AdTdT-3'(正义), 5'-UUCAUA AGCAUCAUAAAGCdCdG-3'(反义);由Takara公司合成。步骤如下: (1)细胞接种: 胰酶消化细胞,按 3×10^5 个细胞/孔接种于6孔板,当细胞达到70%-80%融合时进行转染; (2)转染液的配制: A液: 在100 μ L无血清培养基中加12.5 μ g Annexin A5 siRNA; B液: 在100 μ L无血清培养基中加Lipofactamine 2000脂质体10 μ L,室温静置5 min; 混合A、B两液,室温静置20 min,形成复合体; (3)RPMI 1640无血清培养基洗涤待转染细胞2次; (4) A、B混合液中加入无血清培养基800 μ L,混匀,小心加至6孔板中,置37 $^{\circ}$ C、50 mL/LCO₂的温箱中孵育4 h; (5)最后每孔加入等体积含200 mL/L胎牛血清(FBS)的RPMI1640完全培养基使培养液中含100 mL/L胎牛血清,置于50 mL/L CO₂、37 $^{\circ}$ C恒温培养箱中继续培养44 h; 收集细胞; (6)Western blot检测Annexin A5的表达水平,确定干扰或表达效果; (7)MTT检测细胞株耐药性变化。

统计学处理 应用SPSS17.0统计软件对实验结果进行统计学分析,计数资料两两比较用 t 检验,组间比较采用ANOVA检验。 $P < 0.05$ 即差异有统计学意义。

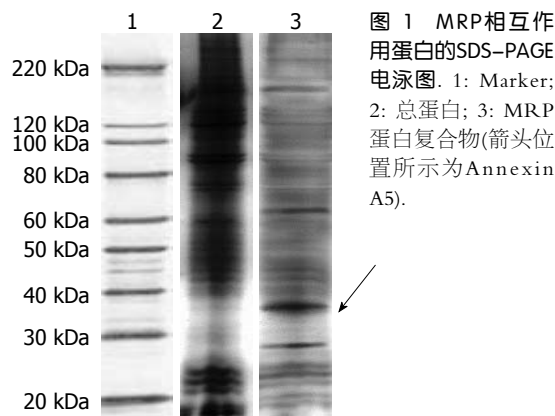


图1 MRP相互作用蛋白的SDS-PAGE电泳图。1: Marker; 2: 总蛋白; 3: MRP蛋白复合物(箭头位置所示为Annexin A5)。

2 结果

2.1 MRP相互作用蛋白质的分离和鉴定 通过免疫沉淀方法分离得到MRP免疫沉淀复合物(图1)。将所分离的蛋白质经ESI-Q-TOF-MS质谱进行鉴定,并利用数据库检索后共有14个MRP相互蛋白质被鉴定,其功能涉及细胞骨架、凋亡、增殖、血管生成、分子伴侣以及新陈代谢(表1)。实验中发现其中Annexin A5为其中得分最高的蛋白,经过进一步查阅文献分析,选取其作进一步耐药性研究。

2.2 胃癌细胞株中MRP、Annexin A5蛋白表达的相关性 通过Western blot分别检测了3个细胞株SGC-7901、siRNA-SGC-7901/DDP、SGC-7901/DDP中MRP、Annexin A5蛋白的表达水平。实验发现,耐药细胞株SGC-7901/DDP中MRP、Annexin A5蛋白表达均高于SGC-7901和siRNA-SGC-7901/DDP,说明MRP、Annexin A5蛋白高表达与胃癌耐药性增高有关; siRNA干扰Annexin A5表达后,发现siRNA-SGC-7901/DDP中MRP蛋白表达下调,说明Annexin A5蛋白与MRP蛋白之间具有相关性。而MRP、Annexin A5蛋白在SGC-7901和siRNA-SGC-7901/DDP之间表达无明显差异(图2)。

2.3 Annexin A5对胃癌细胞株的耐药性影响 运用MTT法检测顺铂、5-Fu和紫杉醇孵育siRNA-SGC-7901/DDP、SGC-7901/DDP细胞株后细胞生长的变化,结果显示经siRNA干扰SGC-7901/DDP后,其IC₅₀值明显减少,胃癌细胞对顺铂、5-Fu和紫杉醇的敏感性分别增加36倍、17倍和4倍(表2)。说明Annexin A5表达下调后,胃癌细胞对化疗药物的敏感性增加。

3 讨论

MRP是一种分子量为190 kDa的能量依赖型“药泵”的跨膜糖蛋白^[1]。MRP增高可引起阿霉素、

表 1 MRP的相互作用蛋白

G _i	基因简写	蛋白名称	分子量(Da)	序列覆盖(%)	得分	功能
4809273	ANX5	Annexin A5	188921	19	501	增殖、凋亡
209969817	HSPB1	heat shock 27 kda protein	22783	17	412	分子伴侣
21961605	KRT10	Keratin 10	59020	28	369	细胞骨架
12803727	KRT7	Keratin 7	51444	10	234	细胞骨架
306891	HSP90AB1	heat shock protein 90 kda alpha (cytosolic), class b member 1	83584	7	199	分子伴侣
1296662	PLEC1	plectin 1, intermediate filament binding protein 500 kda	533408	1	187	细胞骨架
757924	EGFR	epidermal growth factor receptor	137626	4	147	增殖、血管生成
188492	HSPA1L	heat shock 70 kda protein 1-like	70755	4	125	分子伴侣
129369	TP53	Cellular tumor antigen p53	37814	12	112	抑癌基因
28336	ACTB	actin, beta	42318	9	105	细胞骨架
4757756	ANXA2	annexin a2	38808	12	103	胞膜运输
4503571	ENO1	enolase 1	47481	3	52	新陈代谢
148224884	PTPMT1	protein tyrosine phosphatase, mitochondrial 1	23000	6	51	新陈代谢
4506773	S100A9	s100 calcium binding protein a9 18(calgranulin b)	13291	6	39	钙信号分子

■创新盘点

本实验通过串联亲和和纯化结合质谱方法发现14个MRP的相互作用蛋白,并通过siRNA干扰技术证实Annexin A5是MRP耐药相关的关键蛋白之一,其表达下调可能增强胃癌细胞对化疗药物的敏感性。

表 2 siRNA干扰Annexin A5表达后胃癌细胞耐药性的变化 (mean ± SD)

药物	IC ₅₀ (μmol/L)		敏感性增加倍数
	SGC-7901/cDDP	siRNA-SGC-7901/DDP	
顺铂	185.44 ± 13.46	5.13 ± 0.89 ^a	36
紫杉醇	21.43 ± 12.46	1.22 ± 0.12 ^a	17
5-Fu	201.65 ± 18.34	51.77 ± 3.23 ^a	4

^aP<0.05 vs siRNA干扰前。

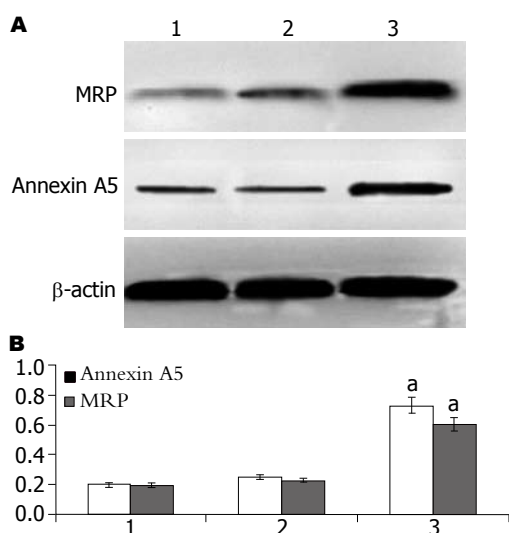


图 2 胃癌细胞株中MRP、Annexin A5蛋白表达的相关性。A: Western blot检测MRP、Annexin A5在3个细胞株中的表达水平, 1: SGC-7901; 2: siRNA-SGC-7901/DDP; 3: SGC-7901/DDP; B: MRP、Annexin A5在3个细胞株中的相对灰度值。*P<0.05 vs SGC-7901组和siRNA-SGC-7901/DDP组。

鬼白乙叉苷(VP-16)、长春花碱(Vinblastine)、长春新碱(VCR)、放线菌素D、秋水仙素等耐药^[12-14], 他的结构、功能与P-gp有许多相似处。其介导的多药耐药(MDR)机制还未完全阐明, 推测他可能通过将GSH与药物的结合物(GS-X)或者是未修饰的药物(但需要GSH的存在)跨膜移位到细胞外, 使细胞内药物浓度减少而导致细胞耐药^[15]。另外, MRP还可在细胞内隔离药物, 使药物不能与靶位点结合, 从而间接导致耐药^[16,17]。MRP主要分布于细胞膜, 在内质网、高尔基复合体也有少量分布。他在人类正常组织及肿瘤组织中广泛存在, 是引起MDR的因素之一。MRP至少有4种亚型, 已知MRP1增高是引起MDR的主要原因之一。MRP这种ATP依赖泵能将带负电荷的药物泵出细胞, 故可观察到许多MDR高表达的细胞系中抗癌药物聚集降低, 此外MRP1可引起细胞内药物分布改变, 使重要的攻击靶点(如细胞核)的药物减少, 从而引起MDR^[18]。当然, MDR机制

■应用要点

Annexin A5是MRP耐药相关的关键蛋白之一,其表达水平增高与胃癌细胞耐药性增加有关,减少其表达能增强胃癌细胞对化疗药物的敏感性。为进一步研究这些蛋白的功能及其在肿瘤耐药中的分子机制很有必要。

中MRP1的转运作用是可饱和的,而且有GSH、P-gp和OTPO的共同参与^[19]。

串联亲和纯化(tandem affinity purification, TAP)耦联质谱技术是一种新的蛋白质相互作用研究技术。TAP耦联质谱技术同时具备了亲和纯化和免疫沉淀两者的优点,能非常灵敏、快速地得到生理条件下与目的蛋白存在真实相互作用的蛋白质^[19]。本研究通过串联亲和纯化结合质谱方法发现14个MRP的相互作用蛋白,这些蛋白功能涉及细胞骨架、凋亡、增殖、血管生成、分子伴侣以及新陈代谢等方面,他们与肿瘤的耐药性之间的关系有待于进一步研究。

Annexin A5是膜联蛋白家族成员之一,该蛋白位于人染色体4q26-q28,由319个氨基酸组成,蛋白分子量为35.8 KDa,是膜联蛋白家族中分布最广泛、含量最丰富的成员之一^[20]。Annexin A5可抑制PKC的活性。PKC是细胞内信号转导通路中最重要的因子之一,目前多数学者认为PKC的激活平衡紊乱理论是肿瘤发生的重要因素^[21]; Annexin A5具有抗炎活性、抗血栓、抗凝作用^[22];与机体自身的免疫应答有关^[22];参与了机体的病毒感染过程^[22-25]。此外,Annexin A5还具有促进肿瘤细胞凋亡,抑制肿瘤细胞增殖的作用,但机制目前尚未完全阐明。近年来研究发现,Annexin A5也是一个重要的肿瘤标志物。有人发现头颈部鳞癌中Annexin A5比正常表皮组织表达增加^[26]; Annexin A5在宫颈鳞癌组织中比正常宫颈上皮表达增高,其表达水平与宫颈鳞癌的分化程度呈负相关^[25]。膜联蛋白A5还参与了信号传导通路,如钙依赖的蛋白激酶C(PKC)的抑制^[28,29];膜联蛋白A5还可以通过直接与受体的细胞内区域相互作用而起到了血管内生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)受体信号的作用^[30]。目前尚未见Annexin A5与MRP的相互作用及其与胃癌耐药的报道。

本研究发现Annexin A5是MRP的相互作用蛋白之一,其功能与肿瘤细胞耐药有关。我们发现耐药细胞株SGC-7901/DDP中MRP、Annexin A5蛋白表达均高于SGC-7901非耐药细胞株,说明MRP、Annexin A5蛋白表达增高与胃癌细胞的耐药性增加有关;而通过siRNA干扰Annexin A5表达后,发现MRP蛋白表达也下调,说明MRP蛋白与Annexin A5之间具有相关性。为进一步证实Annexin A5表达下调能引起胃癌细胞耐药性的改变,本研究采用siRNA技术干扰Annexin A5表达后,发现胃癌细胞对顺铂、5-Fu和紫杉醇3

组化疗药物的IC₅₀值明显减小,其对化疗药物的敏感性分别增加36倍、17倍和4倍,说明Annexin A5表达下调后,胃癌细胞对化疗药物的敏感性增加,可能的分子机制与MRP表达下调有关。

总之,我们在胃癌细胞中发现了14个MRP耐药相关的蛋白,这些蛋白的功能涉及细胞骨架、凋亡、增殖、血管生成、分子伴侣以及新陈代谢等方面; Annexin A5是MRP耐药相关的关键蛋白之一,其表达水平增高与胃癌细胞耐药性增加有关,减少其表达能增强胃癌细胞对化疗药物的敏感性。进一步研究这些蛋白的功能及其在肿瘤耐药中的分子机制很有必要。

4 参考文献

- 1 Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin* 2005; 55: 74-108
- 2 Sutter AP, Fechner H. Gene therapy for gastric cancer: is it promising? *World J Gastroenterol* 2006; 12: 380-387
- 3 Pauwels EK, Erba P, Mariani G, Gomes CM. Multidrug resistance in cancer: its mechanism and its modulation. *Drug News Perspect* 2007; 20: 371-377
- 4 Zhang D, Fan D. Multidrug resistance in gastric cancer: recent research advances and ongoing therapeutic challenges. *Expert Rev Anticancer Ther* 2007; 7: 1369-1378
- 5 Schumacher G, Hoffmann J, Cramer T, Spinelli A, Jacob D, Bahra M, Pratschke J, Pfitzmann R, Schmidt S, Lage H. Antineoplastic activity of 2-methoxyestradiol in human pancreatic and gastric cancer cells with different multidrug-resistant phenotypes. *J Gastroenterol Hepatol* 2007; 22: 1469-1473
- 6 Kang HC, Kim IJ, Park HW, Jang SG, Ahn SA, Yoon SN, Chang HJ, Yoo BC, Park JG. Regulation of MDK expression in human cancer cells modulates sensitivities to various anticancer drugs: MDK overexpression confers to a multi-drug resistance. *Cancer Lett* 2007; 247: 40-47
- 7 Han CY, Cho KB, Choi HS, Han HK, Kang KW. Role of FoxO1 activation in MDR1 expression in adriamycin-resistant breast cancer cells. *Carcinogenesis* 2008; 29: 1837-1844
- 8 Stein U, Lage H, Jordan A, Walther W, Bates SE, Litman T, Hohenberger P, Dietel M. Impact of BCRP/MXR, MRP1 and MDR1/P-Glycoprotein on thermoresistant variants of atypical and classical multidrug resistant cancer cells. *Int J Cancer* 2002; 97: 751-760
- 9 Lin HL, Liu TY, Wu CW, Chi CW. Berberine modulates expression of mdrl gene product and the responses of digestive track cancer cells to Paclitaxel. *Br J Cancer* 1999; 81: 416-422
- 10 王俊普, 李景和, 王宽松. 胃癌耐药机制研究进展. *世界华人消化杂志* 2009; 17: 2692-2699
- 11 Takara K, Sakaeda T, Okumura K. An update on overcoming MDR1-mediated multidrug resistance in cancer chemotherapy. *Curr Pharm Des* 2006; 12: 273-286
- 12 Keppler D. Multidrug resistance proteins (MRPs, ABCs): importance for pathophysiology and drug therapy. *Handb Exp Pharmacol* 2011; (201): 299-323

■名词解释

串联亲和纯化(tandem affinity purification, TAP)耦联质谱技术是一种同时具备了亲和纯化和免疫沉淀两者的优点,能非常灵敏、快速地得到生理条件下与目的蛋白存在真实相互作用蛋白质的新蛋白质相互作用研究技术。

- 13 Pal D, Kwatra D, Minocha M, Paturi DK, Budda B, Mitra AK. Efflux transporters- and cytochrome P-450-mediated interactions between drugs of abuse and antiretrovirals. *Life Sci* 2011; 88: 959-971
- 14 Drain S, Catherwood MA, Alexander HD. Multidrug resistance in the chronic lymphoproliferative disorders. *Leuk Lymphoma* 2010; 51: 1793-1804
- 15 van Zanden JJ, Geraets L, Wortelboer HM, van Bladeren PJ, Rietjens IM, Cnubben NH. Structural requirements for the flavonoid-mediated modulation of glutathione S-transferase P1-1 and GS-X pump activity in MCF7 breast cancer cells. *Biochem Pharmacol* 2004; 67: 1607-1617
- 16 Kerwat K, Kerwat M, Graf J, Wulf H. [Resistance to antibiotics and multiresistant pathogens]. *Anesthesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther* 2010; 45: 242-243
- 17 Mayur YC, Peters GJ, Prasad VV, Lemo C, Sathish NK. Design of new drug molecules to be used in reversing multidrug resistance in cancer cells. *Curr Cancer Drug Targets* 2009; 9: 298-306
- 18 Bogush EA, Kirsanov VI. [Up-to-date approaches to clinical estimate of phenotype of multiple drug resistance associated with function of ABC-transporters in human solid tumors]. *Antibiot Khimioter* 2006; 51: 50-55
- 19 Kuo MT. Roles of multidrug resistance genes in breast cancer chemoresistance. *Adv Exp Med Biol* 2007; 608: 23-30
- 20 Funakoshi T, Hendrickson LE, McMullen BA, Fujikawa K. Primary structure of human placental anticoagulant protein. *Biochemistry* 1987; 26: 8087-8092
- 21 Mi L, Xiao Z, Veenstra TD, Chung FL. Proteomic identification of binding targets of isothiocyanates: A perspective on techniques. *J Proteomics* 2011; 74: 1036-1044
- 22 王小杰, 李欣, 武彦秋, 李晓通, 柳娇娇, 张波. 膜联蛋白A5的结构与功能研究进展. 承德医学院学报 2010; 27: 413-415
- 23 van Genderen HO, Kenis H, Hofstra L, Narula J, Reutelingsperger CP. Extracellular annexin A5: functions of phosphatidylserine-binding and two-dimensional crystallization. *Biochim Biophys Acta* 2008; 1783: 953-963
- 24 Rand JH, Wu XX, Quinn AS, Ashton AW, Chen PP, Hathcock JJ, Andree HA, Taatjes DJ. Hydroxychloroquine protects the annexin A5 anticoagulant shield from disruption by antiphospholipid antibodies: evidence for a novel effect for an old antimalarial drug. *Blood* 2010; 115: 2292-2299
- 25 Rand JH, Wu XX, Quinn AS, Taatjes DJ. Resistance to annexin A5 anticoagulant activity: a thrombogenic mechanism for the antiphospholipid syndrome. *Lupus* 2008; 17: 922-930
- 26 Wehder L, Arndt S, Murzik U, Bosserhoff AK, Kob R, von Eggeling F, Melle C. Annexin A5 is involved in migration and invasion of oral carcinoma. *Cell Cycle* 2009; 8: 1552-1558
- 27 Hummerich L, Müller R, Hess J, Kokocinski F, Hahn M, Fürstenberger G, Mauch C, Lichter P, Angel P. Identification of novel tumour-associated genes differentially expressed in the process of squamous cell cancer development. *Oncogene* 2006; 25: 111-121
- 28 Cederholm A, Frostegård J. Annexin A5 as a novel player in prevention of atherothrombosis in SLE and in the general population. *Ann N Y Acad Sci* 2007; 1108: 96-103
- 29 Kheifets V, Bright R, Inagaki K, Schechtman D, Mochly-Rosen D. Protein kinase C delta (deltaPKC)-annexin V interaction: a required step in deltaPKC translocation and function. *J Biol Chem* 2006; 281: 23218-23226
- 30 Zhang Y, Han J, Yang X, Shao C, Xu Z, Cheng R, Cai W, Ma J, Yang Z, Gao G. Pigment epithelium-derived factor inhibits angiogenesis and growth of gastric carcinoma by down-regulation of VEGF. *Oncol Rep* 2011; 26: 681-686

■同行评价

本研究通过串联亲和纯化结合质谱方法发现MRP的相互作用蛋白, 并通过siRNA干扰技术证实Annexin A5是MRP耐药相关的关键蛋白之一, 研究内容较新颖, 对进一步研究这些蛋白的功能, 进而揭示其在肿瘤耐药中的分子机制很有参考价值。

编辑 张姗姗 电编 闫晋利

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

• 消息 •

WJG 成功通过评审被PMC收录

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

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

HBV转基因小鼠的舌色改变及血流变化

刘文兰, 车念聪, 唐佐青, 油红捷, 杨 铮

■背景资料

慢性乙型肝炎是严重危害我国人民的传染性疾病之一, 中医以辨证论治为特色治疗该病取得了显著的效果。舌诊是中医辨证论治重要的参考指标。临床研究提示观察舌色对于判断病情的轻重十分重要。然而, 目前导致舌色形成的机制尚不明确, 影响了舌诊在临床的推广和应用。

刘文兰, 车念聪, 唐佐青, 油红捷, 杨铮, 首都医科大学中医药学院 北京市 100069

刘文兰, 副教授, 主要从事舌诊客观化的研究。

北京市教育委员会科技计划面上基金资助项目, No. KM201110025011

作者贡献分布: 此课题由刘文兰设计; 研究过程由车念聪与唐佐青操作完成; 数据分析由油红捷完成; 本论文写作由刘文兰与杨铮完成。

通讯作者: 刘文兰, 副教授, 博士, 100069, 北京市右安门外西头条10号, 首都医科大学中医药学院. wenlanliu1900@yahoo.cn
电话: 010-83911634

收稿日期: 2011-10-10 修回日期: 2011-11-20

接受日期: 2011-12-15 在线出版日期: 2011-12-18

Changes in color and blood flow of the tongue of HBV transgenic mice

Wen-Lan Liu, Nian-Cong Che, Zuo-Qing Tang, Hong-Jie You, Zheng Yang

Wen-Lan Liu, Nian-Cong Che, Zuo-Qing Tang, Hong-Jie You, Zheng Yang, School of Chinese Medicine, Capital Medical University, Beijing 100069, China

Supported by: the Science and Technology Program of Beijing Educational Commission, No. KM201110025011

Correspondence to: Wen-Lan Liu, Associate Professor, School of Chinese Medicine, Capital Medical University, Beijing 100069, China. wenlanliu1900@yahoo.cn

Received: 2011-10-10 Revised: 2011-11-20

Accepted: 2011-12-15 Published online: 2011-12-18

Abstract

AIM: To examine the changes in color and microvascular blood flow of the tongue of HBV transgenic mice.

METHODS: Ten C57BL/6J-HBV transgenic mice and 10 normal mice were used in the study. The tongue color of the mice was observed daily. The microvascular blood flow of tongue and liver were detected with a laser Doppler blood flowmeter. Blood samples were taken to measure serum alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST). Pathological changes in the tongue and liver were evaluated by HE staining.

RESULTS: The tongue was purple in color in six HBV transgenic mice and dark red in the remaining four transgenic mice. In contrast,

the tongue of normal mice was light red in color. The hue of the tongue become darker and brightness become weaker in HBV transgenic mice (0.206 ± 0.13 vs 0.794 ± 0.13 ; 0.479 ± 0.07 vs 0.331 ± 0.04 , $P < 0.01$, $P < 0.001$) compared to normal mice. The microvascular blood flow perfusion and velocity in the tongue and liver in HBV transgenic mice decreased significantly compared to normal mice. Obvious inflammatory changes were observed in the liver and tongue of HBV transgenic mice.

CONCLUSION: The tongue of most HBV transgenic mice became purple, whose mechanism is related with microcirculation disorder. Inflammatory changes in the liver and tongue in HBV transgenic mice are perhaps the main cause of microcirculation disorder.

Key Words: HBV Transgene; tongue color; Microcirculation; Laser doppler blood flowmeter

Liu WL, Che NC, Tang ZQ, You HJ, Yang Z. Changes in color and blood flow of the tongue of HBV transgenic mice. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(35): 3574-3578

摘要

目的: 研究HBV转基因小鼠的舌色表现和微血管血流变化。

方法: 10只C57BL/6J-HBV转基因小鼠和10只正常小鼠(C57BL/6J非转基因小鼠), 均雌雄各半, 采用小鼠舌象观察装置对小鼠舌色进行观察; 使用激光多普勒血流仪进行舌和肝脏微血管血流检测; 断头采血, 测定血清丙氨酸氨基转移酶(ALT)、门冬氨酸氨基转移酶(AST)的含量; HE染色观察肝和舌组织病理变化。

结果: HBV转基因小鼠中, 6只小鼠舌色呈紫色, 4只舌色呈暗红色, 而正常小鼠的舌色均为淡红色。HBV转基因小鼠舌色色调(H值)变深, 有显著性差异($P < 0.01$); 舌色亮度(V值)变弱, 有极显著性差异($P < 0.001$)。和正常鼠相比, 紫舌HBV转基因小鼠微血管血流灌注量和血流速度显著降低(0.206 ± 0.13 vs 0.794 ± 0.13 ; 0.479 ± 0.07 vs 0.331 ± 0.04 , $P < 0.01$, $P < 0.001$),

■同行评议者

沈克平, 主任医师, 上海中医药大学附属龙华医院

该模型肝脏微血管血流灌注量和血流速度显著降低, HBV转基因小鼠肝脏和舌存在明显的炎症改变。

结论: HBV转基因小鼠舌色以紫色多见, 其形成机制与微循环障碍有关。该模型存在肝脏和舌的炎症病理, 提示炎症微环境是形成其肝脏和舌微循环障碍的重要原因。

关键词: HBV转基因; 舌色; 微循环; 激光多普勒血流仪技术

刘文兰, 车念聪, 唐佐青, 油红捷, 杨铮. HBV转基因小鼠的舌色改变及血流变化. 世界华人消化杂志 2011; 19(35): 3574-3578
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/3574.asp>

0 引言

舌色是中医学舌诊的重要方面, 对于辨别疾病的性质、判断病情的轻重具有重要的意义^[1]。临床研究表明, 慢性乙型肝炎紫舌患者病情重、预后差^[2], 研究该舌色的形成机制对于病情程度的判断和预后的推测具有重要的临床意义。将HBV的DNA或其片段转入受精卵建立起来的HBV转基因小鼠是目前研究慢性乙型肝炎理想的动物模型。C57BL/6J-HBV转基因小鼠, 其5-8周龄肝脏病理改变与慢性肝炎病变相似。动态研究发现, 4月龄前属于慢性肝炎, 4月龄后在转基因小鼠肝脏可以见到非典型增生, 12 mo可发展为肝细胞癌^[3]。本研究观察HBV转基因小鼠舌色变化, 检测舌血流状况, 初步探讨慢性乙型肝炎紫舌的形成机制。

1 材料和方法

1.1 材料 8周龄的SPF级C57BL/6J-HBV转基因小鼠(所转移的基因片段是编码包膜蛋白HBsAg的S基因、Pre-S基因及编码X抗原的X基因, 该基因片段为HBV的ayw亚型, 可稳定垂直遗传); 8周龄的遗传背景相同的C57BL/6J非转基因小鼠。这些动物均来自北京大学医学部实验动物科学部, 动物生产许可证号: SCXK(京)2006-0008。英国moorVMS-LDF型激光多普勒血流仪; 荧光显微镜(nikoneclipse 80i); 数码相机(Canon EOS 400D); OlympusAV全自动生化分析仪。

1.2 方法

1.2.1 动物麻醉: 动物适应性饲养1 wk后, 先将小鼠禁食12 h后, 腹腔注射3%水合氯醛进行动物麻醉(350 mg/kg)。舌色诊断、微循环检测、取

材。实验过程中注意室温(20 ℃)的恒定。

1.2.2 HBV转基因小鼠模型的评价: 根据血清乙型肝炎表面抗原(HBsAg)的滴度, 血清丙氨酸氨基转移酶(ALT)和门冬氨酸氨基转移酶(AST)等肝功能指标, 肝组织病理形态等综合评价模型是否成功。血清乙型肝炎表面抗原阳性、肝功能异常, 肝组织病理显示肝细胞弥漫性肿胀, 肝细胞胞质呈伊红均染(毛玻璃样变性), 可见核内嗜酸性小体, 肝内散在针状小灶状肝细胞坏死伴淋巴样细胞浸润, 散在单个肝细胞胞质固缩深染伴核固缩深染, 肝窦内可见淋巴样细胞聚集灶, 说明造模成功。

1.2.3 舌色观察和诊断: 在20 ℃的恒温实验室, 动物麻醉后即刻(麻醉后1-2 min), 将小鼠仰卧固定于北京工业大学研制的小鼠舌象观察装置, 该装置配有恒温垫(37 ℃-40 ℃), 以保证小鼠体温的恒定。使用特制的金属环套住小鼠上门齿和下门齿, 使小鼠口呈45°张开使舌自然暴露, 用Canon EOS 400D数码相机在标准光源下(色温5300)距离舌面30 cm的位置拍摄动物舌面照片。2名从事中医舌诊研究的副教授对舌色进行诊断, 达成共识后, 在舌象观察记录表上记录小鼠的舌象。

1.2.4 微血管血流检测: 舌表面微循环血流灌注量和流速检测: 小鼠仰卧于小鼠舌象观察装置上, 运用英国moorVMS-LDF型激光多普勒血流仪, 将激光光导纤维探头固定在舌前1/3靠近左侧舌边的舌面上, 但不重压。仪器自动记录舌血流灌注量(flux, 单位PU)及血流速度(speed, 单位AU)。

肝脏表面微循环血流灌注量和流速检测: 动物仰卧位于铺设恒温垫(37 ℃-40 ℃)的观察台上。固定四肢后, 沿腹中线做3-5 cm切口, 暴露肝脏, 运用英国moorVMS-LDF型激光多普勒血流仪, 将激光光导纤维探头固定在肝脏左叶表面同一位置, 但不重压。仪器自动记录肝脏表面微血管血流灌注量(flux, 单位PU)及血流速度(speed, 单位AU)。

1.2.5 取材及病理观察: 动物处于麻醉状态下, 断头收集血液, 3 500 r/min离心10 min, 取上清立即使用自动生化分析仪测定ALT等肝功能指标。此后, 分离出肝脏, 生理盐水冲洗瘀血, 取肝左叶同一部位, 100 g/L福尔马林固定, 石蜡包埋, HE染色, 进行肝组织病理检测。避开舌中沟, 从舌两侧同一部位取材, 常规石蜡包埋, 连续组织切片, HE染色。光镜观察舌黏膜层组织形态。

■研发前沿

舌象是临床上较为方便、较客观的观察指标, 与脏腑气血的变化密切相关, 能够灵敏地反映病情的进展。因此, 阐释中医舌色的形成机制, 为临床提供机制清楚的诊断指标, 具有重要的意义, 目前, 国内该方面的研究尚不足。

■相关报道

王灵台认为暗舌是慢性肝病的主要舌象之一。舌质暗一般认为是瘀血的表现, 瘀血主要在肝, 即肝血瘀滞, 舌色越暗, 肝瘀越重。所以一般根据舌暗程度判断肝病发展趋势有一定意义。张赤志发现随着舌色的加深, 肝脏病理变化逐渐恶化。

■创新盘点

本文采用乙型肝炎理想的动物模型HBV转基因小鼠,观察其舌色变化,采用激光多普勒血流仪技术对其微循环进行检测,同时观察舌、肝脏的病理变化,发现HBV转基因小鼠紫舌的形成机制与微循环障碍有关,导致微循环障碍的原因与局部炎性微环境相关。

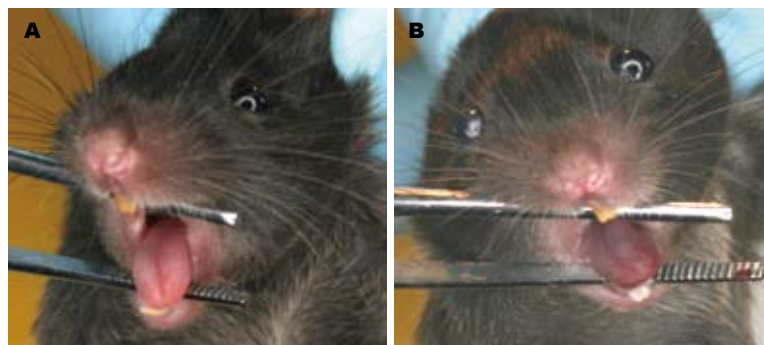


图1 HBV转基因小鼠与正常小鼠舌色比较。A: 正常小鼠; B: HBV转基因小鼠。

表1 HBV转基因小鼠与正常小鼠舌色在HSV颜色空间数值比较

分组	H值	V值	S值
正常小鼠	0.206 ± 0.13	0.479 ± 0.07	0.468 ± 0.04
HBV小鼠	0.794 ± 0.13 ^a	0.331 ± 0.04 ^b	0.477 ± 0.05

^a $P < 0.01$, ^b $P < 0.001$ vs 正常小鼠。

表2 HBV小鼠与正常小鼠肝功能的比较 (mean ± SD)

观察指标	正常组	模型组
ALT	74.69 ± 13.84	111.70 ± 19.11 ^b
AST	136.98 ± 29.99	124.06 ± 20.34

^b $P < 0.001$ vs 正常小鼠。

2 结果

2.1 HBV转基因小鼠舌色变化 研究结果显示, HBV转基因小鼠有6只小鼠的舌色是紫舌, 4只小鼠的舌色是暗红舌, 而正常小鼠的舌色均为淡红舌(图1)。

2.2 舌色色度值的比较 将获取照片在photoshop7.0软件中提取RGB值, 进而在HSV空间计算H、S、V值, 结果提示, HBV转基因小鼠舌色色调(H值)变深, $P < 0.01$; 舌色亮度(V值)变弱, $P < 0.001$, 有显著性差异(表1)。

2.3 血流仪的检测结果

2.3.1 舌微血管血流灌注量和速度的检测: 研究结果表明, HBV转基因小鼠紫舌微血管血流灌注量降低, 正常小鼠淡红舌血流灌注量为294.24 PU ± 62.34 PU, HBV转基因小鼠紫舌血流灌注量为110.41 PU ± 8.43 PU, 差异有统计学意义($P < 0.001$)。HBV转基因小鼠紫舌微血管血流速度降低, 正常小鼠淡红舌血流灌注量为103.45 AU ± 19.83 AU, HBV转基因小鼠紫舌血流灌注量为74.01 AU ± 9.31 AU, 有统计学意义($P < 0.001$)。

2.3.2 肝脏微血管血流灌注量检测结果: HBV转基因小鼠肝脏微血管血流灌注量较正常小鼠显著降低, 正常小鼠肝血流灌注量为299.27 PU ± 87.36 PU, HBV转基因小鼠肝血流灌注量为192.92 PU ± 10.05 PU, 差异有统计学意义($P < 0.01$)。HBV转基因小鼠肝微血管血流速度降低, 正常小鼠肝血流速度为97.99 AU ± 14.01 AU, HBV转基因小鼠肝血流速度为55.76

AU ± 4.82 AU, 差异有统计学意义($P < 0.001$)。

2.3.3 肝功能比较: HBV小鼠肝功能ALT值与正常小鼠存在显著差异(表2)。

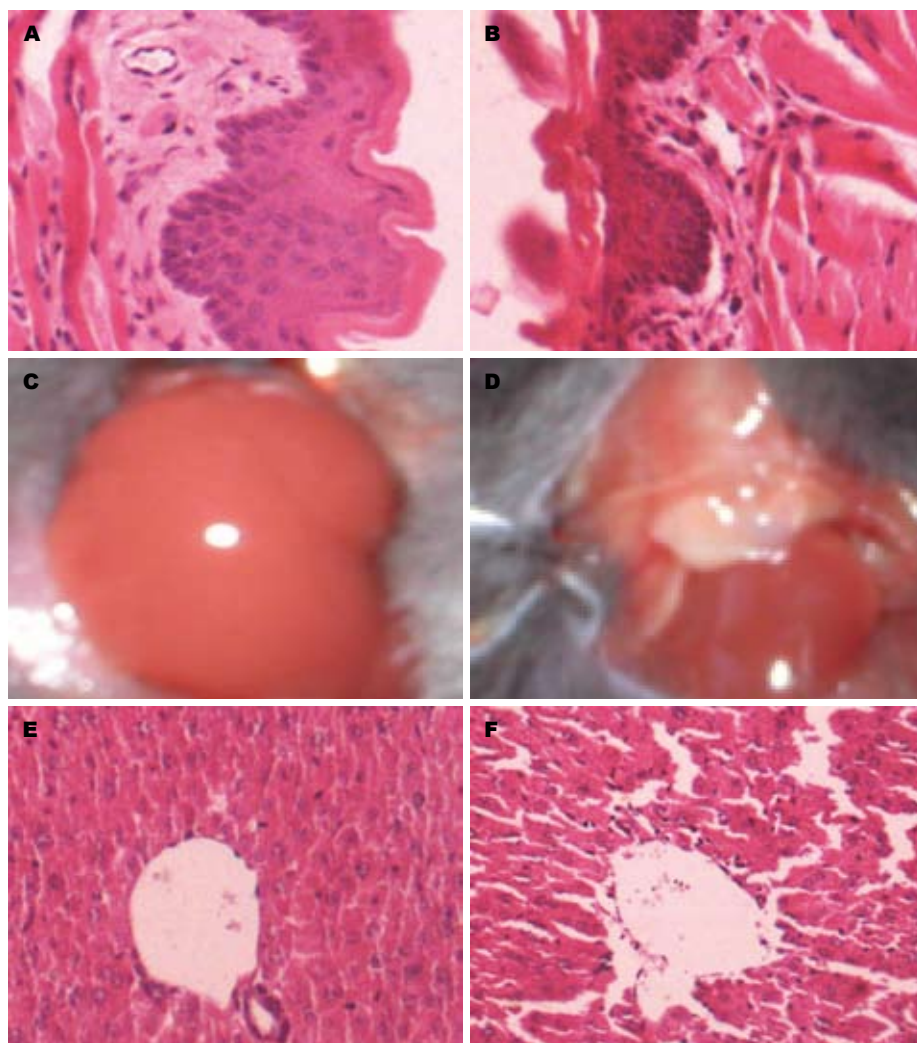
2.3.4 HBV转基因小鼠舌组织病理形态的观察: 研究显示, 小鼠的舌组织学结构包括黏膜层、固有层和肌层。HBV转基因小鼠舌组织有明显的炎性细胞浸润, 并有少量纤维蛋白渗出, 肌纤维排列疏松(图2A, B)。

2.3.5 肝脏形态观察: 正常小鼠肝脏颜色鲜红、均匀; HBV转基因小鼠肝脏颜色暗红(图2C, D)。

2.3.6 肝组织病理观察: 正常肝组织显示, 肝细胞排列整齐, 未见炎性细胞浸润; HBV转基因小鼠肝细胞肿胀, 排列疏松, 可见点状肝细胞坏死, 在中央静脉周围可见以淋巴细胞为主的炎细胞浸润(图2E, F)。

3 讨论

中医舌诊是中医学独具特色的诊法之一^[4,5], 是中医辨证重要的依据^[6,7], 在临床辨证论治中发挥着重要的作用。因此, 中医临床医师均十分重视察舌诊病、审舌用药^[8-10]。慢乙肝舌色调查表明, 该病常见舌色主要有红、淡红、紫、淡白, 紫舌是慢性肝病的主要表现, 提示瘀血内停, 舌色暗程度对于判断肝病发展趋势有一定意义^[11,12]。我们的临床研究亦提示随着舌暗到紫或瘀斑瘀点舌, 慢乙肝病情逐渐加重, 紫舌的紫暗程度对于判断病情的轻重和推测病势的发展具有重要的意义^[13]。对舌象形成机制的研究将会加深我们对舌临床意义的认识, 从而充分地发挥舌诊



■应用要点

本文发现炎性微环境是导致紫舌微循环障碍的重要原因, 因此, 治疗慢性乙型肝炎, 改善其炎性微环境对于减轻病情的发展具有重要的意义。

图2 正常小鼠与HBV转基因小鼠的舌组织病理、肝脏形态和肝组织病理比较. A, B: 正常小鼠与HBV转基因小鼠的舌组织病理(HE, $\times 200$); C, D: 正常小鼠与HBV转基因小鼠的肝脏形态; E, F: 正常小鼠与HBV转基因小鼠的肝组织病理比较(HE, $\times 200$).

对疾病诊治的指导作用^[14]. 实验研究证实, 慢乙肝青紫舌的形成机制与微循环障碍相关^[13,15], 但其具体的机制尚不清楚.

微循环是血液与组织细胞进行物质交换的主要场所^[16], 其结构及功能状态直接影响组织、细胞的物质能量代谢及信息传递^[17]. 很多研究认为, 炎症对微循环的结构和功能产生不良的影响^[18-20]. 炎症状态下往往会产生大量ROS^[21,22], ROS能够损害血管内皮细胞的功能^[23]. 实验研究发现, 内皮细胞功能与组织的炎性改变相关^[19,24]. 本实验发现HBV转基因小鼠肝脏和舌组织均表现炎性改变, 同时存在微循环障碍, 提示其微循环障碍的原因与组织的炎性改变相关. 炎性微环境是形成其微循环障碍的重要原因之一. 因此, 我们推测, 慢性乙型肝炎紫舌是该病微循环障碍的表现之一, 通过舌色的观察, 可以间接了解该病微循环状况, 对于判断病情轻重具有重要的意义. 本实验观察表明, HBV转基因小鼠慢

性乙肝阶段的舌色以紫舌多见, 在HSV颜色空间检测结果表明, 其舌色色调变深, 颜色亮度变弱, 与正常小鼠舌色存在显著差异.

颜色模型(color model)是用来精确标定和生成各种颜色的一套规则和定义^[25]. 某种颜色模型所标定的所有颜色就构成了一个颜色空间(color space). 颜色空间可以分为4大家族, 分别是RGB家族(含1个正RGB和1个负CMY模型), YUV家族(该家族将颜色分为亮度和色度2个方面, 含YUV, YIQ, YCbCr, YCbCr, YPbPr, YcgCr与YDbDr), HSV家族(该家族将颜色分为色调即Hue、饱和度即Saturation、亮度即Value 3个方面)和CIE家族(该家族将颜色精确测量为3个数值, 主要含CIE-XYZ模型)^[26]. HSV(色调-饱和度-亮度)颜色空间是均匀的颜色空间, 反映了人的视觉对颜色的感觉^[27]. 其一, 亮度分量与图像的彩色信息无关; 其二, 色调和饱和度分量与人感受颜色的方式是紧密相连的^[28]. 因此, 本研究采

■同行评价

本文采用HBV转基因小鼠研究炎症状态下小鼠舌色改变及血流变化,为舌色动物模型研究及炎症舌色研究提供了新的研究模式,具有重要的意义。

用HSV颜色模型对HBV转基因小鼠的舌色进行分析,研究发现HBV转基因小鼠舌色的色调变深,颜色亮度变弱,提示应用HSV颜色模型可以对小鼠舌色进行客观量化,这与国内其他研究结果相一致^[29,30]。

总之,本研究观察了HBV转基因小鼠的舌色表现,该模型舌色以紫色多见,其形成机制与微循环障碍有关。该模型存在肝脏和舌的炎症病理,提示炎性微环境是形成其肝脏和舌微循环障碍的重要原因。

4 参考文献

- 1 季绍良,成肇智. 中医诊断学. 北京: 人民卫生出版社, 2002: 48-49
- 2 吉林医科大学第二临床学院中医科. 182例慢性肝炎病人舌象的临床观察. 吉林医科大学学报 1976; 2: 58-60, 57
- 3 康爱君,董宇红,田枫,郑杰,王美华,郭长占,周淑佩,王兆坤,席宏丽,曾争. 乙型肝炎病毒转基因小鼠病理学观察. 中国实验动物学杂志 2002; 12: 8-10
- 4 张广河,程畅和. 舌诊在中医内科中的应用研究. 河南中医 2011; 31: 602-603
- 5 马天明,李沫,张福利. 浅谈《温热论》辨舌理论在皮肤科的应用. 中医药信息 2010; 27: 57-58
- 6 朱培一,汪红兵,刘宝利,张琳. 李乾构教授脾胃病辨证经验介绍. 新中医 2011; 43: 179-181
- 7 许永华,李桃兰. 观察舌象与辨证施护. 云南中医中药杂志 2010; 31: 80
- 8 陈保平. 略论舌诊在临床上的应用意义. 中医学报 2010; 25: 890-891
- 9 程五中,谢世平,刘爱华,李素香,张淼,许前磊. 舌像研究进展及舌诊在艾滋病辨证中的作用. 中华中医药学刊 2009; 27: 2278-2281
- 10 贾秀琴,吴正治,张永锋,曹美群. 舌诊在肾脏病中的应用. 深圳中西医结合杂志 2010; 20: 313-315, 324
- 11 刘文兰,张炎,于玫,范晔,张秋云,李秀惠,胡建华. 慢性乙型肝炎舌色与舌象其他特征关系的研究. 浙江中医杂志 2004; 39: 516-519
- 12 赵钢. 王灵台治疗慢性乙型肝炎临床经验和特色. 上海中医药大学学报 2006; 20: 57-59
- 13 张红月,刘文兰,胡建华,车念聪,王兰,高连印,王敏. 慢性乙型肝炎青紫舌的形成机制及临床意义. 世界华

人消化杂志 2010; 18: 2271-2273

- 14 杨惠,高明利. 干燥综合征舌象形成机制的初步探讨. 中医研究 2008; 21: 4-6
- 15 罗振亮,陈群. 紫舌研究初探. 辽宁中医药大学学报 2011; 131: 47-48
- 16 胡锋,查道刚,陈向辉,杜荣生,周冰洁,刘伊丽. 减阻剂对正常大鼠后肢骨骼肌微循环灌注的影响. 中国医学科学院学报 2011; 33: 189-193
- 17 徐菲菲,刘秀华. 蛋白质组学技术进展及其在微循环研究中的应用. 生理科学进展 2010; 41: 429-434
- 18 Granger HJ, Schelling ME, Lewis RE, Zawieja DC, Meininger CJ. Physiology and pathobiology of the microcirculation. *Am J Otolaryngol* 1988; 9: 264-277
- 19 Hansen PR. Inflammatory alterations in the myocardial microcirculation. *J Mol Cell Cardiol* 1998; 30: 2555-2559
- 20 朱智德. 心肌微循环障碍的中医药防治进展. 广西中医学院学报 2011; 14: 58-60
- 21 余莹,李长明,周沛然,傅兰君, Lance Dworkin, 余晨. 坎地沙坦在炎症过程中抑制氧化应激反应机制的研究. 同济大学学报(医学版) 2010; 31: 59-63
- 22 温韬,刘焱,任锋,武志明,赵金垣. 细胞色素P450 2E1在大鼠急性肝损伤中的表达及其意义. 胃肠病学和肝病学杂志 2006; 25: 392-395
- 23 林宇,崔红霞,宋娟. ROS对内皮细胞胞浆游离钙水平的影响. 齐齐哈尔医学院学报 2009; 30: 1811-1812
- 24 张冀冠,李晓辉,樊继山,张海港,刘彦华,李淑惠,王秀琴,汪云利. 炎症促进大鼠动脉粥样硬化初期内皮功能病变机制研究. 现代生物医学进展 2007; 7: 1461-1463
- 25 王鹤蒙,张艳,周昌乐. 颜色模型在中医舌诊中的应用. 黑龙江科技信息 2007; 15: 66-67
- 26 Jose M. Chaves-González, Miguel A. Vega-Rodríguez, Juan A. Gómez-Pulido, Juan M. Sánchez-Pérez. Detecting skin in face recognition systems: A colour spaces study. *Digital Signal Processing* 2010; 20: 806-823
- 27 黄春艳,杨国胜,侯艳丽. 基于颜色直方图和空间信息融合的图像分割方法. 计算机工程与应用 2005; 41: 85-87
- 28 张国权,李战明,李向伟,魏伟一. HSV空间中彩色图像分割研究. 计算机工程与应用 2010; 46: 179-181
- 29 胡申宁,李文书,施国生,何芳芳. 基于PCA-AdaBoost的舌象颜色分类研究. 广西师范大学学报(自然科学版) 2009; 27: 158-161
- 30 乔园园,杨玲,吴夏,张明涛. 舌色的模式识别研究. 计算机与应用化学 2008; 25: 721-723

编辑 张姗姗 电编 闫晋利

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

• 消息 •

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

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

西维来司钠对大鼠重症急性胰腺炎炎症反应的治疗作用

脱红芳, 王京斌, 郭怀斌, 王 丽, 张万星, 彭彦辉

脱红芳, 王京斌, 郭怀斌, 王丽, 张万星, 彭彦辉, 河北省人民医院普通外科 河北省石家庄市 050051

脱红芳, 医学博士, 主要从事急性胰腺炎发病机制及治疗方法的研究。

河北省自然科学基金资助项目, No. C2008001284

作者贡献分布: 本研究由脱红芳与彭彦辉立题设计; 脱红芳与张万星进行指导; 郭怀斌与王丽参与实验操作; 脱红芳与王京斌负责动物实验、实验数据整理; 最终的论文写作由脱红芳完成。

通讯作者: 彭彦辉, 主任医师, 050051, 河北省石家庄市和平西路348号, 河北省人民医院普通外科. yhpeng1858@sina.com
电话: 0311-85989930

收稿日期: 2011-09-15 修回日期: 2011-11-12

接受日期: 2011-12-07 在线出版日期: 2011-12-18

Sivelestat mitigates severe acute pancreatitis in rats

Hong-Fang Tuo, Jing-Bin Wang, Huai-Bin Guo, Li Wang, Wan-Xing Zhang, Yan-Hui Peng

Hong-Fang Tuo, Jing-Bin Wang, Huai-Bin Guo, Li Wang, Wan-Xing Zhang, Yan-Hui Peng, Department of General Surgery, People's Hospital of Hebei Province, Shijiazhuang 050051, Hebei Province, China

Supported by: the Natural Science Foundation of Hebei Province, No. C2008001284

Correspondence to: Yan-Hui Peng, Chief Physician, Department of General Surgery, People's Hospital of Hebei Province, No. 348 Heping Road, Hebei Province, Shijiazhuang 050051, China. yhpeng1858@sina.com

Received: 2011-09-15 Revised: 2011-11-12

Accepted: 2011-12-07 Published online: 2011-12-18

Abstract

AIM: To evaluate the therapeutic effect of sivelestat on severe acute pancreatitis (SAP) in a rat model by measuring the levels of serum neutrophil elastase (NE) and interleukin-6 (IL-6) and examining pancreatic pathological changes.

METHODS: SAP was induced in rats by retrograde injection of 5% sodium taurocholate into the biliopancreatic duct. Sivelestat was instilled continuously with an infusion pump in rats in the treatment group. Pancreatic pathological changes were evaluated by HE staining. The levels of serum NE and IL-6 were measured by ELISA. The level of serum amylase was measured using a biochemical analyzer.

RESULTS: The level of serum amylase was higher and pancreatic pathological changes

were obvious in SAP rats compared to control rats. The levels of serum amylase, NE and IL-6 at various time points were significantly lower in treated rats than in SAP rats (3 h: 5636.22 ± 713.57 vs 5835.75 ± 681.52 , 16.99 ± 3.28 vs 22.93 ± 4.74 , 181.86 ± 36.56 vs 281.82 ± 30.79 ; 6 h: 5743.44 ± 624.93 vs 6253.66 ± 533.99 , 23.63 ± 4.47 vs 31.81 ± 4.69 , 184.15 ± 28.56 vs 319.39 ± 21.73 ; 12 h: 7098.93 ± 698.42 vs 8420.74 ± 779.72 , 24.46 ± 5.02 vs 39.21 ± 6.23 , 192.52 ± 37.65 vs 354.21 ± 23.72 , all $P < 0.05$). The score of pancreatic pathological changes was significantly lower in treated rats than in SAP rats ($P < 0.05$). Serum levels of NE and IL-6 had a positive correlation with the score of pancreatic pathology.

CONCLUSION: Sivelestat could reduce serum levels of IL-6 and NE, mitigate pancreatic injury, and inhibit inflammatory reaction in rats with SAP.

Key Words: Acute pancreatitis; Sivelestat; Neutrophil elastase; Interleukin-6

Tuo HF, Wang JB, Guo HB, Wang L, Zhang WX, Peng YH. Sivelestat mitigates severe acute pancreatitis in rats. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(35): 3579-3584

摘要

目的: 检测重症急性胰腺炎(severe acute pancreatitis, SAP)大鼠血清中中性粒细胞弹性蛋白酶(neutrophil elastase, NE)、白介素-6(interleukin-6, IL-6)的含量及胰腺病理学改变, 探讨西维来司钠对大鼠SAP的治疗作用。

方法: 采用经十二指肠乳头逆行胆胰管注射5%牛磺胆酸钠的方法制备大鼠SAP模型; 药物治疗组静脉输入西维来司钠, 切取胰腺组织行病理学评分, 测定血清中NE、IL-6及淀粉酶的含量。

结果: 牛磺胆酸钠胰胆管注射可以制作典型的急性胰腺炎模型, 其血清淀粉酶升高、胰腺病理损伤符合急性胰腺炎表现。西维来司钠治疗组血清淀粉酶值及NE、IL-6含量较模型组降低, 有显著性差异(3 h: 5636.22 ± 713.57 vs 5835.75 ± 681.52 , 16.99 ± 3.28 vs 22.93 ± 4.74 ,

■背景资料

重症急性胰腺炎是临床难治疾病之一。随着近年研究的深入, 对重症急性胰腺炎发病机制逐渐明确, 全身炎症反应综合征导致的多器官功能障碍是重症急性胰腺炎患者死亡的主要原因。

■同行评议者

洪天配, 教授, 北京大学第三医院内分泌科

■研究前沿

中性粒细胞释放的弹性蛋白酶是重要的炎症因子之一,应用弹性蛋白酶抑制剂-西维来司钠可以抑制胰腺炎模型的急性炎症反应。

181.86±36.56 vs 281.82±30.79; 6 h: 5743.44±624.93 vs 6253.66±533.99, 23.63±4.47 vs 31.81±4.69, 184.15±28.56 vs 319.39±21.73; 12 h: 7098.93±698.42 vs 8420.74±779.72, 24.46±5.02 vs 39.21±6.23, 192.52±37.65 vs 354.21±23.72, 均 $P<0.05$); 且药物治疗组胰腺损伤的组织病理学评分较模型组降低,有显著性差异($P<0.05$)。NE、IL-6与胰腺病理学评分相关性分析显示,血清中NE、IL-6含量与胰腺损伤程度呈正相关。

结论: 西维来司钠能够降低血清中NE、IL-6浓度,减轻胰腺组织的病理损伤,减轻SAP急性期的炎症反应。

关键词: 急性胰腺炎; 西维来司钠; 中性粒细胞弹性蛋白酶; 白介素-6

脱红芳, 王京斌, 郭怀斌, 王丽, 张万星, 彭彦辉. 西维来司钠对大鼠重症急性胰腺炎炎症反应的治疗作用. 世界华人消化杂志 2011; 19(35): 3579-3584

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/3579.asp>

0 引言

急性胰腺炎(acute pancreatitis, AP)是临床常见的急腹症之一,发生率为4.8-80/10万,且有逐年增高的趋势^[1,2]。按病情严重程度可分为轻症急性胰腺炎(mild acute pancreatitis, MAP)和重症急性胰腺炎(severe acute pancreatitis, SAP)。AP患者中约20%-30%为SAP,死亡率可达10%-40%。在SAP的死亡病例中,50.9%-73%在发病2 wk内死于多器官功能衰竭(multiple organ failure, MOF),33.3%-49.1%在发病2 wk后死于感染并发症^[3]。急性胰腺炎发病过程中早期爆发性的炎症细胞因子释放,引起全身炎症反应综合征,导致多器官功能衰竭,是患者死亡的主要原因之一^[4-6]。IL-6等炎症因子可以作为评定急性胰腺炎严重程度及判断预后的指标^[7-9]。进入21世纪后急性胰腺炎的诊疗有了长足的发展,由既往的内科或外科治疗到目前的药物治疗为主,适时手术干预的总和治疗原则;但医疗费用较高,对于重症急性胰腺炎治疗效果仍不理想^[10,11]。如何控制SAP早期的炎症反应,是目前实验研究的热点之一。

西维来司钠(Sivelestat)是一种小分子中性粒细胞弹性蛋白酶抑制剂,能选择性地抑制中性粒细胞弹性蛋白酶活性(neutrophil elastase, NE),是日本小野药品工业公司开发的全球首个治疗伴有全身炎症反应综合征的急性肺损伤的

药物^[12-14]。本实验主要研究早期应用西维来司钠是否对SAP大鼠模型炎症反应的治疗作用,为临床应用西维来司钠治疗SAP提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 材料 健康清洁级SD大鼠54只,雌雄不限,体重250-280 g,由河北医科大学实验动物中心提供(合格证编号: 706106)。编号后随机分成3组,即对照组、AP模型组和AP药物治疗组(18只/组)。其中每个实验组又分成3个时间点,分别为3 h、6 h和12 h,每个时间点均对应6只模型鼠。

1.2 方法

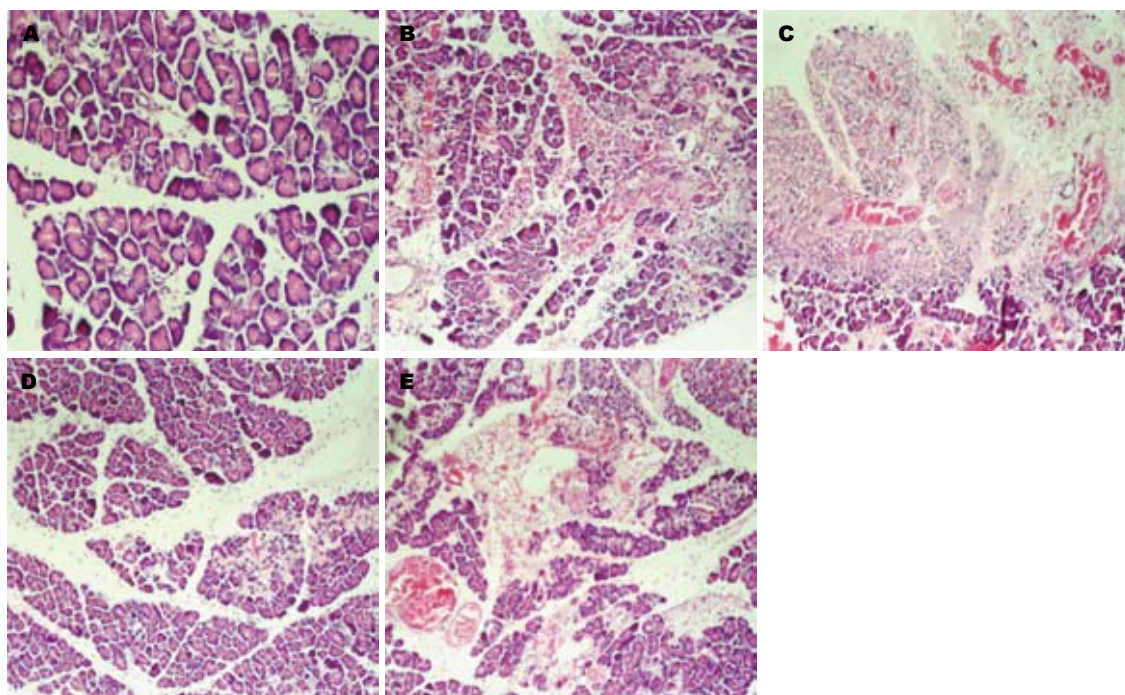
1.2.1 造模: 本文采用Aho等^[15,16]的方法并进行改良。模型组大鼠术前12 h禁食不禁水,麻醉固定后,首先在大鼠颈静脉穿刺并留置套管针,连接微量注射泵给予生理盐水0.5 mL/(100 g·h)。然后开腹,用24号套管针经十二指肠乳头向胆胰管穿刺,同时用无创伤动脉夹阻断胆胰管出肝门端,外套管末端连接微量注射泵注入5%牛磺胆酸钠0.1 mL/100 g, 5 mL/h,约3 min注完后拔除外套管,用无创伤动脉夹夹闭胆胰管十二指肠乳头端约5 min,缝合肠壁戳孔,放开两端动脉夹,关腹;药物治疗组大鼠麻醉后,颈静脉微量注射泵静注西维来司钠,剂量为5 mg/100 (g·h),每毫克西维来司钠加入2 μ L的0.5 mmol/L Na₂CO₃,补液生理盐水0.5 mL/100 (g·h),然后制备动物模型,具体方法同模型组;对照组大鼠麻醉后颈静脉持续静注与模型组等量等速度的生理盐水,然后开腹,轻翻动胰腺及十二指肠后关腹。

1.2.2 各项指标检测: 根据规定的时间点,将大鼠再次开腹,腹腔动脉穿刺取血后,4 °C下3 000 r/min离心10 min,取血清应用全自动生化分析仪检测淀粉酶含量,ELISA法测定NE、白介素-6(IL-6)的含量;取胰体尾部固定位置胰腺组织,40 g/L多聚甲醛固定,用HE染色,参照Schmidt法^[17]对胰腺损伤进行评分,评分越高代表损伤程度越重(表1)。

统计学处理 实验各组数据采用SPSS11.5统计学软件处理,结果以mean±SD表示,采用单因素方差分析, Pearson法计算NE、IL-6含量与胰腺组织病理学评分的相关性,当 $P<0.05$ 时认为具有统计学意义。

2 结果

2.1 胰腺及腹腔组织的肉眼观察 对照组各时间点胰腺无充血水肿,腹腔未见积液、皂化斑; AP



■创新盘点

本文通过急性胰腺炎大鼠模型, 研究西维来司钠对急性胰腺炎的治疗作用. 此类研究尚未见报道.

图1 胰腺组织的HE染色. A: 对照组胰腺组织($\times 200$); B, C: AP组6 h、12 h胰腺组织($\times 100$); D, E: 治疗组6 h、12 h胰腺组织($\times 100$).

表1 胰腺组织病理学评分标准

评分	水肿	炎症(小叶内或血管周围白细胞数/高倍视野)	出血(血管外与间隔内红细胞数/高倍视野)	腺细胞坏死(坏死细胞数/高倍视野)
1分	小叶间隔局灶性扩张	1-10	1-50	1-4
2分	同1+小叶间隔广泛扩张	11-20	51-100	5-10
3分	同2+腺泡间隔扩张	21-30	101-150	11-16
4分	同3+细胞间隔扩张	>30个或小脓肿形成	>150	>16

模型组3 h时间点腹腔内少量积液, 胰腺组织充血肿胀, 胃肠无明显扩张, 6、12 h时间点大鼠腹腔内可见大量血性积液, 胃肠扩张明显, 胰腺周围大网膜及肠系膜见较多皂化斑, 胰腺组织广泛瘀血坏死, 与周围组织粘连; AP药物治疗组大鼠腹腔内见少量积液, 胃肠轻度扩张, 胰腺肿胀呈点状坏死.

2.2 光学显微镜观察胰腺组织 对照组见胰腺小叶结构清晰, 间质内未见炎症细胞及红细胞; AP模型组3 h和6 h时间点见胰腺组织间质显著增宽, 小叶间隔及腺泡间隔扩张, 有核炎症细胞浸润, 血管扩张充血, 红细胞分布于间质或片状存在于胰腺组织内, 实质内可见散在的灶状凝固性坏死, 细胞轮廓消失, 胞核破碎、溶解. 12 h可见胰腺小叶排列紊乱, 小叶间充斥大量炎症细胞及红细胞, 胰腺组织大片坏死, 坏死区内腺泡结构消失, 腺泡细胞萎缩、胞核溶解消失明显; AP药物治疗组各时间点均见胰腺小叶间隔有增

宽, 可见红细胞及炎症细胞散在分布于间质内, 部分小叶内可见腺泡细胞坏死改变(图1).

2.3 胰腺组织病理学评分 AP模型组随时间延长损伤程度加重, 各时间点间差异具有显著性($P<0.05$), 在各时间点与对照组相比评分均增高, 差异具有显著性($P<0.05$); AP治疗组胰腺损伤较AP模型组同时间点降低, 病理学评分在各时间点与AP模型组相比差异具有显著性($P<0.05$, 表2).

2.4 生化指标检测 血清淀粉酶测定结果, B组各时间点血清淀粉酶含量较A组均有明显升高, 差异具有显著性($P<0.05$), 各时间点的血清淀粉酶含量随时间延长而增加, 差异具有显著性($P<0.05$); C组3 h、6 h时间点血清淀粉酶含量较B组同时间点无统计学意义($P>0.05$), 12 h时间点血清淀粉酶值较B组含量降低, 差异具有显著性($P<0.05$). 细胞因子检测结果, B组血清中NE及IL-6含量在各时间点较A组均升高, 差异具有显著性($P<0.05$); 而且在各时间点间随时间延长而

■同行评价

本研究为临床急性胰腺炎的治疗提供实验依据,接近临床需要,实用性强,研究价值大。

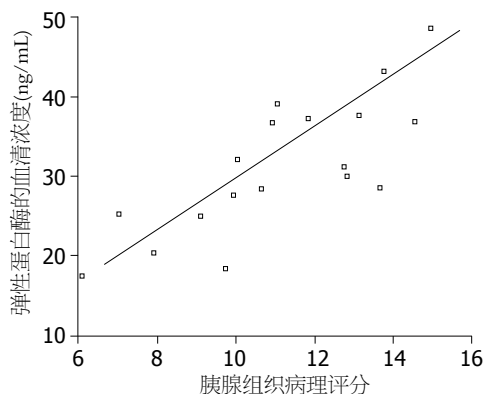


图2 血清中弹性蛋白酶含量与胰腺组织病理评分的关系。

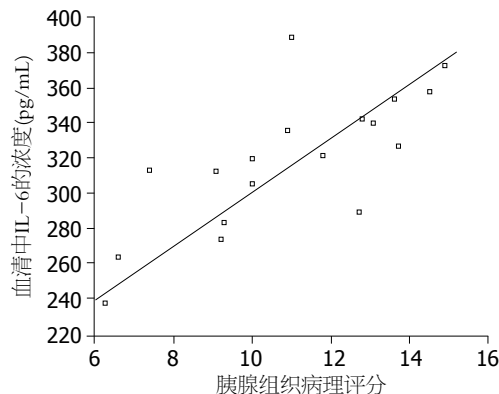


图3 血清中IL-6含量与胰腺组织病理评分的关系。

表2 胰腺组织病理学评分结果 (mean ± SD)

分组	3 h	6 h	12 h
A	0.50 ± 0.55	0.50 ± 0.55	0.50 ± 0.55
B	7.83 ± 1.53 ^a	11.38 ± 1.69 ^{ab}	13.36 ± 1.39 ^{ab}
C	5.96 ± 1.76 ^c	8.32 ± 1.80 ^c	9.22 ± 1.62 ^c

^a $P < 0.05$ vs A组; ^b $P < 0.05$ vs B组; ^c $P < 0.05$ vs B组3 h; ^d $P < 0.05$ vs B组6 h。

表3 血清学测定结果 (mean ± SD)

	分组	3 h	6 h	12 h
Amy(U/L)	对照组	1135.44 ± 181.16	1215.82 ± 132.12	1176.36 ± 139.47
	模型组	5835.75 ± 681.52 ^a	6253.66 ± 533.99 ^{ab}	8420.74 ± 779.72 ^{ab}
	治疗组	5636.22 ± 713.57 ^a	5743.44 ± 624.93 ^a	7098.93 ± 698.42 ^{ac}
NE(μg/L)	对照组	9.25 ± 2.16	9.51 ± 2.53	9.32 ± 2.08
	模型组	22.93 ± 4.74 ^a	31.81 ± 4.69 ^{ab}	39.21 ± 6.23 ^{ab}
	治疗组	16.99 ± 3.28 ^c	23.63 ± 4.47 ^c	24.46 ± 5.02 ^c
IL-6(ng/L)	对照组	91.23 ± 18.09	91.18 ± 14.98	90.11 ± 16.84
	模型组	281.82 ± 30.79 ^a	319.39 ± 21.73 ^{ab}	354.21 ± 23.72 ^{ab}
	治疗组	181.86 ± 36.56 ^c	184.15 ± 28.56 ^c	192.52 ± 37.65 ^c

^a $P < 0.05$ vs 对照组; ^b $P < 0.05$ vs 模型组; ^c $P < 0.05$ vs 同组3 h; ^d $P < 0.05$ vs 同组6 h。

升高,差异具有显著性($P < 0.05$); C组各时间点的NE及IL-6含量较B组同时时间点均降低,差异具有显著性($P < 0.05$,表3)。

2.5 相关性 B组中, SAP大鼠血清NE含量与胰腺组织病理学评分相关系数 $r = 0.779$, $P < 0.05$ (图2); 血清IL-6含量与胰腺组织病理学评分相关系数 $r = 0.745$, $P < 0.05$ (图3)。此结果表明,血清中NE、IL-6含量与胰腺组织病理学评分之间具有正相关关系。

3 讨论

SAP发病机制复杂,发病后早期出现的炎症反应综合征是其主要的病理生理变化之一。1988年

Rinderknecht^[18]提出白细胞过度激活学说后,越来越多的研究认为, SAP是在异常激活的胰酶作用下,机体释放出大量炎症介质与细胞因子,激活粒细胞、内皮细胞和其他免疫细胞,这些细胞再释放出大量的炎症介质,从而诱发“炎症反应的瀑布效应”,造成胰腺局部炎症进一步的扩大及全身炎症反应综合征。在这一炎症反应过程中各炎症因子之间相互作用,互相影响。近年中药在治疗重症胰腺炎方面取得了可喜的成绩:血必净、清胰汤方剂等控制炎症反应方面有着独特的作用,主要是活血化瘀、清热排毒^[19,20]。另外,血液滤过透析也可以清除部分炎症因子,对控制炎症反应有益^[21,22]。但从本质

上说上述方法均为治标之法. 要想从根本上控制炎症反应就应从炎症反应机制着手, 切断炎症因子的级联瀑布效应.

中性粒细胞在炎症因子的作用下聚集、活化, 释放出大量的中性粒细胞弹性蛋白酶(neutrophil elastase, NE)^[23]. 过量的弹性蛋白酶可降解胶原蛋白、层粘连蛋白和其他细胞的细胞内基质, 增加血管通透性, 促进中性粒细胞渗出、炎症因子释放. 弹性蛋白酶抑制剂(西维来司钠)抑制NE活性, 发挥抗炎作用. 目前研究较多的是西维来司钠控制肺的急性炎症损伤^[23-25], 并且已应用于临床并取得了良好的临床效果^[26]. 近年有关弹性蛋白酶抑制剂抑制炎症反应的研究较多. Fukatsu等^[27]应用西维来司钠研究肠道缺血动物模型, 表明西维来司钠可能预防缺血后的系统炎症反应及保护其免疫能力. Suda等^[28]研究脓毒症动物模型显示, 西维来司钠可以降低白介素-1 β 和白介素-10的血清浓度, 降低实验期模型动物死亡率. “西维来司钠对实验动物大脑缺血/再灌注损伤的保护作用研究”也已报道^[29]. 虽然20世纪90年代已经报道NE在SAP的作用^[30], 但是西维来司钠用于SAP的治疗研究未见报道.

本实验研究西维来司钠对AP的治疗作用显示: 淀粉酶、NE、IL-6在急性胰腺炎模型血清中的浓度升高, 应用西维来司钠可降低血清中IL-6、NE浓度. 淀粉酶是胰腺组织受损后首先在血液中表现的胰腺特异性受损指标. 应用西维来司钠后血清淀粉酶浓度的降低胰腺组织损伤减轻. IL-6是在炎症刺激下由多种细胞释放, 是介导急性炎症反应的主要因子. IL-6刺激血管内皮细胞收缩, 间隙增宽, 血管通透性增加, 使白细胞游出血管壁. Cruickshank等^[9]认为IL-6水平可以反映SAP时粒细胞/单核巨噬细胞活性, 并可反映内皮细胞损伤程度. IL-6是目前认为与急性胰腺炎严重程度密切相关的炎症因子之一. 应用西维来司钠抑制NE活性, 同时降低血清中IL-6的浓度, 表明西维来司钠通过抑制NE活性, 可以达到抑制炎症反应的目的.

西维来司钠作为外源性NE抑制剂, 他不受活性氧的影响, 可到达中性粒细胞和组织间隙, 在炎症局部有效抑制弹性蛋白酶活性^[14]. 本实验通过观察急性胰腺模型腹水量及对胰腺组织病理评分可以看出应用西维来司钠组无论是腹水量、胰腺病理学评分都有明显的改善. 相关性分析表明: 血清中IL-6、NE含量均与胰腺病理

学评分的改善成正相关. 说明西维来司钠不仅可以改善系统炎症反应, 也能够对胰腺本身的炎症反应起到抑制作用.

总之, 应用西维来司钠治疗AP模型, 不仅能够减轻机体的全身炎症反应, 也能够减轻胰腺组织的损伤程度. 为临床应用西维来司钠治疗AP提供实验依据.

4 参考文献

- Lowenfels AB, Sullivan T, Fiorianti J, Maisonneuve P. The epidemiology and impact of pancreatic diseases in the United States. *Curr Gastroenterol Rep* 2005; 7: 90-95
- Sekimoto M, Takada T, Kawarada Y, Hirata K, Mayumi T, Yoshida M, Hirota M, Kimura Y, Takeda K, Isaji S, Koizumi M, Otsuki M, Matsuno S. JPN Guidelines for the management of acute pancreatitis: epidemiology, etiology, natural history, and outcome predictors in acute pancreatitis. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 2006; 13: 10-24
- Carnovale A, Rabitti PG, Manes G, Esposito P, Pacelli L, Uomo G. Mortality in acute pancreatitis: is it an early or a late event? *JOP* 2005; 6: 438-444
- 熊建平, 文军. 急性胰腺炎中全身炎症反应综合征与炎症反应综合征. *国际外科学杂志* 2008; 35: 627-630
- 齐洛生, 杨宏富, 孙荣青, 李月霞, 张少雷. 影响重症急性胰腺炎预后的危险因素分析. *中国危重病急救医学* 2010; 22: 557-558
- Al Mofleh IA. Severe acute pancreatitis: pathogenetic aspects and prognostic factors. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 675-684
- Dambrauskas Z, Giese N, Gulbinas A, Giese T, Berberat PO, Pundzius J, Barauskas G, Friess H. Different profiles of cytokine expression during mild and severe acute pancreatitis. *World J Gastroenterol* 2010; 16: 1845-1853
- 姜琳, 朱金水. 急性胰腺炎预后与细胞免疫因子相关研究新进展. *世界华人消化杂志* 2002; 10: 1045-1047
- Cruickshank AM, Fraser WD, Burns HJ, Van Damme J, Shenkin A. Response of serum interleukin-6 in patients undergoing elective surgery of varying severity. *Clin Sci (Lond)* 1990; 79: 161-165
- Tonsi AF, Bacchion M, Crippa S, Malleo G, Bassi C. Acute pancreatitis at the beginning of the 21st century: the state of the art. *World J Gastroenterol* 2009; 15: 2945-2959
- Andersson B, Pendse ML, Andersson R. Pancreatic function, quality of life and costs at long-term follow-up after acute pancreatitis. *World J Gastroenterol* 2010; 16: 4944-4951
- 马铁军, 高宗科, 王毅, 王东平. 新型弹性蛋白酶抑制剂-西维来司钠的神经保护作用. *国际神经病学神经外科杂志* 2011; 38: 378-381
- 胡显腾, 宋歌, 孔令超, 刘小宇. 白细胞弹性蛋白酶抑制剂. *生命化学* 2011; 31: 238-243
- 郑修艳, 曹立莉, 杜冠华. 新型弹性蛋白酶抑制剂西维来司钠临床前药理及机制研究. *中国新药杂志* 2004; 13: 292-294
- Aho HJ, Koskensalo SM, Nevalainen TJ. Experimental pancreatitis in the rat. Sodium taurocholate-induced acute haemorrhagic pancreatitis. *Scand J Gastroenterol* 1980; 15: 411-416
- Aho HJ, Nevalainen TJ, Aho AJ. Experimental pancreatitis in the rat. Development of pancreatic ne-

- crosis, ischemia and edema after intraductal sodium taurocholate injection. *Eur Surg Res* 1983; 15: 28-36
- 17 Schmidt J, Lewandrowski K, Warshaw AL, Compton CC, Rattner DW. Morphometric characteristics and homogeneity of a new model of acute pancreatitis in the rat. *Int J Pancreatol* 1992; 12: 41-51
 - 18 Rinderknecht H. Fatal pancreatitis, a consequence of excessive leukocyte stimulation? *Int J Pancreatol* 1988; 3: 105-112
 - 19 段永庆, 甘平, 张家骅, 廖陈, 谭晶, 许世才. 血必净对急性重症胰腺炎患者炎性介质的影响. *国际中医中药杂志* 2011; 33: 104-106
 - 20 毕旭东, 赵晶, 付晓光. 清胰汤联合地塞米松对急性重型胰腺炎早期全身炎症反应综合征影响的实验研究. *中国现代医学杂志* 2010; 18: 2760-2766
 - 21 郑建臣, 程斌, 郑要初, 郭晓榕. 高容量血液滤过对重症急性胰腺炎的治疗作用. *世界华人消化杂志* 2009; 17: 2379-2384
 - 22 刘晓政, 潘宏伟. 持续血液滤过治疗老年重症急性胰腺炎的疗效观察. *中国老年医学杂志* 2010; 30: 1509-1510
 - 23 Tomoko Ishii, Kent Doi, Koji Okamoto, et al. Neutrophil Elastase Contributes to Acute Lung Injury Induced by Bilateral Nephrectomy. *Am J Pathol* 2010; 177: 1665-1673
 - 24 Hayashida K, Fujishima S, Sasao K, Orita T, Toyoda Y, Kitano M, Hori S. Early administration of sivelestat, the neutrophil elastase inhibitor, in adults for acute lung injury following gastric aspiration. *Shock* 2011; 36: 223-227
 - 25 权明桃, 江智霞, 任阳光, 施久军, 罗祎, 程华刚. 西维来司钠对脑损伤继发吸入性肺损伤大鼠的影响研究. *重庆医科大学学报* 2011; 36: 1044-1047
 - 26 Aikawa N, Ishizaka A, Hirasawa H, Shimazaki S, Yamamoto Y, Sugimoto H, Shinozaki M, Taenaka N, Endo S, Ikeda T, Kawasaki Y. Reevaluation of the efficacy and safety of the neutrophil elastase inhibitor, Sivelestat, for the treatment of acute lung injury associated with systemic inflammatory response syndrome; a phase IV study. *Pulm Pharmacol Ther* 2011; 24: 549-554
 - 27 Fukatsu K, Tanabe K, Maeshima Y, Omata J, Yasuhara H, Saitoh D. Neutrophil elastase inhibitor restores gut ischemia reperfusion-induced impairment of gut immunity with reduced plasma interleukin-6 concentrations in mice. *Surg Infect (Larchmt)* 2010; 11: 517-522
 - 28 Suda K, Takeuchi H, Hagiwara T, Miyasho T, Okamoto M, Kawasako K, Yamada S, Suganuma K, Wada N, Saikawa Y, Fukunaga K, Funakoshi Y, Hashimoto S, Yokota H, Maruyama I, Ishizaka A, Kitagawa Y. Neutrophil elastase inhibitor improves survival of rats with clinically relevant sepsis. *Shock* 2010; 33: 526-531
 - 29 丁丽君, 董志, 乐乐乐, 秦黄英. 西维来司钠对大鼠脑缺血/再灌注损伤的保护作用及机制. *中国药理学通报* 2011; 27: 54-58
 - 30 Gross V, Schölmerich J, Leser HG, Salm R, Lausen M, Rückauer K, Schöffel U, Lay L, Heinisch A, Farthmann EH. Granulocyte elastase in assessment of severity of acute pancreatitis. Comparison with acute-phase proteins C-reactive protein, alpha 1-antitrypsin, and protease inhibitor alpha 2-macroglobulin. *Dig Dis Sci* 1990; 35: 97-105

编辑 张姗姗 电编 闫晋利

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

• 消息 •

中国科技信息研究所发布《世界华人消化杂志》 影响因子 0.625

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

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

肠三叶因子对肠组织TLR2、4和NF-κB的作用及其与肠损伤保护的关系

荆科, 孙梅

荆科, 中国医科大学附属四院儿科 辽宁省沈阳市 110032
孙梅, 中国医科大学盛京医院儿科 辽宁省沈阳市 110004
荆科, 副主任医师, 医学博士, 主要从事新生儿急救、感染与免疫研究。

作者贡献分布: 本课题由荆科与孙梅设计; 由荆科提供试剂, 完成实验, 数据分析和论文撰写。

通讯作者: 荆科, 副主任医师, 110032, 辽宁省沈阳市, 中国医科大学附属四院儿科. jingke3185@sina.com

电话: 024-62571549

收稿日期: 2011-08-05 修回日期: 2011-11-22

接受日期: 2011-12-07 在线出版日期: 2011-12-18

Treatment with intestinal trefoil factor regulates TLR2/4 and NF-κB expression and protects against LPS-induced intestinal injury in rats

Ke Jing, Mei Sun

Ke Jing, Department of Pediatrics, the Fourth Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang 110032, Liaoning Province, China

Mei Sun, Department of Pediatrics, ShengJing Hospital of China Medical University, Shenyang 110004, Liaoning Province, China

Correspondence to: Ke Jing, Associate Chief Physician, Department of Pediatrics, the Fourth Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang 110032, Liaoning Province, China. jingke3185@sina.com

Received: 2011-08-05 Revised: 2011-11-22

Accepted: 2011-12-07 Published online: 2011-12-18

Abstract

AIM: To investigate whether intestinal trefoil factor (ITF) regulates the expression of Toll-like receptor (TLR) 2/4 and nuclear factor-κB (NF-κB) and exerts a protective effect against lipopolysaccharide (LPS)-induced intestinal injury in rats.

METHODS: Twenty-four 10-day-old Wistar rats were randomly and equally divided into three groups: control group (intraperitoneally injected with normal saline 1 mL/kg), endotoxemia group (intraperitoneally injected with LPS 5 mg/kg), and LPS + ITF group (intraperitoneally injected with LPS 5 mg/kg and recombinant ITF 0.1 mL/per rat). Rats were sacrificed 3 h after injection. A segment of the distal ileum was dis-

sected for hematoxylin-eosin staining. Pathological changes in the small intestine were observed under an optical microscope. The mRNA and protein expression of TLR2/4 and NF-κB was detected by RT-PCR and immunohistochemistry, respectively.

RESULTS: The structure of the small intestine of rats in the control group was normal. Inflammatory cell infiltration and interstitial/epithelial edema were observed in rats in the LPS group and LPS + ITF group, and the pathological changes were significantly milder in the LPS + ITF group than in the LPS group. The expression of TLR2 mRNA and protein in the LPS + ITF group was significantly higher than that in the LPS group (7.453 ± 1.90 vs 3.069 ± 0.08 , 52.125 ± 4.1 vs 20.688 ± 2.4 , both $P < 0.01$). The expression of TLR4 and NF-κB mRNAs and proteins in the LPS + ITF group was significantly lower than that in the LPS group (TLR4 mRNA: 5.373 ± 1.18 vs 16.711 ± 1.28 , $P < 0.01$; TLR4 protein: 16.338 ± 4.98 vs 22.760 ± 3.68 , $P < 0.01$; NF-κB mRNA: 0.533 ± 0.05 vs 2.228 ± 0.72 , $P < 0.01$; NF-κB protein: 36.526 ± 9.18 vs 50.433 ± 3.37 , $P < 0.05$).

CONCLUSION: Treatment with ITF protects against LPS-induced intestinal injury in rats possibly via mechanisms associated with down-regulation of TLR4 and NF-κB expression.

Key Words: Intestinal trefoil factor; Toll-like receptor; Nuclear factor-κB; Lipopolysaccharide; Intestine

Jing K, Sun M. Treatment with intestinal trefoil factor regulates TLR2/4 and NF-κB expression and protects against LPS-induced intestinal injury in rats. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(35): 3585-3590

摘要

目的: 探讨肠三叶因子(intestinal trefoil factor, ITF)对肠组织Toll样受体2、4(Toll-like receptor 2, 4, TLR2、4)及核因子-κB(nuclear factor-κB, NF-κB)的调节与肠损伤保护作用的关系。

■背景资料

NF-κB是具有多向性调节作用的蛋白质分子, 过度活化会激活、增强机体的非特异及特异性免疫反应, 造成组织损伤和器官功能紊乱。TLR是能识别病原微生物的免疫受体, 通过信号转导激发天然免疫反应。肠三叶因子是三叶肽家族成员之一, 在肠道的自我保护和损伤后修复中具有重要作用。但肠三叶因子对肠黏膜的保护作用的机制并不十分清楚。

■同行评议者

邢建峰, 副教授, 西安交通大学医学院

■相关报道

滕旭等分别在坏死性小肠结肠炎和炎症性肠病的研究中证实,给予外源性肠三叶因子对肠黏膜具有减轻肠损伤的作用。

方法: 24只10日龄的Wistar幼鼠随机分为正常对照组、内毒素血症(lipopolysaccharide, LPS)组和LPS+ITF组($n = 8$): 对照组给予生理盐水1 mL/kg; LPS组给予LPS(5 mg/kg); LPS+ITF组给予重组肠三叶因子(rITF, 0.5 mg/只)+LPS 5 mg/kg. 均采用腹腔注射给药. 于腹腔注射后3 h处死幼鼠, 留取远端回肠组织, HE染色. 光镜下观察肠组织病理改变, RT-PCR检测肠组织TLR2、4和NF- κ B mRNA的表达. 免疫组织化学检测肠组织TLR2、4及NF- κ B蛋白的定位表达.

结果: 光镜下对照组肠组织结构正常, LPS+ITF组和LPS组均可见间质和上皮细胞水肿, LPS+ITF组较LPS组明显减轻; 肠组织TLR2 mRNA和蛋白定位表达LPS+ITF组较LPS组明显增高(7.453 ± 1.90 vs 3.069 ± 0.08 , 52.125 ± 4.1 vs 20.688 ± 2.4 , 均 $P < 0.01$); TLR4 mRNA和蛋白定位表达LPS+ITF组较LPS组明显下降(5.373 ± 1.18 vs 16.711 ± 1.28 , 16.338 ± 4.98 vs 22.760 ± 3.68 , 均 $P < 0.01$); NF- κ B mRNA和蛋白定位表达LPS+ITF组较LPS组明显下降(0.533 ± 0.05 vs 2.228 ± 0.72 , 36.526 ± 9.18 vs 50.433 ± 3.37 , $P < 0.01$, $P < 0.05$).

结论: ITF减轻肠组织损伤的保护作用可能与其下调TLR4和NF- κ B的mRNA、蛋白的表达相关.

关键词: 肠三叶因子; Toll样受体; 核因子- κ B; 脂多糖; 肠组织

荆科, 孙梅. 肠三叶因子对肠组织TLR2、4和NF- κ B的作用及其与肠损伤保护的关系. 世界华人消化杂志 2011; 19(35): 3585-3590

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/3585.asp>

0 引言

Toll样受体(Toll-like receptor, TLR)是近年发现的一种免疫受体, 是一种跨膜蛋白, 能识别病原微生物或细胞壁成分, 通过信号转导激发先天性免疫反应^[1-6]. 核因子- κ B(nuclear factor- κ B, NF- κ B)是一种能与多种细胞基因的启动子和增强子中的 κ B序列位点发生特异结合的核转录因子, 是具有多向性调节作用的蛋白质分子, 具有广泛的生物学活性. NF- κ B的过度活化会激活、增强机体的非特异及特异性免疫反应, 造成组织损伤和器官功能紊乱^[7-9]. 肠三叶因子(intestinal trefoil factor, ITF)是三叶肽家族成员之一, 由肠黏膜上皮杯状细胞分泌, 广泛存在于胃肠道, 具

有特征性的三叶结构, 被认为是内源性具有抗凋亡特性的肽类物质^[10,11], 在肠道的自我保护和损伤后修复中占有重要地位. 但ITF对肠黏膜的保护作用的机制并不十分清楚. 本研究旨在探讨ITF对肠组织的保护作用是否可以通过抑制TLR和NF- κ B的表达而实现.

1 材料和方法

1.1 材料 清洁级Wistar幼鼠24只, 10日龄, 雌雄不限, 体质量为15-25 g, 由中国医科大学医学实验动物中心提供(许可证号: SCXK(辽)2000-0009). 内毒素(*Escherichia coli* O₅₅: B₅; 脂多糖, lipopolysaccharide, LPS)购于Sigma公司; 基因重组小肠三叶因子(rITF)由北京大学蛋白质工程及植物基因工程国家重点实验室提供, 配制浓度5 mg/mL. TRIzol总RNA提取试剂购自美国Promega公司; RT-PCR试剂盒、反转录和PCR扩增所需要的酶及其他试剂购于TaKaRa公司; TLR2兔抗大鼠IgG(一抗)购于Santa Cruz公司; TLR4、NF- κ B兔抗鼠IgG(一抗)购于武汉博士德生物工程有限公司; 即用型SABC试剂盒及DAB显色剂均购于武汉博士德生物工程有限公司. PCR引物根据Medline数据库自行设计, 由上海英骏生物公司合成.

1.2 方法

1.2.1 分组和造模: 24只幼鼠随机分为正常对照组、LPS组和LPS+ITF组($n = 8$). 对照组给予生理盐水1 mL/kg; 内毒素血症组给予LPS 5 mg/kg; LPS+ITF组给予LPS 5 mg/kg+rITF 0.5 mg/只^[12], 均采用腹腔注射给药. 于腹腔注射后3 h处死, 留取距回盲端1 cm左右回肠组织, 于液氮速冻, 并转-70 °C保存; 另取肠组织40 g/L多聚甲醛固定, 以待检测和分析.

1.2.2 石蜡切片制作: 40 g/L多聚甲醛固定液中标本, 常规进行石蜡包埋, 5 μ m组织切片, HE染色, 光学显微镜下观测肠组织学改变.

1.2.3 应用RT-PCR检测TLR和NF- κ B mRNA的表达: 按TRIzol总RNA提取试剂说明书进行操作提取总RNA, 并经紫外分光光度计测定, 计算提取物RNA浓度. 并经反转录扩增cDNA, RT-PCR检测NF- κ B mRNA表达. 取cDNA 1 μ g, 10 $\times$ buffer 2 μ L, MgCl₂ 4 μ L, 10 mmol/L dNTPs 2 μ L, 引物100 ng, TagDNA多聚酶 1 U. 总体积20 μ L. 将PCR扩增之后的产物进行2%琼脂糖凝胶电泳, 凝胶成像系统及分析系统进行条带分析. TLR和NF- κ B引物序列见表1.

表 1 TLR、NF- κ B和 β -actin引物序列及扩增条件

引物名称	扩增片断(bp)	退火温度($^{\circ}$ C)
TLR2		
F: 5'-CGC TTC CTG AAC TTG TCC-3'	286	51.5
R: 5'-GGT TGT CAC CTG CTT CCA-3'		
TLR4		
F: 5'-CCA GAG CCG TTG GTG TAT -3'	419	53.5
R: 5'-GCC CTG TGA GGT CGT TGA -3'		
NF- κ B		
F: 5'-TGC GAA TGG AGC GAC AGG -3'	243	56
R: 5'-AGG CCA AAT GAA AGG AGT GG -3'		
β -actin		
F: 5'-CAC CCT GTG CTG CTC ACC GAG GCC -3'	690	55
R: 5'-CCA CAC AGA TGA CTT GCG CTC AGG -3'		

■创新盘点

本研究观察了外源性肠三叶因子对TLR和核因子- κ B的调节作用与肠损伤保护作用的关系, 对肠三叶因子在减轻肠损伤的保护作用机制方面增加了新的认识。



图 1 各组肠组织的病理改变(HE $\times$ 400). A: 正常对照组肠黏膜完整, 结构清晰; B: LPS组肠黏膜肿胀, 间质充血, 炎性细胞浸润; C: LPS+ITF组肠黏膜肿胀, 间质充血较LPS组明显减轻。

1.2.4 采用SABC(Strept Avidin-Biotin Complex, 链霉素抗生物素蛋白-过氧化物酶)法检测肠组织TLR2、4和NF- κ B蛋白定位表达: 石蜡切片常规脱蜡至水, 30% H_2O_2 +蒸馏水混合, 室温孵育10 min, 灭活内源性过氧化物酶, 蒸馏水冲洗; 经热修复抗原, 滴加5%BSA封闭液, 室温下孵育30 min; 滴加稀释的兔抗大鼠TLR2、4和NF- κ B抗体(一抗), 4 $^{\circ}$ C孵育过夜; 冲洗后滴加生物素标记的山羊抗兔IgG(二抗), 37 $^{\circ}$ C孵育30 min; 经冲洗, 再滴加SABC溶液, 37 $^{\circ}$ C孵育30 min, 冲洗, 混匀后DAB显色, 室温条件下显色5 min, 蒸馏水充分洗涤; 苏木素轻度复染10 min, 水洗返兰30 min; 脱水、二甲苯透明处理, 封片, 显微镜下观察。阴性对照: 除用PBS代替兔抗大鼠TLR2、4和NF- κ B抗体外, 其他步骤同上。以细胞膜有棕黄色染色为TLR阳性细胞; 以细胞核和细胞质内有均匀的棕黄色颗粒染色为NF- κ B阳性细胞。

免疫组织化学图片测定: 每组图片取8个视野, 采取日本OLYMPUS摄像系统和日本Meta-Morph/BX41图像数据分析系统测定积分吸光度(I4)。

统计学处理 所有数据以mean $\pm$ SD表示, 用

SPSS17.0统计软件包进行方差分析, 组间比较采用LSD法检验, $P<0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

2.1 肠组织在光镜下病理改变 NS组肠绒毛完整, 上皮细胞排列整齐, 杯状细胞少见, 无明显异常改变(图1A)。给予LPS后3 h, LPS组肠组织可见明显异常, 绒毛间质可见有充血, 少许炎性细胞浸润, 水肿明显, 肠上皮细胞排列紊乱, 细胞水肿(图1B); LPS+ITF组间质和上皮细胞水肿较LPS组明显减轻, 杯状细胞明显增加(图1C)。

2.2 肠组织TLR2、4和NF- κ B mRNA的表达 NF- κ B在NS组表达非常弱, LPS组表达较NS组明显增高, 差异有统计学意义($P<0.01$); LPS+ITF组较LPS组表达明显下调, 差异有统计学意义($P<0.01$)。TLR2 mRNA表达LPS组较NS组明显增高, 差异非常显著($P<0.01$), 有统计学意义; LPS+ITF组较NS组、LPS组均明显增高, 且差异有统计学意义($P<0.01$)。肠组织TLR4 mRNA表达LPS组较NS组明显增高, 差异非常显著($P<0.01$), 有统计学意义; LPS+ITF组TLR4 mRNA表达较LPS组明显降低, 差异非常显著

■应用要点

肠三叶因子本身是肠道自身分泌的多肽类因子,在肠道的自我保护和损伤后修复中具有重要作用。在有害因素作用下对肠组织具有保护作用。拓展外源性肠三叶因子在肠损伤保护作用的应用和研究,具有一定的临床指导意义。

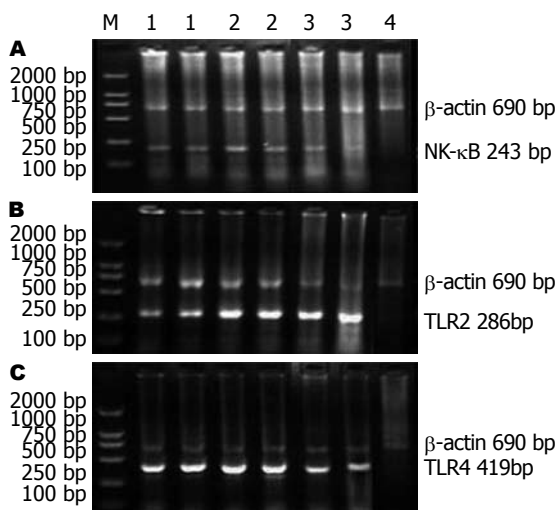


图2 肠组织TLR2、4和NF- κ B mRNA表达。A: 肠组织NF- κ B mRNA表达扩增产物电泳图; B: 肠组织TLR2 mRNA表达扩增产物电泳图; C: 肠组织TLR4 mRNA表达扩增产物电泳图。M: Marker; 1: NS组; 2: LPS组; 3: ITF组; 4: 空白对照组。

($P < 0.01$), 有统计学意义(表2, 图2)。

2.3 肠组织TLR2、4和NF- κ B蛋白定位表达 免疫组化见NF- κ B蛋白表达在NS组肠绒毛顶端上皮细胞胞浆和胞核内, LPS组的蛋白表达较NS组明显增强, 有统计学意义($P < 0.05$); LPS+ITF组蛋白表达较LPS组明显降低, 差异有统计学意义($P < 0.01$)。TLR2蛋白表达在NS组肠绒毛上皮细胞, 胞膜可见颜色较浅的棕黄色染色, LPS组蛋白表达明显增强, 较NS组有非常显著的差异, 有统计学意义($P < 0.01$); LPS+ITF组蛋白表达较NS组、LPS组均明显增强, 差异非常显著, 有统计学意义($P < 0.01$)。TLR4蛋白表达在NS组肠绒毛上皮细胞, 胞膜可见棕黄色染色较浅, LPS组蛋白表达较NS组明显增强, 差异有统计学意义($P < 0.01$); LPS+ITF组蛋白表达较LPS组明显减弱, 差异非常显著($P < 0.01$, 表3, 图3-5)。

3 讨论

感染是儿科常见病之一, 而重症感染常伴发胃肠功能障碍。胃肠功能障碍常常被认为是多器官功能衰竭的始发因子^[13], 胃肠功能障碍的发病机制与内毒素和肠黏膜屏障功能密切相关, 近年来备受人们的关注。当肠黏膜的屏障功能破坏, 肠道内细菌及毒素大量入血及组织中, 引起内毒素血症, 内毒素血症又可促进细胞因子、炎性介质的释放, 加重肠黏膜屏障的损坏, 加速危重症的发展过程, 因此胃肠功能障碍是导致全身炎症反应综合征(systemic inflammatory re-

表2 肠组织TLR2、4和NF- κ B mRNA/ β -actin吸光度 (mean $\pm$ SD, $n = 8$)

	NS组	LPS组	LPS+ITF组
NF- κ B	0.617 $\pm$ 0.02	2.228 $\pm$ 0.72 ^b	0.533 $\pm$ 0.05 ^b
TLR2	1.393 $\pm$ 0.03	3.069 $\pm$ 0.08 ^b	7.453 $\pm$ 1.90 ^{bd}
TLR4	9.907 $\pm$ 0.33	16.711 $\pm$ 1.28 ^b	5.373 $\pm$ 1.18 ^{bd}

^b $P < 0.01$ vs NS组; ^d $P < 0.01$ vs LPS组。

表3 肠组织TLR2、4和NF- κ B蛋白表达积分吸光度 (mean $\pm$ SD, $n = 8$)

	NS组	LPS组	LPS + ITF组
NF- κ B	38.736 $\pm$ 13.62	50.433 $\pm$ 3.37 ^a	36.526 $\pm$ 9.18 ^d
TLR2	14.387 $\pm$ 2.33	20.688 $\pm$ 2.42 ^b	52.125 $\pm$ 4.19 ^{bd}
TLR4	15.637 $\pm$ 4.83	22.760 $\pm$ 3.68 ^b	16.338 $\pm$ 4.98 ^d

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs NS组; ^d $P < 0.01$ vs LPS组。

sponse syndrome, SIRS)和多器官功能衰竭(multiple organ failure, MOF)的重要因素之一^[14,15]。ITF是三叶肽家族成员之一, 由肠黏膜上皮杯状细胞分泌, 广泛存在于胃肠道。他对黏膜的保护作用主要在于增强受损黏膜周围完好的上皮细胞向黏膜损伤表面迁移覆盖, 并与黏液中糖蛋白结合, 形成稳定的凝胶复合物, 抵抗黏膜表面有害物质的损伤, 从而增强了胃肠道黏膜屏障的防御能力^[10,16], 在肠道的自我保护和损伤后修复中占有重要地位。研究表明^[17-20]在实验性结肠炎模型中, 杯状细胞合成和分泌ITF, 维持肠黏膜上皮细胞的完整性并于炎症时发挥其黏膜修复作用。敲除编码鼠ITF基因后, 小鼠由于肠道内缺乏ITF, 缺乏保护作用, 当饮用硫酸葡聚糖钠溶液时, 1/2死于结肠炎, 当给予口服重组ITF后肠黏膜损伤明显减轻。

在以往的研究中, ITF对肠黏膜的保护作用主要集中在肠黏膜上皮细胞的增殖和修复方面。本研究中, 给予外源性ITF明显下调了LPS所致TLR4 mRNA和蛋白的表达, 同时NF- κ B mRNA和蛋白表达也同步下调, 肠组织病理改变显示肠黏膜损伤明显减轻。ITF下调了TLR4的表达, 说明ITF抑制了TLR4的信号转导功能, 使NF- κ B的激活受到抑制, 因而NF- κ B mRNA和蛋白的表达出现下调, 促炎介质释放减少, 肠损伤减轻。LPS的识别和信号转导是宿主发生防御反应的关键, LPS介导的细胞激活需细胞表面能够与内毒素结合的蛋白参与, 这些蛋白包括LPS结合蛋

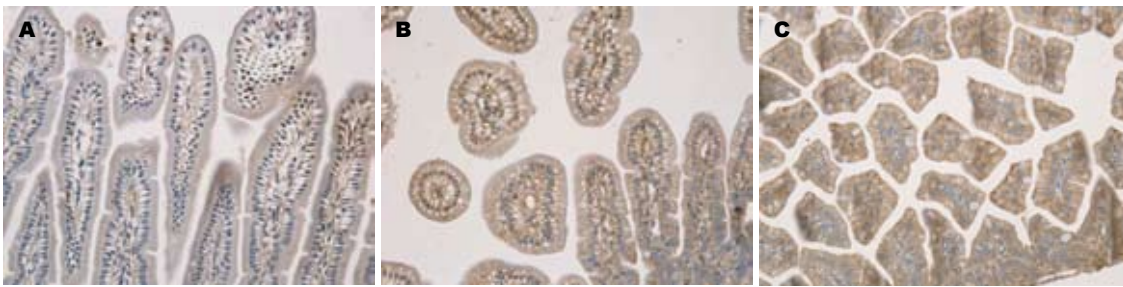


图 3 NF- κ B蛋白表达. A: 正常对照组细胞核棕黄色染色较少; B: LPS组细胞核棕黄色染色明显增多; C: LPS + ITF组细胞核棕黄色染色较LPS组明显减少.

■名词解释

肠三叶因子: 是三叶肽家族成员之一, 由肠黏膜上皮杯状细胞分泌, 广泛存在于胃肠道, 具有特征性的三叶结构, 被认为是内源性具有抗凋亡特性的肽类物质, 在肠道的自我保护和损伤后修复中具有重要作用.

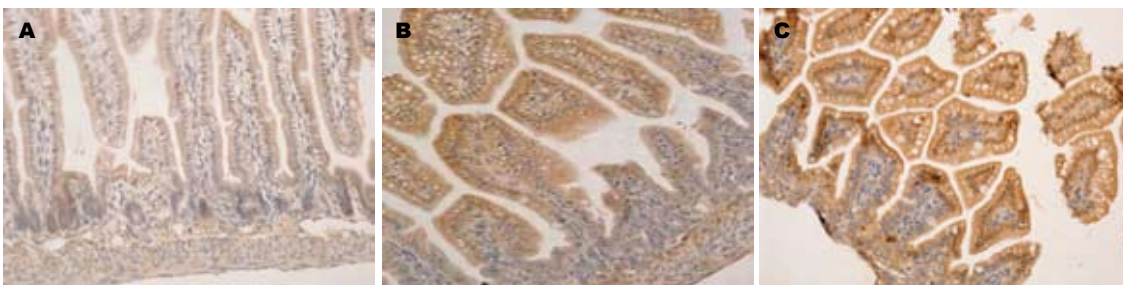


图 4 TLR2蛋白表达. A: 正常对照组细胞膜棕黄色染色较浅; B: LPS组细胞膜棕黄色染色较对照组明显增强; C: LPS+ITF组细胞膜棕黄色染色较LPS组增强.

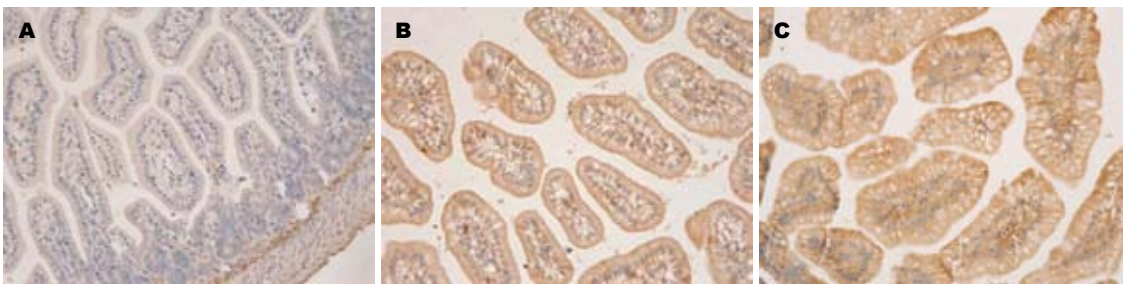


图 5 TLR4蛋白表达. A: 正常对照组细胞膜棕黄色染色较浅; B: LPS组细胞膜棕黄色染色较对照组明显增强; C: LPS+ITF组细胞膜棕黄色染色较LPS组减轻.

白(LPS binding protein, LBP)和CD14, 这些蛋白并没有跨膜转导信号的功能^[21,22]. 研究表明^[23]TLR4与CD14在与LPS的反应中的功能是紧密相连的, 其在肠道的分布也是密切相关的, 在肠道的表达有相似的模式. TLR即是免疫识别受体, 又是跨膜信号转导分子. TLR2、4均可识别LPS, 而TLR4是主要的识别受体^[24-26]. 研究表明^[27,28], TLR4与单独LPS的亲合力实际是相当低的, 在体内LPS形成LPS-LBP-CD14复合物后与TLR4结合的亲合力明显增强, 并使TLR4激活, 通过信号转导作用激活NF- κ B, 激活后的NF- κ B向核内移位, 促进促炎介质合成和释放, 如TNF- α 释放明显增加, 导致肠组织损伤, 使肠黏膜结构破坏和屏障功能降低, 导致细菌移位, 并可导致肠源性内毒素血症, 诱发MOF.

本研究表明ITF对TLR4 mRNA和蛋白的表达有明显的下调作用, 并同时伴有NF- κ B表达的下调, 肠组织损伤明显减轻. ITF对TLR4的表达下调作用其机制可能是多方面的. 其中ITF可能阻抑了TLR4与LPS-LBP-CD14复合物或LPS-LBP与CD14等中间环节的结合, 使信号转导不能传导到细胞内, NF- κ B不能被激活, 因而炎症介质的合成释放受到抑制, 使肠黏膜免遭损伤. 因此, 我们认为ITF阻抑了TLR与LPS的结合, 减少了炎症介质的释放, 可能是其减轻肠黏膜损伤, 保护肠屏障功能的主要作用之一.

研究表明, TLR2也被认为是LPS的信号转导分子, 在肠黏膜屏障保护方面起着一定作用^[29,30]. 本研究中ITF对TLR2 mRNA和蛋白的表达无明显抑制作用, 甚至出现了明显上调. 但TLR2

同行评价

本文是一篇较好的学术论文,有一定的学术价值。

mRNA表达的上调并未使肠组织损伤加重。

总之, ITF减轻肠损伤的作用主要是通过抑制了TLR4的表达而实现的, 这也说明TLR4在LPS的信号转导和介导炎症反应中起主要作用。TLR2在肠道中的作用还有待进一步研究。

参考文献

- Medzhitov R, Janeway C. The Toll receptor family and microbial recognition. *Trends Microbiol* 2000; 8: 452-456
- Uematsu S, Akira S. Toll-like receptors and innate immunity. *J Mol Med (Berl)* 2006; 84: 712-725
- Krieg AM. CpG motifs in bacterial DNA and their immune effects. *Annu Rev Immunol* 2002; 20: 709-760
- Medzhitov R, Janeway CA. An ancient system of host defense. *Curr Opin Immunol* 1998; 10: 12-15
- Akira S, Takeda K. Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol* 2004; 4: 499-511
- Beutler B. Inferences, questions and possibilities in Toll-like receptor signalling. *Nature* 2004; 430: 257-263
- Gadjeva M, Wang Y, Horwitz BH. NF-kappaB p50 and p65 subunits control intestinal homeostasis. *Eur J Immunol* 2007; 37: 2509-2517
- Gadjeva M, Tomczak MF, Zhang M, Wang YY, Dull K, Rogers AB, Erdman SE, Fox JG, Carroll M, Horwitz BH. A role for NF-kappa B subunits p50 and p65 in the inhibition of lipopolysaccharide-induced shock. *J Immunol* 2004; 173: 5786-5793
- Liboni KC, Li N, Scumpia PO, Neu J. Glutamine modulates LPS-induced IL-8 production through IkappaB/NF-kappaB in human fetal and adult intestinal epithelium. *J Nutr* 2005; 135: 245-251
- 陈美娅, 张靖, 任建林. 三叶因子3研究进展. *世界华人消化杂志* 2008; 16: 2267-2273
- Wang L, Li J, Li Q, Zhang J, Duan XL. Morphological changes of cell proliferation and apoptosis in rat jejunal mucosa at different ages. *World J Gastroenterol* 2003; 9: 2060-2064
- 滕旭, 许玲芬, 孙梅, 吴捷, 刘璐. 肠三叶因子对炎症性肠病小鼠细胞凋亡的调节机制. *实用儿科临床杂志* 2011; 26: 1028-1031
- Deitch EA. The role of intestinal barrier failure and bacterial translocation in the development of systemic infection and multiple organ failure. *Arch Surg* 1990; 125: 403-404
- Söderholm JD, Perdue MH. Stress and gastrointestinal tract. II. Stress and intestinal barrier function. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2001; 280: G7-G13
- 王茂贵. 小儿胃肠道特点、黏膜屏障与胃肠功能障碍. *中国实用儿科杂志* 2001; 14: 2-5
- 孙勇, 彭曦. 肠三叶因子研究进展. *肠外与肠内营养* 2006; 13: 243-246
- Shi L, Zhang BH, Yu HG, Yu JP, Xi JL. Intestinal trefoil factor in treatment of neonatal necrotizing enterocolitis in the rat model. *J Perinat Med* 2007; 35: 443-446
- 18 Renes IB, Verburg M, Van Nispen DJ, Büller HA, Dekker J, Einerhand AW. Distinct epithelial responses in experimental colitis: implications for ion uptake and mucosal protection. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2002; 283: G169-G179
- 19 Marchbank T, Cox HM, Goodlad RA, Giraud AS, Moss SF, Poulsom R, Wright NA, Jankowski J, Playford RJ. Effect of ectopic expression of rat trefoil factor family 3 (intestinal trefoil factor) in the jejunum of transgenic mice. *J Biol Chem* 2001; 276: 24088-24096
- 20 Vieten D, Corfield A, Carroll D, Ramani P, Spicer R. Impaired mucosal regeneration in neonatal necrotizing enterocolitis. *Pediatr Surg Int* 2005; 21: 153-160
- 21 Wright SD, Ramos RA, Tobias PS, Ulevitch RJ, Mathison JC. CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. *Science* 1990; 249: 1431-1433
- 22 Ulevitch RJ, Tobias PS. Receptor-dependent mechanisms of cell stimulation by bacterial endotoxin. *Annu Rev Immunol* 1995; 13: 437-457
- 23 Ortega-Cava CF, Ishihara S, Rumi MA, Kawashima K, Ishimura N, Kazumori H, Udagawa J, Kadowaki Y, Kinoshita Y. Strategic compartmentalization of Toll-like receptor 4 in the mouse gut. *J Immunol* 2003; 170: 3977-3985
- 24 Chow JC, Young DW, Golenbock DT, Christ WJ, Gusovsky F. Toll-like receptor-4 mediates lipopolysaccharide-induced signal transduction. *J Biol Chem* 1999; 274: 10689-10692
- 25 Shimazu R, Akashi S, Ogata H, Nagai Y, Fukudome K, Miyake K, Kimoto M. MD-2, a molecule that confers lipopolysaccharide responsiveness on Toll-like receptor 4. *J Exp Med* 1999; 189: 1777-1782
- 26 Heumann D, Roger T. Initial responses to endotoxins and Gram-negative bacteria. *Clin Chim Acta* 2002; 323: 59-72
- 27 da Silva Correia J, Soldau K, Christen U, Tobias PS, Ulevitch RJ. Lipopolysaccharide is in close proximity to each of the proteins in its membrane receptor complex. transfer from CD14 to TLR4 and MD-2. *J Biol Chem* 2001; 276: 21129-21135
- 28 Abreu MT, Vora P, Faure E, Thomas LS, Arnold ET, Arditi M. Decreased expression of Toll-like receptor-4 and MD-2 correlates with intestinal epithelial cell protection against dysregulated proinflammatory gene expression in response to bacterial lipopolysaccharide. *J Immunol* 2001; 167: 1609-1616
- 29 Cario E, Gerken G, Podolsky DK. Toll-like receptor 2 controls mucosal inflammation by regulating epithelial barrier function. *Gastroenterology* 2007; 132: 1359-1374
- 30 Ey B, Eyking A, Gerken G, Podolsky DK, Cario E. TLR2 mediates gap junctional intercellular communication through connexin-43 in intestinal epithelial barrier injury. *J Biol Chem* 2009; 284: 22332-22343

编辑 张姗姗 电编 闫晋利

MUC1, MUC2和MUC3在胃增生性息肉中的表达模式

李娟, 吴丽华, 石岩, 焦宇飞

李娟, 吴丽华, 石岩, 焦宇飞, 哈尔滨医科大学附属第二临床
医院病理科, 黑龙江省哈尔滨市 150081

李娟, 硕士, 主要从事消化系统疾病的病理研究.

作者贡献分布: 此课题由焦宇飞与李娟设计; 研究过程由李娟操
作完成; 数据分析由焦宇飞、李娟及吴丽华完成; 本论文写作由
李娟、吴丽华及石岩完成.

通讯作者: 焦宇飞, 教授, 主任医师, 150081, 黑龙江省哈尔滨市
南岗区学府路246号, 哈尔滨医科大学附属第二临床医院病理
科. yufejiao@yahoo.com

电话: 0451-86605803 传真: 0451-86605803

收稿日期: 2011-10-11 修回日期: 2011-11-20

接受日期: 2011-12-07 在线出版日期: 2011-12-18

Expression patterns of MUC1, MUC2 and MUC3 in gastric hyperplastic polyps

Juan Li, Li-Hua Wu, Yan Shi, Yu-Fei Jiao

Juan Li, Li-Hua Wu, Yan Shi, Yu-Fei Jiao, Department of
Pathology, the Second Affiliated Clinical Hospital of Harbin
Medical University, Harbin 150081, Heilongjiang Province,
China

Correspondence to: Yu-Fei Jiao, Professor, Department of
Pathology, the Second Affiliated Clinical Hospital of Harbin
Medical University, 246 Xuefu Road, Nangang Region,
Harbin 150081, Heilongjiang Province,
China. yufejiao@yahoo.com

Received: 2011-10-11 Revised: 2011-11-20

Accepted: 2011-12-07 Published online: 2011-12-18

Abstract

AIM: To evaluate the expression patterns of MUC1, MUC2 and MUC3 in gastric hyperplastic polyps (GHP) and to analyze their value as markers for judging the malignant potential of GHP.

METHODS: A total of 238 GHP biopsy or surgical specimens, including 188 cases without dysplasia, 35 cases with low grade dysplasia (LGD), 8 cases with high grade dysplasia (HGD), and 7 cases with carcinoma (Ca), were used in this study. Thirty normal gastric mucosal specimens were used as controls. Immunohistochemistry was performed to detect the expression patterns of mucin proteins (MUC1, MUC2 and MUC3) in these specimens.

RESULTS: Cytoplasmic and membranous expression of MUC1 was observed in 85.60% of GHP cases without dysplasia or carcinoma. Glan-

dular luminal expression of MUC1 was observed in 80.0% of GHP cases with LGD and 100% of GHP cases with HGD/Ca. The positive rate of MUC2 expression was 8.11% in GHP, 21.93% in GHP with LGD, and 31.42% in GHP with HGD/Ca. MUC3 expression was detected in one case of GHP with LGD and three cases of GHP with HGD/Ca but not in GHP without dysplasia.

CONCLUSION: MUC1 and MUC2 may be useful markers for judging the malignant potential of GHP.

Key Words: Gastric hyperplastic polyp; Mucin; Expression pattern

Li J, Wu LH, Shi Y, Jiao YF. Expression patterns of MUC1, MUC2 and MUC3 in gastric hyperplastic polyps. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(35): 3591-3596

摘要

目的: 研究MUC1, MUC2和MUC3在胃增生性息肉(gastric hyperplastic polyp, GHP)中的表达模式, 旨在发现可以提示GHP发生癌变的有价值的标志物.

方法: 选用明确诊断的经手术切除或胃镜活检的GHP标本238例, 其中包括GHP未伴有不典型增生188例, GHP伴低级别不典型增生(low grade dysplasia, LGD)35例, GHP伴高级别不典型增生(high grade dysplasia, HGD)8例及GHP伴局灶癌变(carcinoma, Ca)7例. 同时选取30例正常胃黏膜标本为正常对照. 采用免疫组织化学方法评价MUC1, MUC2及MUC3的阳性表达百分率及其表达模式.

结果: MUC1呈现2种表达模式. 模式1: 细胞质和细胞膜弥漫阳性; 模式2: 腔缘侧细胞膜阳性. 所有正常的胃黏膜和85.6%的未伴有不典型增生的GHP, MUC1表达呈模式1. 80%的GHP伴LGD和100%的GHP伴高级别不典型增生或癌变(HGD/Ca)其MUC1的表达呈模式2($P < 0.001$). MUC2在GHP中表达阳性率为8.11%, GHP伴LGD为21.93%, GHP伴HGD/Ca为31.42%($P < 0.001$). MUC3仅在1例GHP伴

■背景资料

粘蛋白是一类高分子量的糖蛋白, 在维持胃肠道正常的生理过程和肿瘤的发生、发展及转移中扮演着重要的角色. 但是探讨粘蛋白在GHP中的表达模式的相关研究国内外极少.

■同行评议者

刘丽江, 教授, 江汉大学医学院病理学

■研究前沿

GHP是最常见的息肉样病变,许多研究报道表明GHP具有恶变潜能,随着内窥镜下息肉切除术及黏膜下切除术的发展,GHP伴有不典型增生或癌变的报道相应增多。因此,GHP发生癌变的机制引起了消化道肿瘤研究领域的关注。

LGD和3例GHP伴HGD/Ca中表达阳性。

结论: MUC1和MUC2可能是提示GHP具有恶变潜能的有价值的标志物。

关键词: 胃增生性息肉; 粘蛋白; 表达模式

李娟, 吴丽华, 石岩, 焦宇飞. MUC1, MUC2和MUC3在胃增生性息肉中的表达模式. 世界华人消化杂志 2011; 19(35): 3591-3596

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/3591.asp>

0 引言

胃的增生性息肉(gastric hyperplastic polyp, GHP)是分化良好的成熟的小凹上皮细胞增生,形成扭曲、伸长的类锯齿状,延伸进入胃间质的有蒂或无蒂的赘生物。GHP是胃息肉状病变的主要类型,在胃窦部多见^[1,2],具有一定的恶变潜能^[3-9]。其诊断标准为:(1)胃小凹上皮结构不规则,腺体扩张、扭曲、伸长;(2)间质中有炎细胞浸润;(3)平滑肌细胞增生^[1,2]。

粘蛋白(Mucin, MUC)是一类高分子量的糖蛋白,目前已发现20种MUC。根据其结构和功能分为分泌型和膜结合型2大类^[10]。这些MUC在维持胃肠道正常的生理过程和肿瘤的发生、发展及转移中扮演着重要的角色。MUC2属于分泌型粘蛋白,编码MUC2的基因位于染色体11q15.5上^[10]。MUC2基因是从小肠cDNA文库中克隆出来的,为正常杯状细胞所特有^[11-13]。跨膜型粘蛋白广泛表达于上皮细胞的表层,MUC1和MUC3属于此类。MUC1是克隆最早的跨膜粘蛋白,定位于染色体1q21-24^[13],是从乳腺癌、胰腺癌等细胞系构建的cDNA表达文库获得^[14]。MUC1在许多分泌型上皮细胞的顶端表达,包括向大多数其他表达细胞膜黏附蛋白细胞的胞外区的过度延伸表达^[10]。MUC3主要表达在胃肠道上皮细胞中,其基因定位于染色体7q22^[10]。MUC3主要表达在小肠绒毛上皮细胞中,也少量表达于结肠绒毛上皮细胞和胰腺导管上皮细胞^[10]。胃癌组织中,MUC3的阳性表达与患者的预后性差相关^[15]。

目前,许多研究报道表明GHP具有恶变潜能,其发展为癌的百分率为0.5%-7.1%^[1-9]。覆盖在胃肠道黏膜表面的粘蛋白是防御机械性、化学性损伤和微生物侵袭的第一道屏障。已有大量研究表明在胃癌组织中存在多种粘蛋白的异常表达,但是粘蛋白在GHP中表达模式的研究国内外均非常少。本文研究粘蛋白在GHP中

的表达模式,旨在阐明MUC表达与GHP恶变潜能的关系,以便寻找可以提示GHP癌变的有价值的标志物。

1 材料和方法

1.1 材料 搜集哈尔滨医科大学附属第二医院2005-01/2011-04手术切除胃及胃镜活检病例,我们将标本不足以进行大量切片、临床资料不全以及诊断不明确病例剔除;经2名病理科医生阅片,选用明确诊断的GHP标本238例,其中包括GHP未伴有不典型增生188例,GHP伴有低级别不典型增生(Low Grade Dysplasia, LGD)35例,GHP伴有高级别不典型增生(High Grade Dysplasia, HGD)8例及GHP伴局灶癌变(Carcinoma, Ca)7例。同时选取30例正常胃黏膜作为对照组,正常胃黏膜取自胃溃疡穿孔或胃癌手术切除标本(距肿瘤组织5 cm以上的胃黏膜组织)。MUC1、MUC2、MUC3抗体均购自Thermo Fisher公司(MUC1、MUC2抗体4℃过夜,MUC3抗体37℃孵育30 min)。

1.2 方法

1.2.1 HE染色: 所有组织经100 g/L中性福尔马林固定,石蜡包埋,4 μm厚度切片,常规HE染色。

1.2.2 免疫组织化学染色: 所有蜡块连续切片,厚度为4 μm。切片使用二甲苯脱蜡,梯度酒精水化之后进行抗原修复,然后滴加3%过氧化酶阻断剂室温反应10 min以阻断内源性过氧化物酶的活性。二抗使用EnVision™检测试剂盒(Thermo Fisher)。然后进行DAB显色,苏木素复染,常规脱水,透明封片。具体步骤参照即用型快捷免疫组化Maxvision™试剂盒(鼠/兔)说明书。

1.2.3 免疫组织化学染色结果判定: MUC1, MUC2表达在细胞质和细胞膜;MUC3表达在细胞膜。MUC2计数整个切片中阳性细胞的百分率,MUC3计数腔缘阳性的腺体数。由于我们在试验中发现MUC1呈现2种表达模式,模式1:细胞质和细胞膜弥漫阳性;模式2:腔缘侧细胞膜阳性。因此,MUC1的免疫组织化学染色结果便是判定其为何种表达模式。

统计学处理 运用SPSS13.0软件对数据进行Mann-Whitney双侧U检验及 χ^2 检验,必要时采用Fisher确切概率法, $P<0.05$ 具有统计学意义。

2 结果

本研究应用的标本的临床病理学详细资料见表1。

2.1 MUC1 MUC1呈2种表达模式。在所有正常

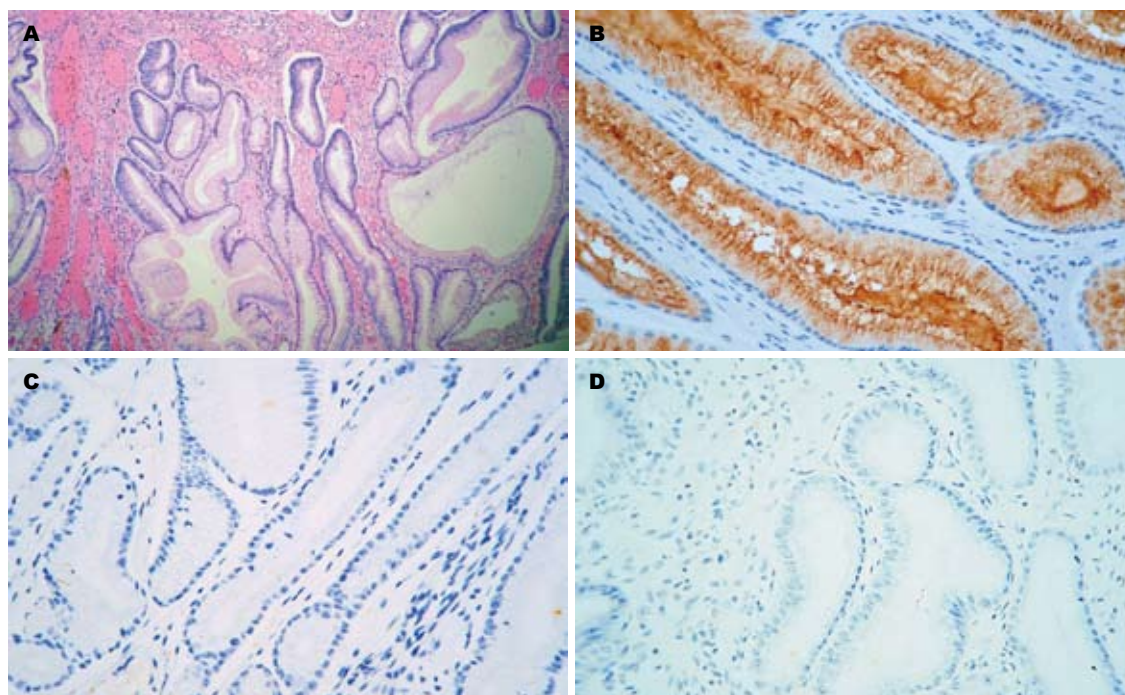


图 1 MUC1、MUC2和MUC3在GHP未伴有不典型增生或癌变中的表达模式(SP × 400). A: HE染色(SP × 100); B: MUC1; C: MUC2; D: MUC3.

■ 相关报道

研究发现MUC1的表达与肿瘤细胞的黏附力、免疫识别、转移和预后密切相关. MUC2在正常胃黏膜不表达, 肠型胃癌中MUC2的表达明显增加; 且MUC2的表达程度与肿瘤的浸润、淋巴结转移及预后有关. MUC3的阳性表达与胃癌的预后, 肿瘤的大小, 转移有关.

表 1 按组织学分型的GHP的临床病理学因子

	GHP	GHP伴LGD	GHP伴HGD/Ca
总数(n)	188	35	15
性别(n)			
男	103	23	12
女	85	12	3
平均年龄(岁)	51.12	56.57	56.92
部位(n)			
贲门、胃底	43	4	6
胃体	31	6	2
胃窦、胃角、幽门	114	25	7
平均大小(cm)	1.15	1.24	2.19
大体形态(n)			
无蒂	112	25	4
有蒂	27	4	5
亚蒂	49	6	6

的胃黏膜和85.6%的未伴有不典型增生的GHP, MUC1表达呈模式1(图1A, B). 然而, 80%的GHP伴LGD和100%的GHP伴HGD/Ca其MUC1的表达呈模式2(图2A, B, $P<0.001$, 表2).

2.2 MUC2 在正常的胃黏膜, MUC2不表达(图1C), MUC2在未伴有不典型增生的GHP中的阳性表达率为8.11%, 在GHP伴LGD的阳性表达率为21.93%, 在GHP伴有HGD/Ca的阳性表达率为31.42%($P<0.001$, 图3). 其阳性表达模式见图2C.

表 2 MUC1在GHP中的表达模式

诊断	MUC1表达模式	
	模式1	模式2
GHP	161 (85.6%)	27(14.4%)
GHP伴LGD	7 (20.0%)	28(80.0%)
GHP伴HGD/Ca	0	15(100%)

$P<0.01$, GHP vs GHP伴LGD; $P<0.01$, GHP vs GHP伴HGD/Ca.

2.3 MUC3 MUC3在大多数病例中均不表达(图1D), 仅在1例GHP伴LGD和3例GHP伴HGD/Ca的病例中呈现腔缘阳性的表达模式(图2D). 因其阳性表达样本例数较少, 所以未进行统计学分析.

3 讨论

GHP通常被认为是一种良性病变, 但是近年来一些研究已经证实GHP具有一定的癌变潜能. GHP发生癌变的相关机制目前仍不清楚. 但已有一些研究结果提示GHP的癌变过程为: GHP → 不典型增生 → 局灶癌变^[16].

在我们的研究中, 所有的正常胃黏膜和85.6%的未伴有不典型增生或癌变的GHP中, MUC1表达为模式1. 但是值得注意的是, 我们观察到80.0%的伴有LGD的GHP中, MUC1表达为模式2; 100%的伴有HGD/Ca的GHP中, MUC1表达为模式2. 在Noguera等^[17]的研究中, MUC1

■创新盘点

本文研究MUC1、MUC2及MUC3在GHP中的表达模式,寻找提示GHP恶变潜能的有价值的标志物。

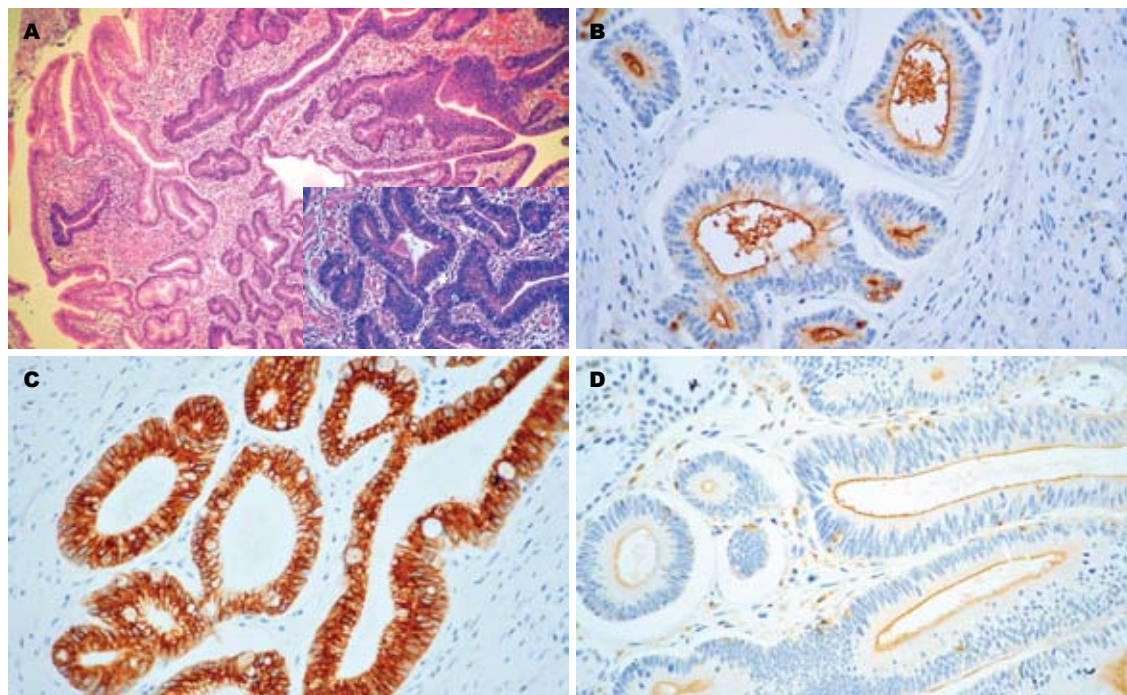


图2 MUC1、MUC2和MUC3在GHP伴HGD中的表达模式(SP×400)。A: HE染色, 右下角为其HGD区域(SP×100); B: MUC1; C: MUC2; D: MUC3。

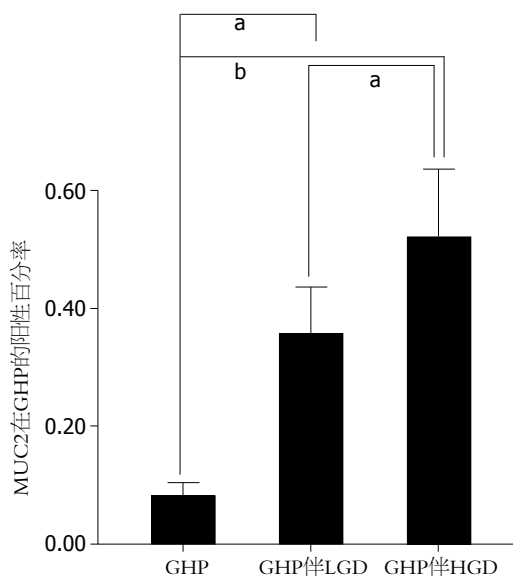


图3 MUC2在各型GHP中的统计学分析结果。^a $P < 0.05$; ^b $P < 0.01$ 。

在胃腺瘤和胃癌标本中的细胞质阳性表达缺失。同样,在Benjamin等^[18]的研究中也指出了MUC1在胃腺瘤和胃癌组织中的异常表达。虽然对MUC1表达模式的描述不是完全相同,但是我们的结论与Noguera、Benjamin等的结论有一点是一致的,即MUC1在不典型增生或癌变的胃黏膜组织中,细胞质的阳性表达缺失。我们的研究结果还证实MUC1在伴有不典型增生或癌变的GHP中与未伴有不典型增生或癌变的GHP的表

达相比,多呈模式2($P < 0.01$),此种表达模式的发生机制还没有明确的结论。

有关MUC1在胃癌组织中作用机制的研究提示此种表达模式是多因子相互诱导的结果^[19]。许多研究结果已经证实MUC1与细胞信号转导、免疫调节,以及抑制细胞与细胞或细胞与间质的黏附相关^[19-22]。有报道显示MUC1的胞质尾区与 β -catenin^[20]以及其他信号分子(如: Grb2/Sos^[21], EGFR^[22]等)有关,表明MUC1在细胞信号转导中可能具有一定的作用。MUC1通过与 β -catenin相似的基序竞争结合E-cadherin,从而阻止E-cadherin- β -catenin复合物的形成^[19]。所以MUC1可能参与了肿瘤细胞的分离、浸润与转移。有许多研究显示MUC1介导细胞效应^[23],组织发生癌变后MUC1过表达提示肿瘤的侵袭性增加^[13,24]。Retterspitz等^[25]表明MUC1表达的强弱与肿瘤的分化相关联。Lapoinet等^[26]在研究胰腺癌时证实MUC1可作为一种独立的判断肿瘤治疗预后的标志物。Retterspitz等^[25]在研究胃癌时也得出相同的结论。也有学者表示细胞癌变时MUC1基因的表达与肿瘤细胞的黏附力、免疫识别、转移和预后密切相关^[23]。Kontani等^[27]证实MUC1的表达缺失或其抗原性改变可能致使癌细胞对细胞毒性T细胞的杀伤效应无应答。MUC1可以保护癌细胞免受自身免疫系统的攻击^[28]。目前, MUC1在胃癌组织中的表达模式尚

存争议. 我们的研究结果显示: 在伴有不典型增生或癌变的GHP中, MUC1主要呈现腔缘阳性的表达模式. MUC1在不同类型的胃黏膜病变中呈现不同的表达模式的相关机制需要更进一步的研究.

在我们的研究中发现, MUC2阳性的标本中, 86.3%的GHP伴有不典型增生和局灶癌变的样本中呈阳性表达; 在GHP伴有HGD/Ca中, 其MUC2阳性率比GHP伴有LGD的阳性率显著增高($P<0.001$). 同样在研究MUC2在胃癌组织的表达情况中提示: MUC2在正常胃黏膜不表达, 而在肠型胃癌中, MUC2的表达明显增加^[29]. 并且证明MUC2的表达程度与肿瘤的浸润、淋巴结转移及预后有很大的关系^[30]. 因此我们与其他研究者的结论支持GHP的癌变过程是GHP→GHP伴有不典型增生→癌变的这一推断.

Wang等^[15]对胃癌的研究表明, MUC3的阳性表达与否与胃癌的预后、肿瘤大小、转移有明显的关联性. MUC3高表达的肿瘤瘤体大、预后差且容易发生转移. 在我们的研究中, MUC3在GHP中不表达, 在GHP伴有不典型增生和癌变的组织中个别阳性. 其表达情况还有待于大样本的进一步研究.

总之, MUC1在GHP中呈现出2种表达模式: 在正常的胃黏膜和未伴有不典型增生的GHP中, MUC1表达呈模式1; 而在伴有不典型增生或癌变的GHP中, MUC1的表达多呈模式2. MUC2的表达阳性率随着GHP不典型程度的增加而增加. 因此MUC1和MUC2可能是提示GHP恶变潜能的有价值的标志物, 即MUC1表达为模式2或MUC2过表达的GHP更具有恶变潜能.

志谢 感谢哈尔滨医科大学附属第二临床医院病理科刘瑾为本研究提供的精湛的HE染色切片和对免疫组织化学染色的技术支持.

4 参考文献

- Jain R, Chetty R. Gastric hyperplastic polyps: a review. *Dig Dis Sci* 2009; 54: 1839-1846
- Carmack SW, Genta RM, Schuler CM, Saboorian MH. The current spectrum of gastric polyps: a 1-year national study of over 120,000 patients. *Am J Gastroenterol* 2009; 104: 1524-1532
- Hongou H, Fu K, Ueyama H, Takahashi T, Takeda T, Miyazaki A, Watanabe S. Mallory-Weiss tear during gastric endoscopic submucosal dissection. *World J Gastrointest Endosc* 2011; 3: 151-153
- Mishra R, Stelow EB, Powell S, Shami VM. Poorly differentiated adenocarcinoma arising from a hyperplastic polyp: which polyps should be endoscopically resected? *Dig Dis Sci* 2007; 52: 1586-1588
- Hirasaki S, Kanzaki H, Fujita K, Matsumura S, Matsumoto E, Yumoto E, Suzuki S. Papillary adenocarcinoma occurring in a gastric hyperplastic polyp observed by magnifying endoscopy and treated with endoscopic mucosal resection. *Intern Med* 2008; 47: 949-952
- Hirasaki S, Suzuki S, Kanzaki H, Fujita K, Matsumura S, Matsumoto E. Minute signet ring cell carcinoma occurring in gastric hyperplastic polyp. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 5779-5780
- Hirano H, Yoshida T, Yoshimura H, Fukuoka M, Ohkubo E, Tachibana S, Saito H, Nakasho K, Nishigami T. Poorly differentiated adenocarcinoma with signet-ring cell carcinoma in a hyperplastic polyp of the stomach: report of a case. *Surg Today* 2007; 37: 901-904
- Saravanan R, Kamalaporn P, Streutker C, May G, Kandel G, Marcon N, Kortan P. Gastric polyp in pernicious anemia: an argument to remove even when biopsy shows hyperplasia. *Endoscopy* 2008; 40 Suppl 2: E77-E78
- Ubukata H, Katano M, Konishi S, Nakachi T, Goto Y, Watanabe Y, Nakada I, Tabuchi T. Multifocal gastric cancer with a variety of histological findings coexisting with hyperplastic polyps: report of a case. *Surg Today* 2011; 41: 1106-1111
- Rachagani S, Torres MP, Moniaux N, Batra SK. Current status of mucins in the diagnosis and therapy of cancer. *Biofactors* 2009; 35: 509-527
- Holmes K, Egan B, Swan N, O'Morain C. Genetic Mechanisms and Aberrant Gene Expression during the Development of Gastric Intestinal Metaplasia and Adenocarcinoma. *Curr Genomics* 2007; 8: 379-397
- Kim YS, Ho SB. Intestinal goblet cells and mucins in health and disease: recent insights and progress. *Curr Gastroenterol Rep* 2010; 12: 319-330
- Kufe DW. Mucins in cancer: function, prognosis and therapy. *Nat Rev Cancer* 2009; 9: 874-885
- Hatrup CL, Gendler SJ. Structure and function of the cell surface (tethered) mucins. *Annu Rev Physiol* 2008; 70: 431-457
- Wang RQ, Fang DC. Alterations of MUC1 and MUC3 expression in gastric carcinoma: relevance to patient clinicopathological features. *J Clin Pathol* 2003; 56: 378-384
- Han AR, Sung CO, Kim KM, Park CK, Min BH, Lee JH, Kim JY, Chang DK, Kim YH, Rhee PL, Rhee JC, Kim JJ. The clinicopathological features of gastric hyperplastic polyps with neoplastic transformations: a suggestion of indication for endoscopic polypectomy. *Gut Liver* 2009; 3: 271-275
- Nogueira AM, Machado JC, Carneiro F, Reis CA, Gött P, Sobrinho-Simões M. Patterns of expression of trefoil peptides and mucins in gastric polyps with and without malignant transformation. *J Pathol* 1999; 187: 541-548
- Benjamin JB, Jayanthi V, Devaraj H. MUC1 expression and its association with other aetiological factors and localization to mitochondria in preneoplastic and neoplastic gastric tissues. *Clin Chim Acta* 2010; 411: 2067-2072
- Zhang HK, Zhang QM, Zhao TH, Li YY, Yi YF. Expression of mucins and E-cadherin in gastric carcinoma and their clinical significance. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 3044-3047
- Yamamoto M, Bharti A, Li Y, Kufe D. Interaction

■应用要点

根据粘蛋白在GHP中的表达模式, MUC1及MUC2可能是提示GHP恶变潜能的有价值的标志物.

■同行评价

该文的选题有重要的临床意义和应用价值,且图片清晰、病变典型。

- of the DF3/MUC1 breast carcinoma-associated antigen and beta-catenin in cell adhesion. *J Biol Chem* 1997; 272: 12492-12494
- 21 Pandey P, Kharbanda S, Kufe D. Association of the DF3/MUC1 breast cancer antigen with Grb2 and the Sos/Ras exchange protein. *Cancer Res* 1995; 55: 4000-4003
- 22 Schroeder JA, Thompson MC, Gardner MM, Gendler SJ. Transgenic MUC1 interacts with epidermal growth factor receptor and correlates with mitogen-activated protein kinase activation in the mouse mammary gland. *J Biol Chem* 2001; 276: 13057-13064
- 23 Kondo S, Yoshizaki T, Wakisaka N, Horikawa T, Muroso S, Jang KL, Joab I, Furukawa M, Pagano JS. MUC1 induced by Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 causes dissociation of the cell-matrix interaction and cellular invasiveness via STAT signaling. *J Virol* 2007; 81: 1554-1562
- 24 İlhan Ö, Han Ü, Önal B, Çelik SY. Prognostic significance of MUC1, MUC2 and MUC5AC expressions in gastric carcinoma. *Turk J Gastroenterol* 2010; 21: 345-352
- 25 Retterspitz MF, Mönig SP, Schreckenberger S, Schneider PM, Hölscher AH, Dienes HP, Baldus SE. Expression of {beta}-catenin, MUC1 and c-met in diffuse-type gastric carcinomas: correlations with tumour progression and prognosis. *Anticancer Res* 2010; 30: 4635-4641
- 26 Lapointe J, Li C, Higgins JP, van de Rijn M, Bair E, Montgomery K, Ferrari M, Egevad L, Rayford W, Bergerheim U, Ekman P, DeMarzo AM, Tibshirani R, Botstein D, Brown PO, Brooks JD, Pollack JR. Gene expression profiling identifies clinically relevant subtypes of prostate cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101: 811-816
- 27 Kontani K, Taguchi O, Narita T, Izawa M, Hiraiwa N, Zenita K, Takeuchi T, Murai H, Miura S, Kannagi R. Modulation of MUC1 mucin as an escape mechanism of breast cancer cells from autologous cytotoxic T-lymphocytes. *Br J Cancer* 2001; 84: 1258-1264
- 28 Hasegawa H, Komoda M, Yamada Y, Yonezawa S, Tsutsumida H, Nagai K, Atogami S, Tsuruda K, Osaka A, Sasaki D, Yanagihara K, Imaizumi Y, Tsukasaki K, Miyazaki Y, Kamihira S. Aberrant overexpression of membrane-associated mucin contributes to tumor progression in adult T-cell leukemia/lymphoma cells. *Leuk Lymphoma* 2011; 52: 1108-1117
- 29 Conze T, Carvalho AS, Landegren U, Almeida R, Reis CA, David L, Söderberg O. MUC2 mucin is a major carrier of the cancer-associated sialyl-Tn antigen in intestinal metaplasia and gastric carcinomas. *Glycobiology* 2010; 20: 199-206
- 30 Toki F, Takahashi A, Aihara R, Ogata K, Ando H, Ohno T, Mochiki E, Kuwano H. Relationship between clinicopathological features and mucin phenotypes of advanced gastric adenocarcinoma. *World J Gastroenterol* 2010; 16: 2764-2770

编辑 张姗姗 电编 闫晋利

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

• 消息 •

《世界华人消化杂志》正文要求

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

H3K27me3在胃癌中的表达及其临床意义

高福利, 吕瑛, 曹俊, 邹晓平

高福利, 吕瑛, 曹俊, 邹晓平, 南京大学医学院附属鼓楼医院
消化内科 江苏省南京市 210008

高福利, 硕士, 主要从事胃癌的表现遗传学研究.

南京市医学科技发展基金资助项目, No. YKK08066

作者贡献分布: 此课题由高福利、吕瑛、曹俊及邹晓平设计; 研究过程由高福利完成; 研究所用新试剂及分析工具由吕瑛与邹晓平提供; 数据分析由高福利完成; 本论文写作由高福利与邹晓平完成.

通讯作者: 邹晓平, 教授, 210008, 江苏省南京市中山路321号, 南京大学医学院附属鼓楼医院消化内科.

zouxiaoping795@hotmail.com

电话: 025-83106666-20602

收稿日期: 2011-09-28 修回日期: 2011-11-12

接受日期: 2011-12-07 在线出版日期: 2011-12-18

Significance of H3K27me3 expression in gastric cancer

Fu-Li Gao, Ying Lv, Jun Cao, Xiao-Ping Zou

Fu-Li Gao, Ying Lv, Jun Cao, Xiao-Ping Zou, Department of Gastroenterology, the Affiliated Drum Tower Hospital of Medical School of Nanjing University, Nanjing 210008, Jiangsu Province, China

Supported by: the Nanjing Medical Technology Development Project, No. YKK08066

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

Received: 2011-09-28 Revised: 2011-11-12

Accepted: 2011-12-07 Published online: 2011-12-18

Abstract

AIM: To investigate the expression of trimethylation at lysine 27 of histone H3 (H3K27me3) in gastric cancer tissue and cell lines and to evaluate its correlation with clinicopathological parameters of gastric carcinoma.

METHODS: The protein expression of H3K27me3 was detected by Western blot in gastric cancer lines SGC7901, BGC823, AGS and normal gastric mucosal epithelial cell line GES-1. Immunohistochemistry (IHC) was utilized to examine the protein expression of H3K27me3 in 61 gastric cancer specimens and 20 normal gastric epithelial specimens.

RESULTS: H3K27me3 expression significantly increased in gastric cancer lines (SGC7901,

BGC823, and AGS) compared to normal gastric mucosal epithelial cell line GES-1. The positive rates of H3K27me3 protein expression in gastric cancer was 80.3%. The expression levels of H3K27me3 were significantly associated with tumor size, depth of invasion, lymph node metastasis, vascular invasion, clinical stage, and T staging ($P = 0.049, 0.030, 0.034, 0.025, 0.003$, and 0.031 , respectively), but had no correlation with patient's age, sex, tumor location, tumor differentiation degree, or nerve invasion.

CONCLUSION: High expression of H3K27me3 correlates closely with tumor invasion and metastasis in gastric cancer and may be an important prognostic factor in patients with gastric cancer.

Key Words: Histone modification; H3K27me3; Gastric cancer

Gao FL, Lv Y, Cao J, Zou XP. Significance of H3K27me3 expression in gastric cancer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(35): 3597-3602

摘要

目的: 研究H3K27me3在胃癌细胞和组织中的表达, 并分析与临床病理因素的关系, 探讨H3K27me3在胃癌发生发展中的作用和意义.

方法: 应用Western blot方法检测胃癌细胞系SGC7901、BGC823、AGS和正常胃黏膜上皮细胞GES-1中H3K27me3的表达; 免疫组织化学方法检测61例胃癌组织及20例正常胃黏膜组织中H3K27me3的表达.

结果: 与正常胃黏膜细胞GES-1相比, H3K27me3在胃癌细胞SGC7901、BGC823、AGS中高表达; H3K27me3在胃癌组织中阳性表达率为80.3%, 并与肿瘤大小、浸润深度、淋巴结转移、血管侵犯、临床分期、TNM分期有关 ($P = 0.049, 0.030, 0.034, 0.025, 0.003, 0.031$), 而与患者的性别、年龄、病变部位、分化程度、神经侵犯之间无相关性.

结论: H3K27me3在胃癌中高表达, 并与肿瘤

■背景资料

组蛋白修饰在肿瘤发生、发展过程中起着重要的作用. 近年研究发现多种组蛋白修饰在恶性肿瘤中发生改变, 且这种变化还有重要的临床应用价值. 如作为判断患者预后的指标、肿瘤早期诊断的标记物、判断对某些化疗药物的治疗反应.

■同行评议者

郑鹏远, 教授, 主任医师, 郑州大学第二附属医院消化科

■ 研发前沿

国内外许多研究发现H3K27me3在恶性肿瘤中表达异常,并与肿瘤侵袭转移有关。生存分析发现H3K27me3表达与患者预后相关,但在不同肿瘤中这一结果尚有争论。

的侵袭转移有关,可能是胃癌患者重要的预后因子。

关键词: 组蛋白修饰; H3K27me3; 胃癌

高福利, 吕琰, 曹俊, 邹晓平. H3K27me3在胃癌中的表达及其临床意义. 世界华人消化杂志 2011; 19(35): 3597-3602

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/3597.asp>

0 引言

胃癌是世界上常见的恶性肿瘤,虽然近年来发病率有所下降,但死亡率在恶性肿瘤中仍占有很大的比重^[1]。影响胃癌患者预后的主要因素是肿瘤分期,包括浸润深度和转移程度。一般分期越高,患者预后越差,但也有部分患者虽具有相同的肿瘤分期和分级,预后差别却很大。因此,鉴定出新的与预后有关的肿瘤分子,并且能区分这些亚分类患者就显得尤为重要。近年研究表明组蛋白修饰在肿瘤的发生发展中起重要的作用,大量的研究也已经发现多种组蛋白修饰在恶性肿瘤中发生改变^[2],并且这种变化还具有重要的临床应用价值,如作为判断患者预后的指标、肿瘤早期诊断的标记物、判断对某些化疗药物的治疗反应^[3-6]。组蛋白H3K27三甲基化(H3K27me3),主要是由PcG复合物核心成分EZH2催化,EZH2已经在多种恶性肿瘤中被发现高表达并与肿瘤侵袭转移有关^[7-9],而H3K27me3在恶性肿瘤中作用目前研究还较少,有学者研究乳腺癌、胰腺癌、肝癌等^[10,11]发现H3K27me3存在表达异常,并且是个重要的独立预后指标,但H3K27me3在胃癌中目前尚无人研究。本文主要通过应用Western blot和免疫组化方法检测胃癌细胞和组织中H3K27me3的表达,并分析与胃癌临床病理因素之间的关系,探讨H3K27me3在胃癌中的作用和意义。

1 材料和方法

1.1 材料 人胃癌细胞系SGC7901、BGC823、AGS及正常胃上皮细胞GES-1由我科实验室提供。组织标本收集2009/12-2010/07南京大学医学院附属鼓楼医院病理科胃癌手术石蜡标本($n = 61$),所有胃癌患者术前均未接受过放疗、化疗及其他针对肿瘤的治疗,术后均经病理学专家确诊为胃癌,其中男性42例,女性19例,年龄44-85岁,平均(65.18 ± 10.22)岁;胃癌标本中肿瘤直径 >4 cm($n = 30$), <4 cm($n = 31$);高/中分化($n = 24$),低分化($n = 37$);临床分期: I / II期($n = 21$),

III/IV期($n = 40$);肿瘤浸润深度: pT1+pT2期($n = 18$), pT3+pT4期($n = 43$) (pT1+pT2: 肿瘤未侵犯到浆膜层组织; pT3+pT4: 肿瘤侵犯浆膜或浆膜外组织)。另取癌旁正常胃黏膜组织($n = 20$)作为对照组,标本取自距肿块5 cm以外区域,病理检测未见癌细胞浸润。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养: 人胃癌细胞株SGC7901、BGC823、AGS培养于含100 mL/L小牛血清的RPMI-1640培养基中,正常胃上皮细胞GES-1培养于含100 mL/L小牛血清的DMEM培养基中,上述两种培养基在使用前均添加100 000 U/L双抗(青霉素和链霉素),所有细胞均置于含50 mL/L CO₂的37 °C孵育箱内培养,隔天换液,每3-4 d传代1次。

1.2.2 Western blot: 从上述细胞中提取总蛋白,经12%SDS-PAGE电泳分离,湿转法将蛋白转印至PVDF膜,5%BSA封闭1 h,然后与1:200比例稀释的H3K27me3抗体4 °C孵育过夜,再与辣根过氧化物酶(HRP)标记二抗孵育2 h后,ECL化学发光作用3-5 min左右后曝光、显影和定影。

1.2.3 免疫组织化学: 采用PV9000二步法免疫组织化学染色,具体步骤如下:将石蜡切片常规脱蜡至水,采用高压锅加热法行抗原修复,3% H₂O₂孵育10 min后,PBS漂洗3次,滴加小鼠抗人H3K27me3单克隆抗体(abcam公司)并于4 °C过夜,PBS漂洗3次,滴加即用型二抗(北京中杉金桥公司)并在室温下孵育20-30 min,DAB显色,苏木精复染后将切片脱水、透明并封片。以已知的H3K27me3染色阳性切片作为阳性对照,PBS代替一抗作为阴性对照,高倍镜(400倍)下随机观察5个视野,以细胞核出现棕黄色或棕褐色颗粒为阳性,根据阳性细胞百分比及染色强度分别计分判定H3K27me3染色结果: (1)阳性染色强度: 0分无染色; 1分淡黄色; 2分棕黄色; 3分棕褐色; (2)阳性细胞比例: 0分 $\leq 10\%$; 1分11%-50%; 2分51%-75%; 3分 $>75\%$ 。两者相乘后积分: 0分(-)、1-2分(+)、3-4分(++)、5-9分(+++)。

统计学处理 采用SPSS18.0软件进行统计学分析,Kruskal-Wallis H检验对H3K27me3在2种不同组织中的表达差异进行分析, χ^2 检验评估H3K27me3和胃癌组织临床病理因素之间的关系, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 H3K27me3在正常胃黏膜上皮细胞和胃癌

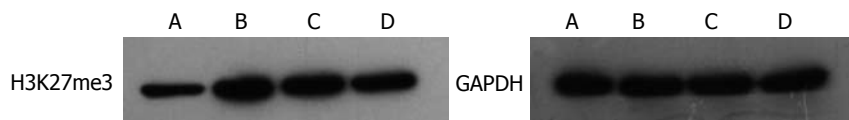


图 1 Western blot 显示胃癌细胞和正常胃上皮细胞中H3K27me3的表达. A: 正常胃上皮细胞GES-1; B-D: 胃癌细胞SGC7901、BGC823、AGS.

■ 相关报道

He等发现H3K27me3不仅可以预测经过局部放化疗食管癌患者的预后, 而且还能区分出这些食管癌患者中不同病理级别的个体不同的预后结局.

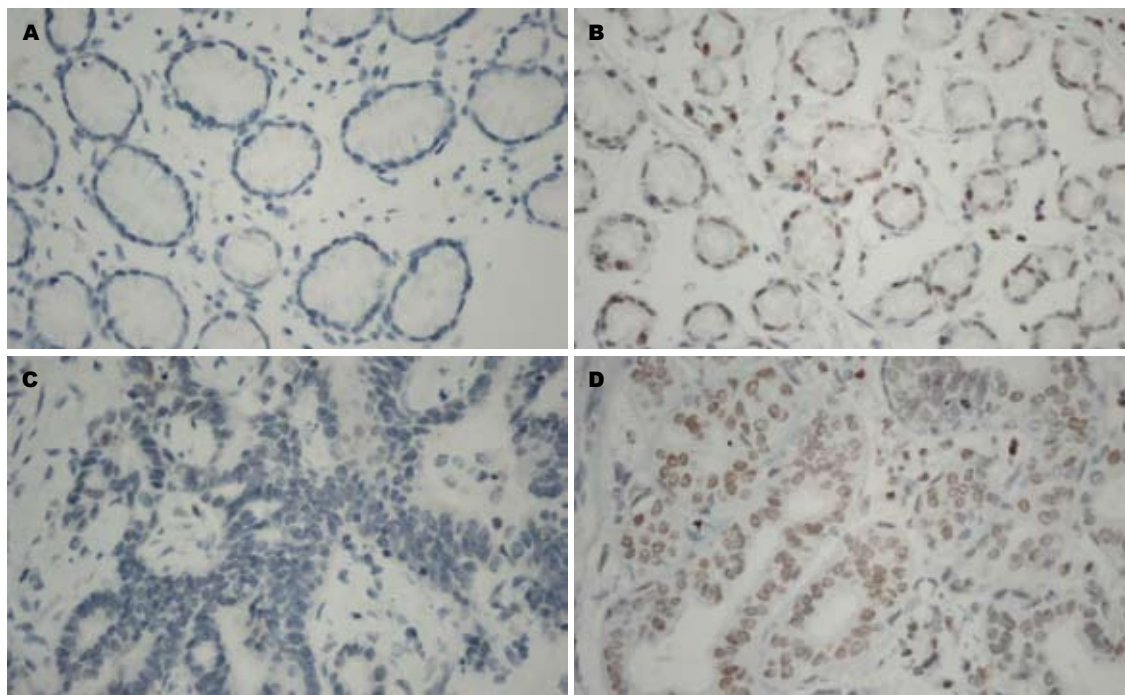


图 2 免疫组织化学染色显示H3K27me3在胃癌和正常组织中的表达情况($\times 400$). A, B: 正常组织; C, D: 胃癌组织; A, C: 阴性; B, D: 阳性.

表 1 H3K27me3在两种组织的表达情况

分组	总例数(n)	H3K27me3				阳性率(%)
		-	+	++	+++	
正常胃组织	20	15	3	2	0	25
胃癌组织	61	12	18	27	4	80.3 ^b

^b $P < 0.01$ vs 正常胃组织.

细胞中的表达 与正常胃上皮细胞(GES-1)相比, H3K27me3在胃癌细胞(SGC7901、BGC823、AGS)中高表达(图1). 且H3K27me3表达位于细胞核, 呈棕黄色颗粒, 细胞膜和细胞质不着色(图2). 胃癌组织中H3K27me3阳性表达细胞的比例明显高于正常胃黏膜组织中H3K27me3阳性表达细胞比例, 分别为80.3%和25%, 二者差异具有明显统计学意义($P < 0.01$, 表1).

2.2 H3K27me3表达水平与胃癌临床病理特征的关系 H3K27me3表达与肿瘤大小、浸润深度、淋巴结转移、血管侵犯、临床分期、TNM分

期有关($P < 0.05$), 而与患者的性别、年龄、病变部位、分化程度、神经侵犯之间无相关性(表2). 肿瘤最大径 > 4.0 cm的癌组织, H3K27me3表达水平高于最大径 < 4.0 cm者, 阳性率分别为83.9%和76.7%; 肿瘤侵犯浆膜或浆膜外组织者(pT3+pT4)高于未侵犯浆膜层者(pT1+pT2), H3K27me3阳性率分别为83.7%和72.2%; 发生淋巴结转移者(87.5%)明显高于无淋巴结转移者(53.8%); 临床分期为III+IV期高于I+II期, H3K27me3阳性率分别为90%和61.9%; 在TNM分期中T3+T4期H3K27me3表达高于T1+T2期, 分别为82.5%和76.2%.

3 讨论

组蛋白修饰指的是核心组蛋白(H2A、H2B、H3、H4)在翻译完成后, 其N端尾区发生的多种共价修饰, 包括乙酰化、甲基化、磷酸化等. 这些组蛋白修饰可以通过改变染色质结构来影响各种基于DNA的重要生理过程如复制、转录、DNA修复^[12], 从而调节基因表达. 但不同的组蛋

■创新盘点

本研究首次检测了胃癌中H3K27me3的表达,并分析了其与临床病理因素的关系。

表 2 H3K27me3表达水平与胃癌临床病理特征的关系

临床病理特征	总例数(n)	H3K27me3				阳性率(%)	P值
		-	+	++	+++		
性别							
男	42	7	11	21	3	83.3	0.533
女	19	5	7	6	1	73.7	
年龄							
≤60岁	19	6	6	7	0	68.4	0.243
>60岁	42	6	12	20	4	85.7	
病变部位							
胃底/贲门	23	3	5	13	2	87.0	0.166
胃体	20	2	8	8	2	90.0	
胃窦	18	7	5	6	0	61.1	
肿瘤大小							
≤4 cm	30	7	13	9	1	76.7	0.049
>4 cm	31	5	5	18	3	83.9	
浸润深度							
pT1+pT2	18	5	9	3	1	72.2	0.030
pT3+pT4	43	7	9	24	3	83.7	
淋巴结转移							
否	13	6	4	3	0	53.8	0.034
是	48	6	14	24	4	87.5	
分化程度							
高/中分化	24	5	7	12	0	70.4	0.405
低分化	37	7	11	15	4	81.1	
血管侵犯							
否	12	6	3	3	0	50.0	0.025
是	49	6	15	24	4	87.8	
神经侵犯							
否	14	4	6	3	1	71.4	0.264
是	47	8	12	24	3	83.0	
临床分期							
I + II	21	8	9	3	1	61.9	0.003
III + IV	40	4	9	24	3	90.0	
TNM分期							
T1+T2	21	5	10	4	2	76.2	0.031
T3+T4	40	7	8	23	2	82.5	

白修饰,调节基因表达的功能不同,如组蛋白乙酰化与基因激活有关,而组蛋白甲基化则依据甲基化位点和种类的不同,功能亦不同^[13]。因此,任何可以使这些组蛋白修饰水平发生改变或调节紊乱都有可能会导致基因表达失衡,从而促进肿瘤的形成。近年研究表明肿瘤的发生、发展是由遗传和表观遗传共同异常导致基因表达失常所致^[14,15]。表观遗传主要包括DNA甲基化和组蛋白修饰,但以往研究大多集中在抑癌基因启动子CpG岛高甲基化,而对组蛋白修饰在肿瘤中研究相对较少。随着“组蛋白密码”学说^[16]的提出以及大量组蛋白修饰酶^[17]被发现,组蛋

白修饰在肿瘤中的作用才逐渐引起重视。2005年, Seligson等^[18]首次报道了组蛋白H3K4双甲基化和H3K18乙酰化可以预测前列腺癌的复发。之后,多种组蛋白修饰在恶性肿瘤中被发现表达异常并与患者预后有关,如Barlesi等^[19]在非小细胞肺癌中发现高表达H3K4双甲基化或低表达H3K9乙酰化的患者生存率高,预后较好; Barbisan等^[20]发现总体H3K9乙酰化水平可以预测低分化膀胱癌患者术后的复发。组蛋白修饰的这方面应用在胃癌中也有类似发现,如Park等^[21]发现胃癌组织中H3K9三甲基化水平与肿瘤分期、淋巴管浸润、肿瘤复发、患者生存率有关,多

因素生存分析结果示H3K9三甲基化是胃癌患者的独立预后因素。

组蛋白H3K27三甲基化(H3K27me3)在恶性肿瘤中的作用亦有研究。Cai等^[11]在肝癌中发现,与正常肝组织相比,H3K27me3在肝癌中高表达,并且与肿瘤大小、血管浸润、肿瘤分期等临床病理因素相关,使用生存分析发现H3K27me3蛋白表达与肝癌患者预后有关,H3K27me3表达越高的患者预后越差。Tzao等^[22]研究了包括H3K27me3在内的多种组蛋白修饰,发现H3K27me3和H3K18ac在食管癌中高表达且表达越高患者预后越差;不仅如此,He等^[23]还发现H3K27me3不仅可以预测经过局部放化疗食管癌患者的预后,而且还能区分出这些食管癌患者中不同病理级别的个体不同的预后结局。但也有部分研究结果却得出相反结论。Wei等^[10]发现H3K27me3在乳腺癌、胰腺癌和卵巢癌中表达下降,H3K27me3蛋白表达与肿瘤大小、淋巴结转移、病理分期等有关,进一步分析提示H3K27me3是乳腺癌、胰腺癌和卵巢癌患者的独立预后指标,H3K27me3表达越低的患者预后越差。因此,H3K27me3在恶性肿瘤中的研究目前尚有争论。

本研究中,我们先用Western blot方法检测了人胃癌细胞系SGC7901、BGC823和AGS中H3K27me3表达,发现与正常胃上皮细胞GES-1相比,H3K27me3在这3株胃癌细胞中高表达。然后我们又用免疫组化方法检测61例胃癌组织中H3K27me3的表达情况,同样可以发现H3K27me3在胃癌组织中高表达,而正常胃黏膜组织中低表达。H3K27me3在胃癌等恶性肿瘤中高表达,原因可能是由于催化H3K27me3的酶EZH2在恶性肿瘤中过表达所致。但Wei等^[10]在乳腺癌、胰腺癌和卵巢癌中却发现H3K27me3低表达,说明H3K27me3在不同的恶性肿瘤中的表达差异明显,一方面可能因为恶性肿瘤是一种异质性非常明显的疾病,即使同一种蛋白在不同肿瘤中表达情况也不同;另一方面可能是各种组蛋白修饰之间存在相互作用^[13,16],H3K27me3蛋白表达受到其他组蛋白修饰的影响;再者,也有可能是催化H3K27me3的酶EZH2在恶性肿瘤中高表达导致PcG蛋白复合体发生改变,形成新的复合体,从而影响EZH2催化活性导致H3K27me3蛋白表达受影响^[24-26]。

我们接着评估了H3K27me3与胃癌临床病理因素的关系,发现H3K27me3的表达与肿瘤

大小、浸润深度、淋巴结转移、血管侵犯、临床分期、TNM分期有关($P<0.05$),而与患者的性别、年龄、病变部位、分化程度、神经侵犯之间无相关性。这与其他作者研究结果基本相同^[10,11,22,23]。虽然本文缺乏这些胃癌患者的预后资料,但从H3K27me3与肿瘤浸润深度、淋巴结转移、TNM分期等这些具有推断意义的预后因素具有相关性来看,H3K27me3可能是胃癌患者重要的预后因子,当然这些尚需要进一步研究证明。至于H3K27me3蛋白表达为什么与肿瘤侵袭转移有关,原因可能有以下2点:一是H3K27me3抑制下游抑癌基因的表达,从而促进肿瘤转移。如Fujii等^[27]发现,EZH2在胃癌细胞中可通过H3K27me3下调E-cadherin基因的表达,而E-cadherin蛋白是肿瘤侵袭转移的重要因素;Yao等^[28]还发现H3K27me3是抑癌基因p16INK4a早期的沉默事件;二是催化H3K27me3的酶EZH2在恶性肿瘤存在高表达,并且EZH2与肿瘤大小、浸润深度、血管浸润、淋巴结转移、临床分期等密切相关^[7-9,29],而EZH2和H3K27me3又存在正相关性^[11,23]。但值得一提的是,组蛋白修饰在临床上的这些应用目前还仅限于总体蛋白修饰水平,对于特定基因启动子区的组蛋白修饰变化目前尚未发现有临床应用价值。

总之,我们研究发现H3K27me3在胃癌细胞和组织中高表达,并且与肿瘤大小、淋巴结转移、血管侵犯、TNM分期等临床病理因素密切相关,H3K27me3可能是胃癌患者重要的预后因子。

4 参考文献

- 1 Catalano V, Labianca R, Beretta GD, Gatta G, de Braud F, Van Cutsem E. Gastric cancer. *Crit Rev Oncol Hematol* 2009; 71: 127-164
- 2 Kurdستاني SK. Histone modifications in cancer biology and prognosis. *Prog Drug Res* 2011; 67: 91-106
- 3 Elsheikh SE, Green AR, Rakha EA, Powe DG, Ahmed RA, Collins HM, Soria D, Garibaldi JM, Paish CE, Ammar AA, Grainge MJ, Ball GR, Abdelghany MK, Martinez-Pomares L, Heery DM, Ellis IO. Global histone modifications in breast cancer correlate with tumor phenotypes, prognostic factors, and patient outcome. *Cancer Res* 2009; 69: 3802-3809
- 4 Ellinger J, Kahl P, von der Gathen J, Rogenhofer S, Heukamp LC, Gütgemann I, Walter B, Hofstädter F, Büttner R, Müller SC, Bastian PJ, von Ruecker A. Global levels of histone modifications predict prostate cancer recurrence. *Prostate* 2010; 70: 61-69
- 5 Manuyakorn A, Paulus R, Farrell J, Dawson NA, Tze S, Cheung-Lau G, Hines OJ, Reber H, Seligson DB, Horvath S, Kurdستاني SK, Guha C, Dawson

■应用要点

本文研究结果提示H3K27me3与胃癌侵袭转移有关,可能作为胃癌患者预后的判断指标。

同行评价

本课题设计合理, 资料全面, 参考文献权威, 对胃癌发生发展的研究具有一定的理论意义和潜在的临床价值。

- DW. Cellular histone modification patterns predict prognosis and treatment response in resectable pancreatic adenocarcinoma: results from RTOG 9704. *J Clin Oncol* 2010; 28: 1358-1365
- 6 Van Den Broeck A, Brambilla E, Moro-Sibilot D, Lantuejoul S, Brambilla C, Eymen B, Khochbin S, Gazzeri S. Loss of histone H4K20 trimethylation occurs in preneoplasia and influences prognosis of non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 2008; 14: 7237-7245
- 7 Kidani K, Osaki M, Tamura T, Yamaga K, Shomori K, Ryoke K, Ito H. High expression of EZH2 is associated with tumor proliferation and prognosis in human oral squamous cell carcinomas. *Oral Oncol* 2009; 45: 39-46
- 8 Collett K, Eide GE, Arnes J, Stefansson IM, Eide J, Braaten A, Aas T, Otte AP, Akslen LA. Expression of enhancer of zeste homologue 2 is significantly associated with increased tumor cell proliferation and is a marker of aggressive breast cancer. *Clin Cancer Res* 2006; 12: 1168-1174
- 9 Varambally S, Dhanasekaran SM, Zhou M, Barrette TR, Kumar-Sinha C, Sanda MG, Ghosh D, Pienta KJ, Sewalt RG, Otte AP, Rubin MA, Chinnaiyan AM. The polycomb group protein EZH2 is involved in progression of prostate cancer. *Nature* 2002; 419: 624-629
- 10 Wei Y, Xia W, Zhang Z, Liu J, Wang H, Adsay NV, Albarracin C, Yu D, Abbruzzese JL, Mills GB, Bast RC, Hortobagyi GN, Hung MC. Loss of trimethylation at lysine 27 of histone H3 is a predictor of poor outcome in breast, ovarian, and pancreatic cancers. *Mol Carcinog* 2008; 47: 701-706
- 11 Cai MY, Hou JH, Rao HL, Luo RZ, Li M, Pei XQ, Lin MC, Guan XY, Kung HF, Zeng YX, Xie D. High expression of H3K27me3 in human hepatocellular carcinomas correlates closely with vascular invasion and predicts worse prognosis in patients. *Mol Med* 2011; 17: 12-20
- 12 Kouzarides T. Chromatin modifications and their function. *Cell* 2007; 128: 693-705
- 13 Sawan C, Herceg Z. Histone modifications and cancer. *Adv Genet* 2010; 70: 57-85
- 14 Jones PA, Baylin SB. The epigenomics of cancer. *Cell* 2007; 128: 683-692
- 15 Esteller M. Epigenetics in cancer. *N Engl J Med* 2008; 358: 1148-1159
- 16 Jenuwein T, Allis CD. Translating the histone code. *Science* 2001; 293: 1074-1080
- 17 Ellis L, Atadja PW, Johnstone RW. Epigenetics in cancer: targeting chromatin modifications. *Mol Cancer Ther* 2009; 8: 1409-1420
- 18 Seligson DB, Horvath S, Shi T, Yu H, Tze S, Grunstein M, Kurdistani SK. Global histone modification patterns predict risk of prostate cancer recurrence. *Nature* 2005; 435: 1262-1266
- 19 Barlési F, Giaccone G, Gallegos-Ruiz MI, Loundou A, Span SW, Lefesvre P, Kruyt FA, Rodriguez JA. Global histone modifications predict prognosis of resected non small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2007; 25: 4358-4364
- 20 Barbisan F, Mazzucchelli R, Santinelli A, Stramaz-zotti D, Scarpelli M, Lopez-Beltran A, Cheng L, Montironi R. Immunohistochemical evaluation of global DNA methylation and histone acetylation in papillary urothelial neoplasm of low malignant potential. *Int J Immunopathol Pharmacol* 2008; 21: 615-623
- 21 Park YS, Jin MY, Kim YJ, Yook JH, Kim BS, Jang SJ. The global histone modification pattern correlates with cancer recurrence and overall survival in gastric adenocarcinoma. *Ann Surg Oncol* 2008; 15: 1968-1976
- 22 Tzao C, Tung HJ, Jin JS, Sun GH, Hsu HS, Chen BH, Yu CP, Lee SC. Prognostic significance of global histone modifications in resected squamous cell carcinoma of the esophagus. *Mod Pathol* 2009; 22: 252-260
- 23 He LR, Liu MZ, Li BK, Rao HL, Liao YJ, Guan XY, Zeng YX, Xie D. Prognostic impact of H3K27me3 expression on locoregional progression after chemoradiotherapy in esophageal squamous cell carcinoma. *BMC Cancer* 2009; 9: 461
- 24 Kuzmichev A, Margueron R, Vaquero A, Preissner TS, Scher M, Kirmizis A, Ouyang X, Brockdorff N, Abate-Shen C, Farnham P, Reinberg D. Composition and histone substrates of polycomb repressive group complexes change during cellular differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102: 1859-1864
- 25 Cao R, Zhang Y. The functions of E(Z)/EZH2-mediated methylation of lysine 27 in histone H3. *Curr Opin Genet Dev* 2004; 14: 155-164
- 26 Kuzmichev A, Jenuwein T, Tempst P, Reinberg D. Different EZH2-containing complexes target methylation of histone H1 or nucleosomal histone H3. *Mol Cell* 2004; 14: 183-193
- 27 Fujii S, Ochiai A. Enhancer of zeste homolog 2 downregulates E-cadherin by mediating histone H3 methylation in gastric cancer cells. *Cancer Sci* 2008; 99: 738-746
- 28 Yao JY, Zhang L, Zhang X, He ZY, Ma Y, Hui LJ, Wang X, Hu YP. H3K27 trimethylation is an early epigenetic event of p16INK4a silencing for regaining tumorigenesis in fusion reprogrammed hepatoma cells. *J Biol Chem* 2010; 285: 18828-18837
- 29 Matsukawa Y, Semba S, Kato H, Ito A, Yanagihara K, Yokozaki H. Expression of the enhancer of zeste homolog 2 is correlated with poor prognosis in human gastric cancer. *Cancer Sci* 2006; 97: 484-491

编辑 张姗姗 电编 闫晋利

CHD5与KLF5蛋白在胃癌组织中的表达及其与预后的关系

罗登, 赵公芳, 路明亮, 黄华, 常江, 郑梦瑶

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

罗登, 在读硕士, 主要从事消化系统肿瘤方面的研究。

云南省卫生科技计划基金资助项目, No. 2010NS066

作者贡献分布: 本课题由黄华与常江设计; 研究过程由罗登、郑梦瑶及赵公芳完成; 数据分析由路明亮完成; 免疫组织化学实验由罗登与郑梦瑶完成; 结果判读由赵公芳与路明亮完成; 研究所用资金由常江提供; 论文写作由罗登与赵公芳完成。

通讯作者: 赵公芳, 主治医师, 650101, 云南省昆明市西山区林园1号, 昆明医学院第二附属医院消化内科。

122068863@qq.com

收稿日期: 2011-10-12 修回日期: 2011-11-12

接受日期: 2011-12-07 在线出版日期: 2011-12-18

Association of CHD5 and KLF5 expression with prognosis in gastric carcinoma

Deng Luo, Gong-Fang Zhao, Ming-Liang Lu, Hua Huang, Jiang Chang, Meng-Yao Zheng

Deng Luo, Gong-Fang Zhao, Ming-Liang Lu, Hua Huang, Jiang Chang, Meng-Yao Zheng, Department of Gastroenterology, the Second Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming 650101, Yunnan Province, China

Supported by: the Health and Science Program of Yunnan Province, No. 2010NS066

Correspondence to: Gong-Fang Zhao, Attending Physician, Department of Gastroenterology, the Second Affiliated Hospital of Kunming Medical University, No.1 Mayuan Road, Xishan District, Kunming 650101, Yunnan Province, China. 122068863@qq.com

Received: 2011-10-12 Revised: 2011-11-12

Accepted: 2011-12-07 Published online: 2011-12-18

Abstract

AIM: To investigate the expression of chromodomain helicase DNA-binding protein 5 (CHD5) and Krüppel-like factor 5 (KLF5) in gastric cancer, and to evaluate whether CHD5 and KLF5 can be used as prognostic markers in gastric cancer.

METHODS: Immunohistochemistry staining was performed to detect the expression of CHD5 and KLF5 proteins in 208 surgical specimens of gastric cancer and 68 noncancerous gastric tissue specimens. The association of CHD5 and KLF5 expression in gastric cancer with the survival time of patients was retrospectively analyzed.

RESULTS: Reduced expression of CHD5 and

KLF5 frequently occurred in gastric cancer. The positive rates of CHD5 and KLF5 expression in gastric cancer were 29.33% (61/208) and 38.46% (80/208), respectively. CHD5 expression was correlated with age, histologic differentiation, depth of invasion, regional lymph node metastasis, distant metastasis, and TNM stage (all $P < 0.05$). KLF5 expression was correlated with histologic differentiation, depth of invasion, lymph node metastasis, distant metastasis, and TNM stage (all $P < 0.05$). Further multivariate analysis revealed that patient's gender, tumor location, histologic differentiation, distant metastasis, TNM stage, and expression of CHD5 and KLF5 were independent prognostic factors in patients with gastric cancer. The Kaplan-Meier plot showed that the median survival was 21.00 ± 1.36 months in patients with negative expression of CHD5 and 20.00 ± 1.54 months in those with negative expression of KLF5. The median survival time was 55.00 ± 6.97 months in patients with positive CHD5 expression and 45.00 ± 3.27 months in patients with positive KLF5 expression. The cumulative 1- and 3-year survival rates were significantly lower in patients with negative expression of CHD5 and KLF5 than in those with positive expression of these two proteins.

CONCLUSION: Reduced expression of CHD5 and KLF5 in gastric cancer is associated with tumor metastasis and poor survival. Ectopic expression of CHD5 and KLF5 proteins may play an important role in the tumorigenesis and progression of gastric carcinoma.

Key Words: Gastric carcinoma; Chromodomain helicase DNA-binding protein 5; Krüppel-like factor 5; Clinicopathologic features; Prognosis

Luo D, Zhao GF, Lu ML, Huang H, Chang J, Zheng MY. Association of CHD5 and KLF5 expression with prognosis in gastric carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(35): 3603-3609

摘要

目的: 探讨胃癌组织中CHD5和KLF5的表达意义及其与预后的关系。

■背景资料

胃癌已成为全球继肺癌、乳腺癌、大肠癌之后发病率第4位的肿瘤,也是导致肿瘤性死亡的第2位原因。探讨胃癌的发生发展及浸润转移等过程中的分子机制,寻求诊断和治疗的有分子靶标尤为重要。

■同行评议者

陈卫昌, 教授, 主任医师, 苏州大学附属第一医院

■相关报道

近年来, CHD5被认为是肿瘤抑制途径的关键调节因子, 在多种恶性肿瘤中常发现CHD5的缺失, 提示CHD5作为一种新型肿瘤抑制因子在肿瘤病理过程中起到重要作用。同样, KLF5在大多数肿瘤组织中也呈表达缺失或者下调趋势, 提示KLF5可能起到抑癌基因的作用。

方法: 收集2000-01/2007-06在昆明医学院第二附属医院手术切除的208例胃癌组织标本, 采用免疫组织化学SP法检测胃腺癌组织、癌旁组织中CHD5和KLF5的表达; 采用 χ^2 检验和Fisher精确概率法分析胃癌中CHD5和KLF5的表达与临床病理指标的相关性; 采用Cox比例风险模型方法进行多因素分析; 应用Kaplan-Meier生存分析法判断CHD5和KLF5表达与各临床病理参数及其预后的关系。

结果: 胃癌组织中CHD5和KLF5呈明显低表达特点。其中, CHD5的表达与患者年龄、肿瘤分化程度、浸润深度、TNM分期、淋巴结和远处转移等有关, 差异有统计学意义($P < 0.05$); KLF5的表达与肿瘤分化程度、浸润深度、TNM分期、淋巴结和远处转移等有关, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。多因素分析显示, 患者的生存时间主要受患者性别、肿瘤部位、组织分化程度、远处转移、TNM分期、CHD5和KLF5的异常表达等因素影响; Kaplan-Meier生存分析显示, CHD5、KLF5阴性组的中位生存期分别为(21.00 mo $\pm$ 1.36 mo)、(20.00 mo $\pm$ 1.54 mo), 而CHD5、KLF5阳性组的中位生存期分别为(55.00 mo $\pm$ 6.97 mo)、(45.00 mo $\pm$ 3.27 mo)。CHD5和KLF5阴性表达组患者的1、3年生存率明显低于阳性表达患者, 差异均有统计学意义。

结论: 胃癌组织中CHD5和KLF5低表达与胃癌的侵袭转移及不良预后存在相关性。提示CHD5和KLF5蛋白的异常表达可能参与胃黏膜恶性转变以及胃癌发生发展等生物学过程。

关键词: 胃癌; CHD5蛋白; KLF5蛋白; 临床病理特征; 预后

罗登, 赵公芳, 路明亮, 黄华, 常江, 郑梦瑶. CHD5与KLF5蛋白在胃癌组织中的表达及其与预后的关系. 世界华人消化杂志 2011; 19(35): 3603-3609
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/3603.asp>

0 引言

胃癌(Gastric cancer)是起源于胃黏膜上皮细胞的恶性肿瘤, 目前已成为全球继肺癌、乳腺癌、大肠癌之后发病率第4位的肿瘤, 也是导致肿瘤性死亡的第2位原因^[1,2]。因此, 探讨胃癌的发生发展及浸润转移等过程中的分子机制, 寻求诊断和治疗的有效分子靶标尤为重要。近年来, Chromodomain helicase DNA-binding protein (CHD5)基因被认为是一种抑癌基因, 通过p19Arf/p53通路调控细胞增殖、衰老和凋

亡, 是抑癌调控系统的关键因子^[3,4]。在肿瘤形成过程中, CHD5基因有较高的甲基化发生率^[5]。KLF5(Krüppel-like factor 5)是一种DNA结合转录调节因子, 属于KLF(Krüppel-like factors)家族, 广泛表达于人体骨骼肌、肺、乳腺、结肠、小肠、前列腺、胰腺、肾脏等多种组织。其不仅在细胞增殖、分化及胚胎形成中发挥重要作用, 还在肿瘤病理过程中发挥着重要作用^[6,7]。现已证实, 结肠癌中KLF5 mRNA的表达下降, 提示KLF5的下调可能参与了结肠癌的发生发展过程。本课题以临床胃癌患者作为研究对象, 采用免疫组织化学SP法检测CHD5和KLF5在胃癌及癌旁组织中的表达, 以期分析两者与肿瘤临床病理特征的相关性及在肿瘤发生发展中的作用, 并进一步了解两者与胃癌预后的关系。

1 材料和方法

1.1 材料 收集2000-01/2007-06昆明医学院第二附属医院手术切除并经病理证实的208例患者的胃腺癌标本, 其均为原发性肿瘤, 同时选取68例正常胃组织(距胃癌原发灶 >5 cm)作对照。所选病例均有随访资料, 所有患者术前均未接受过化学治疗和放射治疗。208例患者中, 男($n = 121$), 女($n = 87$), 男女比例1.39:1; 年龄29-84岁(平均55岁), <50 岁($n = 70$), ≥ 50 岁($n = 138$); 肿瘤部位: 胃近端14例, 胃体部86例, 胃远端108例; 切除肿瘤癌灶 <5 cm ($n = 102$), ≥ 5 cm ($n = 106$); 按美国癌症联合委员会(AJCC)胃癌TNM分期(2010年第7版)标准^[8,9], T₁($n = 17$), T₂($n = 43$), T₃($n = 120$), T₄($n = 28$); N₀($n = 103$), N₁($n = 32$), N₂($n = 40$), N₃($n = 33$); M₀($n = 177$), M₁($n = 31$); I期($n = 47$), II期($n = 70$), III期($n = 60$), IV期($n = 31$)。病理组织学类型: 乳头状腺癌($n = 8$), 管状腺癌($n = 129$), 黏液腺癌($n = 45$), 印戒细胞癌($n = 26$); 高分化癌($n = 13$), 中分化癌($n = 63$), 低分化癌($n = 128$)及未分化癌或其他($n = 4$)。

兔抗人CHD5多克隆抗体购自美国Santa Cruz公司; 兔抗人KLF5多克隆抗体购自美国Millipore公司; 免疫组织化学SP法试剂盒及BAD显色剂均购自中国福州迈新生物技术有限公司。

1.2 方法

1.2.1 实验免疫组化染色及结果判定: 所有标本均经100 g/L甲醛固定, 常规石蜡包埋, 3 μ m切片, SP免疫组化染色步骤和抗体稀释度均按产品说明书进行。PBS代替一抗做阴性对照, 显微镜下

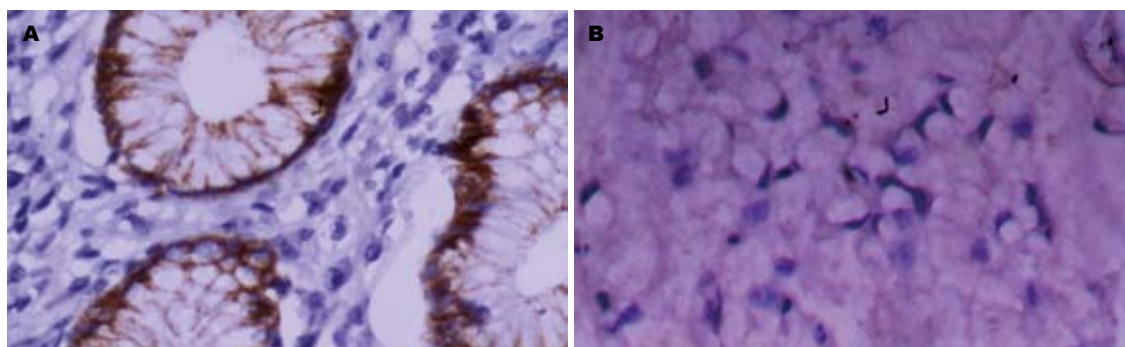


图 1 CHD5的表达(SP×400). A: 癌旁正常腺体; B: 印戒细胞癌.

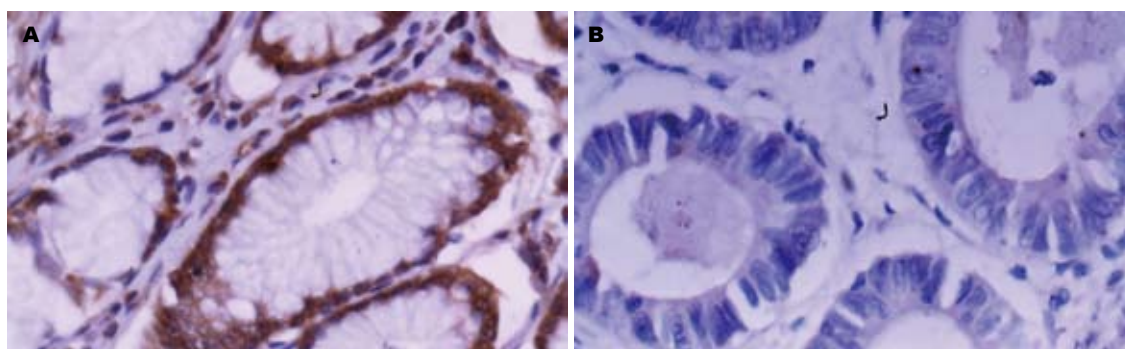


图 2 KLF5的表达(SP×400). A: 癌旁正常腺体; B: 高分化腺癌.

■创新盘点

本文通过病例研究, 综合分析了CHD5和KLF5在胃癌中的表达情况及与胃癌生物学行为和预后的关系.

观察结果.

根据肿瘤细胞显色的比例及染色强度, 对CHD5和KLF5表达做半定量判定. 为减少主观性, 一般至少由2人判断打分. 在显微镜下按显色程度肉眼评分: 弱染色为1分; 中等染色为2分; 强染色为3分. 在高倍镜下按阳性细胞所占百分比计算评分: 阳性细胞数占10%-50%为2分; 50%-80%为3分; $\geq 80\%$ 为4分. 最后将肉眼一般评分与高倍镜下百分比计算评分之和进行最终判断, 无论染色强度如何, 细胞阳性率 $<10\%$ 或少于2分者为阴性(-); 2-3分为弱阳性(+); 4-7分为强阳性(++).

1.2.2 随访: 纳入本研究的所有病例均有完整随访资料, 生存期从胃癌诊断之日开始计算, 至本研究结束(2011-06-23)止. 随访时间单位为月, 研究终点(阳性结局)定义为患者因胃癌或相应并发症死亡, 研究结束时仍未出现阳性结局者定为删失. 本研究随访时间1.0-64.2 mo(中位随访时间27.3 mo), 随访方式为患者复诊、电话及信函.

统计学处理 使用SPSS16.0统计软件, 细胞阳性率的比较采用 χ^2 检验和Fisher精确概率法; 采用非参数检验进行单因素分析CHD5和KLF5的表达与临床病理指标的相关性, 筛查危险因素; 采用COX风险回归模型方法进行多因素分

析; 用Kaplan-Meier法计算生存率及绘制生存曲线, 并用Log-rank法进行组间比较. $P<0.05$ 具有统计学意义.

2 结果

2.1 CHD5和KLF5在胃癌及正常胃黏膜中的表达 胃癌组织中CHD5和KLF5呈明显低表达特点. 208例胃癌组织中CHD5的阳性表达率为29.33%(61/208), KLF5的阳性表达率为38.46%(80/208), 68例正常的胃黏膜中可见CHD5高表达76.47%(52/68)和KLF5高表达66.18%(45/68)(图1, 2).

2.2 CHD5和KLF5的表达与胃癌临床指标的关系 经单因素分析发现, CHD5蛋白的表达与患者年龄、肿瘤分化程度、浸润深度、TNM分期、区域淋巴结及远处转移有关, 而与性别、肿瘤部位、瘤体大小、组织学类型无关. 随着胃壁浸润深度的加深, CHD5的表达呈下降趋势, T_1 、 T_2 、 T_3 、 T_4 各组的阳性率分别为88.2%、53.5%、18.3%、3.6%, 差异有统计学意义($\chi^2 = 56.533$, $P<0.0001$). 另外, 有远处转移者CHD5表达阳性率为6.5%, 低于无转移组33.3%, 且差异有统计学意义($\chi^2 = 9.197$, $P = 0.002$). 随着TNM分期的增加, CHD5的表达也逐渐下降, 且 I + II

■应用要点

本研究采用免疫组织化学的方法检测CHD5和KLF5蛋白在胃癌组织的表达情况,有助于阐释CHD5和KLF5在胃癌发生发展中的机制,并为判断预后提供了参考依据。

表 1 CHD5和KLF5在胃癌中的表达及其与病理特征关系

临床病理特征	n	CHD5				KLF5			
		-	+	χ^2 值	P值	-	+	χ^2 值	P值
年龄									
<50岁	70	43(61.4%)	27(38.6%)	4.350	0.037	39(55.7%)	31(44.3%)	1.512	0.219
≥50岁	138	104(75.4%)	34(24.6%)			89(64.5%)	49(35.5%)		
性别									
男	121	84(69.4%)	37(30.6%)	0.219	0.640	76(62.8%)	45(37.2%)	0.198	0.657
女	87	63(72.4%)	24(27.6%)			52(59.8%)	35(40.2%)		
肿瘤部位									
胃近端	14	12(85.7%)	2(14.3%)	1.773	0.412	11(78.6%)	3(21.4%)	2.707	0.258
胃体部	86	61(70.9%)	25(29.1%)			55(64.0%)	31(36.0%)		
胃远端	108	74(68.5%)	34(31.5%)			62(57.4%)	46(42.6%)		
瘤体大小									
<5 cm	102	72(70.6%)	30(29.4%)	0.001	0.979	64(62.7%)	38(37.3%)	0.123	0.726
≥5 cm	106	75(70.8%)	31(29.2%)			64(60.4%)	42(39.6%)		
组织类型									
乳头状腺癌	8	4(50%)	4(50%)	5.816	0.121	4(50%)	4(50%)	5.412	0.144
管状腺癌	129	86(66.7%)	43(33.3%)			73(56.6%)	56(43.4%)		
黏液腺癌	45	36(80.0%)	9(20.0%)			31(68.9%)	14(31.1%)		
印戒细胞癌	26	21(80.8%)	5(19.2%)			20(76.9%)	6(23.1%)		
分化程度									
高分化	13	7(53.8%)	6(46.2%)	11.534	0.003	5(38.5%)	8(61.5%)	16.771	<0.0001
中分化	63	36(57.1%)	27(42.9%)			28(44.4%)	35(55.6%)		
低分化	128	102(79.69%)	26(20.31%)			92(71.9%)	36(28.1%)		
未分化	4	2(50%)	2(50%)			3(75.0%)	1(25.0%)		
组织侵犯									
T ₁ +T ₂	60	22(36.7%)	38(63.3%)	56.533	<0.0001	25(41.7%)	35(58.3%)	59.885	<0.0001
T ₃ +T ₄	148	125(84.5%)	23(15.5%)			126(85.1%)	22(14.9%)		
区域淋巴转移									
N ₀	103	44(42.7%)	59(57.3%)	77.018	<0.0001	32(31.1%)	71(68.9%)	80.185	<0.0001
N ₁	32	31(96.9%)	1(3.1%)			30(93.8%)	2(6.2%)		
N ₂	40	39(97.5%)	1(2.5%)			36(90.0%)	4(10.0%)		
N ₃	33	33(100%)	0(0%)			30(90.9%)	3(9.1%)		
远处转移									
M ₀	177	118(66.7%)	59(33.3%)	9.197	0.002	99(55.9%)	78(44.1%)	15.771	<0.0001
M ₁	31	29(93.5%)	2(6.5%)			29(93.5%)	2(6.5%)		
TNM 分期									
I+II	117	59(50.43%)	58(49.57%)	85.545	<0.0001	50(42.74%)	67(57.26%)	63.239	<0.0001
III+IV	91	88(96.7%)	3(3.3%)			78(85.71%)	13(14.29%)		

期与III+IV期之间差别显著,有统计学意义($\chi^2=85.545, P<0.0001$).

KLF5蛋白的表达与患者性别、年龄、肿瘤部位、瘤体大小、组织学类型无关,而与肿瘤分化程度、浸润深度、TNM分期、区域淋巴结及远处转移有关($P<0.05$).与CHD5的表达相似,随着胃壁浸润深度的加深及TNM分期的增加,KLF5蛋白的表达也呈现出逐渐下降趋势,并在淋巴结及远处转移时呈低表达现象,差异均有统计学意义(表1).应用COX比例风险回归模型

进行多因素分析发现,患者性别($P=0.003$)、肿瘤部位($P=0.019$)、组织分化程度($P=0.019$)、远处转移($P<0.0001$)、TNM分期($P<0.0001$)、CHD5($P<0.0001$)和KLF5($P<0.0001$)的表达为影响胃癌预后的独立危险因素(表2).

2.3 CHD5和KLF5的表达和相关性 经统计,CHD5和KLF5在胃癌组织中有126例同时呈阴性表达,而二者同时阳性表达数量为59例.经Spearman等级相关分析显示,CHD5和KLF5在胃癌中的表达呈高度正相关,且具有统计学意义

表 2 影响胃癌患者预后的多因素分析 (Cox比例风险回归模型)

危险因素	P值	OR值	95% CI
性别	0.003	1.609	1.176–2.200
肿瘤部位	0.019	1.365	1.051–1.773
组织分化	0.019	0.723	0.550–0.949
远处转移	<0.0001	4.946	2.273–10.762
TNM分期	<0.0001	2.631	1.787–3.873
CHD5	<0.0001	0.248	0.134–0.456
KLF5	<0.0001	0.372	0.227–0.608

($r = 0.771, P < 0.0001$).

2.4 CHD5和KLF5表达与胃癌预后的相关分析应用Kaplan-Meier法进行生存分析显示, CHD5阴性表达组中位生存期为(21.00±1.36) mo, 而阳性组为(55.00±6.97) mo; CHD5阴性组1, 3年生存率分别为76.6%、12.1%, 明显低于阳性表达组患者的1, 3年生存率(96.1%、90.2%), 且Log-rank法进行2组间生存曲线比较, 差异有统计学意义($\chi^2 = 110.030, P < 0.0001$). KLF5阴性表达组中位生存期为(20.00±1.54) mo, 而阳性组为(45.00±3.27) mo; KLF5阴性组1, 3年生存率分别为73.0%、7.4%, 明显低于阳性表达组患者的1, 3年生存率(97.1%、77.1%), 且Log-rank检验, 差异有统计学意义($\chi^2 = 109.952, P < 0.0001$, 图3).

3 讨论

众所周知, 肿瘤形成的过程包括始发突变、潜伏、促癌和演进^[10-13]. 而这些过程往往涉及多个基因的改变, 与原癌基因、抑癌基因突变的逐渐积累有关^[14-17]. CHD蛋白家族属于SWI2/SNF2相关的ATP酶超家族, 包含有染色质调节域(Chromodomains)、类SWI2/SNF2 ATP酶/解旋酶域(SWI2/SNF2-like ATPase/Helicases)和DNA结合域(DNA-binding domain)等结构^[18,19]. 近年来, CHD5被认为是肿瘤抑制途径的关键调节因子, 定位于1p36基因组片段内^[20,21]. 现已证实, 在神经母细胞瘤、黑色素瘤、血液系统的恶性肿瘤(AML、CML)和上皮源性的恶性肿瘤(甲状腺癌、结肠癌、宫颈癌、乳腺癌)中常发现CHD5的缺失, 提示CHD5作为一种新型肿瘤抑制因子在肿瘤病理过程中起到重要作用^[22]. 本研究结果表明, CHD5在胃癌组织中呈明显低表达趋势, 208例胃癌组织中CHD5的阳性表达率为29.33% (61/208), 而68例正常的胃黏膜中可见CHD5高表达76.47%(52/68). 此外, 单因素分

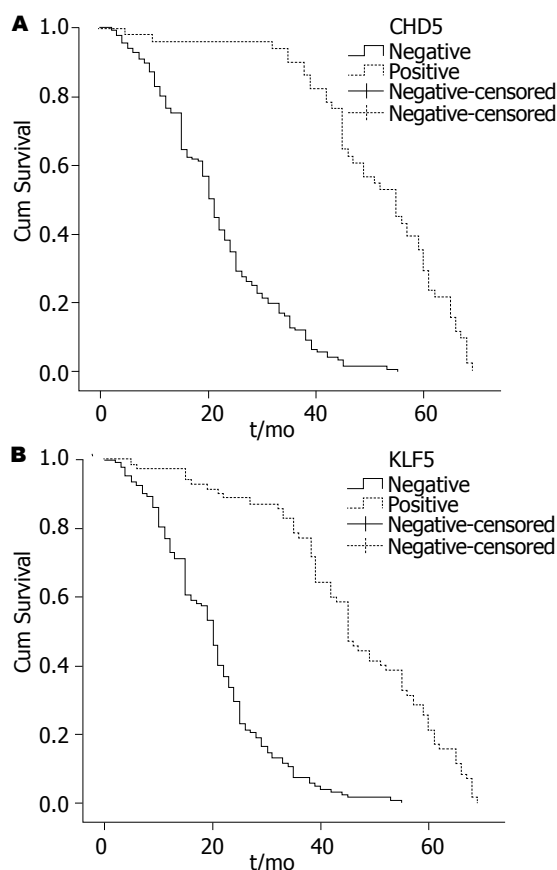


图 3 Kaplan-Meier法进行生存分析. A: CHD5; B: KLF5.

析发现CHD5蛋白的表达与患者年龄、肿瘤分化程度、浸润深度、TNM分期、区域淋巴结及远处转移有关, 而与性别、肿瘤部位、瘤体大小、组织学类型无关. 不仅如此, 随着胃壁浸润深度的加深及TNM分期的增加, CHD5的表达呈逐渐下降趋势, 提示CHD5异常表达与胃癌的恶性行为有关, 可能在胃癌发生发展等的生物学过程中起到一定作用.

之前, 唐莹莹等^[23]在检测CHD5在30例肝癌及癌旁组织中的表达时发现, CHD5 mRNA在肝癌组织、癌旁组织的缺失率分别为53.3%(16/30)、13.3%(4/30). 随后, Wang等^[24]发现CHD5在正常胃组织中呈高表达, 而在所有胃癌细胞株中表达下调; 另外, 还发现在胃癌细胞株及胃癌组织中CHD5启动子呈明显甲基化反应, 而在癌旁正常胃黏膜中并未发生甲基化或呈弱甲基化反应; 因此, Wang等认为, CHD5启动子甲基化反应可能是导致CHD5蛋白表达下调并参与胃癌形成的主要原因. 虽然实验结果与本研究基本相一致, 但因实验样本数量太少, 且并未进一步研究CHD5与胃癌患者预后的关系, CHD5的表达与胃癌临床预后的关系仍

■同行评价

本文采用免疫组织化学方法研究了CHD5与KLF5蛋白在胃癌组织中的表达及其与预后的关系, 有一定的科学性和可读性, 有潜在的研究价值.

不十分清楚. 本实验回顾性分析了208例胃癌患者的临床和随访资料, 结合CHD5在胃癌患者中表达情况, 应用Kaplan-Meier法生存分析发现, CHD5阴性表达组中位生存期为21 mo, 而阳性组为55 mo; CHD5阴性组1, 3年生存率分别为76.6%、12.1%, 明显低于阳性表达组患者的1, 3年生存率(96.1%, 90.2%), 且Log-rank法进行两组间生存曲线比较, 差异有统计学意义($\chi^2 = 110.030, P < 0.0001$). 因此, 提示CHD5的异常表达可能与胃癌的不良预后有关.

KLF5是KLF家族转录因子中的成员之一, 广泛地参与细胞转化、增殖等相关基因的转录调节, 以保障机体各类细胞的正常增殖分化和组织发育的调控^[25,26]. 然而, 这种调控一旦发生异常, 将导致细胞的无限增殖, 促进癌症的发生. 之前研究显示, KLF5在大多数肿瘤组织中呈表达缺失或者下调趋势, 提示KLF5可能起到抑癌基因的作用^[27-29]. 本研究的结果表明, 与CHD5表达相似, KLF5在胃癌组织中同样呈低表达特点, 208例胃癌组织中KLF5的阳性表达率为38.46%(80/208), 而68例正常的胃黏膜中KLF5表达率为66.18%(45/68). KLF5蛋白的表达与患者性别、年龄、肿瘤部位、瘤体大小、组织学类型无关, 而与肿瘤分化程度、浸润深度、TNM分期、区域淋巴结及远处转移有关. 且同样随着胃壁浸润深度的加深及TNM分期的增加, KLF5的表达也呈逐渐下降趋势.

虽然以往许多实验提示KLF5在肿瘤发生发展中可能起到抑癌基因的作用, 但是最近, Mori等^[30]在探索KLF5在胰腺癌中的表达时发现, KLF5呈过度表达趋势. 不仅如此, 也有实验发现, KLF5的高表达与乳腺癌的预后差有关^[31]. 因此, 需要进一步的探索KLF5的生物学功能, 特别是在肿瘤形成过程中的调节机制, 以明确KLF5是作为原癌基因还是抑癌基因而发挥作用. 本组研究发现, KLF5的表达与胃癌患者的预后有关, KLF5阴性表达组中位生存期为20 mo, 而阳性组为45 mo; KLF5阴性组1, 3年生存率分别为73.0%、7.4%, 明显低于阳性表达组患者的1, 3年生存率(97.1%, 77.1%), 且Log-rank检验, 差异有统计学意义($\chi^2 = 109.952, P < 0.0001$). 因此, 提示KLF5与胃癌的发生、发展及不良预后密切相关.

此外, 本组实验进一步行多因素分析发现, 患者性别、肿瘤部位、组织分化程度、远处转移、TNM分期、CHD5和KLF5的表达为影响胃

癌预后的独立危险因素. 因CHD5和KLF5在大多数肿瘤中呈抑癌基因特点, 本组将两者同时在胃癌组织中进行研究, 以期探索两种蛋白的表达之间有无相关性. 经Spearman等级相关分析显示, CHD5和KLF5在胃癌中的表达呈高度正相关, 且存在统计学意义($r = 0.771, P < 0.0001$). 故而推测二者在胃癌的形成过程可能存在相互调节、协同效应.

总之, CHD5和KLF5与胃癌的发生、发展密切相关, CHD5和KLF5的表达下调可能对胃癌的恶性程度和预后起到一定影响作用. 但毕竟肿瘤的发生、发展过程受多种因素的影响, 是多种基因相互协调、相互作用的结果. 有关CHD5和KLF5参与胃癌形成的具体机制及相关调节途径有待于更深入的探索. 相信随着对CHD5和KLF5研究的不断深入, 不久将来可为胃癌的诊断和分子靶向治疗提供了崭新的思路.

4 参考文献

- 1 Ajani JA, Barthel JS, Bekaii-Saab T, Bentrem DJ, D'Amico TA, Das P, Denlinger C, Fuchs CS, Gerdes H, Hayman JA, Hazard L, Hofstetter WL, Ilson DH, Keswani RN, Kleinberg LR, Korn M, Meredith K, Mulcahy MF, Orringer MB, Osarogiagbon RU, Posey JA, Sasson AR, Scott WJ, Shibata S, Strong VE, Washington MK, Willett C, Wood DE, Wright CD, Yang G. Gastric cancer. *J Natl Compr Canc Netw* 2010; 8: 378-409
- 2 Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Thun MJ. Cancer statistics, 2009. *CA Cancer J Clin* 2009; 59: 225-249
- 3 Schuster EF, Stöger R. CHD5 defines a new subfamily of chromodomain-SWI2/SNF2-like helicases. *Mamm Genome* 2002; 13: 117-119
- 4 Bagchi A, Papazoglu C, Wu Y, Capurso D, Brodt M, Francis D, Bredel M, Vogel H, Mills AA. CHD5 is a tumor suppressor at human 1p36. *Cell* 2007; 128: 459-475
- 5 Gorringer KL, Choong DY, Williams LH, Ramakrishna M, Sridhar A, Qiu W, Bearfoot JL, Campbell IG. Mutation and methylation analysis of the chromodomain-helicase-DNA binding 5 gene in ovarian cancer. *Neoplasia* 2008; 10: 1253-1258
- 6 Dong JT, Chen C. Essential role of KLF5 transcription factor in cell proliferation and differentiation and its implications for human diseases. *Cell Mol Life Sci* 2009; 66: 2691-2706
- 7 Bateman NW, Tan D, Pestell RG, Black JD, Black AR. Intestinal tumor progression is associated with altered function of KLF5. *J Biol Chem* 2004; 279: 12093-12101
- 8 Washington K. 7th edition of the AJCC cancer staging manual: stomach. *Ann Surg Oncol* 2010; 17: 3077-3079
- 9 Santiago JM, Sasako M, Osorio J. [TNM-7th edition 2009 (UICC/AJCC) and Japanese Classification 2010 in Gastric Cancer. Towards simplicity and standardisation in the management of gastric cancer]. *Cir Esp* 2011; 89: 275-281

- 10 Resende C, Ristimäki A, Machado JC. Genetic and epigenetic alteration in gastric carcinogenesis. *Helicobacter* 2010; 15 Suppl 1: 34-39
- 11 Watanabe Y, Maekawa M. Methylation of DNA in cancer. *Adv Clin Chem* 2010; 52: 145-167
- 12 Ruf W, Disse J, Carneiro-Lobo TC, Yokota N, Schaffner F. Tissue factor and cell signalling in cancer progression and thrombosis. *J Thromb Haemost* 2011; 9 Suppl 1: 306-315
- 13 Berger AH, Knudson AG, Pandolfi PP. A continuum model for tumour suppression. *Nature* 2011; 476: 163-169
- 14 程桂丹, 陈洪, 陆枫林. 肿瘤相关基因RASAL1在结肠癌中的表达及临床意义. *世界华人消化杂志* 2011; 19: 488-493
- 15 Bardella C, Pollard PJ, Tomlinson I. SDH mutations in cancer. *Biochim Biophys Acta* 2011; 1807: 1432-1443
- 16 Saad AF, Hu W, Sood AK. Microenvironment and pathogenesis of epithelial ovarian cancer. *Horm Cancer* 2010; 1: 277-290
- 17 刘伟, 王丽, 余英豪, 王旭洲, 武一曼, 吴在增, 欧阳学农, 王烈. k-ras基因在中国结直肠癌患者中的突变状态. *世界华人消化杂志* 2011; 19: 1367-1374
- 18 Thompson PM, Gotoh T, Kok M, White PS, Brodeur GM. CHD5, a new member of the chromodomain gene family, is preferentially expressed in the nervous system. *Oncogene* 2003; 22: 1002-1011
- 19 Fujita T, Igarashi J, Okawa ER, Gotoh T, Manne J, Kolla V, Kim J, Zhao H, Pawel BR, London WB, Maris JM, White PS, Brodeur GM. CHD5, a tumor suppressor gene deleted from 1p36.31 in neuroblastomas. *J Natl Cancer Inst* 2008; 100: 940-949
- 20 Wong RR, Chan LK, Tsang TP, Lee CW, Cheung TH, Yim SF, Siu NS, Lee SN, Yu MY, Chim SS, Wong YF, Chung TK. CHD5 Downregulation Associated with Poor Prognosis in Epithelial Ovarian Cancer. *Gynecol Obstet Invest* 2011; 72: 203-207
- 21 Wang J, Chen H, Fu S, Xu ZM, Sun KL, Fu WN. The involvement of CHD5 hypermethylation in laryngeal squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* 2011; 47: 601-608
- 22 Mulero-Navarro S, Esteller M. Chromatin remodeling factor CHD5 is silenced by promoter CpG island hypermethylation in human cancer. *Epigenetics* 2008; 3: 210-215
- 23 唐莹莹, 田德安, 晏维, 夏丽敏, 张全乐, 王伟. 一种潜在的抑癌基因-CHD5参与肝癌的发生和发展. *胃肠病学和肝病杂志* 2008; 12: 994-996
- 24 Wang X, Lau KK, So LK, Lam YW. CHD5 is down-regulated through promoter hypermethylation in gastric cancer. *J Biomed Sci* 2009; 16: 95
- 25 Courboulain A, Tremblay VL, Barrier M, Meloche J, Jacob MH, Chapolard M, Bisserier M, Paulin R, Lambert C, Provencher S, Bonnet S. Krüppel-like Factor 5 contributes to pulmonary artery smooth muscle proliferation and resistance to apoptosis in human pulmonary arterial hypertension. *Respir Res* 2011; 12: 128
- 26 Bialkowska AB, Crisp M, Bannister T, He Y, Chowdhury S, Schürer S, Chase P, Spicer T, Madoux F, Tian C, Hodder P, Zaharevitz D, Yang VW. Identification of small-molecule inhibitors of the colorectal cancer oncogene Krüppel-like factor 5 expression by ultrahigh-throughput screening. *Mol Cancer Ther* 2011; 10: 2043-2051
- 27 Chen C, Bhalala HV, Vessella RL, Dong JT. KLF5 is frequently deleted and down-regulated but rarely mutated in prostate cancer. *Prostate* 2003; 55: 81-88
- 28 Humbert M, Halter V, Shan D, Laedrach J, Leibundgut EO, Baerlocher GM, Tobler A, Fey MF, Tschann MP. Deregulated expression of Krüppel-like factors in acute myeloid leukemia. *Leuk Res* 2011; 35: 909-913
- 29 Yang Y, Nakagawa H, Tetreault MP, Billig J, Victor N, Goyal A, Sepulveda AR, Katz JP. Loss of transcription factor KLF5 in the context of p53 ablation drives invasive progression of human squamous cell cancer. *Cancer Res* 2011; 71: 6475-6484
- 30 Mori A, Moser C, Lang SA, Hackl C, Gottfried E, Kreutz M, Schlitt HJ, Geissler EK, Stoeltzing O. Up-regulation of Krüppel-like factor 5 in pancreatic cancer is promoted by interleukin-1beta signaling and hypoxia-inducible factor-1alpha. *Mol Cancer Res* 2009; 7: 1390-1398
- 31 Tong D, Czerwenka K, Heinze G, Ryffel M, Schuster E, Witt A, Leodolter S, Zeillinger R. Expression of KLF5 is a prognostic factor for disease-free survival and overall survival in patients with breast cancer. *Clin Cancer Res* 2006; 12: 2442-2448

编辑 张姗姗 电编 闫晋利

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

• 消息 •

WJG 总被引频次排名位于第 174 名

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

肝卵圆细胞分子标志物的研究进展

余幼林, 施宝民

■背景资料

肝卵圆细胞来源于肝门管区有一些增生的小细胞。增殖的卵圆细胞最终能分化为成熟的肝细胞及胆管细胞。这类细胞通常能够参与肝细胞再生和肝脏损伤修复。

余幼林, 施宝民, 山东大学附属省立医院肝胆胰外科 山东省济南市 250021

国家自然科学基金资助项目, No. 30972922

作者贡献分布: 此文综述由余幼林完成; 由施宝民审校。

通讯作者: 施宝民, 主任医师, 教授, 250021, 山东省济南市经五纬七路324号, 山东大学附属省立医院肝胆胰外科。

baomins@tom.com

电话: 0531-85186363

收稿日期: 2011-06-16 修回日期: 2011-10-25

接受日期: 2011-12-13 在线出版日期: 2011-12-18

Progress in research of molecular markers for hepatic oval cells

You-Lin Yu, Bao-Ming Shi

You-Lin Yu, Bao-Ming Shi, Department of Hepato-Bilio-Pancreatic Surgery, Shandong Provincial Hospital Affiliated to Shandong University, Jinan 250021, Shandong Province, China

Supported by: the National Natural Science Foundation of China, No. 30972922

Correspondence to: Bao-Ming Shi, Professor, Department of Hepato-Bilio-Pancreatic Surgery, Shandong Provincial Hospital Affiliated to Shandong University, Jinan 250021, Shandong Province, China. baomins@tom.com

Received: 2011-06-16 Revised: 2011-10-25

Accepted: 2011-12-13 Published online: 2011-12-18

Abstract

Hepatic stem cells have the capacity of self-renewal, proliferation and differentiation and can produce progeny cells that have the same phenotypes and genotype as parental cells. The cells originate from the foregut endoderm and exist in the form of hepatic cells in embryonic liver, and small oval cells (OCs) with a large nuclear/cytoplasmic ratio and special cell markers in the adult liver. Hepatic stem cells are normally in the dormant state and divide at a very slow rate. The cells begin to be activated to proliferate quickly and transit from quiescent phase to proliferative phase when the liver is resected by operation or injured by drugs. In recent years, numerous studies have confirmed that hepatic OCs are hepatic stem cells that have the bipotential capability of differentiation into mature hepatocytes and biliary epithelial cells when hepatocyte proliferation is inhibited and liver regeneration compromised. The research of the

role of hepatic OCs in the management of acute and chronic liver dysfunction, advanced cirrhosis, other liver diseases, and diabetes caused by pancreatic lesions has attracted wide attention. Great efforts have been made to find and isolate hepatic OCs. This review discusses the progress in research of molecular markers for hepatic OCs.

Key Words: Hepatic oval cells; Molecular markers; Hepatic stem cells

Yu YL, Shi BM. Progress in research of molecular markers for hepatic oval cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(35): 3610-3615

摘要

肝干细胞是一类具有自我更新与增殖分化能力的细胞, 能产生表现型与基因型和自己完全相同的子细胞。起源于前肠内胚层, 在胚胎发育过程中以肝细胞的形式存在, 在成年哺乳动物肝中以小卵圆细胞存在, 表现为核大而胞质小并具有特殊的细胞标记。正常情况下这类细胞处于静止期, 增生分裂非常慢。当切除或药物损伤后, 这类细胞开始活化增生, 迅速从静止期进入增殖期。近年来的研究已经证实, 肝卵圆细胞在肝细胞严重受损和分裂增生受抑制时呈现出向肝细胞和胆管上皮细胞双向分化的潜能, 是一种肝脏的干细胞, 目前已经成为热点。肝卵圆细胞不仅在急慢性肝功能不良、晚期肝硬化等肝脏病变, 在胰腺病变引起的糖尿病等疾病研究中也开始引起兴趣。但如何发现和获得肝卵圆细胞始终是解决此类问题的关键。本文就肝卵圆细胞的分子标志物的研究进展作一综述。

关键词: 肝卵圆细胞; 分子标志物; 肝干细胞

余幼林, 施宝民. 肝卵圆细胞分子标志物的研究进展. *世界华人消化杂志* 2011; 19(35): 3610-3615

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/3610.asp>

0 引言

临床上, 进行肝干细胞移植治疗各类型终末期慢性肝病已被深切关注。肝卵圆细胞(hepatic

■同行评议者

黄志勇, 教授, 华中科技大学同济医院普外科

oval cells, HOC)作为肝脏干细胞的观点已被广泛接受。肝卵圆细胞于1937年由Kinosita首次发现,其细胞形态体积较小,核呈椭圆或圆型,细胞质浅染。Farber等^[1]在研究肝癌的病理变化中,观察到肝卵圆细胞来源于肝门管区有一些增生的小细胞。Wilson和Leduc在研究肝损伤的修复机制中,证实增殖的卵圆细胞最终能分化为成熟的肝细胞及胆管细胞,首先指出这类细胞为肝脏内原始肝干细胞^[2]。这类细胞通常能够参与肝细胞再生和肝脏损伤修复。当肝脏受到药物刺激,或其他原因造成的严重损伤或者肝功能受到严重损害时,这类细胞被激活并增殖、分化为肝实质细胞和胆管上皮细胞,使得肝功能得以重建。

1 肝卵圆细胞的分子标志物

近年来随着对肝卵圆细胞研究的不断深入,已经确立了一些肝卵圆细胞高度表达的分子标志物。依据其表达于细胞部位的不同,将其分为3类:细胞膜类-表达于细胞膜表面的分子标志物类、细胞胞质类-表达于细胞胞质的分子标志物类、细胞核类-表达于细胞核的分子标志物类。

1.1 细胞膜类 依据细胞膜类分子标志物类型的不同,将其分为CD分子类、受体类及膜蛋白类。

1.1.1 CD分子类: CD分子为细胞分化分子,在细胞分化、增殖、迁移中发挥着重要的作用。Yovchev等^[3]在肝卵圆细胞增殖模型中,研究发现大量增殖的肝卵圆细胞表面表达多种CD分子: CD24、CD44、CD90、CD133。CD24是一种高度糖基化蛋白质分子,与细胞黏附有关,CD24的表达参与了细胞的迁移,并调节细胞生长、增殖。Nestl等^[4]应用Northern杂交印迹和免疫组织化学方法对小鼠肿瘤细胞及人类肿瘤组织进行了研究,证实CD24表达与肿瘤的转移表型相。Baumann等^[5]用RNA干扰技术下调肿瘤细胞的CD24表达,发现培养的肿瘤细胞数量明显减少,提示CD24在肿瘤细胞生长过程中起重要作用。CD44是一种细胞膜表面糖基化蛋白质分子,参与细胞异质性黏附,研究表明CD44表达强度增加将有助于细胞迁移。Seiter等^[6]在给接种有转移BSp73ASML细胞的大鼠,从静脉注射识别CD44的单克隆抗体,发现能明显抑制肿瘤细胞生长和转移。CD90和CD133均为干细胞分子标志物^[7,8], CD90又称Thy-1抗原,是细胞黏附分子免疫球蛋白超家族中最小的成员,与细胞增殖、分化等有重要关联^[9]。CD133是一种细胞表面抗

原,是干细胞独特的分子标志,其显著特点就是: CD133的表达会随着细胞的分化成熟而迅速下调^[8],常被用于干细胞分离和鉴定。在D-半乳糖胺/2-乙酰氨基菊,半肝切除构建鼠肝损伤模型, Yovchev等^[10]进一步研究证实了增殖的肝卵圆细胞的确有分子CD44、CD24、CD133的表达。同时发现CD44、CD24分子在胆管细胞中也有表达, CD133分子在成熟肝细胞中未表达;肝卵圆细胞作为肝干细胞之一, CD44、CD24在肝卵圆细胞中持续表达或高表达,提示肝卵圆细胞存在着正处在向胆管细胞分化的可能, CD133在肝卵圆细胞中低表达或者表达消失,提示肝卵圆细胞正处在向成熟肝细胞分化的可能。

在研究胚胎肝卵圆细胞中, CD分子表达各有不同, Rao等^[11]发现EpCAM阳性的肝卵圆细胞在增殖的过程中表达分子CD90、CD34,在分化过程中表达CD45,同时也有CD49f的表达。其中, CD90、CD45,分别被认为是肝前体细胞,胆管上皮细胞,造血干细胞的表面分子标志^[12], CD49f则被认为是具有分化为肝细胞的潜能的原始内胚肝细胞的一种表面分子标志^[13]。Nyamath等^[14]研究发现CD34分子表达阳性的胚胎期肝卵圆细胞最终可表达AFP、ALB。CD45分子属于典型的受体型蛋白酪氨酸磷酸酶,为I型跨膜蛋白,位于白细胞表面的白细胞共同抗原,参与免疫细胞的分化、发育等过程^[15]。在肝卵圆细胞中表达,与肝卵圆细胞发育分化密切相关; CD49f属于整合素家族成员,介导了细胞局部黏附和信号传导,积极参与细胞的生长、分化、增殖的调控^[16,17]。CD49f表达于肝卵圆细胞,参与调控肝卵圆细胞的分化、增殖。CD34是一种相对分子质量为105-120 kDa的跨膜细胞表面磷酸糖蛋白,为一种造血干/祖细胞的表面标志。选择性地局限表达于造血干/祖细胞^[18,19],肝卵圆细胞中表达CD34,提示肝卵圆细胞可能具有多分化潜能,为肝卵圆细胞作为肝干细胞之一提供佐证。另有研究发现CD34、CD90、CD133、CD49f在肝卵圆细胞膜上的表达则持有不同观点, Schmelzer等^[20]用细胞免疫磁珠分选出的胚胎肝卵圆细胞表达分子发现造血干细胞分子标志物CD34、CD90未见表达; CD133可见表达;而CD133、CD49f曾被视为2个独有的分子标志去分辨胚胎肝卵圆细胞^[21,22]; Liu等^[23]研究也证实了CD133、CD49f是2个高选择性的分子标志针对胚胎肝卵圆细胞,这与Rountree等^[24]进行肝干细胞筛选时,证实肝卵圆细胞表达分子CD133、CD49f相一

■研究前沿

近年来的研究已经证实,肝卵圆细胞在肝细胞严重受损和分裂增生受抑制时呈现出向肝细胞和胆管上皮细胞双向分化的潜能,是一种肝脏的干细胞,目前已经成为热点。

■应用要点

肝卵圆细胞不仅在急性肝功能不良、晚期肝硬化等肝脏病变,在胰腺病变引起的糖尿病等疾病研究中也开始引起兴趣。

致;同时, Liu等^[23]用流式细胞仪检测到胚胎肝卵圆细胞还表达分子CD117. CD117又称C-kit受体,属于III型蛋白酪氨酸激酶受体超家族成员^[25],为I型跨膜性糖蛋白. 正常情况下CD117的活化需要干细胞因子(SCF)的参与^[26]. SCF是重要的造血生长因子,与其他细胞因子协同作用可刺激造血干/祖细胞的增殖和分化. SCF-CD117相互作用可能是干细胞生存的关键因素. CD117在肝卵圆细胞的表达,参与调控肝卵圆细胞生长、增殖和分化.

CD分子在肝卵圆细胞不同分化阶段呈现不同表达,具备多向性分化潜能,提示肝卵圆细胞有着肝干细胞特质. 肝卵圆细胞是否具有防御性免疫功能,与造血干细胞是否具有同源性有待进一步研究证实.

1.1.2 受体类: 在肝卵圆细胞增殖模型中, Yovchev等^[3]研究指出, 肝卵圆细胞表面有多种受体的表达: Dmbt 1, Ednra Endothelin receptor type A, Ednrb Endothelin receptor type B, Sctr Secretin receptor, Gabrp (Gamma-aminobutyrate, type A receptor π), Fractalkine, Ddr1, Smo, Ros1, Integrin β 4, Integrin α 6; Chiu等^[27]应用2-乙酰氨基苄/四氯化碳构建鼠肝损伤模型, 在肝再生修复的过程中, 发现增殖的肝卵圆细胞表达多种受体: CTGF受体、HGF受体、SCF受体、IFN受体、FGF-1受体、jagged 1受体、pleiotrophin受体、IGFBP 1受体、TGF 2受体、secretin受体. 这些受体对肝卵圆细胞的增殖、迁移、分化起着重要作用. 其中, HGF受体与HGF结合,可明显刺激肝卵圆细胞有丝分裂,促进肝卵圆细胞增殖; Ednra Endothelin receptor type A, Ednrb Endothelin receptor type B, Sctr Secretin receptor, Fractalkine, Integrin β 4, Integrin α 6这类受体与肝卵圆细胞迁移相关. Dmbt 1, Gabrp (Gamma-aminobutyrate, type A receptor π), Ddr1, Smo, Ros1, CTGF, SCF, IFN, FGF-1, jagged 1, pleiotrophin, IGFBP 1, TGF 2, secretin这类受体参与肝卵圆细胞的分化过程.

1.1.3 膜蛋白类: 也有研究发现, 在肝卵圆细胞增殖, 分化, 迁移及信号传导过程中, 有膜蛋白的参与. DLK1(delta-like protein/preadipocyte factor 1)是一种跨膜蛋白, 其结构特征为蛋白的细胞外区域拥有6串在结构及氨基酸序列上与表皮生长因子高度同源的重叠结构, 属于表皮生长因子家族的成员之一, 定位于人类染色体14q32, 是真正的祖细胞表面标志^[28,29]. Huang等^[30]研究发现

肝卵圆细胞表达分子DLK1, 参与肝卵圆细胞的增殖分化过程; 磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3(GPC3), 为硫酸肝素糖蛋白家族成员之一. GPC3通过糖基磷脂酰肌醇锚定于细胞膜上. GPC3 mRNA在胎肝中高表达, 在成人表达关闭^[31]. Grozdanov等^[32]应用D-半乳糖胺、2-乙酰氨基苄和半肝切除构建肝损伤模型, 在肝修复再生早期, 发现大量增殖的肝卵圆细胞高表达分子Gpc3, 这种分子可作为肝卵圆细胞一种新的标志物. 与肝卵圆细胞分化密切相关. Epiplakin为细胞支架结合蛋白, 锚定于细胞膜上, 参与细胞增殖、分化、迁移的过程, 属于细胞功能型膜蛋白. Matsuo等^[33]在胆碱缺乏的乙硫氨酸补充(choline-deficient ethionine-supple-mented, CDE)饮食建立的肝损伤模型中, 发现肝再生过程中增殖的肝卵圆细胞表达Eppk1. 细胞黏附分子是一类细胞膜表面跨膜糖蛋白, 与细胞的信号传导、细胞迁移、分化密切相关, 在肝卵圆细胞表面也有表达. 上皮型钙黏蛋白(E-cadherin)为上皮细胞标志物, 神经型钙黏蛋白(N-cadherin)为间质细胞标志物, E-cadherin表达的下调和N-cadherin表达的上调被称为EMT现象, 这种现象表现为细胞骨架系统排列发生变化, 细胞黏附功能下降, 易于细胞迁移. Zhao等^[34]研究肝卵圆细胞分化过程中发现了分子N-cadherin的表达; Tirnitz-Parker等^[35]在胆碱缺乏的乙硫氨酸补充(choline-deficient ethionine-supple-mented, CDE)饮食诱导的卵圆细胞增殖模型中, 证实了增殖的肝卵圆细胞表达分子E-cadherin; EpCAM(Epithelial cell adhesion molecule, 上皮细胞黏附分子)作为细胞膜表面的一种跨膜糖蛋白, 主要介导同源细胞之间的黏附, 有促进细胞迁移的作用. Rao等^[11]研究证实了EpCAM分子肝卵圆细胞膜上也有表达. Matrilin-2是近年新发现的非胶原型细胞外基质蛋白的新家族成员之一, 有4个呈现出大致相同结构的家族成员. 唯独不同的是, Matrilin-2包含1个位于第2个vWFA域和寡聚合反应域之间的片段. 在卵圆细胞增殖和分化过程中, 卵圆细胞与肝脏胞外基质成分Matrilin-2具有紧密的解剖学关系, 介导的肝再生发挥重要作用. Szabó等^[36]在大鼠肝再生实验动物模型AAF/PH中发现Matrilin-2 mRNA只在增殖肝卵圆细胞中表达, 提示Matrilin-2可能是高分化增殖能力肝卵圆细胞的标记.

1.2 细胞胞质类 在D-半乳糖胺/2-乙酰氨基苄, 半肝切除构建鼠肝损伤模型中, Yovchev等^[10]研

究发现, 在肝再生修复过程中, 大量增殖的肝卵圆细胞还表达分子: OV-1, 间质细胞分子标志物: 波形蛋白、内皮蛋白、成骨蛋白7; Dorrell等^[37]应用DDC(1, 4-二氢-5, 3-吡啶二甲酸二乙酯)诱导的肝卵圆细胞增殖的模型中, 发现大量增殖的肝卵圆细胞表达分子OC2-1C6, OC2-2A6, OC2-6E10, 同时, 表达胆管上皮细胞分子标志物: MIC1-1C3, OC2-1D11, OC2-2F3; 这些在肝卵圆细胞的细胞质中表达的多类型细胞标志蛋白, 为肝卵圆细胞多向性分化提供依据。

1.3 细胞胞核类 Golding等^[38]研究发现, 经D-半乳糖胺处理过的鼠肝在肝再生过程中, 增殖的肝卵圆细胞表达分子HNF1 α , HNF4 α , C/EBP α , β , δ , Foxa1, Foxa2. Shafritz等^[39]在肝损伤修复过程中, 同样发现增殖的肝卵圆细胞高表达细胞分子HNF4 α 和HNF6. HNF1 α , HNF4 α , C/EBP α , β , δ , HNF6, Foxa1, Foxa2均属于HNF家族成员中的转录因子, 这些转录因子及其之间的相互作用构成的复杂调控网络, 精确地调控肝脏的发育和肝细胞增殖, 分化及其功能^[40]. 基因分析证明了肝细胞分化中HNF4 α 、C/EBP α 和HNF1 α 的作用. HNF1 α 和HNF4 α 主要控制葡萄糖代谢以及脂质和氨基酸代谢; HNF6控制一些生长因子的分泌, 如抑制糖皮质激素的活性; C/EBP α 主要调节葡萄糖和糖原代谢以及脂质平衡. 但C/EBP α 也可能抑制肝母细胞增殖和胆管发育, 并介导HGF诱导的肝内基因表达^[41,42]. 近期研究指出Foxa1、Foxa2调控肝卵圆细胞定向分化胆管细胞及增殖水平, 开始发育的肝卵圆细胞中敲除FoxA1和FoxA2后, 突变体则因胆管细胞过度增殖而形成超常增生的胆管系统^[43]. Suzuki等^[44]证实了肝卵圆细胞分化阶段有转录调控分子Tbx3表达, 调控分子Hhex^[45], Sall4^[46]也有表达; Tbx(T-box)属发育调控相关转录因子家族, 表达产物作为真核生物的转录调控因子, 具有重要的发育调控功能, 在脊椎和非脊椎动物胚胎的形态和组织发生中发挥着重要作用^[47]. Tbx3是T-box家族转录因子之一^[48], 参与调节细胞分化, 正常表达量调控细胞定向分化, 过表达可导致细胞去分化, 恶变促成肿瘤形成. 造血细胞表达的同源异形框因子(hematopoietically expressed homeobox, Hhex)调控心源性区域内能决定肝细胞命运的腹侧内胚层的增殖和定位^[49]. 缺失Hhex的小鼠胚胎虽然可以进行肝向特化(hepatic specification), 但是不能完成肝芽的形态学形成^[50]. 在早期肝卵圆细胞内对Hhex基因进行条件性敲除

后, 也不能分化成肝细胞^[45]. Sall4促进胆管分化, 而Tbx3则抑制分化^[44,46,51]. Tbx3敲除小鼠肝卵圆细胞增殖减弱而胆管分化增强. Sackett等^[52]采用胆管结扎术致肝损伤来研究肝再生, 结果发现大量增殖肝卵圆细胞高表达分子Foxl1, Foxl1属于Fox基因家族成员, 是功能多样的转录因子, 含有“翼螺旋”的DNA结合区域^[53,54], 参与转录调控和信号转导途径在细胞生长增殖、细胞分化、代谢、凋亡等方面发挥关键作用. 由此, 细胞核类分子标志物的表达与肝卵圆细胞信号传导, 调控肝卵圆细胞生长、增殖、分化密切相关。

2 结论

目前, 尚未找到肝卵圆细胞的特异性标志. 可能与其阶段性表达、多分化潜能或异质性有关. 尽管通过细胞膜、细胞质和细胞核等各部位的标志物已经基本达到标志、分离、纯化的目的, 但仍然缺乏一种简单有效准确的标志物, 相信在不久的将来, 随着肝卵圆细胞的进一步研究, 对其认识的不断深入, 终将会找到一种或几种理想的标志物, 为肝功能衰竭的有效治疗提供有力保障。

3 参考文献

- 1 FARBER E. Similarities in the sequence of early histological changes induced in the liver of the rat by ethionine, 2-acetylaminofluorene, and 3'-methyl-4-dimethylaminoazobenzene. *Cancer Res* 1956; 16: 142-148
- 2 WILSON JW, LEDUC EH. Role of cholangioles in restoration of the liver of the mouse after dietary injury. *J Pathol Bacteriol* 1958; 76: 441-449
- 3 Yovchev MI, Grozdanov PN, Joseph B, Gupta S, Dabeva MD. Novel hepatic progenitor cell surface markers in the adult rat liver. *Hepatology* 2007; 45: 139-149
- 4 Nestl A, Von Stein OD, Zatloukal K, Thies WG, Herrlich P, Hofmann M, Sleeman JP. Gene expression patterns associated with the metastatic phenotype in rodent and human tumors. *Cancer Res* 2001; 61: 1569-1577
- 5 Baumann P, Cremers N, Kroese F, Orend G, Chiquet-Ehrismann R, Uede T, Yagita H, Sleeman JP. CD24 expression causes the acquisition of multiple cellular properties associated with tumor growth and metastasis. *Cancer Res* 2005; 65: 10783-10793
- 6 Seiter S, Arch R, Reber S, Komitowski D, Hofmann M, Ponta H, Herrlich P, Matzku S, Zöller M. Prevention of tumor metastasis formation by anti-variant CD44. *J Exp Med* 1993; 177: 443-455
- 7 Goldschneider I, Gordon LK, Morris RJ. Demonstration of Thy-1 antigen on pluripotent hemopoietic stem cells in the rat. *J Exp Med* 1978; 148: 1351-1366
- 8 Peichev M, Naiyer AJ, Pereira D, Zhu Z, Lane WJ, Williams M, Oz MC, Hicklin DJ, Witte L, Moore MA, Rafii S. Expression of VEGFR-2 and AC133 by circulating human CD34(+) cells identifies a popu-

■同行评价

本文主要综述了肝卵圆细胞相关分子标志物的研究进展, 内容丰富详实, 文献信息量大, 具有较好的参考意义。

- lation of functional endothelial precursors. *Blood* 2000; 95: 952-958
- 9 Shimazaki C, Sumikuma T, Inaba T. CD34+ CD90+ cells and late hematopoietic reconstitution after autologous peripheral blood stem cell transplantation. *Leuk Lymphoma* 2004; 45: 661-668
 - 10 Yovchev MI, Grozdanov PN, Zhou H, Racherla H, Guha C, Dabeva MD. Identification of adult hepatic progenitor cells capable of repopulating injured rat liver. *Hepatology* 2008; 47: 636-647
 - 11 Rao MS, Khan AA, Parveen N, Habeeb MA, Habibullah CM, Pande G. Characterization of hepatic progenitors from human fetal liver during second trimester. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 5730-5737
 - 12 Masson NM, Currie IS, Terrace JD, Garden OJ, Parks RW, Ross JA. Hepatic progenitor cells in human fetal liver express the oval cell marker Thy-1. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2006; 291: G45-G54
 - 13 Nava S, Westgren M, Jaksch M, Tibell A, Broomé U, Ericzon BG, Sumitran-Holgersson S. Characterization of cells in the developing human liver. *Differentiation* 2005; 73: 249-260
 - 14 Nyamath P, Alvi A, Habeeb A, Khosla S, Khan AA, Habibullah CM. Characterization of hepatic progenitors from human fetal liver using CD34 as a hepatic progenitor marker. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 2319-2323
 - 15 Nam HJ, Poy F, Saito H, Frederick CA. Structural basis for the function and regulation of the receptor protein tyrosine phosphatase CD45. *J Exp Med* 2005; 201: 441-452
 - 16 Green LJ, Mould AP, Humphries MJ. The integrin beta subunit. *Int J Biochem Cell Biol* 1998; 30: 179-184
 - 17 Shinohara T, Avarbock MR, Brinster RL. beta1- and alpha6-integrin are surface markers on mouse spermatogonial stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96: 5504-5509
 - 18 Acevedo LM, Londono I, Oubaha M, Ghitescu L, Bendayan M. Glomerular CD34 expression in short- and long-term diabetes. *J Histochem Cytochem* 2008; 56: 605-614
 - 19 Gu J, Zhang QH, Huang QH, Ren SX, Wu XY, Ye M, Huang CH, Fu G, Zhou J, Niu C, Han ZG, Chen SJ, Chen Z. Gene expression in CD34(+) cells from normal bone marrow and leukemic origins. *Hematol J* 2000; 1: 206-217
 - 20 Schmelzer E, Zhang L, Bruce A, Wauthier E, Ludlow J, Yao HL, Moss N, Melhem A, McClelland R, Turner W, Kulik M, Sherwood S, Tallheden T, Cheng N, Furth ME, Reid LM. Human hepatic stem cells from fetal and postnatal donors. *J Exp Med* 2007; 204: 1973-1987
 - 21 Zheng YW, Taniguchi H. Diversity of hepatic stem cells in the fetal and adult liver. *Semin Liver Dis* 2003; 23: 337-348
 - 22 Hoppo T, Fujii H, Hirose T, Yasuchika K, Azuma H, Baba S, Naito M, Machimoto T, Ikai I. Thy1-positive mesenchymal cells promote the maturation of CD49f-positive hepatic progenitor cells in the mouse fetal liver. *Hepatology* 2004; 39: 1362-1370
 - 23 Liu WH, Li R, Dou KF. Convenient and efficient enrichment of the CD133+ liver cells from rat fetal liver cells as a source of liver stem/progenitor cells. *Stem Cell Rev* 2011; 7: 94-102
 - 24 Rountree CB, Senadheera S, Mato JM, Crooks GM, Lu SC. Expansion of liver cancer stem cells during aging in methionine adenosyltransferase 1A-deficient mice. *Hepatology* 2008; 47: 1288-1297
 - 25 Rosnet O, Birnbaum D. Hematopoietic receptors of class III receptor-type tyrosine kinases. *Crit Rev Oncog* 1993; 4: 595-613
 - 26 Kuriu A, Ikeda H, Kanakura Y, Griffin JD, Druker B, Yagura H, Kitayama H, Ishikawa J, Nishiura T, Kanayama Y. Proliferation of human myeloid leukemia cell line associated with the tyrosine-phosphorylation and activation of the proto-oncogene c-kit product. *Blood* 1991; 78: 2834-2840
 - 27 Chiu CC, Sheu JC, Chen CH, Lee CZ, Chiou LL, Chou SH, Huang GT, Lee HS. Global gene expression profiling reveals a key role of CD44 in hepatic oval-cell reaction after 2-AAF/CCl4 injury in rodents. *Histochem Cell Biol* 2009; 132: 479-489
 - 28 Tanimizu N, Tsujimura T, Takahide K, Kodama T, Nakamura K, Miyajima A. Expression of Dlk/Pref-1 defines a subpopulation in the oval cell compartment of rat liver. *Gene Expr Patterns* 2004; 5: 209-218
 - 29 Jensen CH, Jauho EI, Santoni-Rugiu E, Holmskov U, Teisner B, Tygstrup N, Bisgaard HC. Transit-amplifying ductular (oval) cells and their hepatocytic progeny are characterized by a novel and distinctive expression of delta-like protein/preadipocyte factor 1/fetal antigen 1. *Am J Pathol* 2004; 164: 1347-1359
 - 30 Huang J, Zhang X, Zhang M, Zhu JD, Zhang YL, Lin Y, Wang KS, Qi XF, Zhang Q, Liu GZ, Yu J, Cui Y, Yang PY, Wang ZQ, Han ZG. Up-regulation of DLK1 as an imprinted gene could contribute to human hepatocellular carcinoma. *Carcinogenesis* 2007; 28: 1094-1103
 - 31 Tangkijvanich P, Chanmee T, Komtong S, Mahachai V, Wisedopas N, Pothacharoen P, Kongtawelert P. Diagnostic role of serum glypican-3 in differentiating hepatocellular carcinoma from non-malignant chronic liver disease and other liver cancers. *J Gastroenterol Hepatol* 2010; 25: 129-137
 - 32 Grozdanov PN, Yovchev MI, Dabeva MD. The oncofetal protein glypican-3 is a novel marker of hepatic progenitor/oval cells. *Lab Invest* 2006; 86: 1272-1284
 - 33 Matsuo A, Yoshida T, Yasukawa T, Miki R, Kume K, Kume S. Epilplakin1 is expressed in the cholangiocyte lineage cells in normal liver and adult progenitor cells in injured liver. *Gene Expr Patterns* 2011; 11: 255-262
 - 34 Zhao D, Chen S, Cai J, Guo Y, Song Z, Che J, Liu C, Wu C, Ding M, Deng H. Derivation and characterization of hepatic progenitor cells from human embryonic stem cells. *PLoS One* 2009; 4: e6468
 - 35 Tirnitz-Parker JE, Tonkin JN, Knight B, Olynyk JK, Yeoh GC. Isolation, culture and immortalisation of hepatic oval cells from adult mice fed a choline-deficient, ethionine-supplemented diet. *Int J Biochem Cell Biol* 2007; 39: 2226-2239
 - 36 Szabó E, Lódi C, Korpos E, Batmunkh E, Rottenberger Z, Deák F, Kiss I, Tokés AM, Lotz G, László V, Kiss A, Schaff Z, Nagy P. Expression of matrilin-2 in oval cells during rat liver regeneration. *Matrix Biol* 2007; 26: 554-560
 - 37 Dorrell C, Erker L, Lanxon-Cookson KM, Abraham SL, Victoroff T, Ro S, Canaday PS, Streeter PR, Grompe M. Surface markers for the murine oval cell response. *Hepatology* 2008; 48: 1282-1291
 - 38 Golding M, Sarraf CE, Lalani EN, Anilkumar TV,

- Edwards RJ, Nagy P, Thorgerirsson SS, Alison MR. Oval cell differentiation into hepatocytes in the acetylaminofluorene-treated regenerating rat liver. *Hepatology* 1995; 22: 1243-1253
- 39 Shafritz DA, Oertel M, Menthena A, Nierhoff D, Dabeva MD. Liver stem cells and prospects for liver reconstitution by transplanted cells. *Hepatology* 2006; 43: S89-S98
- 40 Cereghini S. Liver-enriched transcription factors and hepatocyte differentiation. *FASEB J* 1996; 10: 267-282
- 41 Shiojiri N, Takeshita K, Yamasaki H, Iwata T. Suppression of C/EBP alpha expression in biliary cell differentiation from hepatoblasts during mouse liver development. *J Hepatol* 2004; 41: 790-798
- 42 Yamasaki H, Sada A, Iwata T, Niwa T, Tomizawa M, Xanthopoulos KG, Koike T, Shiojiri N. Suppression of C/EBPalpha expression in periportal hepatoblasts may stimulate biliary cell differentiation through increased Hnf6 and Hnf1b expression. *Development* 2006; 133: 4233-4243
- 43 Li Z, White P, Tuteja G, Rubins N, Sackett S, Kaestner KH. Foxa1 and Foxa2 regulate bile duct development in mice. *J Clin Invest* 2009; 119: 1537-1545
- 44 Suzuki A, Sekiya S, Büscher D, Izpisua Belmonte JC, Taniguchi H. Tbx3 controls the fate of hepatic progenitor cells in liver development by suppressing p19ARF expression. *Development* 2008; 135: 1589-1595
- 45 Hunter MP, Wilson CM, Jiang X, Cong R, Vasavada H, Kaestner KH, Bogue CW. The homeobox gene Hhex is essential for proper hepatoblast differentiation and bile duct morphogenesis. *Dev Biol* 2007; 308: 355-367
- 46 Oikawa T, Kamiya A, Kakinuma S, Zeniya M, Nishinakamura R, Tajiri H, Nakauchi H. Sall4 regulates cell fate decision in fetal hepatic stem/progenitor cells. *Gastroenterology* 2009; 136: 1000-1011
- 47 Papaioannou VE, Silver LM. The T-box gene family. *Bioessays* 1998; 20: 9-19
- 48 Tümpel S, Sanz-Ezquerro JJ, Isaac A, Eblaghie MC, Dobson J, Tickle C. Regulation of Tbx3 expression by anteroposterior signalling in vertebrate limb development. *Dev Biol* 2002; 250: 251-262
- 49 Bort R, Martinez-Barbera JP, Beddington RS, Zaret KS. Hex homeobox gene-dependent tissue positioning is required for organogenesis of the ventral pancreas. *Development* 2004; 131: 797-806
- 50 Martinez Barbera JP, Clements M, Thomas P, Rodriguez T, Meloy D, Kioussis D, Beddington RS. The homeobox gene Hex is required in definitive endodermal tissues for normal forebrain, liver and thyroid formation. *Development* 2000; 127: 2433-2445
- 51 Cirillo LA, Lin FR, Cuesta I, Friedman D, Jarnik M, Zaret KS. Opening of compacted chromatin by early developmental transcription factors HNF3 (FoxA) and GATA-4. *Mol Cell* 2002; 9: 279-289
- 52 Sackett SD, Li Z, Hurtt R, Gao Y, Wells RG, Brondeau K, Kaestner KH, Greenbaum LE. Foxl1 is a marker of bipotential hepatic progenitor cells in mice. *Hepatology* 2009; 49: 920-929
- 53 Coffey PJ, Burgering BM. Forkhead-box transcription factors and their role in the immune system. *Nat Rev Immunol* 2004; 4: 889-899
- 54 Carlsson P, Mahlapuu M. Forkhead transcription factors: key players in development and metabolism. *Dev Biol* 2002; 250: 1-23

编辑 李军亮 电编 闫晋利

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

• 消息 •

《世界华人消化杂志》外文字符标准

本刊讯 本刊论文出现的外文字符应注意大小写、正斜体与上下角标。静脉注射iv, 肌肉注射im, 腹腔注射ip, 皮下注射sc, 脑室注射icv, 动脉注射ia, 口服po, 灌胃ig. s(秒)不能写成S, kg不能写成Kg, mL不能写成ML, lcpm(应写为1/min)÷E%(仪器效率)÷60=Bq, pH不能写PH或P^H, *H pylori*不能写成HP, T_{1/2}不能写成tl/2或T_{1/2}¹, V_{max}不能V_{max}, 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。

门静脉高压症少见成因及其诊断

孙立平, 童巧霞, 揭盛华

■背景资料

门静脉高压症是指由不同原因引起的门静脉血流受阻或者血流异常增多而导致门静脉系统压力增高和广泛侧支循环形成的临床综合征, 最常见于肝硬化。由非肝硬化性疾病所致的门静脉高压仅占5%-10%, 虽然发病率低, 但易被忽视, 常常被误诊为肝硬化。因此, 提高对此类疾病的认识和诊断水平是十分必要的。

孙立平, 童巧霞, 揭盛华, 华中科技大学附属协和医院感染科 湖北省武汉市 430022

作者贡献分布: 本文综述由孙立平与童巧霞共同完成; 揭盛华审校。
通讯作者: 揭盛华, 主任医师, 430022, 湖北省武汉市解放大道1277号358信箱, 华中科技大学附属协和医院感染科。 abeycd@126.com

收稿日期: 2011-10-26 修回日期: 2011-11-18

接受日期: 2011-12-07 在线出版日期: 2011-12-18

Portal hypertension: rare causes and their diagnosis

Li-Ping Sun, Qiao-Xia Tong, Sheng-Hua Jie

Li-Ping Sun, Qiao-Xia Tong, Sheng-Hua Jie, Department of Infectious Diseases, Union Hospital, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, Hubei Province, China

Correspondence to: Sheng-Hua Jie, Chief Physician, Department of Infectious Diseases, Union Hospital, Huazhong University of Science and Technology, 1277 Jiefang Road, Wuhan 430022, Hubei Province, China. abeycd@126.com
Received: 2011-10-26 Revised: 2011-11-18

Accepted: 2011-12-07 Published online: 2011-12-18

Abstract

Portal hypertension is defined as an increase in blood pressure in the veins of the portal system and extensive formation of portal-systemic communicating branches, which results from a blockage in the portal blood flow or abnormal blood increment. Generally, cirrhotic portal hypertension is common more than non-cirrhotic portal hypertension, but the latter is caused by a group of diseases, such as idiopathic portal hypertension (IPH), pancreatic sinistral portal hypertension (PSPH), cavernous transformation of the portal vein (CTPV), congenital hepatic fibrosis (CHF), Budd-Chiari syndrome (BCS), hepatic sinusoidal obstruction syndrome (SOS), portal vein thrombosis (PVT), myeloproliferative disease (MLD), hepatic amyloidosis, and hemochromatosis (HC). This paper reviews the rare causes of portal hypertension and their diagnosis.

Key Words: Portal hypertension; Cause; Diagnosis

Sun LP, Tong QX, Jie SH. Portal hypertension: rare causes and their diagnosis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(35): 3616-3622

摘要

门静脉高压症是指由不同原因引起的门静脉血流受阻或者血流异常增多而导致门静脉系统压力增高和广泛侧支循环形成的临床综合征, 最常见于肝硬化。而非硬化性门脉高压常见于特发性门静脉高压(idiopathic portal hypertension, IPH)、胰源性门脉高压(pancreatic sinistral portal hypertension, PSPH)、门静脉海绵样变性(cavernous transformation of the portal vein, CTPV)、先天性肝纤维化(congenital hepatic fibrosis, CHF)、Budd-Chiari综合征(Budd-Chiari syndrome, BCS)、肝窦阻塞综合征(hepatic sinusoidal obstruction syndrome, SOS)、门静脉血栓形成(portal vein thrombosis, PVT)、骨髓增生性疾病(myeloproliferative disease, MLD)、肝淀粉样变(hepatic amyloidosis)、血色病(hemochromatosis, HC)等。本文就这几种门脉高压的少见成因及诊断作一综述。

关键词: 门静脉高压; 病因; 诊断依据

孙立平, 童巧霞, 揭盛华. 门静脉高压症少见成因及其诊断. 世界华人消化杂志 2011; 19(35): 3616-3622

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/3616.asp>

0 引言

门静脉高压症(portal hypertension)的成因, 按照血流阻力增加的方式分为: (1)肝前性: 发病率较低, 多由门静脉海绵样变, 门静脉或脾静脉血栓形成及肿瘤等浸润、压迫引起; (2)肝内性: 发病率很高, 主要由血吸虫病、先天性肝纤维化、特发性门静脉高压、淀粉样病、骨髓增生性疾病、肝转移癌、肝炎肝硬化、Budd-Chiari综合征等所致; (3)肝后性: 发病率最低, 由下腔静脉闭塞性疾病、肝窦阻塞综合征、慢性右心衰、心脏瓣膜病、缩窄性心包炎等引起。由非肝硬化性疾病所致的门静脉高压仅占5%-10%^[1], 虽然发病率低, 但易被忽视, 常常被误诊为肝硬化。因此, 提高对此类疾病的认识和诊断水平是十分必要的。

■同行评议者

刘绍能, 主任医师, 中国中医科学院广安门医院

1 几种门静脉高压症的少见成因及诊断

1.1 特发性门静脉高压 特发性特发性门静脉高压(idiopathic portal hypertension, IPH)又名肝内型窦前阻塞性门脉高压症、班替氏综合征、班替氏病、良性肝内门脉高压、肝门静脉硬化症、非硬化性门静脉纤维化。由于他们的临床病理表现很相似, 很难明确区分, 故目前认为是同一疾病, 普遍接受的名称是特发性门静脉高压症^[2]。即一种以脾脏肿大、脾功能亢进, 食管胃底静脉曲张、反复上消化道出血, 但无腹水、肝性脑病、黄疸表现的门静脉高压症。他与肝硬化引起的门静脉高压症临床表现极相似, 但缺乏肝硬化的典型病理表现。患者一般状况良好, 肝功能正常或者轻度异常, 晚期可出现白蛋白降低, 因此临床诊断时须排除血吸虫、肝静脉梗阻等各种病因。

IPH的病因不明确, 一般认为与砷、铜等化学物质, 腹腔内感染, 接触毒物或者药物, 免疫因素, 凝血功能异常有关^[3]。这些因素都会影响肝内小静脉及汇管区, 使门静脉、汇管区及其周围组织发生纤维化, 继而闭塞, 最终导致IPH。研究显示, 患者脾脏并不是淤血性肿大, 因脾大、脾功能亢进症状的出现明显早于门静脉高压症状, 可能是某种刺激因素引起, 为独立于肝脏的病变^[4]。现认为特发性门静脉高压症的病理变化分为4期: 被膜下肝细胞萎缩、肝实质细胞萎缩、门静脉及肝实质纤维化和门静脉硬化、闭塞, 通常至第4期才会出现脾大^[3,5-7]。

IPH的诊断依据^[8-10]: (1)临床表现且排除了各种已知原因的肝脉高压; (2)肝脏病理学检查示汇管区、门静脉及周围纤维化或有炎细胞浸润, 肝小叶结构正常, 无假小叶形成, 晚期可出现肝细胞缓慢变性、坏死等; (3)B超显示肝表面平整, 门静脉管壁增厚、回声增强、管腔狭窄甚至闭塞出现高回声, 门静脉主干最大血流速度明显减小, 脾脏增厚; (4)CT检查显示胃底食管静脉曲张, 脐静脉及腹壁静脉扩张; (5)门静脉造影示门静脉主干扩张, 中小分支减少。

研究发现IPH可发展至不完全分割性肝硬化^[11]。Rai等^[12]报道了5例不完全分隔性肝硬化, Hillaire等^[13]也认为IPH随着纤维化程度的加重, 可以发展为不完全分割性肝硬化。

1.2 胰源性门静脉高压症 胰源性门静脉高压症(pancreatic sinistral portal hypertension, PSPH)又称为区域性门静脉高压症、孤立性脾静脉栓塞、胃脾区门静脉高压症、节段性门静脉高压

症, 是由脾静脉血液回流受阻引起脾胃区域静脉压力增高, 使胃黏膜下静脉曲张, 继而发生上消化道出血^[14]。主要表现为反复呕血及黑便、贫血、脾脏肿大、脾功能亢进显著, 但肝功能无明显异常, 孤立性胃底静脉曲张是特征性表现, 胰腺病变的表现为腹痛、消瘦, 在各种门静脉高压症中是唯一可以治愈的^[15]。

胰源性门脉高压是一种特殊的肝外型门静脉高压症, 其根本原因是脾静脉阻塞。随着脾静脉压的增高, 脾血可以通过下列侧支循环回流: (1)脾静脉-胃短静脉-胃底静脉丛-胃冠状静脉-门静脉; (2)胃网膜左静脉-胃网膜静脉弓-肠系膜上静脉。因此, 会出现左侧门静脉压力增高、胃黏膜下静脉曲张及上消化道出血。胰头部病变导致门静脉、肠系膜上静脉和脾静脉受阻时, 可出现异位十二指肠静脉曲张^[16]。在各种疾病中, 引起胰源性IPH的原因分为3类: 胰源性、脾源性、腹膜后源性^[17]。胰源性最常见的病因是胰腺炎、胰腺肿瘤和结核; 脾源性主要为先天性脾静脉狭窄或闭塞、脾动静脉瘘及反复感染导致的脾静脉炎症和血栓。腹膜后源性主要是腹膜后纤维化、胃切除术、创伤、感染等。

PSPH的诊断依据: (1)临床表现且原发病变明确: 胰腺、脾脏及腹膜后病变; (2)钡餐及胃镜可见孤立性胃底静脉曲张; (3)CT示脾脏肿大, 脾门周围及胃底静脉、胃网膜静脉丛扩张、迂曲, 而肝脏形态正常, 同时可发现胰腺的原发病灶; (4)B超可发现胰腺的原发病灶, 肝脏形态正常, 脾门及周围可见迂曲成团的静脉, 呈蜂窝状, 胃底或胃左静脉曲张成团, 血流量增加, 速度减慢, 因此有研究显示没有肝硬化的孤立性胃底静脉曲张是区域性门静脉高压症最有特征的表现^[18]; (5)血管静脉期造影示脾静脉血流受阻, 胃冠状静脉和网膜静脉扩张, 胃底静脉曲张。

1.3 门静脉海绵样变性 门静脉海绵样变性(cavernous transformation of the portal vein, CTPV)是指门静脉主干完全或部分阻塞后, 导致门静脉血流受阻, 侧支循环形成的一种肝前型门静脉高压症^[19], 是机体为保证肝功能及肝脏血流正常的一种代偿性改变, 临床上较少见。本病最初被认为是先天性血管畸形^[20], Omokawa等^[21]用动物模型证实了门静脉阻塞可导致CTPV。主要临床表现为脾脏肿大、脾功能亢进、上消化道出血、贫血, 也可伴有不同程度的腹胀、腹水, 但患者肝功能基本正常, 因此肝性脑病的发生率较低^[22]。

引起CTPV的病因目前还不确切, 但各种引

■创新盘点

本文系统地综述了临床上罕见的几种由非肝硬化性疾病所致的门静脉高压症的成因及诊断方法, 对临床上对该类疾病的诊治提供了很好的借鉴依据。

■应用要点

本文系统阐明了其发病原因及诊断依据,对临床诊断有重要的指导意义。

起门静脉阻塞的因素都可能促使他的发生,分为原发性门静脉海绵样变性和继发性门静脉海绵样变性^[23]。先天性门静脉狭窄、闭锁或缺如是引起原发性的病因,而腹腔脏器感染、腹部外伤、腹腔肿瘤、真性红细胞增多症、全身感染累及门静脉等均可引起继发性门静脉海绵样变性。

CTPV的诊断依据: (1)临床表现; (2)B超提示门静脉正常结构消失,门静脉主干和分支狭窄或闭塞,可见蜂窝状血流信号,脾脏肿大; (3)CT示脾脏肿大,脾静脉扩张呈团块状,肝区门静脉正常结构消失,代之以扩张、迂曲的团块状血管影,周围可见呈特征性海绵样改变的多发蜂窝状侧支血管影,胃底、食管下段及胃冠状静脉曲张。

1.4 先天性肝纤维化 先天性肝纤维化(congenital hepatic fibrosis, CHF)是以门管区纤维组织增生、小胆管增生为特征,最终使门静脉区纤维化,导致门静脉压力增高,形成门静脉高压症。超过一半的患者有肾脏病变^[24],儿童期发病多见^[25,26],有一定的家族遗传倾向。主要表现为呕血、黑便、肝脾肿大、腹胀、腹水,易合并Carolina病和多囊肾,伴发Carolina病时可反复发作上腹痛、发热、黄疸,伴发多囊肾时会出现肾功能减退,甚至肾功能衰竭。目前,多数学者认为先天性肝纤维化和常染色体隐性遗传性多囊肾是同一疾病的不同表现形式^[27,28]。CHF根据临床表现的不同分为^[29]: 门脉高压型、胆管炎型、门脉高压合并胆管炎型、无症状型4种,以门脉高压型最多见,主要为上消化道出血(占44.4%)、反复发作的胆管炎所致的发热、腹痛(占30.6%),也可同时出现上消化道出血和胆管炎、发热(占8.3%)。有的患者终生无症状,仅在尸检时偶然发现^[29]。

CHF的诊断依据: (1)临床表现; (2)B超及CT可见肝脾肿大、门静脉扩张、食管胃底静脉曲张、肝内胆管扩张,伴发多囊肾时,可见双肾多发性囊性病变; (3)肝功能正常或轻微异常; (4)肝组织活检是确诊先天性肝纤维化的金标准^[30]: 肝小叶结构完整,无结节性再生及假小叶形成,肝细胞板排列基本正常,无肝细胞坏死及再生,肝内门脉支减少或消失; 肝内小叶间胆管发育异常,小叶间胆管受累,形成发育不良的胆管结构^[31]; 肝组织内呈现宽大致密的胶原纤维间隔,或纤维束弥漫穿插于固有的肝小叶内,纤维间隔内无明显炎症反应。

1.5 Budd-Chiari综合征 Budd-Chiari综合征(Budd-

Chiari syndrome, BCS)又称为肝静脉阻塞综合征,是指肝静脉或其开口以上的下腔静脉阻塞性病变引起的一种以IPH(或)和下腔静脉高压为特征的肝后性疾病。本病多发于中青年男性,典型临床表现为腹痛、肝脾大、腹水、下肢水肿^[32-34]。受肝静脉和下腔静脉阻塞的部位、程度及侧支循环的影响,肝静脉阻塞时还可出现食欲不振、腹胀、黄疸、消化道出血,胸腹壁及精索大隐静脉曲张,肝昏迷,下腔静脉阻塞还可出现色素沉着、溃疡、乏力、活动后心悸、气喘等。

引起BCS的因素有: 先天性发育异常导致的下腔静脉阻塞,肿瘤占位,血栓阻塞,血管压迫,自身免疫性疾病,体内血液高凝状态等。形成的病理生理改变基础是肝静脉回流受阻后,其压力明显升高,致肝中央静脉和肝静脉淤血、扩张,继而导致门静脉高压。如果病变累及下腔静脉,就会导致下腔静脉高压,进而出现一系列临床表现。如诊断不及时,可因肝实质纤维化、肝硬化甚至肝功能衰竭而死亡。部分患者因肝动脉代偿性充血及血流分布不均,可在肝硬化或门静脉高压症状出现以前形成再生结节^[35]。

BCS的诊断依据: (1)临床表现; (2)B超提示肝静脉及下腔静脉阻塞的具体部位,同时有肝脾肿大和腹水; (3)CT示肝脾明显增大,肝内多发雪花状或斑片状强化表现; (4)血管造影显示下腔静脉造影或者肝静脉造影可明确病变部位及侧支循环情况,明确诊断; (5)磁共振示肝脏淤血,肝实质低强度信号,肝静脉和下腔静脉的开放状态也可清晰显示,甚至可以区分新鲜血栓与机化血栓或者肿瘤,还可显示蛛网样的肝内侧支循环,同时显示肝外侧支循环。

1.6 肝窦阻塞综合征 肝窦阻塞综合征(hepatic sinusoidal obstruction syndrome, SOS)又称肝小静脉闭塞病,是某些原因使肝小叶中央静脉和小叶下静脉等肝窦内皮细胞损害导致管腔狭窄、广泛闭塞即肝窦流出道阻塞所引起的肝内窦性门静脉高压症,临床上较为少见。典型的SOS是疼痛性肝肿大、顽固性腹水及黄疸,还可出现脾脏肿大、乏力、纳差、恶心、呕吐、腹泻、腹胀等,严重者可同时出现心、肺、肾损害的多脏器功能衰竭。最初发现SOS是摄入千里光中毒的患者,当时组织学最显著的改变是中央静脉阻塞,严重者可进展为非门脉性肝硬化^[36]。近年的实验研究证明本病发生最根本、最早的病理改变是肝窦流出道阻塞而非小静脉阻塞^[37]。因

此, DeLeve^[38]等将其更名为SOS.

发生SOS的主要原因有药物如咪唑硫嘌呤, 免疫性因素如器官移植, 植物毒素如吡咯类生物碱和中药土三七, 其他因素如先天性畸形、血栓等. 肝窦内皮细胞对这些因素比肝细胞更敏感^[39,40], 主要是引起肝窦高度扩张、淤血, 进而致肝小静脉内膜明显增厚并纤维化, 管腔显著变小. 但是随着研究的进展, 肝小静脉阻塞的组织学依据不再是确诊SOS的必备条件^[41].

SOS的诊断依据: (1)临床表现; (2)肝功能示血清胆红素升高, CA125升高^[42], 蛋白质C等降低^[43]; (3)B超显示肝、脾肿大, 腹腔积液, 门静脉主干及分支内径增宽、血流缓慢, 肝静脉内径狭窄、变细等; 肝内回声强弱不均匀, 呈补丁状分布^[37]; (4)MRI可表现为肝实质片状信号增强, 与肝窦淤血相一致^[44]. 动脉期肝内信号偏低, 门静脉期见门静脉分支末端肝实质信号片状强化, 呈不均匀分布, 肝静脉腔内造影剂充盈不良; (5)肝组织学活检光镜下可见肝窦扩张、淤血, 肝细胞变性、坏死, 中央静脉或汇管区小静脉管腔狭窄、管腔增厚伴纤维化.

1.7 门静脉血栓形成 门静脉血栓形成(portal vein thrombosis, PVT)指门静脉主干、肠系膜上静脉、肠系膜下静脉或者脾静脉发生血栓, 继而阻碍门静脉系统血液回流, 是一种临床上较少见的血管阻塞性疾病, 其起病隐匿, 少有急骤. 临床表现为: 早期腹痛、腹泻、恶心、呕吐; 进展期症状加重, 不同程度腹胀、肛门停止排便、排气、腹膜刺激征、血性腹水、发热、上消化道出血等. 急性门静脉血栓形成时, 脾脏迅速增大, 食管胃底静脉曲张破裂而出现上消化道出血, 慢性者可出现肝门处海绵状血管瘤和门静脉压力进行性升高^[45]. 如患者不能得到及时有效地治疗, 病情恶化, 将会导致肠坏死、腹膜炎、血性腹水等. 此时病情凶险, 死亡率高达50%^[46]. 由于缺乏典型的症状和体征, 临床上常误诊为急性肠梗阻、胰腺炎、胆囊炎、原发性腹膜炎等.

PVT的原因可分为原发性和继发性^[47], 二者均与血液的高凝状态相关. 但原发性门静脉血栓形成多为先天性因素如高纤维蛋白原血症、蛋白缺乏症等, 而继发性门静脉血栓形成多与获得性凝血功能障碍有关, 如门静脉高压症、腹腔感染、腹部手术及外伤、长期使用高凝药物等^[48]. 因此, 在临床诊治过程中, 对于无明确原因的上消化道大出血或脾大, 不明原因的麻痹性

肠梗阻, 不明原因的腹胀、腹痛、血样便, 伴有血液高凝状态, 应警惕门静脉血栓形成.

PVT的诊断依据: (1)临床表现; (2)B超示血管腔内均匀低回声团, 无血流信号; (3)CT诊断本病的准确率是90%, 是目前较为常用的方法^[49]. CT示小的血栓充盈缺损, 门静脉完全阻塞时表现为“双轨征”; (4)颈静脉造影可精确显示门静脉血栓的延伸、狭窄程度及具体位置.

1.8 骨髓增生性疾病 骨髓增生性疾病(myeloproliferative disease, MLD)是某一系或多系分化相对成熟的骨髓细胞不断地克隆性增殖所引起的肿瘤性疾病, 包括骨髓纤维化, 原发性血小板增多症, 慢性粒细胞白血病, 真性红细胞增多症, 约20%的骨髓增生性疾病可伴发门静脉高压症^[50]. 本病以中年男性多见, 可表现为头痛、眩晕、多汗、疲乏无力、耳鸣、眼花等, 系由于血液的黏滞度增高导致血流缓慢及缺氧, 还可出现呕血、黑便、皮肤、黏膜显著性充血, 多伴有脾大.

MLD引起门静脉高压症的原因: (1)门静脉及脾静脉血流量增大, 形成漩涡及血管内皮损伤而导致门静脉及脾静脉血栓形成, 引起非硬化性门静脉高压症^[1]; (2)因髓外造血致脾静脉血流量增加, 形成的高动力循环易发生门静脉高压症^[51].

MLD所致门静脉高压症的诊断依据: (1)临床表现且脾大, 但无脾功能亢进的表现; (2)肝功能基本正常, 可有腹水, 但白蛋白正常; 白细胞、血小板升高, 但与感染无关^[52]; 骨髓检查嗜酸性粒细胞较多见^[53]; (3)B超显示肝脏体积正常或者稍大, 脾肿大, 门静脉管壁增厚, 管腔狭窄; (4)门静脉造影示门静脉主干管腔狭窄, 脾静脉未显影, 肝内门静脉汇合处狭窄伴周围侧支形成, 食管胃底静脉曲张; (5)肝组织活检可见肝细胞轻度肿大, 未见假小叶; (6)脾穿刺可发现髓样化生, 处于不同阶段的粒细胞、巨核细胞、有核红细胞及正常脾淋巴细胞.

1.9 肝淀粉样变 肝淀粉样变(hepatic amyloidosis)是一种临床少见, 且易漏诊、误诊的病变, 是由多种原因导致的以纤维蛋白为主的淀粉样物质沉积在血管壁及组织或者器官细胞外, 最易累及肝脏、脾脏等, 预后不良^[54,55]. 淀粉样物质沉积于肝细胞之间或网状纤维支架时称为肝淀粉样变^[53]. 肝脏是淀粉样变最易累积的部位^[56,57], 有文献显示^[58], 95%的淀粉样变患者有肝淀粉样变. 本病多发于中老年, 临床表现根据淀粉样

■同行评价

本文综述了引起门脉高压的少见成因及诊断, 为临床提供了诊断思路. 全文内容丰富, 层次清晰, 可读性强, 对临床有较好的指导意义; 此外, 本文反映了研究工作的科学问题和特定内容, 简明而有特色.

物质沉积的部位、沉积量及受累器官、组织不同而表现各异。肝脏受累的临床表现较轻微, 80%-90%患者肝肿大^[59], 重量可超出正常的几倍, 甚至成为巨肝, 巨肝伴转氨酶升高、黄疸时病情严重, 预后差。此外, 纳差、腹胀、体质量减轻、疲劳、水肿、腹水等也是常见症状, 极少部分出现门静脉高压症。

肝淀粉样变性所致的门静脉高压症诊断依据: (1)临床表现; (2)肝功能轻度异常, 其他可有蛋白尿、碱性磷酸酶增高等^[57]; (3)CT示淀粉样物质沉积部位表现为灶性低密度改变, 称为“淀粉样假瘤”^[60]; (4)B超检查无特异性改变, 多为肝脏弥漫性增大; (5)肝组织活检示淀粉样物质沉积于动脉、小动脉管壁及狄氏间隙, 肝窦及肝实质、门脉及周围均可累及, 未见假小叶, 电镜下表现为肝细胞周围大量团块状、纤维状微小非分支的细纤维结构。

1.10 肝血色病 血色病(hemochromatosis, HC)又称色素性肝硬化, 是多种原因导致过多的铁沉积在脏器、组织, 造成不同程度的基质细胞破坏、纤维组织增生及脏器功能障碍, 是罕见的先天性铁代谢紊乱性疾病。当过多的铁沉积于肝脏, 即为肝血色病, 又称为血红蛋白沉着症、肝铁过度沉积症。临床特点^[61,62]: 早期无症状, 一般在3-5年以后, 随着病情进展会出现皮肤色素沉着、内分泌紊乱、肝功能衰竭、糖尿病、心脏和关节病变、腺垂体功能障碍等。血色病患者大部分都会出现肝肿大, 说明对肝脏的病变起主导作用的是沉积的铁。血色病肝硬化发生原发性肝癌的发生率是正常人的200倍, 大部分起源于肝内胆管, 但是在肝硬化发生前治疗本病可防止肝癌发生^[63]。

肝血色病的发生原因分为原发性和继发性^[64]。肝原发性血色病是一种常染色体隐性遗传病, 与HFE基因中C282Y错义突变型密切相关^[65], 85%的病人都可检测到C282Y突变, 是较好的诊断依据^[66]。肝继发性血色病患者过量的铁一般沉积在网状内皮细胞内^[67], 常见于过量应用铁剂、大量输血、溶血性贫血、肝病、铁利用障碍所致的贫血等。

肝血色病的诊断依据: (1)皮肤色素沉着, 患者全身古铜色或金属灰色; (2)糖尿病: 有时可为首发症状; (3)肝肿大和肝硬化: 早期患者可表现为肝肿大, 肝质地较硬, 肝功能异常; (4)心脏可出现心率失常、心力衰竭, 关节主要是疼痛; (5)实验室检查铁代谢异常: 血清铁、铁蛋白及

铁蛋白饱和度增高; (6)CT示肝脏密度弥漫性增高, 似增强后, 称之为“白肝症”^[68], 但肝内血管密度减低, 原发性肝血色病的脾脏密度正常; (7)MRI示肝脏的信号强度降低, 这种低信号的肝脏称之为“黑肝症”^[68], 是肝脏铁过度沉积的定性指标^[69]; (8)肝细胞活检示小管周边肝细胞内有含铁血黄素颗粒, 晚期胆管上皮细胞、枯否细胞及巨噬细胞都有铁质沉积, 同时还会出现脂肪变性和空泡变性等非特异性的变化; (9)基因检测: 检测C282Y有无突变, 可用来筛查和诊断^[70]。

非硬化性门静脉高压症的诊断较困难, 详细的病史采集极为重要, 各种辅助检查也是重要的诊断依据。

2 结论

临床上, 形成门静脉高压症的非硬化性疾病还有 α 1-抗胰蛋白酶缺乏症、Wilson病、成人先天性门静脉畸形、门静脉纤维化、脾静脉血栓形成等。由于该类疾病发生率低, 且多数缺乏特异性诊断手段, 加之临床医生普遍对其认识水平及重视程度不够, 以至于误诊率很高。因此, 有必要提高对该类疾病的认识水平。当遇到非肝硬化所致门静脉高压症时, 采集详细的病史, 认真分析疾病的特征, 合理选择相关检测手段, 是明确病因、减少误诊、误治的关键。

3 参考文献

- 1 刘玉兰, 肖文斌. 非肝硬化性门脉高压病因分析. 北京医学 2001; 23: 105-107
- 2 Sarin SK, Kapoor D. Non-cirrhotic portal fibrosis: current concepts and management. *J Gastroenterol Hepatol* 2002; 17: 526-534
- 3 Okudaira M, Ohbu M, Okuda K. Idiopathic portal hypertension and its pathology. *Semin Liver Dis* 2002; 22: 59-72
- 4 王莉, 韩伟, 周涛, 袁孟彪. 脾脏在特发性门静脉高压症形成中的作用研究. 中华肝脏病杂志 2006; 14: 133-134
- 5 Dhiman RK, Chawla Y, Vasishta RK, Kakkar N, Dilawari JB, Trehan MS, Puri P, Mitra SK, Suri S. Non-cirrhotic portal fibrosis (idiopathic portal hypertension): experience with 151 patients and a review of the literature. *J Gastroenterol Hepatol* 2002; 17: 6-16
- 6 Poddar U, Thapa BR, Puri P, Girish CS, Vaiphei K, Vasishta RK, Singh K. Non-cirrhotic portal fibrosis in children. *Indian J Gastroenterol* 2000; 19: 12-13
- 7 Nakanuma Y, Tsuneyama K, Ohbu M, Katayanagi K. Pathology and pathogenesis of idiopathic portal hypertension with an emphasis on the liver. *Pathol Res Pract* 2001; 197: 65-76
- 8 高艳景, 袁孟彪. 特发性门静脉高压症研究进展. 临床肝胆杂志 2000; 16: 20-21
- 9 朱安善, 陈军贤. 6例特发性门静脉高压症的分析. 中华消化杂志 1998; 18: 277

- 10 Tsuneyama K, Kouda W, Nakanuma Y. Portal and parenchymal alterations of the liver in idiopathic portal hypertension: a histological and immunochemical study. *Pathol Res Pract* 2002; 198: 597-603
- 11 Bernard PH, Le Bail B, Cransac M, Barcina MG, Carles J, Balabaud C, Bioulac-Sage P. Progression from idiopathic portal hypertension to incomplete septal cirrhosis with liver failure requiring liver transplantation. *J Hepatol* 1995; 22: 495-499
- 12 Rai T, Ohira H, Fukaya E, Abe K, Yokokawa J, Takiguchi J, Shishido S, Sato Y. A case of merged idiopathic portal hypertension in course of mixed connective tissue disease. *Hepatol Res* 2004; 30: 51-55
- 13 Hillaire S, Bonte E, Denninger MH, Casadevall N, Cadranet JF, Lebrec D, Valla D, Degott C. Idiopathic non-cirrhotic intrahepatic portal hypertension in the West: a re-evaluation in 28 patients. *Gut* 2002; 51: 275-280
- 14 Arcidiaco M, Dicorato G, Pasqualin G, Gherardi S, Silva P, Tinozzi S. [Portal hypertension and enterostomy: a dangerous combination. Colostomy-induced varices as a rare cause of gastrointestinal hemorrhage. Report of a case and review of the literature]. *Ann Ital Chir* 1999; 70: 61-65
- 15 Köklü S, Yüksel O, Arhan M, Coban S, Başar O, Yolcu OF, Uçar E, Ibiş M, Ertugrul I, Sahin B. Report of 24 left-sided portal hypertension cases: a single-center prospective cohort study. *Dig Dis Sci* 2005; 50: 976-982
- 16 张谊, 陈宗静, 张启瑜. 区域性门静脉高压症研究进展. *肝胆胰外科杂志* 2006; 5: 323-325
- 17 施宝民, 王秀艳, 王亚力, 杨镇. 区域性门静脉高压症的诊断与治疗. *中华肝胆外科杂志* 1999; 1: 53-54
- 18 Hwang TL, Jan YY, Jeng LB, Chen MF, Hung CF, Chiu CT. The different manifestation and outcome between pancreatitis and pancreatic malignancy with left-sided portal hypertension. *Int Surg* 1999; 84: 209-212
- 19 De Gaetano AM, Lafortune M, Patriquin H, De Franco A, Aubin B, Paradis K. Cavernous transformation of the portal vein: patterns of intrahepatic and splanchnic collateral circulation detected with Doppler sonography. *AJR Am J Roentgenol* 1995; 165: 1151-1155
- 20 Klemperer P. Cavenomotous transformation of the portal vein. *Arch Pathol* 1928; 76: 353-377
- 21 Omokawa S, Asanuma Y, Koyama K. Evaluation of hemodynamics and hepatic mitochondrial function on extrahepatic portal obstruction in the rat. *World J Surg* 1990; 14: 247-253; discussion 253-254
- 22 张鸿坤, 李鸣, 潘松龄, 沈来根, 封华. 门脉海绵样变性的外科治疗. *中华外科杂志* 2001; 39: 697
- 23 旷历琼. 门静脉海绵样变性7例临床分析. *现代中西医结合杂志* 2007; 16: 5109-5110
- 24 Mindikoglu AL, Regev A, O'Sullivan MJ, Schiff ER. Multiple normal deliveries in a woman with severe portal hypertension due to congenital hepatic fibrosis: the importance of preserved hepatocellular function. *Am J Gastroenterol* 2005; 100: 2359-2361
- 25 Kamath BM, Piccoli DA. Heritable disorders of the bile ducts. *Gastroenterol Clin North Am* 2003; 32: 857-875, vi
- 26 Poddar U, Thapa BR, Vashishta RK, Girish CS, Singh K. Congenital hepatic fibrosis in Indian children. *J Gastroenterol Hepatol* 1999; 14: 1192-1196
- 27 Gunay-Aygun M, Avner ED, Bacallao RL, Choyke PL, Flynn JT, Germino GG, Guay-Woodford L, Harris P, Heller T, Ingelfinger J, Kaskel F, Kleta R, LaRusso NF, Mohan P, Pazour GJ, Shneider BL, Torres VE, Wilson P, Zak C, Zhou J, Gahl WA. Autosomal recessive polycystic kidney disease and congenital hepatic fibrosis: summary statement of a first National Institutes of Health/Office of Rare Diseases conference. *J Pediatr* 2006; 149: 159-164
- 28 王辉, 沈颖. 常染色体隐性遗传性多囊肾儿童期发病的临床分析. *中国医刊* 2002; 37: 26-27
- 29 赵新颜, 王宝恩, 贾继东. 36例先天性肝纤维化的临床病理特点. *中华消化杂志* 2005; 25: 748-749
- 30 梅建民, 于聪慧, 聂洪峰, 杨荣华, 王剑飞, 刘沙雷. 先天性肝纤维化一例并文献复习. *临床误诊误治* 2009; 22: 28-32
- 31 Leung VK, Loke TK, Luk IS, Lui PC, Kung NN, Lam SH. Recurrent variceal bleeding in a young woman. *Hong Kong Med J* 2005; 11: 295-298
- 32 Horton JD, San Miguel FL, Membreno F, Wright F, Paima J, Foster P, Ortiz JA. Budd-Chiari syndrome: illustrated review of current management. *Liver Int* 2008; 28: 455-466
- 33 Aydinli M, Bayraktar Y. Budd-Chiari syndrome: etiology, pathogenesis and diagnosis. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 2693-2696
- 34 Brancatelli G, Vilgrain V, Federle MP, Hakime A, Lagalla R, Iannaccone R, Valla D. Budd-Chiari syndrome: spectrum of imaging findings. *AJR Am J Roentgenol* 2007; 188: W168-W176
- 35 Cazals-Hatem D, Vilgrain V, Genin P, Denninger MH, Durand F, Belghiti J, Valla D, Degott C. Arterial and portal circulation and parenchymal changes in Budd-Chiari syndrome: a study in 17 explanted livers. *Hepatology* 2003; 37: 510-519
- 36 DeLeve LD, McCuskey RS, Wang X, Hu L, McCuskey MK, Epstein RB, Kanel GC. Characterization of a reproducible rat model of hepatic veno-occlusive disease. *Hepatology* 1999; 29: 1779-1791
- 37 Carreras E, Díaz-Beyá M, Rosiñol L, Martínez C, Fernández-Avilés F, Rovira M. The incidence of veno-occlusive disease following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation has diminished and the outcome improved over the last decade. *Biol Blood Marrow Transplant* 2011; 17: 1713-1720
- 38 DeLeve LD, Shulman HM, McDonald GB. Toxic injury to hepatic sinusoids: sinusoidal obstruction syndrome (veno-occlusive disease). *Semin Liver Dis* 2002; 22: 27-42
- 39 DeLeve LD, Wang X, Kuhlenkamp JF, Kaplowitz N. Toxicity of azathioprine and monocrotaline in murine sinusoidal endothelial cells and hepatocytes: the role of glutathione and relevance to hepatic veno-occlusive disease. *Hepatology* 1996; 23: 589-599
- 40 DeLeve LD. Cellular target of cyclophosphamide toxicity in the murine liver: role of glutathione and site of metabolic activation. *Hepatology* 1996; 24: 830-837
- 41 徐涛, 刘福旭, 张颖. 布-加综合征延误诊断1例. *中华全科医师杂志* 2005; 4: 62
- 42 McDonald GB, Sharma P, Matthews DE, Shulman HM, Thomas ED. Venocclusive disease of the liver after bone marrow transplantation: diagnosis, incidence, and predisposing factors. *Hepatology* 1984; 4: 116-122
- 43 Faioni EM, Mannucci PM. Venocclusive disease of the liver after bone marrow transplantation: the role of hemostasis. *Leuk Lymphoma* 1997; 25: 233-245
- 44 Dumont Ch, Lambert M, Van Beers BE. MR imag-

- ing findings in a patient with hepatic veno-occlusive disease. *Acta Gastroenterol Belg* 2004; 67: 236-238
- 45 Hoekstra J, Janssen HL. Vascular liver disorders (II): portal vein thrombosis. *Neth J Med* 2009; 67: 46-53
- 46 贾国葆. 骨髓增生性疾病引起门脉高压症2例报告. *浙江临床医学* 2004; 6: 663-665
- 47 Kashyap AS, Kashyap S. Mesenteric venous thrombosis. *AJR Am J Roentgenol* 2002; 179: 1072; author reply 1072-1073
- 48 莫友发, 张礼聘, 李想良, 高代平. 门静脉和肠系膜上静脉血栓形成的CT、MRI诊断. *中华肝胆外科杂志* 2007; 13: 22-24
- 49 李学峰, 谷涌泉, 余恒锡, 张建, 孙家邦, 董宗俊, 李建新, 汪忠镐. 急性肠系膜上静脉血栓形成的诊治. *中国普通外科杂志* 2009; 18: 602-604
- 50 Besses C, Cervantes F, Pereira A, Florensa L, Solé F, Hernández-Boluda JC, Woessner S, Sans-Sabrafen J, Rozman C, Montserrat E. Major vascular complications in essential thrombocythemia: a study of the predictive factors in a series of 148 patients. *Leukemia* 1999; 13: 150-154
- 51 赵刚, 孙勇伟, 吴志勇, 罗蒙, 张斌. 骨髓增生性疾病致门静脉高压症的诊治. *中华消化外科杂志* 2007; 6: 277-279
- 52 H Syrjälä, H M Surcel, J Ilonen. Low CD4/CD8 T Lymphocyte ratio in acute myocardial infarction. *Clin Exp Immunol* 1991; 83: 326-328
- 53 O'Shaughnessy TC, Ansari TW, Barnes NC, Jeffery PK. Inflammation in bronchial biopsies of subjects with chronic bronchitis: inverse relationship of CD8+ T lymphocytes with FEV1. *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 155: 852-857
- 54 Bestard Matamoros O, Poveda Monje R, Ibernón Vilaró M, Carrera Plans M, Grinyó Boira JM. [Systemic AA amyloidosis induced by benign neoplasms]. *Nefrologia* 2008; 28: 93-98
- 55 Gillmore JD, Lovat LB, Hawkins PN. Amyloidosis and the liver. *J Hepatol* 1999; 30 Suppl 1: 17-33
- 56 Ebert EC, Nagar M. Gastrointestinal manifestations of amyloidosis. *Am J Gastroenterol* 2008; 103: 776-787
- 57 Park MA, Mueller PS, Kyle RA, Larson DR, Plevak MF, Gertz MA. Primary (AL) hepatic amyloidosis: clinical features and natural history in 98 patients. *Medicine (Baltimore)* 2003; 82: 291-298
- 58 Monzawa S, Tsukamoto T, Omata K, Hosoda K, Araki T, Sugimura K. A case with primary amyloidosis of the liver and spleen: radiologic findings. *Eur J Radiol* 2002; 41: 237-241
- 59 Gertz MA, Kyle RA. Hepatic amyloidosis: clinical appraisal in 77 patients. *Hepatology* 1997; 25: 118-121
- 60 Georgiades CS, Neyman EG, Fishman EK. Cross-sectional imaging of amyloidosis: an organ system-based approach. *J Comput Assist Tomogr* 2002; 26: 1035-1041
- 61 许大波, 刘晓红, 孙钢, 周旭东, 柯美云. 血色病的临床分析与病理特点. *基础医学与临床* 2004; 24: 179-181
- 62 Franchini M. Hereditary iron overload: update on pathophysiology, diagnosis, and treatment. *Am J Hematol* 2006; 81: 202-209
- 63 Potekhina ES, Lavrov AV, Samokhodskaya LM, Efimenko AY, Balatskiy AV, Baev AA, Litvinova MM, Nikitina LA, Shipulin GA, Bochkov NP, Tkachuk VA, Bochkov VN. Unique genetic profile of hereditary hemochromatosis in Russians: high frequency of C282Y mutation in population, but not in patients. *Blood Cells Mol Dis* 2005; 35: 182-188
- 64 Adams P, Brissot P, Powell LW. EASL International Consensus Conference on Haemochromatosis. *J Hepatol* 2000; 33: 485-504
- 65 孟海英, 侯一平. HFE基因与遗传性血色素沉着症. *中华医学遗传学杂志* 2002; 19: 159-162
- 66 Pointon JJ, Viprakasit V, Miles KL, Livesey KJ, Steiner M, O'Riordan S, Hien TT, Merryweather-Clarke AT, Robson KJ. Hemochromatosis gene (HFE) mutations in South East Asia: a potential for iron overload. *Blood Cells Mol Dis* 2003; 30: 302-306
- 67 Brunt EM, Olynyk JK, Britton RS, Janney CG, Di Bisceglie AM, Bacon BR. Histological evaluation of iron in liver biopsies: relationship to HFE mutations. *Am J Gastroenterol* 2000; 95: 1788-1793
- 68 雷军强, 王晓慧, 陈勇, 张兴强, 辛仲宏, 郭顺林, 薛敬梅. 肝血色病的MRI和CT表现. *中国医学影像学杂志* 2009; 17: 218-220
- 69 Brittenham GM, Badman DG. Noninvasive measurement of iron: report of an NIDDK workshop. *Blood* 2003; 101: 15-19
- 70 Choi SJ, Min WK, Chun S, Park H, Kim JW, Park CJ, Chi HS. Frequencies of C282Y and H63D mutations and transferrin saturation indices in the Korean population. *Clin Chem Lab Med* 2002; 40: 689-692

编辑 张姗姗 电编 闫晋利

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

• 消息 •

《世界华人消化杂志》2011年开始不再收取审稿费

本刊讯 为了方便作者来稿, 保证稿件尽快公平、公正的处理, 《世界华人消化杂志》编辑部研究决定, 从2011年开始对所有来稿不再收取审稿费. 审稿周期及发表周期不变. (编辑部主任: 李军亮 2011-01-01)

妊娠合并高脂血症性胰腺炎治疗进展

韩红梅, 朴熙绪

韩红梅, 朴熙绪, 延边大学附属医院消化内科 吉林省延吉市 133000

作者贡献分布: 本文综述由韩红梅完成; 朴熙绪审校。

通讯作者: 韩红梅, 讲师, 主治医师, 133000, 吉林省延吉市, 延边大学附属医院消化内科. hanhm79@yahoo.cn

收稿日期: 2011-08-30 修回日期: 2011-11-12

接受日期: 2011-12-13 在线出版日期: 2011-12-18

Advances in treatment of hyperlipidemic pancreatitis in pregnancy

Hong-Mei Han, Xi-Xu Piao

Hong-Mei Han, Xi-Xu Piao, Department of Gastroenterology, Affiliated Hospital of Yanbian Medical University, Yanji 133000, Jilin Province, China

Correspondence to: Hong-Mei Han, Attending Physician, Department of Gastroenterology, Affiliated Hospital of Yanbian Medical University, Yanji 133000, Jilin Province, China. hanhm79@yahoo.cn

Received: 2011-08-30 Revised: 2011-11-12

Accepted: 2011-12-13 Published online: 2011-12-18

Abstract

Acute pancreatitis is a serious complication of pregnancy. In recent years, hypertriglyceridemia has become a common cause of acute pancreatitis, and up to 56% of pancreatitis cases during pregnancy are caused by hypertriglyceridemia. The majority of cases of hyperlipidemic pancreatitis in pregnancy belong to severe pancreatitis, and are commonly seen in the second and third trimester, easily recurrent, and dangerous. As hyperlipidemic pancreatitis in pregnancy is associated with a perinatal and maternal mortality of 20% to 50%, it seriously threatens maternal health and fetal lives. Now great efforts have been made to reduce the incidence of this complication and deaths of mothers and fetuses, and avoid the deformity of the baby. This article aims to review the progress in the treatment of hyperlipidemic pancreatitis in pregnancy.

Key Words: Hyperlipidemia; Pancreatitis; Pregnancy; Treatment

Han HM, Piao XX. Advances in treatment of hyperlipidemic pancreatitis in pregnancy. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(35): 3623-3628

摘要

妊娠合并急性胰腺炎是妊娠期严重的并发症, 其中高脂血症性胰腺炎近年在妊娠合并急性胰腺炎病因中所占比率逐年增加。近年统计高脂血症所占比率高达妊娠合并急性胰腺炎的56%, 而且妊娠合并高脂血症性胰腺炎为重症胰腺炎的主要原因, 多见于妊娠中晚期, 易反复发作, 病情凶险, 孕产妇病死率及围生儿病死率达20%-50%, 严重威胁着孕产妇的身体健康, 也殃及胎儿的生命安全。目前临床上致力于研究降低此病的发病率、孕妇与胎儿的死亡率以及避免婴儿的畸形, 本文就有关妊娠合并高脂血症性胰腺炎治疗方面的现状与进展作一综述。

关键词: 高脂血症; 胰腺炎; 妊娠; 治疗

韩红梅, 朴熙绪. 妊娠合并高脂血症性胰腺炎治疗进展. *世界华人消化杂志* 2011; 19(35): 3623-3628

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/3623.asp>

0 引言

妊娠合并急性胰腺炎是妊娠期严重的并发症, 高脂血症性胰腺炎发生约占1/25 000分娩者, 占妊娠合并胰腺炎的4%-6%^[1-4]。近年随着生活水平提高和饮食结构的改变, 发病率在我国有升高趋势, 高脂血症所占比率高达妊娠合并急性胰腺炎的56%^[5,6]。妊娠合并高脂血症性胰腺炎为重症胰腺炎的主要原因^[7], 通常发生在妊娠中晚期^[8], 其病情凶险^[9], 孕产妇病死率及围生儿病死率为20%-50%^[10,11]。此病虽然临床少见, 但症状重、并发症多、易反复发作, 严重威胁着孕产妇的身体健康, 也殃及胎儿的生命安全, 其治疗方案及治疗理念备受关注。本文就有关本病治疗方面的现状与进展作一综述, 以期对今后的研究有所裨益。

1 妊娠合并高脂血症性胰腺炎的病因

国内外研究者认为高脂血症性胰腺炎与血清胆固醇升高无关, 而与血清甘油三酯(triglyceride, TG)水平显著升高密切相关^[12,13], 当TG高

■背景资料

妊娠合并急性胰腺炎是妊娠期严重的并发症, 其中高脂血症性胰腺炎近年在妊娠合并急性胰腺炎病因中所占比率逐年增加, 而且多为重症胰腺炎, 多见于妊娠中晚期, 易反复发作, 病情凶险, 孕产妇病死率及围生儿病死率高, 本文主要阐述其治疗进展。

■同行评议者

张国梁, 主任医师, 天津市第一中心医院消化内科

■研究前沿

关于妊娠期出现的高TG血症应努力深入研究, 进一步研究安全有效迅速地降低TG浓度的方法。另外采取基因治疗以降低家族性高TG血症的血TG浓度, 有望成为研究的方向, 应用前景广阔。

于11.3-22.6 mmol/L时可直接诱发急性胰腺炎(acute pancreatitis, AP)^[14-16], 故高脂血症性急性胰腺炎又称为“高甘油三酯血症性急性胰腺炎”。高脂血症(hyperlipidemia, HL)既可作为AP病因, 又可为其结果; 妊娠为继发性血脂升高的主要因素^[17], 可导致高脂血症性胰腺炎, 其发生原因考虑为如下: (1)由于近年来随着生活水平的提高, 妊娠期营养摄入不合理, 主要以高蛋白、高脂肪饮食为主, 肠道吸收脂肪功能增加, 导致妊娠期孕妇HL发生率明显升高; (2)AP时, 由于大网膜和腹膜的脂肪组织坏死后脂质被吸收入血, 肝脏释放出更多的TG, 加重HL; (3)正常妊娠在脂蛋白水平上发生生理变化^[18,19], 孕早期与非孕期相差不大, 孕中期以后逐渐增高, 到孕晚期明显增高^[20], 这与在妊娠生理状况下, 机体内多种激素发生变化有关。妊娠可明显影响血脂及脂蛋白代谢, 促使脂肪动员的激素如糖皮质激素、胰高血糖素、生长激素等分泌增加以及脂肪组织中激素敏感性脂肪活性增强, 促使肝脏合成极低密度脂蛋白增强, 导致孕末期有HL倾向^[21-24]。也有报道, 随孕周的增加, 胎盘泌乳素分泌量逐渐增加, 同时, 雌激素的刺激, 使体内载脂蛋白AI合成增加约25%, 而孕激素可部分抵消雌激素升高高密度脂蛋白胆固醇(high-density lipoprotein cholesterol, HDL-C)水平的作用^[25]。高甘油三酯血症的原因还可见于原发性甘油三酯代谢遗传性疾病, 最常见的疾病有家族性高甘油三酯血症、脂蛋白脂酶缺乏症和载脂蛋白C-II的缺乏^[26]。报道^[27-30]称I型、IV和V型HL^[30,31]发生AP最为多见, TG 10-20 mmol/L为妊娠合并AP可确认的危险因素^[32,33]。一旦血中TG升高, 胰腺释放高浓度胰脂酶分解TG, 使血液产生大量游离脂肪酸, 脂蛋白底物释放的脂肪酸及在胰腺毛细血管床释放的溶血卵磷脂超过了白蛋白所能结合的数量, 胰腺血管微血栓形成, 而使胰腺细胞膜溶化, 产生化学性AP^[34,35]。妊娠期血液常处于高凝状态, HL又可加重血液黏稠度, 使胰腺处于缺血状态, 从而诱发AP, 特别在有胰腺炎病史者更易复发。另外, 妊娠中晚期增大的子宫挤压胰腺、压迫胰腺导管导致其内压升高, 同时又可压迫胃、十二指肠, 使十二指肠液反流入胰管, 激活胰酶从而诱发AP^[36]。

2 妊娠合并高脂血症性胰腺炎的治疗现状

妊娠合并高脂血症性胰腺炎的治疗原则与非妊娠期基本相同, 但由于其病情一般较重, 常为重

症AP, 又要同时兼顾母婴安全, 常需要联合消化内科、产科、儿科及重症医学科等多学科, 根据孕妇本身情况、胎儿成熟情况等制定“个体化”治疗方案^[37]。

2.1 非手术治疗 国内外研究^[38,39]认为治疗目标包括降低血清TG浓度、减少胰腺分泌、控制疼痛、抗感染及预防循环衰竭等。关键在于根本上解决HL的状况, TG降至5.65 mmol/L以下可防止AP的进一步发展^[29,40,41]。同时因妊娠的特殊性, 要提供孕妇和胎儿必要的营养, 选择药物应特别慎重。

2.1.1 高脂血症的治疗: 禁食和静注5%葡萄糖与胰岛素往往能降低TG含量^[42,43], 有效地控制妊娠患者的TG水平, 但其持续时间有限。因为一个成长中的胎儿需要母体的热量、必需氨基酸和必需脂肪酸, 然而在这些患者中再次进食的开始就出现TG水平增加, 加重胰腺炎^[44]。含微量脂肪的食物中同时含有高浓度的非脂肪的热量, 妊娠期可能会导致极低密度脂蛋白综合征, 增加在肝脏TG的合成^[45]。有人发现含约10%脂肪的热量的全肠外营养不会显著增加孕妇的TG^[42,44], 这是因为脂质在全身输送绕过肝脏, 生成富含脂蛋白的TG。因此高脂血症性AP孕期脂类摄入量控制在30-40 g以下即可^[28,46,47]。同时限制热量摄入可使血脂下降, 降低复发危险性。调脂药物选择上, 他汀类属FDA妊娠分级X类, 对胎儿有致畸的危害性, 妊娠期禁用^[48]。贝特类与烟酸属C类, 报道称^[49]非诺贝特安全用于怀孕期高TG血症。普罗布考为FDA妊娠分级B类, 但对血TG的影响小, 对于高脂血症性AP效果不佳。因此, 目前妊娠期HL无安全而有效的调脂药物, 需饮食调节来控制TG水平, 待开发适合妊娠期用的新的调脂药物。

2.1.2 抑制胰腺分泌: (1)禁食及胃肠减压可减少胃酸进入十二指肠引起胰腺分泌增加的风险, 并可减轻肠胀气及肠麻痹; (2)抗胰酶的活性药物抑肽酶, 可以抑制胰蛋白酶、纤维蛋白酶及酶原的激活因子; (3)抑制胃酸分泌药物H2受体阻滞剂如雷尼替丁、质子泵抑制剂如泮托拉唑等, 通过抑制胃酸的分泌减少促胰酶的分泌而使胰酶分泌减少; (4)其他: 生长抑素及其类似品如施他宁、奥曲肽等, 能抑制促胰酶的分泌。以上药物均属FDA妊娠分级B类, 对胎儿是否有潜在影响还缺乏循证方面的数据, 应用时需慎重, 尤其生长抑素类制剂对在孕妇中是否应用目前尚无定论。

2.1.3 抗生素的应用: 为预防继发感染及并发症, 原则上应使用广谱、高效、易通过血胰屏障的抗生素, 可选用FDA妊娠分级B类的药物如第3代头孢菌素、甲硝唑, 但FDA妊娠分级C类药物亚胺培南与喹诺酮类如左氧氟沙星在妊娠期应慎用. 抗生素应根据病情轻重调整剂量及疗程, 在孕期使用应权衡利弊, 以保证疗效和胎儿的安全.

2.1.4 止痛、解痉: 腹痛明显时可用维生素K₃(FDA妊娠分级B类)解痉, 减轻疼痛; 盐酸哌替啶、硫酸阿托品虽有止痛, 防止Oddis括约肌痉挛, 减少胰液、胃液的分泌, 但均为FDA妊娠分级C类药物, 妊娠期应慎用.

2.1.5 营养支持, 纠正和维持水电解质酸碱平衡紊乱, 防治休克治疗: 早期给予全肠外营养是一个安全和灵活的治疗方案^[50], 可使胰腺休息、控制TG浓度, 可为成长中的胎儿提供必要的卡路里和必需氨基酸, 满足母体及胎儿对营养的需求, 保证胎儿各重要脏器发育成熟^[51]. 同时全肠外营养也可作为控制症状和降低TG、预防AP诱发的一种有效的手段. 早期进食导致症状复发和TG浓度不好控制, 因此待症状和体征、血象恢复正常后开始进流食. Chen等^[52]认为入院时TG<4.5 mmol/L者使用脂肪乳剂是相对安全的, 结合综合治疗能减少并发症发生, 缩短病程; 但入院时TG>4.5 mmol/L者因可能存在先天性脂蛋白酶系统异常, 应用脂肪乳剂后TG升高、病情加重或复发、病程延长等风险, 故建议间断使用或禁用脂肪乳剂. 积极补充液体及电解质(钾、镁、钙离子), 以恢复有效循环血量. 有休克时应给予羟乙基淀粉或白蛋白或输血浆, 密切观察和及时处理其他全身并发症.

2.2 血浆置换 可快速而安全地降低TG、乳糜微粒, 改善症状、体征^[53]. 血浆置换的时间是关键, 越早置换(发病48 h内)效果越好^[52,54,55]. Saravanan等^[56]报道过2次连续的血浆置换, TG水平分别降低73%和82%, 首次血浆置换后血浆黏稠度下降50%, 迅速改善重症AP病情.

2.3 血液灌流、连续性静脉-静脉血液滤过 血液灌流有稳定内环境的作用, 能在早期清除过多的细胞因子和炎症介质^[57], 可能有利于减轻全身炎症反应, 改善心、肺、肾等器官功能^[28,58-60], 连续性静脉-静脉血液滤过(continuous venous-venous hemofiltration, CVVH)能显著减少肠道细菌易位和内毒素血症^[61]. 孙备等^[62]认为血液滤过是高脂血症性AP非手术综合治疗的中心环节

和重要措施, 应用血液滤过的时机选择早期(72 h内)为佳, 即越早越好, 且血液滤过对于高脂血症性AP合并腹腔室隔综合征(ACS)的部分患者可显著改善腹内压, 使其避免经历开腹减压的创伤. 文献报道^[63], 31岁的孕妇25 wk时出现高脂血症性AP合并败血症及多器官功能障碍综合征(multiple organ dysfunction syndrome, MODS), 在常规治疗基础上, 进行了CVVH和3个循环阶段的血液灌流(hemoperfusion, HP)后治愈, 认为早期干预血液净化治疗和CVVH与HP结合可在重症及高脂血症性AP有效. 也有报道^[64], 配对血浆滤过吸附(plasma filtration adsorption, CPFA)与CVVH联合治疗急性肝功能衰竭(acute liver failure, ALF)及MODS患者, 症状显著改善, 未见治疗相关的不良反应, 但尚无合并妊娠患者的治疗报道. 也有报道^[65]CVVH并没有显著减少甘油三酯水平, 不是处理妊娠合并高脂血症性胰腺炎的关键方法, 需在临床多规模治疗观察.

2.4 手术治疗 国内外作者认为对于妊娠合并高脂血症性AP的手术治疗作用有限, 除有并发症发生外一般采用保守治疗. 如积极治疗48-72 h, 病情恶化, 影像学提示胰周浸润范围扩大, 则采用外科干预治疗^[66]. 手术指征: (1)胰腺感染坏死; (2)腹腔内大量渗液、腹内压明显增高、迅速出现严重并发症; (3)合并胆管梗阻者. 手术时机在妊娠中期或产褥期. 妊娠中期胎儿器官发育已完善, 自发性流产和早产的可能性较小, 且子宫也未进入上腹腔, 对手术视野影响较小^[67]. 手术重点是剖宫产娩出胎儿缓解腹腔内高压、胰包膜切开引流、清除坏死及毒性物质、腹腔引流及术中、术后冲洗^[68]. 随着微创技术的发展, 目前大多数研究表明, 妊娠期腹腔镜手术治疗是安全可靠的, 术中所致的二氧化碳气腹并不干扰胎儿的酸碱平衡, 但应注意母体的酸碱平衡, 若出现高碳酸血症或酸中毒, 应改行开腹手术^[69].

2.5 产科处理

2.5.1 预防早产: 约75%的妊娠期AP发生在妊娠晚期, 据统计其早产率高达30%-40%^[28,70,71], 因此在保守治疗AP的同时需保胎治疗, 密切观察胎心率、宫缩及阴道分泌物的变化, 并进行无负荷试验(NST)、胎动计数及B超检查等监护胎儿宫内发育状况. 对有早产征象者给予硫酸镁抑制宫缩及地塞米松促胎肺成熟, 作终止妊娠准备.

2.5.2 终止妊娠: 终止妊娠有利于AP病情的缓解, 孕妇分娩后TG明显下降^[72]. 有些人认为分娩后

■应用要点

妊娠合并高脂血症性胰腺炎由于合并妊娠的特殊情况, 选择药物上受限制, 如他丁类降脂药物对胎儿有致畸作用; 也涉及产科问题, 需消化内科、产科协助治疗, 必要时需要外科治疗, 本文对妊娠合并高脂血症性胰腺炎治疗有一定的指导意义.

■同行评价

该综述很好地阐述了目前国内外对妊娠合并高脂血症性胰腺炎的治疗进展,对消化科医生、妇产科医生及普外科医生会有很大的帮助,对临床医生正确诊断和治疗该病提供了很好的依据,临床价值很大,实用性非常好,紧密联系临床。

24 h内血脂水平可降低15%-25%,也有报道产后48 h TG可降低50%^[29]。AP产生的细胞因子和炎症介质可能通过胎盘影响胎儿的生长发育; AP所致的ARDS又可能导致胎儿宫内窘迫,甚至宫内死亡,进而影响孕妇的预后^[73]。因此,对于妊娠晚期患者,如果经多学科评估,认为胎儿出生后存活的可能性大,即应果断终止妊娠;孕早、中期病人应加强对胎儿的监测,一旦发现胎儿死亡应及早采取措施,排出死胎。是否终止妊娠需要综合考虑孕妇病情、胎儿发育情况、胎儿是否存活等,对有下列情况应尽快终止妊娠: (1)明显的流产或早产征象; (2)胎儿窘迫或死胎; (3)已到临产期^[67]。终止妊娠的方法: 应选择最快、对母体影响最小的方法,一般应选择剖宫产术。如果孕妇已临产、胎儿很小或产程进展很顺利,可考虑经阴道分娩,胎儿窘迫者应及时行剖宫产术分娩抢救胎儿。治疗总的原则是尽可能兼顾母婴的安全,当无法兼顾时,在终止妊娠的决策过程中应以保全孕妇的生命为首要目标。

3 结论

妊娠合并高脂血症性AP治疗主要致力于降低TG含量、治疗胰腺炎、保护孕妇和胎儿,因此孕妇应采取合理、均衡的营养,避免高脂血症的产生,一旦发生AP应早期诊断及治疗,阻止病情发展。关于妊娠期出现的高TG血症应努力深入进行实验研究和临床探索,寻找安全有效迅速地降低TG浓度的新药新方法,并且在AP的发生和发展的机制上作更进一步的深入研究,在临床中探索适合妊娠期的新方法,同时多学科协作制定适合妊娠期高脂血症性AP的综合性治疗方案,以降低该病的发病率和死亡率。

4 参考文献

- Herfort K, Fialová V, Šrp B. Acute pancreatitis in pregnancy. *Mater Med Pol* 1981; 13: 15-17
- Zemni Djellali S, Bibi M, Ben Ali A, Khairi H, Said R, Ben Haj Hmida R, Gharbi S. [Acute pancreatitis during pregnancy and the postpartum: 3 cases]. *Tunis Med* 1992; 70: 411-415
- Laraki M, Harti A, Bouderkha MA, Barrou H, Matar N, Benaguida M. [Acute pancreatitis and pregnancy]. *Rev Fr Gynecol Obstet* 1993; 88: 514-516
- Qin HD, Zhang JG, Li CL, Zou XM. Three cases of hyperlipidemic pancreatitis in late pregnancy. *Chin Med J (Engl)* 2004; 117: 314-315
- Chang CC, Hsieh YY, Tsai HD, Yang TC, Yeh LS, Hsu TY. Acute pancreatitis in pregnancy. *Zhonghua Yixue Zazhi (Taipei)* 1998; 61: 85-92
- Ewald N, Hardt PD, Kloer HU. Severe hypertriglyceridemia and pancreatitis: presentation and management. *Curr Opin Lipidol* 2009; 20: 497-504
- Sun L, Li W, Geng Y, Shen B, Li J. Acute pancreatitis in pregnancy. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2011; 90: 671-676
- Kayataş SE, Eser M, Cam C, Cogendez E, Guzin K. Acute pancreatitis associated with hypertriglyceridemia: a life-threatening complication. *Arch Gynecol Obstet* 2010; 281: 427-429
- Huissoud C, Robert JM, Bakrin N, Rudigoz RC, Levrat A. [Severe gestational hypertriglyceridemia: related complications and management]. *J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris)* 2008; 37: 517-520
- 边旭明. 妊娠合并胰腺疾病的生理与病理. *实用妇产科杂志* 2009; 25: 321-322
- Swisher SG, Hunt KK, Schmit PJ, Hiyama DT, Ben-nion RS, Thompson JE. Management of pancreatitis complicating pregnancy. *Am Surg* 1994; 60: 759-762
- Chuang SC, Lee KT, Wang SN, Kuo KK, Chen JS. Hypertriglyceridemia-associated acute pancreatitis with chylous ascites in pregnancy. *J Formos Med Assoc* 2006; 105: 583-587
- De Chalain TM, Michell WL, Berger GM. Hyperlipidemia, pregnancy and pancreatitis. *Surg Gynecol Obstet* 1988; 167: 469-473
- Morita Y, Yoshikawa T, Takeda S, Matsuyama K, Takahashi S, Yoshida N, Clemens MG, Kondo M. Involvement of lipid peroxidation in free fatty acid-induced isolated rat pancreatic acinar cell injury. *Pancreas* 1998; 17: 383-389
- Fortson MR, Freedman SN, Webster PD. Clinical assessment of hyperlipidemic pancreatitis. *Am J Gastroenterol* 1995; 90: 2134-2139
- Beyrouiti MI, Beyrouiti R, Ben Amar M, Dhieb N, Jammoussi K, Louhichi S, Frikha F, Boujelbene S, Ghorbel A. [Acute hyperlipemic pancreatitis (2 cases)]. *Tunis Med* 2007; 85: 610-613
- Exbrayat V, Morel J, De Filippis JP, Tourne G, Jospe R, Auboyer C. [Hypertriglyceridemia-induced pancreatitis in pregnancy. A case report]. *Ann Fr Anesth Reanim* 2007; 26: 677-679
- Perrone G, Critelli C. [Severe hypertriglyceridemia in pregnancy. A clinical case report]. *Minerva Ginecol* 1996; 48: 573-576
- Torres Colores J, Vadillo Buenfil M, González Bárcena D. [Hypertriglyceridemic pancreatitis during pregnancy. A report of a case]. *Ginecol Obstet Mex* 2006; 74: 170-176
- Dukić A, Zivancević-Simonović S, Varjacić M, Dukić S. [Hyperlipidemia and pregnancy]. *Med Pregl* 2009; 62 Suppl 3: 80-84
- Abel T, Blázovics A, Kemény M, Lengyel G. [Hyperlipoproteinemia in pregnancy]. *Orv Hetil* 2011; 152: 753-757
- Crisan LS, Steidl ET, Rivera-Alsina ME. Acute hyperlipidemic pancreatitis in pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 2008; 198: e57-e59
- Gosnell FE, O'Neill BB, Harris HW. Necrotizing pancreatitis during pregnancy: a rare cause and review of the literature. *J Gastrointest Surg* 2001; 5: 371-376
- Belo L, Caslake M, Gaffney D, Santos-Silva A, Pereira-Leite L, Quintanilha A, Rebelo I. Changes in LDL size and HDL concentration in normal and preeclamptic pregnancies. *Atherosclerosis* 2002; 162: 425-432
- 杨冬梅. 孕妇不同时期血脂及脂蛋白的变化. *中国生育健康杂志* 2005; 16: 234-235
- Steinmetz A, Schäfer JR. [Secondary disorders of

- lipid metabolism, metabolic syndrome and familial combined hyperlipidemia]. *Wien Med Wochenschr* 1994; 144: 299-307
- 27 Yamauchi H, Sunamura M, Takeda K, Suzuki T, Itoh K, Miyagawa K. Hyperlipidemia and pregnancy associated pancreatitis with reference to plasma exchange as a therapeutic intervention. *Tohoku J Exp Med* 1986; 148: 197-205
 - 28 Nies BM, Dreiss RJ. Hyperlipidemic pancreatitis in pregnancy: a case report and review of the literature. *Am J Perinatol* 1990; 7: 166-169
 - 29 Yadav D, Pitchumoni CS. Issues in hyperlipidemic pancreatitis. *J Clin Gastroenterol* 2003; 36: 54-62
 - 30 Ohmoto K, Neishi Y, Miyake I, Yamamoto S. Severe acute pancreatitis associated with hyperlipidemia: report of two cases and review of the literature in Japan. *Hepatogastroenterology* 1999; 46: 2986-2990
 - 31 Bae JH, Baek SH, Choi HS, Cho KR, Lee HL, Lee OY, Yoon BC, Hahm JS, Lee MH, Lee DH, Kee CS. Acute pancreatitis due to hypertriglyceridemia: report of 2 cases. *Korean J Gastroenterol* 2005; 46: 475-480
 - 32 Batiste MC, Schaefer EJ. Diagnosis and management of lipoprotein abnormalities. *Nutr Clin Care* 2002; 5: 115-123
 - 33 Graesdal A. [Severe hypertriglyceridemia--an important cause of pancreatitis]. *Tidsskr Nor Lægeforen* 2008; 128: 1053-1056
 - 34 Badja N, Troché G, Zazzo JF, Benhamou D. Acute pancreatitis and preeclampsia-eclampsia: a case report. *Am J Obstet Gynecol* 1997; 176: 707-709
 - 35 Khan AS, Latif SU, Eloubeidi MA. Controversies in the etiologies of acute pancreatitis. *JOP* 2010; 11: 545-552
 - 36 王莉, 杜丽敏, 尚涛, 谷香珍. 妊娠合并急性胰腺炎14例分析. *中国实用妇科与产科杂志* 2004; 20: 633-634
 - 37 Stimac D, Stimac T. Acute pancreatitis during pregnancy. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2011; 23: 839-844
 - 38 Batashki I, Milchev N, Uchikova E, Pekhlivanov B, Chifligarov K, Uchikov A. [Hyperlipidemic pancreatitis during pregnancy--a case report]. *Akush Ginekol (Sofiia)* 2006; 45 Suppl 1: 41-43
 - 39 Chen CP, Wang KG, Su TH, Yang YC. Acute pancreatitis in pregnancy. *Acta Obstet Gynecol Scand* 1995; 74: 607-610
 - 40 Fujita N, Shirai Y, Tsukada K, Hatakeyama K. Gestational hyperlipidemic pancreatitis without non-gestational hyperlipidemia. *Hepatogastroenterology* 1999; 46: 2018-2019
 - 41 Lindberg DA. Acute pancreatitis and hypertriglyceridemia. *Gastroenterol Nurs* 2009; 32: 75-82; quiz 83-84
 - 42 Sanderson SL, Iverius PH, Wilson DE. Successful hyperlipemic pregnancy. *JAMA* 1991; 265: 1858-1860
 - 43 Gürsoy A, Kulaksizoglu M, Sahin M, Ertugrul DT, Ozer F, Tutuncu NB, Demirag NG. Severe hypertriglyceridemia-induced pancreatitis during pregnancy. *J Natl Med Assoc* 2006; 98: 655-657
 - 44 Ihimoyan A, Chelimillaa H, Kalakada N, Dev Aa, Kumbuma K. Hypertriglyceridemia Induced Pancreatitis in a Non-Diabetic Pregnant Patient Requiring the Use of Total Parenteral Nutrition. *Gastroenterology Research* 2011; 4: 88-91
 - 45 Weinberg RB, Sitrin MD, Adkins GM, Lin CC. Treatment of hyperlipidemic pancreatitis in pregnancy with total parenteral nutrition. *Gastroenterology* 1982; 83: 1300-1305
 - 46 Sattler AM, Bock K, Schmidt S, Maisch B, Schaefer JR. [Excessive hyperchylomicronemia--a rare cause of acute retrosternal and epigastric pain in pregnancy]. *Herz* 2003; 28: 257-261
 - 47 Sattler AM, Bock K, Schmidt S, Maisch B, Schaefer JR. [LDL-Apheresis for the treatment of hyperchylomicronemia-induced pancreatitis]. *Z Kardiol* 2003; 92: III64-III67
 - 48 Athyros VG, Giouleme OI, Nikolaidis NL, Vasiliadis TV, Bouloukos VI, Kontopoulos AG, Eugenidis NP. Long-term follow-up of patients with acute hypertriglyceridemia-induced pancreatitis. *J Clin Gastroenterol* 2002; 34: 472-475
 - 49 Whitten AE, Lorenz RP, Smith JM. Hyperlipidemia-associated pancreatitis in pregnancy managed with fenofibrate. *Obstet Gynecol* 2011; 117: 517-519
 - 50 Forget S, Senesse P, Burlet G, Lacroix N, Boulot P. [Total parenteral nutrition for recurrent episodes of acute pancreatitis during pregnancy. A case report and literature review]. *J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris)* 2007; 36: 817-820
 - 51 Loh JA, Rickels MR, Williams J, Iqbal N. Total parenteral nutrition in management of hyperlipidemic pancreatitis during pregnancy. *Endocr Pract* 2005; 11: 325-330
 - 52 Chen JH, Yeh JH, Lai HW, Liao CS. Therapeutic plasma exchange in patients with hyperlipidemic pancreatitis. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 2272-2274
 - 53 Dittrich E, Schmaldienst S, Langer M, Jansen M, Hörl WH, Derfler K. Immunoabsorption and plasma exchange in pregnancy. *Kidney Blood Press Res* 2002; 25: 232-239
 - 54 顾蔚蓉, 李笑天. 妊娠合并急性胰腺炎的临床特点及诊治. *实用妇产科杂志* 2007; 23: 466-468
 - 55 Syed H, Bilusic M, Rhondla C, Tavaría A. Plasma-pheresis in the treatment of hypertriglyceridemia-induced pancreatitis: A community hospital's experience. *J Clin Apher* 2010; 25: 229-234
 - 56 Saravanan P, Blumenthal S, Anderson C, Stein R, Berkelhammer C. Plasma exchange for dramatic gestational hyperlipidemic pancreatitis. *J Clin Gastroenterol* 1996; 22: 295-298
 - 57 Ronco C, Tetta C, Mariano F, Wratten ML, Bonello M, Bordoni V, Cardona X, Inguaggiato P, Pilotto L, d'Intini V, Bellomo R. Interpreting the mechanisms of continuous renal replacement therapy in sepsis: the peak concentration hypothesis. *Artif Organs* 2003; 27: 792-801
 - 58 Bellomo R. Continuous hemofiltration as blood purification in sepsis. *New Horiz* 1995; 3: 732-737
 - 59 Shen Q, Gan H, Du XG, Li ZR, Chen DJ. [Continuous veno-venous hemofiltration in treatment of severe acute pancreatitis]. *Zhonghua Neike Zazhi* 2003; 42: 483-485
 - 60 Yekebas EF, Eisenberger CF, Ohnesorge H, Saal-müller A, Elsner HA, Engelhardt M, Gillesen A, Meins J, The M, Strate T, Busch C, Knoefel WT, Bloechle C, Izbicki JR. Attenuation of sepsis-related immunoparalysis by continuous veno-venous hemofiltration in experimental porcine pancreatitis. *Crit Care Med* 2001; 29: 1423-1430
 - 61 Darvas K, Futó J, Okrös I, Gondos T, Csomós A, Kupcsulik P. [Principles of intensive care in severe acute pancreatitis in 2008]. *Orv Hetil* 2008; 149: 2211-2220

- 62 孙备, 徐东升, 姜洪池. 高脂血症性重症性胰腺炎综合治疗的探讨. *中华外科杂志* 2007; 45: 733
- 63 Tang Y, Zhang L, Fu P, Kang Y, Liu F. Hemoperfusion plus continuous veno-venous hemofiltration in a pregnant woman with severe acute pancreatitis: a case report. *Int Urol Nephrol* 2011 Mar 19. [Epub ahead of print]
- 64 He CS, Shi W, Ye ZM, Liang XL, Zhang B, Liu SX, Qin TH. [Efficacy and safety of coupled plasma filtration adsorption combined with continuous veno-venous hemofiltration for multiple organ dysfunction syndrome patients with acute liver failure]. *Zhongguo Weizhongbing Jijiu Yixue* 2007; 19: 47-49
- 65 Li HL, An WH, Zhao YY, Zhu X. [Blood purification therapy of gestational hyperlipidemic pancreatitis: a case report]. *Beijing Daxue Xuebao* 2009; 41: 599-601
- 66 Sakorafas GH, Tsiotos GG, Bower TC, Sarr MG. Ischemic necrotizing pancreatitis. Two case reports and review of the literature. *Int J Pancreatol* 1998; 24: 117-121
- 67 黄珍珍. 妊娠合并急性胰腺炎的诊治进展. *实用心脑血管肺血管病杂志* 2011; 19: 695-697
- 68 黄鹤光, 卢星榕, 赵文新. 晚期妊娠并发高脂血症性重症急性胰腺炎的诊治. *中华普通外科杂志* 2005; 20: 409
- 69 陈训如, 田伏洲, 黄大熔. 微创胆道外科手术学. 北京: 军事医学科学出版社, 2000: 339-343
- 70 Eddy JJ, Gideonsen MD, Song JY, Grobman WA, O'Halloran P. Pancreatitis in pregnancy. *Obstet Gynecol* 2008; 112: 1075-1081
- 71 Hsia SH, Connelly PW, Hegele RA. Successful outcome in severe pregnancy-associated hyperlipemia: a case report and literature review. *Am J Med Sci* 1995; 309: 213-218
- 72 王涛, 黄晓静. 孕妇分娩前后血脂变化及意义. *山东医药* 2005; 45: 49
- 73 Vandembroucke L, Seconda S, Lassel L, Le Bouar G, Poulain P. [Acute pancreatitis induced by major hypertriglyceridemia during pregnancy. A case report]. *J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris)* 2009; 38: 436-439

编辑 曹丽鸥 电编 闫晋利

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

• 消息 •

《世界华人消化杂志》修回稿须知

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

1 修回稿信件

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

2 稿件修改

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

3 版权

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

ERCP治疗左右肝管结石48例

梁运啸, 农兵, 梁列新, 卓文金, 王彩英, 潘咏, 覃惠庆

梁运啸, 农兵, 梁列新, 卓文金, 王彩英, 潘咏, 覃惠庆, 广西壮族自治区人民医院消化内科 广西壮族自治区南宁市 530021
作者贡献分布: 梁运啸与农兵对此文所作贡献均等; 本研究操作由梁运啸与农兵完成, 卓文金、王彩英、潘咏及覃惠庆配合; 本论文写作由梁运啸完成; 由梁列新指导及审阅。

通讯作者: 梁列新, 主任医师, 530021, 广西壮族自治区南宁市, 广西壮族自治区人民医院消化内科。mdlianglx@126.com
电话: 0771-2186184

收稿日期: 2011-09-20 修回日期: 2011-10-20

接受日期: 2011-11-04 在线出版日期: 2011-12-18

Treatment of left and/or right hepatic duct stones by endoscopic retrograde cholangiopancreatography: an analysis of 48 cases

Yun-Xiao Liang, Bing Nong, Lie-Xin Liang, Wen-Jin Zhuo, Cai-Ying Wang, Yong Pan, Hui-Qing Qin

Yun-Xiao Liang, Bing Nong, Lie-Xin Liang, Wen-Jin Zhuo, Cai-Ying Wang, Yong Pan, Hui-Qing Qin, Department of Gastroenterology, the People's Hospital of Guangxi Zhuang Autonomous Region, Nanning 530021, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China

Correspondence to: Lie-Xin Liang, Chief Physician, Department of Gastroenterology, the People's Hospital of Guangxi Zhuang Autonomous Region, Nanning 530021, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China. mdlianglx@126.com

Received: 2011-09-20 Revised: 2011-10-20

Accepted: 2011-11-04 Published online: 2011-12-18

Abstract

AIM: To evaluate the therapeutic value of endoscopic retrograde cholangiopancreatography (ERCP) in the management of left and/or right hepatic duct stones.

METHODS: The clinical data for 48 patients with left and/or right hepatic duct stones who underwent ERCP in People's Hospital of Guangxi were retrospectively analyzed. Stones were removed using basket or balloon techniques.

RESULTS: Stones were successfully removed in 42 patients, and the success rate was 87.5%. Among those recover patients, 19 cases were firstly and directly done by using basket in all 48 patients, and 11 cases were then done by guide wire basket in left 29 patients, and 6 cases of 18

patients were done by strong balloon in third step. Finally, 6 cases of 12 critical patients were done by sucking stone with balloon.

CONCLUSION: ERCP is effective in treating the left and/or right hepatic duct stones.

Key Words: Hepatic duct stones; Endoscopic retrograde cholangiopancreatography; Success rate

Liang YX, Nong B, Liang LX, Zhuo WJ, Wang CY, Pan Y, Qin HQ. Treatment of left and/or right hepatic duct stones by endoscopic retrograde cholangiopancreatography: an analysis of 48 cases. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(35): 3629-3631

摘要

目的: 探讨ERCP在左右肝管结石治疗中的应用价值。

方法: 连续收集左右肝管结石患者($n=48$), 根据病情特点, 在ERCP术中依次采用取石网篮直接取石法、带导丝取石网篮取石法、胆道取石球囊取石法、胆道取石球囊吸引法进行左右肝管取石术。

结果: 左右肝管结石48例的ERCP取石成功42例, 成功率为87.5%。其中取石网篮直接取石48例, 成功19例; 带导丝取石网篮取石29例, 成功11例; 胆道取石球囊取石18例, 成功6例; 胆道取石球囊负压吸引取石12例, 成功6例。

结论: ERCP术可以有效地治疗左右肝管结石。

关键词: 左右肝管结石; 内镜逆行胰胆管造影术; 成功率

梁运啸, 农兵, 梁列新, 卓文金, 王彩英, 潘咏, 覃惠庆. ERCP治疗左右肝管结石48例. *世界华人消化杂志* 2011; 19(35): 3629-3631

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/3629.asp>

0 引言

内镜逆行胰胆管造影术(endoscopic retrograde cholangiopancreatography, ERCP)具有治疗效果

■背景资料

内镜逆行胰胆管造影术(ERCP)目前已成为治疗胆总管结石的主要方法, 但位于左右肝管内结石的治疗目前还未有定论。本文对左右肝管结石的取石方法进行研究, 探讨左右肝管结石的内镜治疗方法。

■同行评议者

吴泰璜, 教授, 山东省立医院肝胆外科

■研发前沿

在内镜治疗中,左右肝管结石属于肝内胆管,左右肝管内结石的内镜治疗难度大,结石不易取出。目前有关左右肝管内结石内镜下取石的有效性仍不清楚。

■创新盘点

根据病情特点,依次采取取石网篮直接取石法、带导丝取石网篮取石法、胆道取石球囊取石法、胆道取石球囊吸引法进行左右肝管取石术。

好、创伤小、恢复快、费用低等优势,目前已成为治疗胆总管结石的主要方法。肝内胆管结石是指位于左右肝管汇合处以上部位的胆管结石^[1],治疗上以传统开腹手术为主。但位于左右肝管内结石的治疗目前还未有定论,此类结石的内镜治疗难度大,结石不易取出。目前有关左右肝管结石内镜下取石方法的报道很少,本文回顾性分析我院2005-03/2010-12 ERCP左右肝管结石取石的临床资料,探讨左右肝管结石的内镜治疗方法。

1 材料和方法

1.1 材料 连续收集2005/03-2010/12我院行ERCP治疗的胆管结石病例,所有病例术前均经腹部B超、CT和/或MRCP检查,具有ERCP的适应证、无ERCP的禁忌证,均征得患者和/或家属的书面知情同意。选用Olympus TJF240十二指肠镜和Olympus PSD-20型高频电发射器、Olympus三腔聪明刀、COOK乳头切开刀、碎石网篮及取石网篮、斑马导丝、胆道取石球囊、鼻胆引流管等器械。

1.2 方法

1.2.1 治疗: 术前按常规准备,取俯卧位,插入十二指肠镜,找到十二指肠乳头,以三腔聪明刀或乳头切开刀行选择性胆管插管及造影。胆总管结石是在内镜下乳头括约肌切开术(EST)或内镜下乳头括约肌气囊扩张术(EPBD)后,以取石网篮套取结石。但对于左右肝管结石,我们依次采取以下4种方法取石:(1)取石网篮直接取石,通过调节镜身、抬钳器,以普通取石网篮伸入左或右肝管套取结石,拉出;(2)带导丝取石网篮取石,先把斑马导丝置入左或右肝管越过结石,引导带导丝取石网篮套取结石,拉出;(3)胆道取石球囊取石,先把斑马导丝置入左或右肝管越过结石,引导胆道取石球囊越过结石,在结石上方充气后拉出结石或将结石拉至胆总管,再换普通取石网篮拉出结石;(4)胆道取石球囊负压吸引,把取石球囊正置于结石下方,适量充气,气囊直径略大于胆管直径,以适当速度拉下,结石可被负压吸引至胆总管(可以反复多次操作),再利用球囊或网篮取石。

1.2.2 术后处理: 术后常规予以抑酸、抗感染和静脉用生长抑素或生长抑素类似物1-3 d;术后2 h、24 h查血尿淀粉酶;根据患者腹痛及淀粉酶情况决定是否进食和进食时间,术后1 wk左右复查上腹部B超或CT。

1.2.3 取石成功标准: 取出结石后术中造影显示左右肝管和胆总管无结石负影;术后1 wk左右复查上腹部B超或CT检查结果阴性。

2 结果

收集到胆总管结石患者352例,其中左和/或右肝管有结石者48例,占13.6%;左右肝管结石者的年龄42-78岁,平均年龄67岁,其中男性26例,女性22例。

左右肝管结石患者48例,ERCP取石成功42例,总取石成功率为87.5%。其中取石网篮直接取石48例,成功19例;带导丝取石网篮取石29例,成功11例;胆道取石球囊取石18例,成功6例;胆道取石球囊负压吸引取石12例,成功6例。

3 讨论

在内镜操作中,左右肝管属于肝内胆管,关于肝内胆管结石的EST取石治疗存在较多争议^[2,3]。原发性肝内胆管结石,原则不是ERCP适应证^[4]。但是,对于不伴有其他肝内胆管结石的左右肝管结石的处理,目前尚无明确的处理建议和方法。临床实践中主要根据术者个人的技术和经验决定是否处理、或处理的方法。

我们在临床上发现,左右肝管结石的内镜下取石操作存在一定的困难,主要是左右肝管出现不同程度的狭窄或扭曲、或结石较大,导致取石器械难以插入和套取结石。目前,国内鲜有关于内镜下左右肝管取石的研究报道。

我们在ERCP中,针对左右肝管结石病例的不同特点,依次采用针对性的解决办法:(1)首先采取取石网篮直接取石法,如左右肝管与胆总管角度不大及胆管无扭曲,且结石略小于胆管直径,通过调节十二指肠镜身弯曲度、左右旋转镜身、使用抬钳器及适当的靠近或远离乳头,改变取石网篮的弯曲程度,进行左右肝管的选择性插管,操作中可以不断适当打开不同程度大小的网篮以调节方向,必要时尚可拔出取石网篮在体外进行塑形,当网篮越过结石后可以打开网篮套取结石。此法的取石成功率为39.6%;(2)网篮直接取石失败者,其原因主要是左右肝管和肝总管的角度过大,使得网篮无法选择性进入左右肝管;或者结石与胆管之间的缝隙过小,网篮无法通过。可采用带导丝取石网篮取石法,通过改变插管深度、切开刀弓的弯曲度、在不同胆总管位置进行球囊充气以调节导丝的方向等方法^[5],使导丝选择性进入左右肝管,再插入导丝引导取石网篮取石。注意更换前端不同弯曲角度的斑马导

丝有助于导丝的插入^[5]. 带导丝取石网篮取石法的取石成功率为37.9%; (3)导丝介导取石失败的主要原因是左右肝管扩张形态不规则或者过于扭曲, 使得取石网篮和结石处于不同平面, 增加了网篮操作的难度; 另外就是结石与胆管之间的缝隙太小, 取石网篮无法充分打开, 结石不能套入网篮. 此时, 可采用胆道取石球囊取石法, 引导导丝越过结石后, 引导取石球囊越过结石近端, 适当充气, 把结石直接拉出胆总管或结石进入胆总管后换普通取石网篮取石. 胆道取石球囊取石法的取石成功率为33.3%; (4)对于肝管过于扭曲, 球囊无法直接接触结石; 结石嵌顿在左或右肝管内, 导丝和气囊均不能越过结石者, 可使用胆道取石球囊负压吸引法, 首先把引导导丝超选进入含有结石的胆管, 将球囊置于结石下方, 适当充气使得球囊直径略大于胆管, 快速把球囊拉下, 结石可被负压吸引至胆总管, 负压吸引可以反复多次进行^[6], 胆道取石球囊负压吸引法的取石成功率为50%.

我们应用ERCP治疗左右肝管结石患者48例, 42例取石成功, 成功率为87.5%, 这和我科报道^[7]的一次胆总管取石成功率79.75%, 多次取石成功率91.14%数据基本一致, 可有效解决大部分肝内胆管一级分支结石患者的问题. 对于肝内胆管不规则狭窄与扩张, 或者结石嵌顿严重, 经以上4种方法取石失败者, 可判定为ERCP

无法治疗者, 应考虑外科手术治疗. 本组病例中有6例ERCP取石不成功属于此类情况, 其中2例患者是因为心肺功能障碍, 不能长时间耐受内镜治疗, 各种取石方法未能充分施展而终止了ERCP取石.

总之, 肝内胆管一级分支内的结石并不一定是ERCP治疗的禁忌证, 只要认真阅读患者的CT或MRCP片, 了解肝内胆管的病变, 根据病情特点, 采取适当的方法, ERCP可以有效地治疗左右肝管结石. 但是, 本研究病例数较少, 仍需今后扩大病例数验证其效果.

4 参考文献

- 1 焦大海, 王明亮, 郑民华. 肝内胆管结石的微创治疗. 外科理论与实践 2008; 13: 598-601
- 2 Tanaka M, Ikeda S, Ogawa Y, Yokohata K, Matsu-moto S, Chijiwa K. Divergent effects of endoscopic sphincterotomy on the long-term outcome of hepatolithiasis. *Gastrointest Endosc* 1996; 43: 33-37
- 3 Kayhan B, Akdoğan M, Parlak E, Ozarslan E, Sahin B. Hepatolithiasis: a Turkey experience. *Turk J Gastroenterol* 2007; 18: 28-32
- 4 中华医学会消化内镜分会ERCP学组. ERCP诊治指南(2010版). 中华消化内镜杂志 2010; 27: 113-118
- 5 唐采白, 胡兵, 郭召军. 导丝技术在ERCP操作中的应用技巧. 世界华人消化杂志 2006; 14: 1027-1029
- 6 施云星, 孙振兴, 王娜. 气囊导管在ERCP操作中应用技巧的探讨. 中华消化内镜杂志 2005; 22: 280
- 7 梁运啸, 农兵, 梁列新, 覃江. 老年患者行经十二指肠镜逆行胰胆管造影的临床应用价值. 微创医学 2009; 4: 619-621

编辑 李军亮 电编 闫晋利

■同行评价

该文评价ERCP术中左右肝管取石的效果发现结石并采取适当的方法, ERCP术可以有效地治疗左右肝管结石. 文章条理清晰, 分析得当, 研究有一定意义, 科学性及可读性较强.

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

• 消息 •

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

本刊讯 《中文核心期刊要目总览》(2008年版)采用了被索量、被摘量、被引量、他引量、被摘率、影响因子、获国家奖或被国内外重要检索工具收录、基金论文比、Web下载量等9个评价指标, 选作评价指标统计源的数据库及文摘刊物达80余种, 统计文献量达32 400余万篇次(2003-2005年), 涉及期刊12 400余种. 本版还加大了专家评审力度, 5 500多位学科专家参加了核心期刊评审工作. 经过定量评价和定性评审, 从我国正在出版的中文期刊中评选出1 980余种核心期刊, 分属七大编73个学科类目. 《世界华人消化杂志》入选本版核心期刊库(见R5内科学类核心期刊表, 第66页). (编辑部主任: 李军亮 2010-01-08)

非比麸治疗结直肠癌肠造口术后患者19例

陈诗伟, 张思奋, 罗湛滨, 梁嘉迪

■背景资料

肠造口患者失去大便控制能力, 造成大便次数增多、大便稀烂及造口周围皮肤刺激等, 极大影响患者的生活质量, 如何通过简单有效的方法改善这种状态是本研究的出发点。

陈诗伟, 张思奋, 罗湛滨, 广东省中医院肛肠科 广东省广州市 510120

梁嘉迪, 广州中医药大学第二临床医学院 广东省广州市 510405

作者贡献分布: 此研究主要由陈诗伟设计; 张思奋与罗湛滨进行临床指导及质量控制; 研究过程由陈诗伟、张思奋、罗湛滨及梁嘉迪操作完成; 数据分析由陈诗伟与梁嘉迪完成; 本论文写作由陈诗伟与梁嘉迪完成。

通讯作者: 陈诗伟, 主治医师, 510120, 广东省广州市, 广东省中医院住院部肛肠科, chenshiwei@21cn.com

电话: 020-81887233-33729

收稿日期: 2011-09-18 修回日期: 2011-10-18

接受日期: 2011-11-04 在线出版日期: 2011-12-18

Therapeutic effects of fiberform on defecation in patients after enterostomy for colorectal cancer: an analysis of 19 cases

Shi-Wei Chen, Si-Fen Zhang, Zhan-Bin Luo, Jia-Di Liang

Shi-Wei Chen, Si-Fen Zhang, Zhan-Bin Luo, Department of Colorectal Medicine, Guangdong Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510120, Guangdong Province, China

Jia-Di Liang, the Second Institute of Clinical Medicine, Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510405, Guangdong Province, China

Correspondence to: Shi-Wei Chen, Attending Physician, Department of Colorectal Medicine, Guangdong Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510120, Guangdong Province, China. chenshiwei@21cn.com
Received: 2011-09-18 Revised: 2011-10-18
Accepted: 2011-11-04 Published online: 2011-12-18

Abstract

AIM: To investigate the therapeutic effects of fiberform on defecation in patients after enterostomy for colorectal cancer.

METHODS: Nineteen patients who underwent enterostomy for colorectal cancer from January 2010 to July 2011 at our hospital were given continuous oral fiberform for 1 wk. Stool characteristics, peristomal skin appearance, and both doctor and patient satisfaction were quantitatively compared between before and after medication.

RESULTS: Fiberform could significantly improve stool frequencies and characteristics as well as peristomal skin irritations (1.09 ± 0.78 vs $2.03 \pm$

0.63 , 4.32 ± 0.49 vs 6.01 ± 0.66 , 0.44 ± 0.21 vs 1.57 ± 0.57 , all $P < 0.05$) and was not associated with significant adverse effect during medication.

CONCLUSION: Fiberform could improve defecation status in patients after enterostomy for colorectal cancer.

Key Words: Fiberform; Colorectal cancer; Colorectal stoma; Defecation

Chen SW, Zhang SF, Luo ZB, Liang JD. Therapeutic effects of fiberform on defecation in patients after enterostomy for colorectal cancer: an analysis of 19 cases. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(35): 3632-3635

摘要

目的: 观察非比麸颗粒对结直肠癌肠造口术后患者的疗效及其安全性。

方法: 选取2010-01/2011-07在我科住院的结直肠癌行肠造口术后患者19例, 连续口服非比麸颗粒治疗1 wk, 采用自身前后对照方法观察服药前后大便频率、大便性状、造口周围皮肤及医患双方满意度情况, 并进行量化评分比较。

结果: 非比麸颗粒能明显改善结直肠癌肠造口术后大便频率、大便性状及造口周围皮肤刺激[(1.09 ± 0.78)分 vs (2.03 ± 0.63)分, (4.32 ± 0.49)分 vs (6.01 ± 0.66)分, (0.44 ± 0.21)分 vs (1.57 ± 0.57)分, 均 $P < 0.05$], 服药期间未发现明显不良反应。

结论: 非比麸颗粒可以改善肠造口术后大便频率、大便性状及造口周围皮肤刺激, 安全有效, 满意度高。

关键词: 非比麸; 结直肠癌; 肠造口; 排便

陈诗伟, 张思奋, 罗湛滨, 梁嘉迪. 非比麸治疗结直肠癌肠造口术后患者19例. *世界华人消化杂志* 2011; 19(35): 3632-3635
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/3632.asp>

0 引言

肠造口术是结直肠癌外科根据病情和病变部位

■同行评议者

刘宝林, 教授, 中国医科大学附属盛京医院普通外科

常施行的手术之一^[1,2], 往往是挽救病情、延续生命的重要手段^[3-6]. 2005年的统计数据显示: 全世界每年约有100万新增结肠造口手术^[7]. Ferlay等^[8]报道, 欧洲2006年的新增肠造口手术为41.29万; 美国每年新增肠造口约10万例, 有肠造口患者75万例; 英国每年结肠造口亦有10万人之多, 每年有超过1.3万名肠癌患者等待永久造口手术^[9]; 万德森等^[10]估计, 我国每年新增加的永久性肠造口患者约10万人, 累计肠造口者达100万人, 今后还有增加的趋势. 造口的出现改变了患者原有正常的生理排便方式, 由于肠造口没有括约肌的功能, 患者对排便失去了控制能力, 造成大便次数增多、大便稀烂及造口周围皮肤刺激等, 严重的甚至可导致水、电解质、营养物质的丢失及内环境紊乱, 极大影响患者的生活质量^[11,12]. 膳食纤维(dietary fiber, DF)在结肠被细菌分解后产生短链脂肪酸(short chain fatty acids, SCFA), 可促进结肠黏膜生长和细胞增殖, 对肠胃道食物转运以及营养吸收均有作用, 并有防治腹泻和便秘的作用^[13]. 而非比麸是一种具有药用功效的小麦纤维素制剂, 为了观察其对改善肠造口术后大便情况的疗效及安全性, 我们对19例结直肠癌行肠造口术后患者进行了前瞻性自身对照研究, 现报道如下.

1 材料和方法

1.1 材料 选取2010-01/2011-07在我科住院的结直肠癌行肠造口术后患者($n = 19$)纳入研究, 男性($n = 12$), 女性($n = 7$), 年龄最小者35岁, 最大者73岁, 平均年龄(58.12 ± 10.34)岁. 研究采用前瞻性自身对照方法. 小麦纤维素颗粒, 瑞典Recip AB公司出品.

1.2 方法

1.2.1 纳入标准: 结直肠癌行肠造口手术患者.

1.2.2 排除标准: (1)服用其他止泻药物者; (2)合并有心血管、脑血管、肝肾、造血系统等严重原发性疾病者; (3)过敏体质及对多种药物过敏者; (4)无法合作者, 如精神病患者; (5)近期曾采用同类药物治疗, 致药物疗效难以判断者; (6)各种病原体感染引起的腹泻者.

1.2.3 服药方案: 入选患者均服用非比麸, 3.5 g(1包)/次, 2次/d(每日清晨应服用1次), 与各种食物或饮料混合搅拌均匀后服用, 连续服用1 wk. 患者治疗前后饮食结构及饮食摄入量应保持一致.

1.2.4 观察及评价指标: 观察记录治疗前后大便、造口周围皮肤及医患双方满意度情况, 比

较治疗前后积分(表1). 医患双方满意度根据主观感受进行评价, 分为4个等级: 非常满意、比较满意、不太满意、不满意.

1.2.5 疗效判定标准: 服药1 wk未进行疗效评估, 计算积分减少率. 积分减少率计算方法为: (治疗前积分-治疗后积分)/治疗前积分 $\times 100\%$. 其中显效: 积分减少 $\geq 60\%$, 有效: $25\% \leq$ 积分减少 $< 60\%$, 无效: 积分减少 $< 25\%$.

1.2.6 安全性判定: 观察服药期间有无出现排便以外的其他症状如: 腹痛、腹胀、腹泻、恶心、呕吐、皮疹等情况, 并对上述症状进行描述分析, 得出以下结论: A: 肯定有关; B: 很可能有关; C: 可能有关; D: 可能无关; E: 肯定无关. 其中A、B、C被认为是非比麸的不良反应, 并填写不良反应表.

统计学处理 采用SPSS14.0软件对数据进行处理, 计量资料以 $\text{mean} \pm \text{SD}$ 表示, 治疗前后比较采用 t 检验; 计数资料以率(%)表示, 采用 χ^2 检验. $P < 0.05$ 为差异有统计学意义.

2 结果

2.1 治疗前后患者排便情况评分比较 口服非比麸颗粒后大便频率、粪便性状、造口皮肤周围刺激与服药前比较均有好转, 排便感觉比较没有显著差异. 服药后各项症状评分见表2.

2.2 医生及患者满意度评价情况 医生评价结果表明, 非常满意和比较满意率为68.4%, 不满意为5.3%. 患者评价结果表明, 非常满意和比较满意率为78.9%, 不满意为10.5%(表3).

2.3 治疗后积分减少率评价 口服非比麸, 显效患者($n = 7$, 36.8%), 有效患者($n = 10$, 52.6%), 总有效率为89.4%.

2.4 安全性分析 对19例患者进行了随访, 全部患者在服药期间无不良反应发生.

3 讨论

自从Miles开创直肠癌经腹会阴联合切除术以来, 肠造口术就成为外科治病救人的一个重要手术方式. 但肠造口术后由于排便不规律, 排便时无感觉, 排便次数多、便质稀烂且无法控制, 严重影响了患者的生存质量. 肠造口术后排便是否规律性与患者的躯体功能、心理功能及对生活质量的总体评价均呈正相关^[14-16]. 一项永久性肠造口排便现状调查^[17]结果显示: 60%以上患者排便无规律, 每日排便次数在4次以上. 有研究显示^[18], 大多数患者希望得到造口相关知识的

■ 研发前沿

目前对肠造口的关注主要在于术后如何进行护理, 如何通过调节肠道功能改善大便性状或改善造口控制能力方面尚未见有更多报道, 本研究旨在为肠造口患者提供一种有效的方法.

■ 相关报道

目前对膳食纤维改善腹泻的相关研究主要集中在胃肠内营养方面, 通过增加膳食纤维达到调节肠道运动、改善营养吸收及保持肠道菌群平衡的作用.

■创新盘点

小麦纤维素主要是针对便秘患者而开发的,既往文献报道主要集中在改善便秘上面,本研究发现其有双向调节作用,不仅可以加快肠的过慢转运,同时也能减慢肠的过快转运,通过吸附水分令稀烂的大便软化成形,为临床应用开辟一条新的途径。

表 1 评分标准

评分	大便频率(次/d)	粪便性状 ¹	排便感觉	造口周围皮肤刺激
0分	1-3		时常有	无
1分	4-6	B: 1	清醒时常有,睡眠时无	轻度(发红)
2分	7-9	B: 2	清醒时偶尔有	中度(破损)
3分	>10	B: 3	无	重度(褥疮)
4分		B: 4		
5分		B: 5		
6分		B: 6		
7分		B: 7		

¹粪便性状按照Bristol大便性状图谱分型: 1型大便为坚果状硬球; 2型为成块但呈腊肠状; 3型为腊肠状表面有裂缝; 4型为表面光滑柔软似腊肠; 5型为软团状; 6型为糊状便; 7型为水样便。

表 2 服药前后各项症状平均分值得比较 (mean ± SD)

症状	服药前	服药后
大便频率	2.03 ± 0.63	1.09 ± 0.78 ^a
粪便性状	6.01 ± 0.66	4.32 ± 0.49 ^a
排便感觉	2.10 ± 0.71	1.53 ± 0.88
造口周围皮肤刺激	1.57 ± 0.57	0.44 ± 0.21 ^a

^a $P < 0.05$ vs 服药前。

指导。以往对于肠造口患者通常采用在术后早期开始指导患者进行规律排便训练,通过造口灌洗的方法重建定时排便习惯,帮助患者早期养成规律排便^[9]。但是由于多数患者在住院期间接受治疗和护理的时间比较短暂,加上结肠灌洗需要一定的专业技巧,出院后又很少能够系统的获取相关知识,无法得到过专业人员的指导,从而导致效果并不理想。而使用止泻药减少大便次数,往往难以控制治疗效果,甚至有导致肠梗阻发生的可能。

膳食纤维是指不易被人体消化吸收的,以多糖类为主的大分子物质的总称,是由纤维、果胶类物质、半纤维素、糖蛋白等物质组成的聚合物。膳食纤维已被证实对小肠形态、肠胃道食物转运以及营养吸收均有作用。我们通过既往对非比麸(小麦纤维素颗粒)的临床研究资料进行总结发现,补充食物中的纤维素能够明显改善大便情况,服用非比麸可以明显减少造口大便频率,改善大便性状,从而减轻对造口周围皮肤的刺激。

早期研究^[20]发现,麦麸不仅可以加快肠的过慢转运,同时也能减慢肠的过快转运,其中起作用的是麦麸中的小麦纤维素,它是一种不能被消化的纤维素,其作用体现在: (1)因其结构中富

表 3 患者与医生评价结果 $n(\%)$

	患者评价结果	医生评价结果
非常满意	7(36.8)	6(31.6)
比较满意	8(42.1)	7(36.8)
不太满意	2(10.5)	5(26.3)
不满意	2(10.5)	1(5.3)

含亲水基团,具有很强的水结合能力,可大量吸附水分,故能令稀烂的大便软化成形; (2)膳食纤维可延长胃排空,减慢肠道蠕动时间,故有抗腹泻作用,可防止液体饮食者排水样便^[13]; (3)结直肠手术患者术前都常规接受口服抗生素和肠道清洁,术后也需使用广谱抗生素,破坏了肠道菌群和正常微生态环境,也可能是造成腹泻的因素。膳食纤维在肠道发酵并产生短链脂肪酸,从而修复受损结肠黏膜,还可作为肠内益生菌的发酵底物,促进益生菌的生长,有效改善肠道菌群分布,抑制致病菌的生长,减少了肠道感染及溃疡的发生。另外,短链脂肪酸还可促进水、钠吸收,减少结肠腔内的液体,从而减少腹泻发生; (4)小麦纤维素经提炼后,几乎完全除去了存在于传统纤维素内的植物酸和可能引起过敏的游离蛋白,从而避免了微量元素吸收障碍及一些不良反应的发生,保证了其安全性。

我们的研究资料表明,经过非比麸治疗后,患者大便频率、性状及造口周围皮肤情况得到改善,医患双方满意度高,没有出现不良反应。表明非比麸不仅有效,而且安全无副作用,可以长期服用。

总之,非比麸是符合生理需求的膳食纤维制剂,对于肠造口术后患者,可以通过双向调节作用使大便情况明显好转,而且安全无不良反应。

■应用要点

本研究为肠造口患者提供一种简单易行有效的改善造口并发症的方法,结合完善的造口护理,可有效提高造口患者的生活质量。

但由于未设平行对照, 且样本量较小, 随访时间较短, 有可能影响临床疗效评价, 因此, 其长期疗效还有待进一步观察。

4 参考文献

- 1 Karanjia ND, Corder AP, Holdsworth PJ, Heald RJ. Risk of peritonitis and fatal septicaemia and the need to defunction the low anastomosis. *Br J Surg* 1991; 78: 196-198
- 2 Machado M, Hallböök O, Goldman S, Nyström PO, Järhult J, Sjödaahl R. Defunctioning stoma in low anterior resection with colonic pouch for rectal cancer: a comparison between two hospitals with a different policy. *Dis Colon Rectum* 2002; 45: 940-945
- 3 张胜本, 童卫东. 重视肠造口的康复治疗. *中华胃肠外科杂志* 2003; 6: 146-147
- 4 Grabham JA, Moran BJ, Lane RH. Defunctioning colostomy for low anterior resection: a selective approach. *Br J Surg* 1995; 82: 1331-1332
- 5 Goligher JC, Graham NG, De Dombal FT. Anastomotic dehiscence after anterior resection of rectum and sigmoid. *Br J Surg* 1970; 57: 109-118
- 6 Marusch F, Koch A, Schmidt U, Geibetaler S, Dralle H, Saeger HD, Wolff S, Nestler G, Pross M, Gastinger I, Lippert H. Value of a protective stoma in low anterior resections for rectal cancer. *Dis Colon Rectum* 2002; 45: 1164-1171
- 7 丁炎明. 造口管理. *中国护理管理* 2009; 9: 79-80
- 8 Ferlay J, Autier P, Boniol M, Heanue M, Colombet M, Boyle P. Estimates of the cancer incidence and mortality in Europe in 2006. *Ann Oncol* 2007; 18: 581-592
- 9 Baxter A, Salter M. Stoma care nursing. *Nurs Stand* 2000; 14: 59
- 10 万德森. 肠造口的并发症及其处理. *实用肿瘤杂志* 1998; 13: 195-196
- 11 童志琴. 心理干预在直肠癌Miles手术前后应用的效果分析. *护理与康复* 2006; 5: 219-220
- 12 高有福, 沈浩. 直肠癌术后生活质量研究现状和进展. *中国肛肠病杂志* 2001; 21: 40-42
- 13 王强, 赵滢. 胃癌术后含膳食纤维的早期肠内营养与消化道并发症的关系. *山东医药* 2008; 48: 63-64
- 14 周玉洁, 路潜, 庞冬, 杨萍. 直肠癌结肠造口患者生活质量调查分析. *护理学杂志* 2003; 18: 488-490
- 15 路潜, 郭蕾蕾, 王静. 直肠癌结肠造口患者生活质量的研究. *中华护理杂志* 2002; 37: 648-651
- 16 陈增蓉, 李卡, 印义琼, 王艳红. 120例直肠癌结肠造口患者生存质量的分析. *四川大学学报(医学版)* 2005; 36: 445-446
- 17 袁红涛, 寇京莉, 韩斌如. 永久性结肠造口患者规律排便现状调查分析. *中华护理杂志* 2007; 42: 315-316
- 18 路潜, 周玉洁. 结肠造口患者造口知识掌握情况和需求状况的研究. *中华护理杂志* 2003; 38: 251
- 19 黄木兰, 陈冰清, 陈洁红, 吴洁兰, 孙木吟, 卢芳, 程一霓. 结肠灌洗对造口病人生活质量的影响. *护理研究* 2006; 20: 326-327
- 20 Payler DK, Pomare EW, Heaton KW, Harvey RF. The effect of wheat bran on intestinal transit. *Gut* 1975; 16: 209-213

■同行评价

该课题密切联系临床实际, 有一定临床可推广价值, 同时所提供的方法简单易行, 安全性高。

编辑 李军亮 电编 闫晋利

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

• 消息 •

《世界华人消化杂志》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。